



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Mecânica

JÉSSICA ASAMI

**Membrana a Base de Látex/Poli(Álcool
Vinílico) e Extrato de *Calêndula officinalis*
para Doenças Dérmicas Raras**

CAMPINAS
2024

JÉSSICA ASAMI

Membrana a Base de Látex/Poli(Álcool Vinílico) e Extrato de *Ccalêndula officinalis* para Doenças Dérmicas Raras

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Mecânica, na Área de Materiais e Processos de Fabricação.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO(A) ALUNO(A) JÉSSICA ASAMI, E ORIENTADA PELO(A) PROF(A). DR(A) ELIANA APARECIDA DE REZENDE DUEK

**CAMPINAS
2024**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Elizangela Aparecida dos Santos Souza - CRB 8/8098

Asami, Jéssica, 1993-
As72m Membrana a base de látex/Poli(álcool vinílico) e extrato de Calêndula officinalis para doenças dérmicas raras / Jéssica Asami. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Biomateriais. 2. Borracha natural. 3. Acetato polivinila. 4. Pele - Doença.
5. Cicatrização de ferida. 6. Calêndula officinalis. I. Duek, Eliana Aparecida de
Rezende, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
Faculdade de Engenharia Mecânica. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Latex/Polyvinyl Alcohol (PVA) membrane with Calêndula officinalis extract for rare dermal diseases

Palavras-chave em inglês:

Biomaterials
Natural rubber
Polyvinyl alcohol
Skin diseases
Wound healing
Calendula officinalis

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Doutora em Engenharia Mecânica

Banca examinadora:

Eliana Aparecida de Rezende Duek [Orientador]
Sonia Maria Malmonge
Marco Vinicius Chaud
Lais Pellizzer Gabriel
Marcos Akira D Avila

Data de defesa: 02-07-2024

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Mecânica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)
- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-6171-9305>
- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1956436970361884>

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA**

TESE DE DOUTORADO ACADÊMICO

**Membrana a Base de Látex/Poli(Álcool
Vinílico) e Extrato de *Calêndula officinalis*
para Doenças Dérmicas Raras**

Autor: Jéssica Asami

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Eliana Aparecida de Rezende Duek

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Tese:

**Prof^ª. Dr^ª. Eliana Aparecida de Rezende Duek, Presidente
Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP**

**Prof^ª. Dr^ª. Sonia Maria Malmonge
Universidade Federal do ABC- UFABC**

**Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud
Universidade de Sorocaba-UNISO**

**Prof^ª. Dr^ª. Laís Pellizzer Gabriel
Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP**

**Prof. Dr. Marcos Akira D'Avila
Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP**

A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Campinas, 02 de julho de 2024.

Dedicatória

Dedico este trabalho à Setsuko Asami (*in memoriam*) que foi uma avó e mulher incrível o qual eu me orgulho e que me inspira a ser uma pessoa melhor a cada dia da minha vida.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus por todas as bênçãos e proteções recebidas durante toda a minha trajetória nesta incrível etapa profissional.

Agradeço aos meus pais, Margarete, Lincoln e Silvio, e ao meu avô Yoshio por todo o suporte que me deram durante esses 4 anos, sendo o meu alicerce para chegar até o final. Muito obrigada. Vocês foram e são essenciais na minha vida, amo muito vocês.

Agradeço ao meu marido Diogo, que acompanhou de perto toda a minha evolução nesta jornada e foi a pessoa que mais me motivou a continuar e mostrar que eu era capaz de alcançar o sucesso. Muito obrigada por acreditar em mim e no meu potencial meu amor! Sem você eu não chegaria aonde cheguei. Te amo demais.

Agradeço à minha sogra Ana Maria, às minhas irmãs Carol e Isabella, aos meus cunhados Patrick, Laura, Rafael e Bruno, aos meus sobrinhos lindos Eduardo, Beatriz, Gabriel, Isabela, Melissa, Caio e Pedro, aos meus tios Mieko e Fábio, aos meus tios do coração Silvia e Olivaldo. Vocês fizeram total diferença na minha vida, me proporcionando momentos de felicidade e de aconchego nos momentos difíceis. Muito obrigada.

Agradeço aos meus grandes incentivadores na vida profissional, Eliana, Daniel e Moema. Vocês são um espelho para minha vida. Admiro os profissionais que são e devo muito a vocês. O meu muito obrigada, pela confiança, pelos ensinamentos, mas principalmente por me mostrarem o caminho do sucesso sempre com muita sabedoria e acima de tudo, com muita humildade.

Agradeço aos meus amigos do laboratório de Biomateriais, Rodrigo, Bruna, Bianca, Pamela, Ariana, Flávia, Juliana, Cecilia, Gabriella, Filipe, Dario, Fernanda e Kaique. Muito obrigada por todo apoio e momentos de cafés, os meus dias foram muito mais leves e produtivos por cada momento de risadas e de conversas. Vocês formam a família Labiomat e que eu carregarei comigo para sempre.

Agradeço a todos os meus amigos da vida, amigos de Sorocaba, Campinas, Curitiba e São Paulo que sempre me incentivaram e sempre demonstraram o entusiasmo pelo meu trabalho e pelo meu projeto, isso me moveu e me deu forças para continuar e acreditar no sucesso. Muito obrigada de coração!

Agradeço ao professor Arnaldo e à aluna de doutorado Luciana da UFABC, os quais fizeram parte desse projeto e que me deram todo o suporte necessário. Muito

obrigada pela parceria e pelo aprendizado. Agradeço às técnicas de microbiologia da PUC-SP Amantina Aparecida Costa e Ângela Maria Corrocci por todo o suporte nos experimentos executados. Muito obrigada de coração!

Por fim, agradeço as universidades envolvidas no projeto (PUC, UFSCar, UNISO UFABC, UNESP, UNICAMP e UFU) e ao CINTESP.br que contribuiu inteiramente com o trabalho.

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu estado original”

Albert Einstein

Resumo

Segundo dados do ministério da saúde estima-se que existam milhares de tipos diferentes de doenças raras em todo o mundo. Alguns tipos são de pele e provocam ferimentos de grande proporção no tecido dérmico, necessitando de um acompanhamento e tratamento médico. Atualmente existem curativos dérmicos comerciais, como Biobrane™, Alloderm® e Integra® que são a base de nylon/colágeno tipo I/silicone, colágeno/elastina e colágeno/glicosaminoglicanos, respectivamente. Esses produtos auxiliam no processo regenerativo, contudo, esses curativos apresentam um custo elevado. Buscar alternativas que sejam de baixo custo e com um maior desempenho no tratamento, se torna cada vez mais relevante. Logo, o Látex, e o poli(álcool vinílico) (PVA), que por sua vez, possuem propriedades químicas relevantes e característica de biocompatibilidade, se mostrando alternativas para tratamento de lesões teciduais. Em associação aos dois materiais, o extrato de *Calêndula officinalis* (CO) é um extrato natural que possui propriedades que auxiliam no processo de cura desses ferimentos dérmicos. Desta maneira, objetivo do trabalho foi desenvolver uma membrana a base de látex e PVA associada ao extrato de CO para as doenças dérmicas raras. O projeto foi desenvolvido em três etapas. Na etapa 1 foi realizada o estudo da desproteinização do látex utilizando o processo de centrifugação e purificação; na etapa 2 foi elaborado um estudo da blenda de látex/PVA, nas composições 50/50, 75/25, 80/20, 90/10, respectivamente. Foram realizadas as caracterizações por espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier (FTIR), termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), ensaio de intumescimento, potencial zeta, ângulo de contato, microscopia eletrônica de varredura (MEV), ensaio mecânico e ensaios in vitro de viabilidade celular. Os resultados obtidos na etapa 1 mostraram que o látex não centrifugado e não purificado (LNCP) resultou numa estabilidade térmica, maior taxa de intumescimento e uma maior viabilidade celular. Na etapa 2, o látex/PVA na composição de 80/20 se mostraram com maior taxa de intumescimento, com poros e rugosidade na superfície e mais resistente termicamente e mecanicamente, sendo promissor para a aplicação em questão. Além disso, todas as composições de látex/PVA não apresentaram citotoxicidade. Na etapa 3, as análises de FTIR, TG e DSC mostraram que o extrato de CO nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL foram incorporados na membrana de látex/PVA na composição 80/20. O ensaio de liberação mostrou uma maior liberação de extrato de 100 mg/mL seguidos das demais concentrações, nas primeiras horas e um platô nos dias seguintes. Ensaio microbiológico mostraram inibição do extrato com *S. aureus*. Os resultados sugerem que o extrato de CO incorporado à membrana de Látex/PVA se mostram promissores para as doenças dérmicas raras.

Palavras Chave: Biomaterial, borracha natural, PVA, doença dérmica, cicatrização de pele.

Abstract

According to data from the Ministry of Health, it is estimated that there are thousands of different types of rare diseases worldwide. Some types affect the skin and cause extensive injuries to the dermal tissue, requiring medical monitoring and treatment. Currently, there are commercial dermal dressings, such as BiobraneTM, Alloderm[®], and Integra[®], which are based on nylon/collagen type I/silicone, collagen/elastin, and collagen/glycosaminoglycans, respectively. These products assist in the regenerative process; however, they come with a high cost. Seeking alternatives that are low-cost and have better performance in treatment is becoming increasingly relevant. Thus, biomaterials are an alternative for tissue injury treatments, such as latex and poly(vinyl alcohol) (PVA), which possess relevant chemical properties and biocompatibility characteristics. In association with these materials, *Calendula officinalis* (CO) is a natural extract that possesses properties aiding in the healing process of these dermal wounds. Thus, the objective of this study was to develop a membrane based on latex and PVA associated with CO extract for rare dermal diseases. The project was developed in three stages. In stage 1, the study of latex deproteinization was carried out using centrifugation and purification processes; in stage 2, a study of the latex/PVA blend was elaborated, with compositions of 50/50, 75/25, 80/20, 90/10, respectively. Characterizations were performed by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetry (TG), differential scanning calorimetry (DSC), swelling assay, zeta potential, contact angle, scanning electron microscopy (SEM), mechanical testing, and in vitro cell viability assays. The results obtained in stage 1 showed that non-centrifuged and non-purified latex (NCNP) resulted in thermal stability, higher swelling rate, and increased cell viability. In stage 2, the latex/PVA composition of 80/20 showed a higher swelling rate, with pores and roughness on the surface, and was more thermally and mechanically resistant, being promising for the application in question. Additionally, all latex/PVA compositions showed no cytotoxicity. In stage 3, the FTIR, TG, and DSC analyses showed that the CO extract at concentrations of 25, 50, and 100 mg/mL was incorporated into the latex/PVA membrane with an 80/20 composition. The release assay demonstrated a higher release of the 100 mg/mL extract, followed by the other concentrations, during the initial hours, reaching a plateau in the subsequent days. Microbiological assays indicated a slight inhibition of the extract against *S. aureus*. These results suggest that the CO extract incorporated into the latex/PVA membrane may be promising for rare dermal diseases.

Key Word: Biomaterial, natural rubber, PVA, skin diseases, skin healing.

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema ilustrativo das estruturas do tecido dérmico, composto pela epiderme, derme e hipoderme. Adaptado de FITZGERALD (2018).....	30
Figura 2. Esquema das fases de cicatrização aguda das feridas dérmicas. Adaptado de SANCHEZ et al. (2021).	31
Figura 3. Imagem ilustrativa da árvore <i>Hevea brasiliensis</i> (A) e do sistema coloidal da extração do látex diretamente da árvore (B). Fonte: Imagem pública.	33
Figura 4. Estrutura química da borracha natural do látex a partir da extração da árvore <i>Hevea brasiliensis</i> . Adaptado de GUERRA et al. (2021).....	33
Figura 5. Imagem ilustrativa do látex fresco, mostrando as diferentes fases que se formam após o processo de centrifugação. Adaptado de PARRELLA e GASPARI (2002).	34
Figura 6. Imagem esquemática da atuação da fração do Soro B e C onde A) os processos de desproteinização do látex para a retirada de produtos alergênicos; B) atividade anticancerígeno a partir da fração B e C do látex; C) atividade antimicrobiana da fração B e C do látex e D) capacidade regenerativa (angiogêneses) da fração sérica B do látex. Adaptado de HERCULANO et al. (2024).	35
Figura 7. Estrutura química do PVA (SALMAN et al. 2018).....	37
Figura 8. Imagem ilustrativa da flor de <i>Calêndula officinalis</i> (comumente conhecida como margarida). Fonte: Imagem Pública	39
Figura 9. Estrutura química básica do flavonoide. Fonte: KUMAR e PANDEY, 2013.....	40
Figura 1. Imagens da solução de látex após o processo de centrifugação. Fase A: Micelas de borracha (borracha natural), Fase B: Soro contendo proteínas e fosfolipídios e Fase C: Fração inferior.	48
Figura 2. Espectroscopia do FTIR de látex não centrifugado e purificado (LNCP), borracha natural (BN) e látex purificado 6 vezes (LP6).....	52
Figura 3. Curvas de TG e DTG de amostras de látex não centrifugado e purificado (LNCP), borracha natural (BN) e látex purificado 6 vezes (LP6).....	53
Figura 4. Curvas de DSC de amostras de látex não centrifugado e purificado (LNCP), borracha natural (BN) e látex purificado 6 vezes (LP6).....	54
Figura 5. Gráfico da taxa de intumescimento (%) vs tempo (horas) das amostras de látex não centrifugado e não purificado (LNCP), borracha natural (BN), e látex purificado 6 vezes (LP6).	56

Figura 6. Gráfico do potencial Zeta em função do pH das amostras de látex não centrifugado e não purificado (LNCP), borracha natural (BN) e látex purificado 6 vezes (LP6).....	57
Figura 7. Valores do ângulo de contato (em graus) para amostras de látex não centrifugado e não purificado (LNCP), borracha natural (BN) e látex purificado 6 vezes (LP6).....	59
Figura 8. Imagens de MEV de amostras de látex. A: látex não centrifugado e não purificado (LNCP); B: Borracha natural (BN) e C: Látex purificado 6 vezes (LP6). Ampliação de 500 x. Barra de escala: 100µm.	60
Figura 9. Análise morfológica da citotoxicidade direta e de extrato. Nos diferentes grupos experimentais as células vero foram observadas após 24 h de incubação em duas condições: na primeira coluna, citotoxicidade por contato direto (analisada por contraste de fase) na segunda coluna citotoxicidade por extrato (contraste de fase) e na terceira coluna, citotoxicidade por extrato (analisado por CV). As abreviaturas correspondem ao controle negativo: CT-, controle positivo: CT+, BN: Borracha Natural, LNCP: Látex Não Centrifugado e Purificado e LP6: Látex Purificado 6 vezes. O (*) indica o material em contato direto. Barra de escala: 50 µm.	63
Figura 10. Viabilidade celular pelo cultivo das células vero, por extrato das diferentes amostras estudadas. A linha tracejada indica o limiar de citotoxicidade. Controle negativo CT-, controle positivo CT+, látex não centrifugado e purificado (LNCP), borracha natural (BN) e látex purificado 6 vezes (LP6).....	64
Figura 1. Imagem macroscópica das membranas de Látex/PVA nas seguintes composições, respectivamente: A) 90/10, B) 80/20, C) 75/25 e D) 50/50.	76
Figura 2. Análise de FTIR do látex puro, PVA puro e nas respectivas composições de látex/PVA, 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10, respectivamente.	77
Figura 3. Curvas de (A) TG e (B) DTG da membrana de látex puro, PVA puro e látex/PVA nas composições de 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10, respectivamente.	79
Figura 4. Curvas de DSC das amostras de (A) látex puro, (B) PVA puro, (C-F) das membranas de látex/PVA nas composições de 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10, respectivamente.....	82
Figura 5. Gráfico do ensaio de intumescimento da membrana de Látex/PVA nas composições de 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10, respectivamente.	84
Figura 6. Gráfico dos valores médios de tensão-deformação da amostra de látex/PVA nas composições 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10.	85
Figura 7. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das membranas de Látex/PVA onde A: látex puro; B: PVA puro, C: 50/50; D: 75/25; E: 80/20 e F: 90/10.....	88
Figura 8. Gráfico de potencial zeta da membrana de látex puro, PVA puro e de látex/PVA nas respectivas composições de 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10, respectivamente.....	90

Figura 9. Citotoxicidade direta das diferentes amostras cultivadas com células Vero após 24 horas. Análise do contraste de fase e citoquímica dos materiais, utilizando as colorações: Cristal Violeta (CV); Xylidine Ponceau (XP) e Azul de Toluidina (AT). Os asteriscos (*) representam a identificação do material; a sigla CT- corresponde à citotoxicidade negativa e CT+ à citotoxicidade positiva. São indicadas as variações de concentração do látex e do PVA na margem esquerda da figura. Barra de escala = 50 µm.....	92
Figura 10. Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das diferentes amostras de cultura de células Vero após 24 horas. As letras alfabéticas representam: A e B látex puro; C e D PVA puro. Os asteriscos (*) denotam a identificação dos materiais. Barra de escala = 200 µm e 50 µm.....	94
Figura 11. Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de diferentes amostras de culturas de células Vero após 24 horas. As letras alfabéticas representam: A e B 50/50; C e D 75/25; E e F 80/20; G e H 90/10. Asteriscos (*) denotam a identificação do material. Barra de escala = 100 µm e 50 µm.....	96
Figura 1. Mapa das palavras-chave relacionado ao extrato de CO. Fonte: imagem retirada do programa VOSviewer.....	100
Figura 2. Imagem macroscópica das membranas de Látex/PVA nas concentrações de 25 mg/mL (25CO). 50 mg/mL (50CO) e 100 mg/mL (100CO).	106
Figura 3. Espectro de FTIR das amostras da membrana de Látex/PVA, extrato de CO puro e membranas de Látex/PVA com extrato de CO nas concentrações de 25 mg/mL (25CO), 50 mg/mL (50CO) e 100 mg/mL (100CO).	107
Figura 4. Curvas de (A) TG e (B) DTG da membrana de Látex/PVA, extrato de CO puro e membrana de Látex/PVA com extrato de CO nas concentrações de 25CO, 50CO e 100CO.	108
Figura 5. Curvas de DSC das amostras de Látex/PVA, extrato de CO (CO), membranas de Látex/PVA com extrato de CO nas concentrações de 25mg/mL (25CO), 50 mg/mL(50CO) e 100 mg/mL (100CO).	110
Figura 6. Formação de biofilme de <i>S. aureus</i> a partir da coloração por Cristal Violeta. A) imagem macroscópica da membrana de látex/PVA (CT+) e membranas com extrato de CO nas concentrações de 25 mg/mL (25CO), 50 mg/mL (50CO) e 100 mg/mL (100CO) coradas com Cristal Violeta. B) Gráfico da quantidade de <i>S. aureus</i> nas diferentes amostras. O símbolo (*) indica significância estatística (p<0.05).	112
Figura 7. Difusão do extrato de CO incorporado à membrana de Látex/PVA nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL, após 24h em cultura de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> . A Doxiciclina foi utilizada	

como controle de antibiótico comercial e a membrana de Látex/PVA isento de CO foi utilizado como Controle Positivo.	113
Figura 8. Gráfico da liberação controlada do extrato de CO na membrana de Látex/PVA nas concentrações de 25 mg/mL (25CO), 50 mg/mL (50CO) e 100 mg/mL (100CO).	114
Figura 9. Modelo matemático de Korsmeyer-Peppas aplicado ao perfil de liberação do extrato de CO nas concentrações de 25Co, 50Co e 100CO.	117
Figura 10. Viabilidade celular das membranas de Látex/PVA com extrato de CO nas concentrações de 25mg/mL (25CO), 50 mg/mL (50CO) e 100 mg/mL(100CO). O controle negativo (CT-) refere-se as células semeadas direto na placa; controle positivo (CT+) a membrana de Látex/PVA isenta de CO e o controle morte (CT Morte) o qual as células foram submetidas a morte. O símbolo (***) indica significância estatística ($p < 0,001$) comparando os grupos no período de 24h e 72h.....	118

Lista de Tabelas

Tabela 1. Preços médios dos curativos dérmicos comerciais que são utilizados no tratamento de feridas.	25
Tabela 2. Doenças dérmicas raras descritas com maior frequência na literatura.	28
Tabela 1. Volume utilizado para o desenvolvimento de cada membrana com diferentes porcentagens de látex/PVA, respectivamente.	71
Tabela 2. Propriedades térmicas determinadas por TG e DTG em amostras de látex puro, PVA puro, látex/PVA nas composições de 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10, respectivamente.	80
Tabela 3. Valores médios e respectivos desvios padrão do Módulo de Young, tensão máxima e tensão de ruptura para a blenda látex/PVA nas composições de 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10.	87
Tabela 1. Fórmulas matemáticas de perfil de liberação dos modelos de Korsmeyer-Peppas, Higuchi, Primeira Ordem e Ordem Zero.	104
Tabela 2. Valores obtidos a partir da curva de DSC das amostras de Látex/PVA, extrato de CO e membrana de Látex/PVA nas concentrações de 25CO, 50CO e 100CO.	111
Tabela 3. Valores de modelos matemáticos de Korsmeyer-Peppas, Higuchi, Ordem Zero e Primeira Ordem aplicados aos perfis de liberação do extrato de CO.	116

Lista de Abreviaturas e Siglas

BN	Borracha natural
LNCP	Látex não centrifugado e não purificado
LP6	Látex purificado 6 vezes
OMS	Organização Mundial da Saúde
PVA	Poli álcool vinílico
SIS	Poli(estireno-b-isopreno-b-estireno)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
TG	Termogravimetria
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
PBS	Solução tampão fosfato estéril
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
Tonset	Temperatura de início de perda de massa
Tendset	Temperatura final de perda de massa
Tmax	Temperatura de degradação máxima
Tg	Temperatura de transição vítrea
ζ	Potencial zeta
CT-	Controle negativo
CT+	Controle Positivo
CO	<i>Calêndula officinalis</i>

Sumário

Capítulo I.....	21
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo Geral	25
2.1.1 Objetivos Específicos	26
Capítulo II.....	27
1. DOENÇAS DÉRMICAS RARAS	28
2. REGENERAÇÃO DÉRMICA	30
3. BIOMATERIAIS	31
4. LÁTEX.....	32
4.1 DESEMPENHO DAS PROPRIEDADES SÉRICAS DO LÁTEX	34
4.2 LÁTEX E ASSOCIAÇÕES A BIOMATERIAIS E OUTROS COMPONENTES.	36
4.3 POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) (PVA).....	37
5. <i>Calêndula officinalis</i> (CO)	39
Capítulo III	42
1. INTRODUÇÃO.....	44
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
2.1 Processo de Desproteíntização do Látex por Centrifugação	47
2.2 Processo de Desproteíntização do Látex por Purificação.....	48
2.3 Preparação da Membrana de Látex não Centrifugado e não Purificado (LNCP)	48
2.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	49
2.5 Análise de Termogravimetria (TG)	49
2.6 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	49
2.7 Ensaio de Intumescimento.....	49
2.8 Análise de Potencial Zeta	50
2.9 Ângulo de Contato.....	50

2.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	50
2.11 Caracterização Biológica - Citotoxicidade Direta e Citoquímica	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR-ATR).....	52
3.2 Análise de Termogravimétrica (TG)	53
3.3 Análise de Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)	54
2.3 Ensaio De Intumescimento	55
3.5 Análise do Potencial Zeta.....	57
3.6 Ângulo de Contato.....	58
3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	60
3. 8 Ensaio de Citotoxicidade	61
4. CONCLUSÃO.....	66
Capítulo IV	67
1. INTRODUÇÃO.....	69
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
2.1 Síntese da Solução de Látex/PVA	71
2.2 Preparação da Membrana de Látex/PVA	71
2.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	72
2.4 Análise de Termogravimetria (TG)	72
2.6 Ensaio de Intumescimento.....	73
2.7 Análise de Potencial Zeta	73
2.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	74
2.9 Ensaio Mecânico de Tração.....	74
2.10 Caracterização Biológica - Citotoxicidade Direta e Citoquímica	74
2.11 Avaliação da Adesão e Morfologia Celular - Microscopia Eletrônica de Varredura	75
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76

3.1 Análise de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR ATR)	76
3.2 Análise De Termogravimétrica (TG)	78
2.2 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	81
3.4 Análise de Intumescimento das Membranas de Látex/PVA	83
3.5 Ensaio Mecânico de Tração	85
3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	88
3.7 Potencial Zeta	90
3.8 Caracterização Biológica - Citotoxicidade Direta e Citoquímica	91
3.9 Avaliação da Morfologia e Adesão Celular	94
4. CONCLUSÃO	97
Capítulo V	98
1. INTRODUÇÃO	99
2. MATERIAIS E MÉTODOS	100
2.1 Incorporação do Extrato de <i>Calêndula officinalis</i> (CO) na Membrana de Látex/PVA100	
2.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	101
2.3 Termogravimetria (TG)	101
2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	101
2.5 Formação de Biofilme via Ensaio de Cristal Violeta	102
2.6 Ensaio de Antibiograma	103
2.7 Ensaio de Liberação	103
2.8 Ensaio de Citotoxicidade - MTT	105
2.9 Análise Estatística	105
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
3.1 Análise de FTIR	106
3.2 Análise de TG	108
3.3 Análise de DSC	110

3.4.1 Análise da formação de biofilme por Cristal Violeta	111
3.4.2 Antibiograma	113
3.5 Ensaio de Liberação.....	114
4. CONCLUSÃO.....	119
Capítulo VI.....	120
1. CONCLUSÕES FINAIS	121
2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	121
Referências	122
REFERÊNCIAS	123
Apêndices	150
APÊNDICE A	151
APÊNDICE B.....	152

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que existam de 6.000 a 8.000 tipos diferentes de doenças raras em todo o mundo e no Brasil, cerca de 13 a 15 milhões de pessoas possuem alguma doença rara. Essas doenças são geralmente crônicas, progressivas, degenerativas e até mesmo incapacitantes, afetando a qualidade de vida das pessoas e suas famílias. O tratamento por muitas vezes requer uma equipe multiprofissional, incluindo médicos, fisioterapeutas, psicólogos, nutricionistas e fonoaudiólogos. Por ser raro, muitas dessas doenças não possuem um tratamento efetivo e apenas 10 % delas possuem algum tratamento por medicamentos específicos e que por muitas vezes são de alto custo (BRASIL, 2014).

Alguns tipos de doenças, são de pele e provocam ferimentos de grande proporção no tecido dérmico. Essas feridas, quando não cicatrizadas corretamente ou acarretam problemas como inflamação excessiva, desordem no processo regenerativo da pele e arquitetura anormal da matriz extracelular (NYSTROM e BRUCKNER 2018). Diante desse fato, buscar produtos que amenizam esses tipos de problemas se torna cada vez mais relevante. Atualmente, as pesquisas são voltadas à utilização de polímeros sintéticos e naturais para aplicações biomédicas (SATCHANSK et al. 2024).

Tendo em vista os polímeros naturais, o látex é uma borracha natural extraída da árvore brasileira, *Hevea brasiliensis* ou mais comumente chamada de Seringueira. Essa borracha é derivada de uma secreção esbranquiçada nomeada de seiva leitosa coagulada, produzida pelo caule da árvore quando sofre uma incisão na casca (ROSA et al. 2019). A composição do látex consiste basicamente em 35,62 % de borracha, 1,65 % de extrato de acetona (lipídios, resinas e ceras), 2,03 % de proteínas, 0,34 % de carboidratos, 0,70 % de cinzas e 59,62 % de água (JALANI e RAMLI, 2003). O látex tem sido utilizado, há anos, pela indústria para confecção de luvas, chupetas, mamadeiras, preservativos (SALOMEZ et al. 2014). Contudo, se torna muito promissor na área de engenharia tecidual (OKAMOTO 2018) por apresentar biocompatibilidade (a seiva do látex), processo de vascularização aprimorada e possuir uma matriz sólida para a liberação modificada de medicamento (GUERRA et al. 202). Dentro desse âmbito, suas aplicações têm sido voltadas às diversas áreas de regeneração, tais como, a óssea (KERCHE-SILVA et al. 2018), de cartilagem (KINOSHITA et al. 2019) dérmica (KRUPP et al. 2019; GARMS et al. 2019).

Apesar do látex ser um material promissor nas aplicações na regeneração dérmica (LEITE et al. 2020), as proteínas presentes nas suas estruturas (frações séricas do látex)

se tornam um desafio, uma vez que as mesmas possuem características alergênicas que geralmente se manifesta através da pele (NUCERA et al. 2020). Desta maneira, a desproteção do látex é comumente realizada, a partir de diferentes processos, como a centrifugação, lixiviação simples ou até mesmo a base de solventes (SUKSAEREE et al. 2023). Por outro lado, estudos mostram que as proteínas alergênicas que constituem a fração sérica do látex possuem características angiogênicas, anticancerígenas, antimicrobiana e regenerativa, que são promissoras na aplicação biomédica (FERREIRA et al. 2009; HERCULANO et al. 2024; ANDRADE et al. 2022). Além disso, o látex é comumente associado a outros tipos de materiais para obtenção de blendas visando melhorar suas propriedades físicas (DATTA 2013).

Algumas doenças dérmicas raras, bem como a Psoríase, Epidermólise Bolhosa e o Prurigo, apresentam alterações na pele caracterizadas por lesões, bolhas, escaras e até o aparecimento de úlceras. Tais alterações dérmicas levam a um processo inflamatório, coceiras, escamação e uma difícil cicatrização (MELLERIO et al. 2020; LEE e KIM 2023; WONG e YEN 2022). Em vista disso, o látex demonstra auxiliar no processo inflamatório e de cicatrização, devido suas propriedades naturais inerentes (PENHAVEL et al. 2016). Ademais, para um tratamento que exija proteção contra a perda de água, capacidade de absorver o exsudato, troca de gases e permeação de fármacos por meio da permeação da pele, o poli álcool vinílico (PVA) mostra ser um potencial material para auxiliar no processo de cicatrização dessas lesões (FERNANDES et al. 2023; JIN 2022). O PVA pode ser considerado um curativo úmido, devido a sua característica hidrofílica. Tal característica é suficiente para que a ferida seja cicatrizada mais rapidamente comparado com um curativo seco por manter o local do ferimento apropriado para o processo de cicatrização (JIN 2022).

O PVA é um polímero muito empregado na formação de blendas para as utilizações biomédicas (ABDEL-MOHSEN et al. 2011; PAN et al. 2020; QURESHI et al. 2021). O PVA é um hidrogel sintético, livremente solúvel em água e é associado a outros materiais para conferir estrutura de suporte e além de propriedades biocompatíveis e biodegradáveis pelo organismo (PARADOSSI et al. 2003; GAO et al. 2019) O mesmo pode ser utilizado como uma cobertura ideal para a cicatrização de feridas, pois previne a perda de água e desempenha um papel de barreira contra microrganismos do ambiente externo (KIM e LEE 2017).

Visando o desenvolvimento de uma blenda, a associação blendas com diferentes tipos de fármacos de origem natural têm sido bastante estudado para liberação modificada (ADEOSUN et al. 2020), regeneração de órgãos e tecidos (FARAG 2023), cicatrização de lesões (MURRAY et al. 2019), enxertos (SHEIKH et al. 2017). Desta forma, os extratos naturais ganham espaço nesse âmbito uma vez que possuem a capacidade de auxiliar em vários tipos de tratamentos (ILOMUANYA et al. 2021). O extrato de *Calêndula officinalis* (CO) contribui em tratamentos de feridas dérmicas, como no efeito calmante em regiões acometidas por irritações (SIMÕES et al.2020). A CO é uma planta conhecida comumente como margarida ou bem me quer. Essa planta possui composições químicas que incluem triterpenóides, esteróides, terpenóides, ácidos fenólicos, carboidratos, ácidos graxos, carotenoides, óleos essenciais, minerais, quinonas e tocoferóis (AK et al. 2021). É uma planta considerada aromática com flores amarelas e laranjas e muito utilizadas na cura de feridas dérmicas, queimaduras, cortes, erupções cutâneas, contusões e até mesmo tratamento de úlceras nos pés (BROWN e DATNER 1998).

Atualmente, existem vários curativos dérmicos comerciais que são utilizados para o tratamento em diversos tipos de lesões dérmicas. A BiobraneTM (marca inglesa Smith Nephew) é produto comercial com uma estrutura bilaminar constituída por uma membrana de tecido de nylon revestido com silicone o qual o colágeno tipo I de origem suína está quimicamente ligado (SHARMA et al. 2019). Essa membrana possui características de adesão, flexibilidade, elasticidade, fornece uma barreira contra patógenos e reduz a produção de exsudato de queimaduras. A mesma pode ser utilizada para lesões dérmicas parciais e profundas (FAN et al. 2018). A Alloderm[®] (Lifecell, Branchburg, NJ) por sua vez, é uma matriz acelular para regeneração dérmica a base de colágeno, elastina e possuem antígenos associados à sua matriz (AGARWAL et al 2015). A matriz tem a capacidade de servir como uma ponte para a reconstrução permanente com cobertura de enxerto de pele ou mesmo como curativo biológico permanente de defeitos cirúrgicos complexos e com resultados estéticos favoráveis (DENEVE et al. 2013). A membrana Integra[®] (IDRT, Integra LifeSciences, Princeton, NJ, EUA) é um curativo dérmico, o qual possui uma dupla camada de colágeno tipo I e glicosaminoglicanos com cobertura de silício semipermeável e atua na cobertura e fechamento imediato das feridas dérmicas (TAUPIN et al. 2023).

Além de serem produtos importados, o tratamento à base dessas membranas é relativamente caro. Na **Tabela 1**, é possível observar o valor médio, em dólar, (por cm²) dos curativos mencionados anteriormente:

Tabela 1. Preços médios dos curativos dérmicos comerciais que são utilizados no tratamento de feridas.

Produto	Preço médio	Referência
Biobrane™	\$1,66 por 6 cm ²	Orkar et al. (2019)
Alloderm®	\$28,00 por cm ²	Cheng; Saint-cyr (2012)
Integra®	\$2.000,00 a \$3.000,00 tamanhos de 5x5 cm	SETH et al. (2019)

A utilização de produtos comerciais importados com elevado valor de mercado apresenta um desafio significativo, especialmente quando há lesões cutâneas extensas. Nessas situações, há uma tendência de necessidade de curativos de maior tamanho, o que inevitavelmente aumenta os custos do tratamento, assim como o tempo requerido para a cicatrização. Portanto, a busca por alternativas mais acessíveis, que possuam características semelhantes aos produtos comerciais, é crucial para aprimorar a qualidade dos curativos. Nesse contexto, o desenvolvimento de curativos de baixo custo, utilizando biomateriais e extratos naturais, representa um avanço notável e altamente promissor para aplicações biomédicas. Além disso, estudo de KUO et al. (2022) evidenciou em seu trabalho de revisão que apenas 100 medicamentos foram desenvolvidos para doenças dérmicas raras nos últimos 38 anos. Considerando este fato, o desenvolvimento de curativos à base de látex/PVA associado ao extrato de CO, torna-se de grande significância uma alternativa adicional de baixo custo no âmbito das aplicações e particularmente no tratamento de feridas decorrentes de doenças dérmicas raras.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um curativo dérmico à base de Látex/PVA com extrato de CO para tratamento de doenças raras, visando uma maior acessibilidade do tratamento e eficiência para saúde e bem-estar do indivíduo.

2.1.1 Objetivos Específicos

- Analisar o efeito da desproteinização do látex;
- Obter membranas de látex/PVA nas composições de 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10;
- Caracterizar físico-química e biologicamente a membrana de látex/PVA nas composições de 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10;
- Avaliar microbiologicamente a concentração do extrato de CO;
- Associar o extrato de CO à membrana de látex/PVA nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL;
- Caracterizar físico-química e biologicamente a membrana à base de látex/PVA/extrato de CO nas diferentes concentrações.

Capítulo II

1. DOENÇAS DÉRMICAS RARAS

Doenças são consideradas raras quando uma determinada parte da população é afetada com o diagnóstico e a porcentagem dessa população varia de acordo com cada país. Cerca de 500 milhões de pessoas são afetadas por doenças raras em todo o mundo e devido a esta taxa, é potencialmente importante compreender a doença de qualquer indivíduo visando a sua qualidade de vida e bem-estar (UITTO 2012). Segundo a Sociedade Brasileira de Dermatologia (2023) as doenças dérmicas raras têm origens genéticas, degenerativas, metabólicas, infecciosas e são variadas na área da dermatologia. Segundo estudos de SETH et al. (2017) os distúrbios cutâneos e subcutâneos são a 4^o causa de doença não fatais em todo o mundo, levando uma atenção especial à saúde desses pacientes, não apenas no ponto de vista epidemiológico, mas também, socioeconômico.

Na **Tabela 2**, observam-se alguns tipos de doenças dérmicas raras que afetam indivíduos de todas as faixas etárias, desde crianças até adultos.

Tabela 2. Doenças dérmicas raras descritas com maior frequência na literatura.

Doença	Faixa etária afetada	Sintomas	Referência
Síndrome de blau	Tem aparecimento precoce ainda na primeira infância	Dermatite	SANTANA et al. 2019.
Prurigo actínico	Qualquer idade e sexo	Fotodermatose idiopática	PILE e CRANE 2023
Síndrome da escamação da pele	Não é especificado	Escamação indolor da pele.	SINGHAL et al. 2017.
Ictiose	Primeiro ano de vida ou em adultos	Descamação, fissuras ou secura	SUBMUTH et al. 2020.
Epidermólise bolhosa	Não definido	Formação de bolhas e feridas	BARDHAN et al. 2020

A Síndrome de Blau é uma condição de herança autossômica dominante que também pode surgir de maneira esporádica devido a mutações (SANTANA et al. 2019). Essa doença, geralmente, é acometida na primeira infância como uma dermatite granulomatosa, artrite e uveíte, contudo a primeira manifestação costuma ser a erupção cutânea (WOUTERS et al. 2014). A doença de prurigo actínico é uma doença fotodermatose idiopática que afeta essencialmente a pele que foi exposta ao sol o qual tem um clima seco, ensolarado e altitudes superiores a 1000 metros acima do nível do

mar (GONZALEZ et al. 2017). Geralmente as regiões mais afetadas são a face, pescoço e superfície dorsal das extremidades superiores. Além disso, os casos graves da doença podem ocorrer escoriações, queilite (inflamação labial), doença conjuntival e cicatrizes (PILE e CRANE 2023). Já a síndrome da escamação da pele, é uma doença rara autossômica recessiva que é caracterizada basicamente pela descamação indolor da pele (pescoço, tronco e extremidades) em lâminas superficiais (SINGHAL et al. 2017). A doença ictiose apresenta uma semelhança com os sintomas da síndrome da descamação da pele, contudo a ictiose apresenta várias formas, desde as mais comuns até as formas mais raras. Essa doença está relacionada a fatores genéticos e pode ser adquirida por consequência de outras doenças (SUBMUTH et al. 2020). Outra doença que se insere neste âmbito é a epidermólise bolhosa. É uma doença cutânea hereditária que é causada por mutações de genes diferentes e que causa bolhas e feridas na pele, ocasionando dor e desconforto ao paciente (BARDHAN et al. 2020; PRODINGER et al. 2018).

Existem grandes desafios na compreensão dessas doenças raras, no desenvolvimento de medicamentos para estas condições, incluindo a identificação dos pacientes portadores, estudos e os custos (LIU et al. 2022). Atualmente, existe um banco de dados de doenças de peles raras que vinculam com os fármacos que são um potencial alvo para esses tipos de doenças, auxiliando no tratamento mais eficaz e rápido (KUO et al. 2022). Entretanto, medicamentos para tratar tais doenças raras são limitadas, não apenas por se tratar de uma doença rara, mas também pelo alto custo de investimento, desenvolvimento, fabricação e venda. A maioria das indústrias farmacêuticas não investem nesses tipos de fármacos pelo volume e lucro não se alinharem aos fatores econômicos da empresa (KARAS et al. 2019; KATELARI 2014).

Estudos vêm se aprofundando para atender a lacuna significativa entre a oferta e procura de tratamentos eficazes para essas doenças raras, além de buscar o sucesso na regeneração dos tecidos, bem como a regeneração do tecido dérmico (KUO et al. 2022). Atualmente existem trabalhos que associam os biomateriais a fim de desenvolver uma alternativa para a terapia genética visando alguns tipos de doenças raras (ZHAO et al. 2019). De acordo com NEDELUTA et al. (2021) o colágeno derivado das córneas bovina, mostrou ser um ótimo suporte para as células epiteliais que formaram uma monocamada superficial após 48 h de aplicação e um recém-nascido que sofria de epidermólise bolhosa. O colágeno possibilitou acelerar o processo de regeneração dermo-epidérmica em diversas condições da criança. Buscar meios com menor custo, com alta

disponibilidade e com características tão promissoras quanto as opções de alto custo existentes são de grande relevância para a comunidade científica e sociedade.

2. REGENERAÇÃO DÉRMICA

A pele, por ser a camada mais externa do corpo, também se apresenta como o órgão mais vulnerável e pode ser lesionada facilmente. Contudo, lesões superficiais da pele podem cicatrizar facilmente após o tratamento, já as lesões mais profundas dificilmente cicatrizarão por completo sem o tratamento adequado, levando a não regeneração do tecido e até causar a morte do indivíduo (QIN et al. 2022).

A cicatrização de feridas é dividida em inflamação, proliferação e remodelação (ARAMWIT 2016). O tecido dérmico é uma parte essencial da pele e que faz a conexão entre a epiderme e a hipoderme (**Figura 1**). A derme é uma estrutura irregular de tecido conjuntivo denso composto por células fibroblásticas. Essas células atuam na síntese da matriz extracelular, o qual é composta por colágeno, glicoproteínas e proteoglicanos. A matriz extracelular, induzirá o crescimento de células endoteliais epidérmicas e vasculares. Além disso, é capaz de regular a migração, proliferação, diferenciação e função metabólica celular e desempenha um papel importante na cicatrização de feridas (ZHOU et al. 2017).

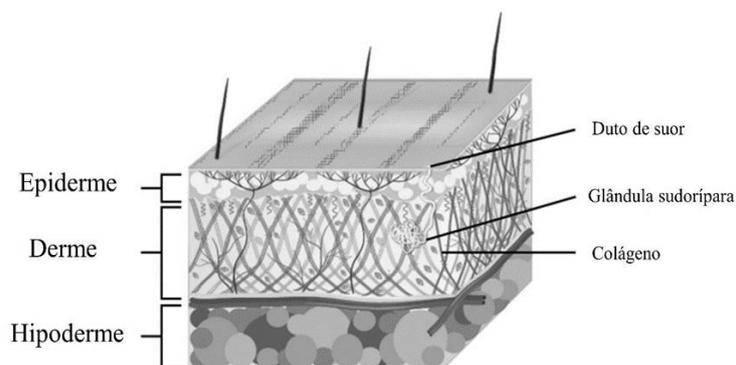


Figura 1. Esquema ilustrativo das estruturas do tecido dérmico, composto pela epiderme, derme e hipoderme. Adaptado de FITZGERALD (2018).

Na fase da homeostase há a ativação da fibrina que é responsável pela coagulação do sangue, fazendo com que o sangramento seja interrompido. Na fase da inflamação, as células danificadas são fagocitadas e os fatores de crescimento são liberados para migração e proliferação celular. As células fibroblásticas e as células mesenquimais da

pele, na fase proliferativa, atingem o local da ferida e formam uma matriz extracelular provisória. Assim, na fase de remodelamento, as fibras de colágeno são realinhadas e os resíduos são removidos, obtendo assim a cicatrização total da pele (**Figura 2**) (SANCHEZ et al. 2021).

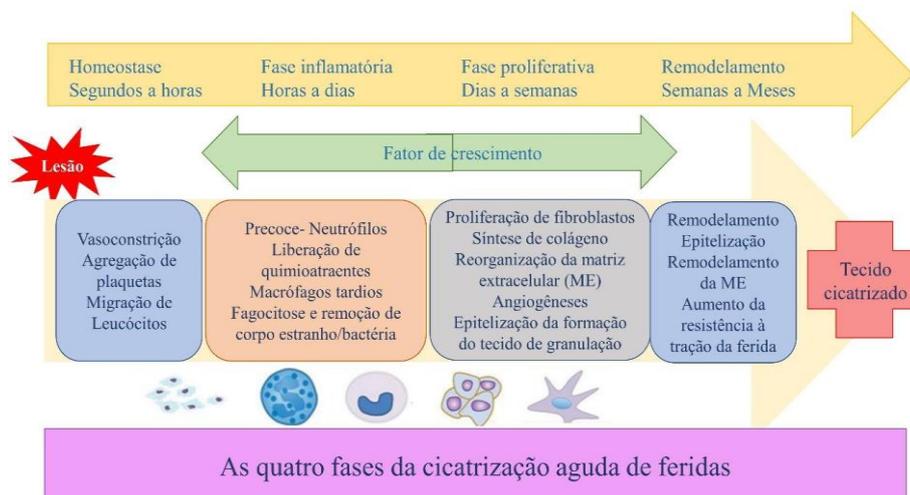


Figura 2. Esquema das fases de cicatrização aguda das feridas dérmicas. Adaptado de SANCHEZ et al. (2021).

Embora a pele tenha o mecanismo natural de regeneração, doenças e traumas que acarretam a lesão dérmica, necessita de atenção e tratamentos adequados, uma vez que incapacitam a regeneração natural da mesma (QIN et al. 2022). Desta maneira, os biomateriais são amplamente utilizados no cuidado da saúde, melhorando, substituindo ou aumentando a funcionalidade do tecido dérmico por um longo período (KAUR et al. 2022), além de serem explorados para os desenvolvimentos de novas terapias e aplicações para doenças dérmicas raras (ZHAO et al. 2019). Esses biomateriais podem proporcionar propriedades anti-inflamatórias, bactericidas e adesivas satisfatórias (KAUR et al. 2022).

3. BIOMATERIAIS

Nos últimos 50 anos, a área de biomateriais apresentou avanços significativos, associando materiais celulares para aplicações médicas (CLIMOV et al. 2016). Os biomateriais devem ser inicialmente não tóxicos e biocompatíveis, para evitar a indução da resposta imune, esterilizável para ser envolvido com segurança ao tecido receptor, biodegradável para ser eliminado do organismo após cumprido sua função e ser bioativo para o processo de cura do tecido (ELDEEB et al. 2022). Ademais, os biomateriais podem

orientar a reconstrução de estrutura básica e morfologia dos órgãos e agilizar a regeneração tecidual (LIU et al. 2022).

Os modelos curativos dérmicos necessitam atuar em resposta materiais ou microrganismos tóxicos para se obtenha um sucesso no crescimento da matriz celular e assim promover a cicatrização da ferida (PANDIYAN et al. 2021). Existem vários tipos de curativos/enxertos dérmicos em estudos, as diferenças se dão pelo tipo do material utilizado, morfologia e seus componentes adicionais que buscam outras propriedades benéficas para cada tipo de aplicação. Os curativos/enxertos podem ser mais comumente vistos como membranas eletrofiadas, as quais apresentam uma estrutura em rede, promovendo a troca de gases; em hidrogéis, que forma uma barreira contra os patógenos e mantém o local da ferida hidratada (MURRAY et al. 2019); em scaffold (arcabouço) o qual possui várias camadas para a reconstrução de lesões mais profundas (KAUR et al. 2019) e as membranas que podem auxiliar de forma eficiente as lesões de pele, servindo como proteção contra infecções, reduzindo dor e estimulando a migração e proliferação celular (ARAUJO et al. 2020). Além disso, os fatores de crescimento, células epiteliais e princípios ativos são associados aos dispositivos para promover uma melhor performance na aplicação (MURRAY et al. 2019).

Dentro dessa área, os biopolímeros são excelentes candidatos na aplicação de implantes, cicatrização de feridas e medicina regenerativa (BISWAL 2021; PEARCE e O'REILLY 2021). Os polímeros podem ser classificados como naturais, tal qual o colágeno, fibrina, quitosana, látex entre outros, e sintéticos, como as poliuretanas, PVA, poliácidos lácticos, policaprolactonas, poliácido glicólico etc. (AGARWAL et al. 2020). Tanto os polímeros naturais quanto os sintéticos, sozinhos ou combinados, apresentam uma importância significativa na medicina regenerativa por possuírem características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioatividade (LOVENE et al. 2021).

4. LÁTEX

O látex pode ser extraído de plantas e árvores, e pode ser sintetizado em laboratórios por meio da junção de vários monômeros. Existem cerca de vinte mil plantas que produzem o látex, contudo apenas doze mil espécies contém a borracha natural em sua composição. Dentre as espécies existentes, poucas detém a capacidade de produzir látex de qualidade e quantidade viáveis, a fim de produzir borracha em escala comercial.

A árvore *Hevea brasiliensis* (**Figura 3A e B**) é cultivada com sucesso e a produção comercial da borracha natural é obtida especificamente desta árvore (HO 2013).



Figura 3. Imagem ilustrativa da árvore *Hevea brasiliensis* (A) e do sistema coloidal da extração do látex diretamente da árvore (B). Fonte: Imagem pública.

O látex é um líquido leitoso extraído da árvore *Hevea brasiliensis*, mais comumente conhecida como seringueira. É um líquido que tem na sua composição a borracha natural, polímero a base de isopreno, biocompatível e com grande capacidade de atuar no reparo tecidual, potencializando o processo de angiogênese (GUERRA et al. 2021). Essa extração acontece por um sistema coloidal contendo 50 % de água, 4-5 % de não borracha (bem como proteínas, lipídios) e 30-45 % de partículas de borracha (cis-1,4-poliisopreno) (**Figura 4**). Quando o látex entra em contato com oxigênio, as proteínas se estabilizam e as partículas de borracha se degradam levando a coagulação do látex (BORGES et al. 2014; FERREIRA et al. 2009).

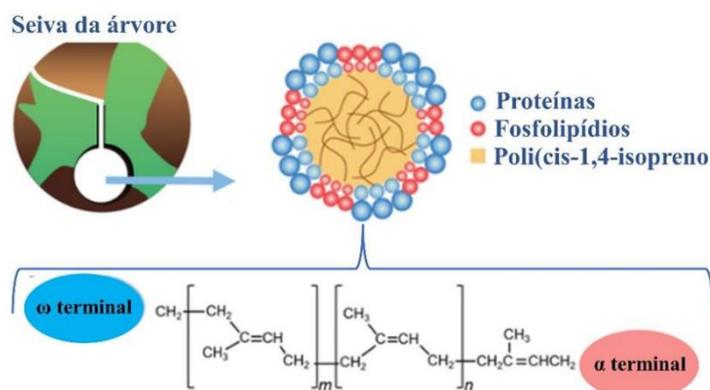


Figura 4. Estrutura química da borracha natural do látex a partir da extração da árvore *Hevea brasiliensis*. Adaptado de GUERRA et al. (2021).

A forma coagulada do látex é bastante utilizada na fabricação de produtos à base de “borracha seca”, como pneus automotivos. Contudo, o látex pode ser estabilizado de forma não coagulada com o uso de amônia, e assim ser utilizado para a fabricação de outros produtos, como luvas cirúrgicas, balões, mamadeiras etc. (KERSHE-SILVA et al. 2018).

4.1 DESEMPENHO DAS PROPRIEDADES SÉRICAS DO LÁTEX

O látex possui proteínas em sua composição que em muitos casos se apresenta como um produto alergênico para os indivíduos e isso acaba sendo um problema de saúde global (PARISI et al. 2021). Por conta disso, quando destinado à aplicação médica, a desproteínização do látex se torna um processo necessário para que seja amenizado os sintomas alergênicos (BOONME et al. 2014). As proteínas contidas no látex são de alta massa molar e solúveis em água e podem ser extraídas da estrutura do látex por meio de uma centrifugação do látex estabilizado com amônia. A partir dessa centrifugação, há uma separação de fases do látex, o qual a primeira porção apresenta o látex, a segunda porção as proteínas e a terceira porção contém outros componentes presentes no látex (**Figura 5**) (BARROS et al. 2019).

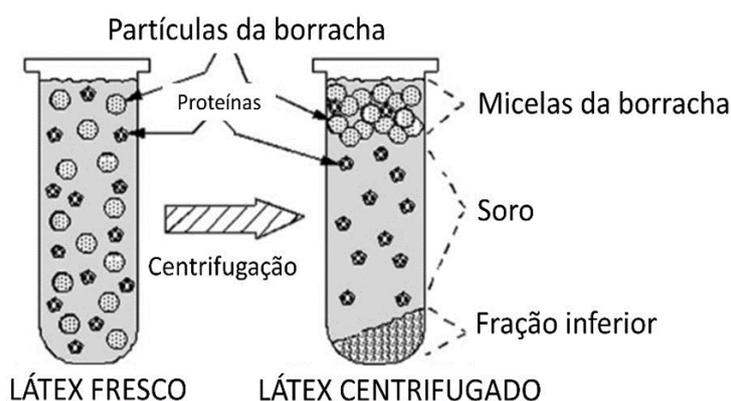


Figura 5. Imagem ilustrativa do látex fresco, mostrando as diferentes fases que se formam após o processo de centrifugação. Adaptado de PARRELLA e GASPARI (2002).

Além do método de centrifugação mencionado anteriormente, existem outras técnicas, como a purificação por precipitação (KHODAKARAMI e ALAGHA, 2017), que é utilizada em muitos casos para polímeros sintéticos. Em geral, materiais

sintetizados ou polimerizados contêm radicais livres como subprodutos, componentes que não reagiram no processo e sais. Esses constituintes podem ocasionar efeitos colaterais, como estresse oxidativo e hemólise ou até mesmo a funcionalidade do polímero, sendo necessário a realização da purificação do mesmo antes do uso (YASUNO et al. 2021). Estudos utilizam o método de purificação por método de reprecipitação utilizando clorofórmio (CHCl_3) como solvente e precipitado em álcool metílico (CH_3OH) (MARQUES et al. 2017; TSUNEIZUME et al. 2010).

Todavia, a fração séria do látex, o qual é composta por inúmeras proteínas, além de apresentar respostas alérgicas, apresenta atividades anticancerígeno, antimicrobiano e capacidade angiogênica no processo regenerativo de tecidos (**Figura 6**) (HERCULANO et al. 2024).

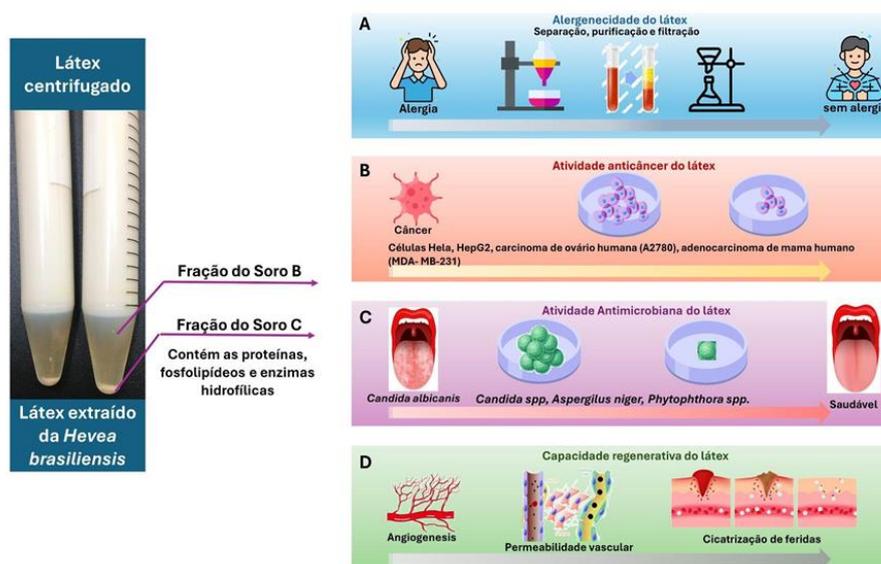


Figura 6. Imagem esquemática da atuação da fração do Soro B e C onde A) os processos de desproteinização do látex para a retirada de produtos alérgicos; B) atividade anticancerígeno a partir da fração B e C do látex; C) atividade antimicrobiana da fração B e C do látex e D) capacidade regenerativa (angiogêneses) da fração sérica B do látex. Adaptado de HERCULANO et al. (2024).

Estudos de ONG et al. (2009) demonstraram que a fração sérica B e C derivada do látex da *Hevea brasiliensis* possuem propriedades anticancerígenas em ensaios in vitro, utilizando células HeLa e células vero. As frações séricas reduziram o crescimento das células HeLa, que são de origem cancerosa, em comparação com as células vero que não são de origem cancerosa. Da mesma maneira, LAM et al. (2012) mostraram que a atividade antiproliferativa da fração sérica C em células cancerígenas foi eficaz uma vez

que os ensaios moleculares de PCR em tempo real demonstraram que as células não morreram por vias de sinalização apoptótica clássica, mas sim pela indução da fração sérica C atuando diretamente nas células.

Adicionalmente, essas frações séricas do látex se mostram promissoras nas atividades antimicrobianas, ou seja, apresentam capacidades antifúngica e antibacteriana (KANOKWIROON et al. 2008). De acordo com estudos de DARULIZA et al. (2011) demonstraram que o soro C contida no látex exerceu uma atividade antifúngica específica contra a *Aspergillus niger*, além de evidenciar uma baixa toxicidade do soro C no teste de letalidade da *Artemia salina* (crustáceo capaz de sobreviver a ambientes extremamente secos e com alta salinidade no ambiente). Da mesma forma, as proteínas contidas na fração sérica do látex têm a capacidade de proteger as plantas contra as ações de fungos, bactérias, vírus e parasitas, mostrando a sua função nas seivas das árvores (RAMOS et al. 2019).

A capacidade regenerativa das frações séricas do látex, foi demonstrado em estudos de MENDONÇA et al. (2010). Os autores mostraram que a aplicação de curativos a base de látex proporcionou bons resultados na cicatrização de feridas dérmicas, evidenciando a ação das proteínas do látex quando em contato com a lesão. Além disso, verificaram que os curativos foram capazes de estimular a angiogênese, aumentando a proliferação de fibroblastos e queratinócitos os quais contribuíram para a cicatrização da ferida. Esse processo angiogênico também foi observado em estudos de FERREIRA et al. (2009) o qual utilizaram uma biomembrana à base de borracha natural e seus constituintes em um defeito no embrião da galinha.

4.2 LÁTEX E ASSOCIAÇÕES A BIOMATERIAIS E OUTROS COMPONENTES

O látex, possui algumas propriedades limitadas quando comparados aos outros polímeros utilizados em aplicações biomédicas. Isso o torna um material conveniente para ser associado a outros tipos de polímeros. Segundo os estudos de CESAR et al. (2020) o látex quando associado ao polímero a base de ácido láctico (PLA) em diferentes concentrações de ambos, mostrou um dispositivo que é capaz de se degradar mais facilmente pela presença do PLA. Isso confere uma nova capacidade de degradabilidade ao látex, o qual sozinho não apresentava essa habilidade. Da mesma maneira, PINTO et al. (2024) associou à membrana co-eletrofiada de PLDLA com a borracha natural e

evidenciou um melhoramento na propriedade mecânica da membrana assim como demonstrou porosidade e viabilidade celular.

Além de demonstrar ser vantajoso em associar com outros componentes, o látex possui a capacidade de associação com fármacos e bioativos. As cadeias de isopreno que a borracha natural do látex possui formam redes que funcionam como um reservatório que permite a liberação gradual de compostos (ANDRADE et al. 2022). Estudos que incorporaram fármacos, como fluconazol (antifúngico) (MARCELINO et al. 2018), extratos naturais, como a própolis (ZANCANELA et al. 2019; KRUPP et al. 2019) e associação com outros tipos de materiais, como hidroxiapatita (DICK e SANTOS, 2017) mostraram que a borracha natural, em associação aos diferentes componentes, apresentou resultados satisfatórios de liberação sustentada, promovendo a inibição de fungos, função antimicrobiana e uma melhor bioatividade da borracha natural, respectivamente.

Desta maneira, associar o látex a outros tipos de polímeros que melhoram suas características físico-químicas e que auxiliam numa maior função de liberação de fármacos se torna um grande desafio.

4.3 POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) (PVA)

O PVA é um polímero sintético biocompatível e muito utilizado em estudos em aplicações biomédicas como um curativo, suporte para feridas, liberação controlada de medicamentos, arcabouços para engenharia tecidual e dispositivos implantáveis (SHITAKE et al. 2019). É um polímero linear com a fórmula $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})]_n$ (Figura 7) e tem como função de aglutinador em cerâmicas, plásticos, fibras, pigmentos, entre outros (SALMAN et al. 2018). Este polímero apresenta propriedades de não toxicidade, alta hidrofiliabilidade, boa processabilidade, resistência química e mecânica (BAHADORAN et al. 2020).

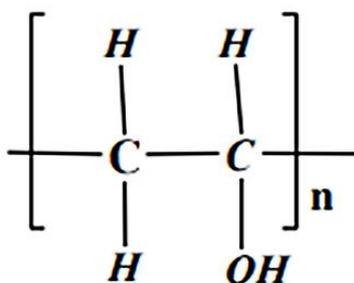


Figura 7. Estrutura química do PVA (SALMAN et al. 2018).

Os géis a base de PVA tem alto grau de intumescimento em água ou fluidos biológicos, além de conferir em sua estrutura um aspecto elástico ou emborrachado. A reticulação é necessária para manter a integridade do gel e garantir resistência (OLIVEIRA et al. 2014). O método de reticulação físico por congelamento e descongelamento do PVA garante a sua reticulação na rede e é considerado o melhor processo para este fim sem uso de produtos químicos tóxicos tradicionais (BAGHAIE et al. 2017). O método químico mais comum utilizado para a reticulação do PVA é pelos aldeídos, bem como o glutaraldeído. O grupo funcional aldeído reage com o grupo hidroxila do PVA formando uma ligação éster (BATES et al. 2020).

O PVA é considerado um hidrogel que tem a capacidade de manter o ambiente úmido e absorver exsudatos do local da ferida (GAO et al. 2019). O polímero puro por sua vez, não suportam as propriedades mecânicas apenas pela sua reticulação. Portanto, para aplicações biomédicas, estudos visam melhorar e controlar a sua estrutura e função adicionando diferentes compostos que o torna um candidato promissor para diversos tratamentos, bem como o desenvolvimento de curativos de feridas (ZHONG et al. 2024).

Diversos estudos que utilizam o PVA para regeneração da pele, são, por muitas vezes, associadas a outros componentes. Tais componentes, como células-tronco mesenquimais (GAO et al. 2019), colágeno com nanopartículas de prata (Mendes-Junior et al. 2021), quitosana com antissépticos (MASSARELLI et al. 2021) e nanopartículas de cúrcuma com colágeno (LENG et al. 2020), vão garantir a eficácia da atuação do PVA melhorando a grande absorção de umidade (MENDES-JUNIOR et al. 2021).

Estudo recente de DORKHANI et al. (2023) mostrou que além das várias funções e aplicações que o PVA possui, o polímero apresenta uma capacidade bastante promissora de estancar sangramentos causados por traumas. No seu trabalho in vivo, utilizando ratos, evidenciou um estancamento do sangue a partir de uma hemorragia parenquimatosa no fígado do animal, evitando a mortalidade e se mostrando mais eficaz do que a gaze, torniquete entre outros. Esse estancamento se dá pela presença do PVA no local de sangramento, diminuindo o volume de sangue, concluindo que o PVA atua como um agente hemostático.

Além disso, o PVA se mostra um polímero com uma capacidade promissora na liberação de fármacos (HERNÁNDEZ et al. 2021). Estudos de ARRIAGA et al. (2021) mostraram que o PVA carregado com um fármaco utilizado como analgésico e anti-

inflamatórias, apresentou uma liberação sustentada in vitro do fármaco. Isso se deve às interações dos grupos funcionais do medicamento com ligações de hidrogênio do PVA.

5. *Calêndula officinalis* (CO)

A *Calêndula officinalis* (CO) é nativa do centro, leste e sul europeu, e comumente cultivada em diferentes regiões no mundo, bem como América do Norte, Europa oriental e na Índia (VERMA et al. 2018). A CO é conhecida pela família Asteraceae e possui uma cor amarelada e suas flores alaranjadas (**Figura 8**). O seu cultivo se dá não apenas para fins ornamentais, mas propósitos medicinais (DULF et al. 2013).



Figura 8. Imagem ilustrativa da flor de *Calêndula officinalis* (comumente conhecida como margarida).

Fonte: Imagem Pública

O extrato de CO, por apresentar características de atividade antiinflamatórias, pode auxiliar no tratamento de lesões cutâneas e em algumas doenças dérmicas, tais como dermatite alérgica ou de contato, vitiligo, rosácea, melasma, psoríase e até mesmo toxicidade cutânea derivada do tratamento de câncer (SILVA et al. 2021; ALSARAF et al. 2019). Além disso, a CO é largamente estudada em associação a fármacos sedativos, fármacos anti-hipertensiva, hipoglicêmicos e redução de níveis de colesterol (ASHWLAYAN et al. 2018).

Tais características que o extrato possui se deve a presença de várias classes de compostos químicos como os triterpenóides, flavonoides, cumarina, quininos, óleos, carotenoides e aminoácidos (ASHWLAYAN et al. 2018; BUTNARIU e CORADINI 2012; HMPC 2018). Os flavonoides são metabólitos secundários encontrados nas plantas,

frutas e sementes, sua principal função é proteger as plantas contra as espécies reativas de oxigênio e responsável pelo crescimento celular (DIAS et al. 2021). Sua estrutura química é básica, o qual é formado quinze carbonos que consiste em dois anéis de benzeno (A e B) ligados por um anel pirano heterocíclico (C) (KUMAR e PANDEY 2013) (**Figura 9**).

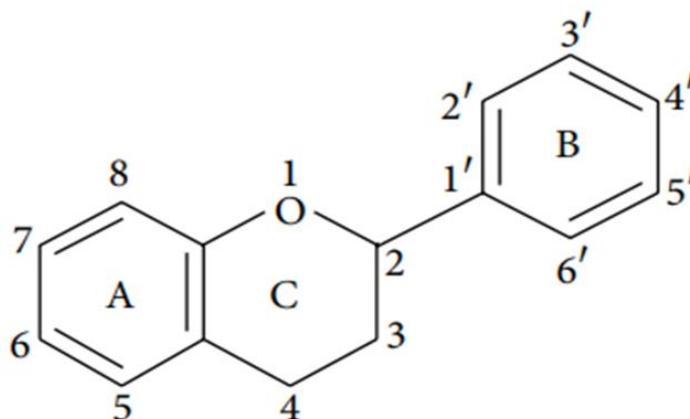


Figura 9. Estrutura química básica do flavonoide. Fonte: KUMAR e PANDEY, 2013.

Nesse sentido, os flavonoides podem ser classificados em diferentes subgrupos conforme a estrutura química, o grau de insaturação e oxidação do anel de carbono, bem como as flavanonas, flavanol, flavanonóis, flavans, chalconas, antocianidinas e isoflavonóides (ULLAH et al. 2020). A CO possui características bactericidas pela presença dos flavonoides, moléculas antimicrobianas naturais (SHANKAR et al. 2017) e apresentam atividade antioxidante, antiinflamatório e antiviral (BOKELMANN 2022). Os triterpenóides são componentes importantes anti-inflamatório e antiedematoso, o qual apresenta efeito estimulante de fibroblastos. Os flavonoides, além de dividir as mesmas características dos triterpenóides, também demonstram a capacidade de inibição de mastócitos e propriedades antioxidantes (GIVOL et al. 2019).

Além disso, a CO auxilia no tratamento de feridas dérmicas, ao passo que seu extrato contribui na cicatrização dérmica, aumentando a atividade hexosamina, a produção de colágeno e diminuindo os níveis de enzimas marcadoras de dano tecidual e proteínas de fase aguda. A utilização do extrato de CO diminui o desconforto durante as trocas de curativos (JAN et al. 2017).

Estudos *in vitro* demonstram que o extrato de CO tem a capacidade de cicatrização dérmica por conter as propriedades que inibiram a atividade da colagenase *in vitro* e

aumentou a quantidade de colágeno no sobrenadante dos fibroblastos dérmicos humanos. (NICOLAUS et al. 2017). GUNASEKARAN et al. (2020) também demonstraram *in vivo* que o extrato CO agiu como cicatrizantes em feridas dérmicas dorsais realizadas em ratos Wistar, melhorando a síntese de colágeno, aumento da contração de ferida e alterações nos fatores de crescimento dérmico. SILVA et al. (2021) mostraram que o extrato da flor de CO exerceu uma atividade anti-inflamatória em tratamentos de pele lesionada, bem como casos de dermatite, contato irritativa e alérgica, vitiligo, rosácea, melasma, psoríase e toxicidades cutâneas. Estudos clínicos de POMMIER et al. (2004) e SCHNEIDER et al. (2015) estudaram a ação do extrato de CO em doenças e efeitos colaterais de tratamentos que ocasionam a irritabilidade dérmica, como por exemplo em pacientes submetidos à radioterapia após cirurgia de câncer de mama, obtiveram melhores resultados quando comparado com o salicilato de trolamina, medicamento usualmente utilizado para este fim. Devido a presença do extrato, alguns pacientes não apresentaram a dermatite ou presença mínima da doença. Além disso, o extrato diminuiu consideravelmente a dor no local da aplicação da radioterapia.

Desta maneira, o extrato de CO demonstra ser um potencial fármaco natural para ser aplicado em curativos dérmicos, uma vez que tais características inerentes da flor contribuem de forma eficaz no tratamento de feridas e cicatrização de uma lesão acarretada por doenças dérmicas raras e doenças que acarretam traumas na pele.

The impact of non-deproteinization on physicochemical and biological Properties of natural rubber latex for biomedical applications

Este artigo foi publicado ao periódico International Journal of Biological Macromolecules

com fator de impacto igual a 8.1

O impacto da não Desproteíntização da borracha natural do látex nas propriedades físico-químicas e biológicas para aplicações biomédicas

Jessica Asami^{1,2*}, Bruna V. Quevedo², Arnaldo R. Santos Jr³, Luciana Pastena Giorno³, Daniel Komatsu², Eliana Aparecida de Rezende Duek^{1,2}

¹Mechanical Engineering Faculty (FEM), State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

²Laboratory of Biomaterials, Faculty of Medical Sciences and Health (FCMS), Pontifical Catholic University of São Paulo (PUC-SP), Sorocaba, SP, Brazil.

³Center of Natural and Human Sciences, Federal University of ABC (UFABC), São Bernardo do Campo, SP, Brazil.

Corresponding author: *Phone (+55) 15 99123-6666, jessicaasami@gmail.com

Resumo

O látex é um líquido leitoso extraído da árvore *Hevea brasiliensis*, que contém borracha natural, poli(isopreno) e outros componentes como proteínas e fosfolipídios. Esses componentes estão presentes tanto na borracha natural quanto no soro do látex. Este estudo teve como objetivo investigar a influência do processo de desproteíntização no comportamento químico e biológico do látex de borracha natural. A borracha natural (NR) extraída do látex puro (LNCP) foi obtida através de centrifugação, e a purificação por solvente do látex foi realizada seis vezes (LP6). A estrutura foi caracterizada utilizando espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), análise termogravimétrica (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), teste de intumescimento, potencial zeta de superfície (ζ), ângulo de contato e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Além disso, um ensaio biológico foi realizado para avaliar a citotoxicidade e a adesão celular usando coloração com violeta cristal. Os resultados mostraram que o grupo LP6 apresentou uma menor taxa de intumescimento, menor adesão e proliferação celular, e uma superfície menos rugosa com uma carga superficial negativa menor. Por outro lado, o grupo LNCP exibiu uma maior taxa de

intumescimento, maior adesão e crescimento celular, e uma superfície mais negativamente carregada e mais rugosa. Assim, as propriedades do soro do látex e das proteínas mostram potencial para várias aplicações biomédicas.

Palavras-chave: Purificação, *Hevea brasiliensis*, Caracterização, Proteínas, Biomateriais

1. INTRODUÇÃO

A borracha natural (BN) é obtida do látex da árvore *Hevea brasiliensis*, que exsuda uma seiva leitosa (ROSA et al. 2019). O látex é composto principalmente por 35,62 % de borracha, 1,65 % de extrato de acetona (composto por lipídios, resinas e ceras), 2,03 % de proteínas, 0,34 % de carboidratos, 0,70 % de cinzas e 59,62 % de água (JALANI et al. 2003). Acredita-se que os constituintes presentes no látex, incluindo proteínas e fosfolipídios, estejam organizados na fração do soro e distribuídos ao redor da superfície das partículas de borracha. Este revestimento, composto por proteínas e fosfolipídios, confere estabilidade coloidal à BN (SANSATSADEEKUL et al. 2011). Tipicamente, a BN tem sido utilizada na produção de itens como luvas, mamadeiras, preservativos e chupetas (SALOMEZ et al. 2014). No entanto, a BN está demonstrando potencial no campo da engenharia biomédica (GUERRA et al. 2021; OKAMOTO et al. 2018). No âmbito das aplicações médicas, a BN extraída do látex mostra utilidade em várias disciplinas. É aplicada para liberação sustentada de medicamentos, sistemas de administração transdérmica de fármacos e na medicina regenerativa, visando facilitar a regeneração da pele, ossos, cartilagem e diversos tecidos de órgãos (ANDRANDE et al. 2022).

De acordo com o estudo conduzido por JAYADEVAN et al. (2023), a utilização de BN combinada com plastificantes como glicerol e ftalato de dibutilo apresenta potencial para funcionar como um veículo no transporte de substâncias medicinais. Este sistema apresenta perspectivas promissoras para sua aplicação como adesivos transdérmicos. Da mesma forma, estudos de BARROS et al. (2019) indicam que a BN pode ser utilizada como uma matriz sólida para a liberação sustentada de compostos farmacologicamente relevantes, como o glicerol, que pode ser utilizado para auxiliar na cicatrização de fissuras mamilares ocorridas em mulheres no pós-parto devido à amamentação. Outros estudos *in vivo* envolvendo coelhos também demonstram que a BN

pode ter biocompatibilidade favorável e, quando em contato direto com a pele peniana e vaginal, não induz irritações ou sensibilizações dérmicas nos animais (SUKUMAR et al. 2020).

Outras investigações reforçam a capacidade da BN como um veículo para agentes terapêuticos, tanto sintéticos quanto de origem natural. Estudos abordaram sua utilização no tratamento de condições como psoríase (HERCULANO et al. 2023), queimaduras de segundo grau, infecções microbianas (TANAKA et al. 2021; LI et al. 2022) e enurese (BARROS et al. 2017). Além disso, a BN tem mostrado resultados promissores na regeneração óssea quando incorporada a uma membrana contendo nanopartículas de prata, como demonstrado por MARQUES et al. (2020). Um exemplo notável de aplicação da BN é destacado no estudo de OKAMOTO e OKAMOTO (2023), que utilizaram o compósito de colágeno-BN para induzir a diferenciação condrogênica *in vitro* a partir de células-tronco mesenquimais, garantindo implicações significativas para a formação de tecido cartilaginoso.

O látex é uma mistura complexa de substâncias orgânicas, que inclui uma combinação de proteínas (YEANG et al. 2002). Muitas dessas proteínas induzem respostas alérgicas em humanos, apresentando, assim, uma preocupação substancial de saúde mundial (PARISI et al. 2021). Conseqüentemente, o procedimento de desproteínização do látex torna-se obrigatório para contextos médicos. Este procedimento é utilizado para minimizar as reações alérgicas (BOONME et al. 2014). Nesse contexto, diferentes técnicas para desproteínização e purificação da BN são descritas na literatura, sendo a desproteínização por centrifugação (JAYADEVAN et al. 2018) e a reprecipitação (MARQUES et al. 2017) os métodos mais utilizados.

Portanto, a centrifugação do látex destaca-se como uma técnica amplamente utilizada para a isolamento das proteínas do látex. Após a centrifugação, o látex se segrega em três fases distintas: a fase inicial contendo borracha natural, a segunda fase contendo proteínas e a terceira fase abrangendo outros constituintes inerentes à solução de látex (BARROS et al. 2018). THAN-ARDNA et al. (2019) demonstraram que o aumento do número de ciclos de centrifugação (três ciclos de centrifugação) aumenta a proporção de BN desproteínizada. Observações análogas foram relatadas por HAYEEMASAE et al. (2022).

Além disso, a técnica de reprecipitação representa outra abordagem utilizada para a desproteínização de polímeros. Tipicamente, materiais ou compostos polimerizados

incorporam subprodutos, constituintes não reagidos, radicais livres e até sais, todos os quais podem apresentar resultados indesejáveis, como estresse oxidativo, hemólise ou danos funcionais ao polímero. Portanto, a purificação torna-se essencial para sua utilização (YASUNO et al. 2021). Dentro da metodologia de precipitação, os polímeros são reprecipitados através da utilização de clorofórmio (CHCl_3) como solvente, posteriormente precipitados em álcool metílico (CH_3OH) (MARQUES et al. 2017; TSUNEIZUMI et al. 2010). CHAIKUMPOLLERT et al. (2011) documentaram que a purificação da BN pode ser alcançada através da utilização de solventes polares, como clorofórmio e metanol, onde as proteínas são extraídas da BN por meio da mistura de solventes. Da mesma forma, YUSOF et al. (2015) demonstraram a purificação da BN utilizando solventes polares como etanol, metanol e tolueno.

Os métodos de desproteinização utilizados na BN são obrigatórios devido às reações alérgicas das proteínas para indivíduos específicos (PARASI et al. 2021). BERTHELOT et al. (2014) destacaram que o fator de alongação da borracha (REF) e a proteína de partícula pequena da borracha (SRPP), duas das várias proteínas-chave da BN, estão relacionadas a respostas alérgicas, embora tais alergias tenham sido predominantemente observadas em indivíduos com uso frequente de luvas de látex.

Por outro lado, as proteínas do látex estão ligadas ao metabolismo celular, indicando maior atividade biológica (KERCHE-SILVA et al. 2018). Diversas investigações indicaram impactos positivos das proteínas do látex em tratamentos médicos. MENDONÇA et al. (2010) documentaram que a fração de soro proteico obtida do látex da árvore *Hevea brasiliensis* apresenta efeitos angiogênicos notáveis e aumenta a permeabilidade vascular. Além disso, essa fração de soro rica em proteínas demonstrou cicatrização rápida de úlceras cutâneas. Observações comparáveis foram registradas em investigações conduzidas por FERREIRA et al. (2009), enfatizando que tanto a BN quanto a fração de soro desempenham um papel na promoção da angiogênese.

Apesar da existência de estudos relevantes envolvendo a BN em diversas aplicações biomédicas, as pesquisas sobre a influência das proteínas nas características físico-químicas e biológicas da BN são limitadas. Isso se deve ao fato de que as proteínas presentes na matriz coloidal da BN podem influenciar diretamente na estabilidade do material, o que pode comprometer seu desempenho final. Conforme discutido por HU et al. (2020) e MAHENDRA et al. (2021), os processos de desproteinização podem resultar em uma diminuição nas propriedades físicas, químicas e mecânicas da BN. Além disso,

as pesquisas envolvendo a avaliação comparativa das metodologias de desproteíntização, especificamente centrifugação e reprecipitação, também são limitadas.

O objetivo deste estudo é investigar o impacto das proteínas presentes na matriz coloidal da BN, obtida do látex da árvore *Hevea brasiliensis*, em suas propriedades físico-químicas e biológicas. Mais especificamente, o objetivo principal é avaliar como a presença de proteínas influencia a estabilidade da BN e comparar e analisar as metodologias de desproteíntização utilizadas na BN, a fim de compreender suas implicações nas propriedades físicas, químicas, mecânicas e biológicas. A pesquisa também visa preencher as lacunas de conhecimento sobre as correlações entre proteínas e as características da BN, fornecendo insights valiosos para otimizar e orientar a utilização da BN em diversas aplicações biomédicas, com foco na estabilidade, segurança e eficácia do material.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Processo de Desproteíntização do Látex por Centrifugação

Para o processo de desproteíntização por centrifugação, o látex estabilizado com hidróxido de amônia foi centrifugado, com o auxílio de uma centrífuga (Centrifuge 5804 R- Eppendorf®) a uma velocidade de 5000 rotações por minuto (rpm) por um período de 30 minutos. Esse processo de centrifugação foi 6 vezes. Nessa fase, as proteínas presentes no látex foram segregadas em três fases distintas, como ilustrado na **Figura 1**. Essas fases foram identificadas da seguinte forma: a fase A representava as micelas de borracha (poli(cis-1,4-isopreno)), a fase B consistia no soro contendo proteínas e a fase C denotava a fração inferior. Essa classificação está de acordo com os resultados relatados por PARRELA e GASPARI (2002). As micelas de borracha, compostas de borracha natural (BN), obtidas a partir do procedimento de centrifugação, foram utilizadas para os fins deste estudo.

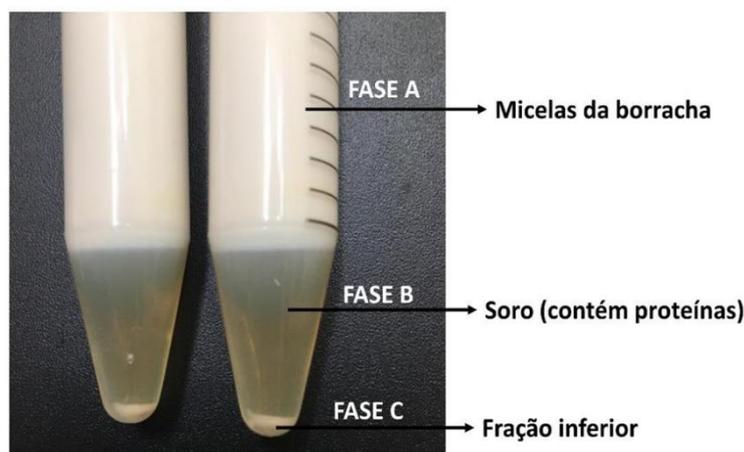


Figura 1. Imagens da solução de látex após o processo de centrifugação. Fase A: Micelas de borracha (borracha natural), Fase B: Soro contendo proteínas e fosfolípidos e Fase C: Fração inferior.

2.2 Processo de Desproteinização do Látex por Purificação

O látex com o pH corrigido e coagulado foi solubilizado em clorofórmio P.A (Labsynth[®]) sob agitação magnética. Em seguida, a solução homogênea foi vertida por gotejamento em solução de metanol P.A (Labsynth[®]) sob agitação magnética., levando à formação de um látex precipitado. Essa fase de purificação foi adaptada de MARQUES et al. (2017). O látex precipitado foi lavado com água destilada e submetido à secagem em estufa a uma temperatura de 35 °C. Esse processo de solubilização do látex em clorofórmio e precipitação em metanol foi repetido por 6 vezes para obter o látex purificado final, referido como amostra LP6.

2.3 Preparação da Membrana de Látex não Centrifugado e não Purificado (LNCP)

O látex estabilizado com hidróxido de amônio foi adquirido da empresa látex São Roque. O pH do látex foi corrigido com HCl a 0,5 M até que o mesmo coagulasse. Após a coagulação, o material coagulado foi lavado em água corrente para retirar os resíduos da amônia e deixado secar em temperatura ambiente. 10 % (m/v) do látex foi solubilizado em clorofórmio P.A (Labsynth[®]) sob agitação magnética. A solução homogênea foi vertida de uma placa de teflon com um diâmetro de 10 cm deixado secar em temperatura ambiente até que o solvente evaporasse por completo. Tal membrana foi denominada de Látex Não Centrifugado e Não Purificado (LNCP).

2.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR foi para identificar e caracterizar a estrutura química das amostras LNCP, BN, LP6, utilizando um espectrofotômetro Perkin Elmer em modo ATR (Spectrum 65 FT-IR). A análise foi realizada na faixa de número de onda de 4000 a 600 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e 64 varreduras.

2.5 Análise de Termogravimetria (TG)

A estabilidade térmica das amostras LNCP, BN e LP6, foi avaliada usando análise TG com um equipamento modelo Discovery TGA 55 da TA Instruments (TA Instruments, EUA). Aproximadamente 5 mg de cada amostra foi aquecido de 25 a 300 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio.

2.6 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise DSC foi realizada usando um equipamento TA Instruments Discovery DSC 25. Amostras LNCP, BN e LP6 com 5 mg foram hermeticamente seladas em recipientes de alumínio e submetidas a aquecimento de 25 a 150 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹. Após atingir a temperatura de 150 °C, as amostras foram resfriadas até -50 °C a uma taxa de resfriamento de 10 °C.min⁻¹ e mantidas a essa temperatura por 1 minuto. Por fim, as amostras foram aquecidas novamente (taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹) até 300 °C. A análise foi conduzida sob uma atmosfera de nitrogênio com uma taxa de fluxo de 5 mL.min⁻¹.

2.7 Ensaio de Intumescimento

As amostras LNCP, BN e LP6 foram submetidas a um teste de intumescimento usando uma membrana com 3,0 cm (comprimento) x 1,5 cm (largura). As amostras foram pesadas e, em seguida, imersas em 10 mL de solução de PBS a 37 °C por um total de 10 dias. No primeiro dia de análise, as amostras foram pesadas nos seguintes intervalos: 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos. Após o primeiro dia, as amostras foram pesadas a cada 24 horas. O teste de intumescimento foi realizado em duplicata. O percentual de intumescimento (%) de cada amostra foi calculado usando seu peso inicial (W_0) e seu peso após absorção (W_t), usando a equação 1 descrita por ALVES et al. (2016):

$$\text{Intumescimento}(\%) = \left[\frac{W_0 - W_t}{W_0} \right] \times 100 \quad (1)$$

2.8 Análise de Potencial Zeta

A análise de potencial zeta foi realizada por um analisador eletrocinético (SurPASS, Anton Paar GmbH, Áustria). O potencial zeta das superfícies das amostras LNCP, BN e LP6, foram medidas em função das alterações de pH de uma solução eletrolítica de cloreto de potássio 0,001 M. O pH da solução foi ajustado adicionando 0,05 M de HCl ou 0,05 M de NaOH usando a unidade de titulação automática do instrumento. As amostras foram fixadas em um suporte plano de amostra medindo 20 mm (comprimento) e 10 mm (largura) de cada lado, com a distância entre as superfícies ajustada para $100 \pm 10 \mu\text{m}$. O potencial zeta foi realizado em duplicata e todas as medições foram conduzidas à temperatura ambiente.

2.9 Ângulo de Contato

As amostras de LNCP, BN e LP6 foram preparadas no formato de membrana com 2 cm (comprimento) x 1 cm (largura). As medições do ângulo de contato foram realizadas em quintuplicata usando um goniômetro Rammé-Hart 100-00 e o software DROPimage Standard. Aproximadamente 10 μL de água deionizada (um líquido polar) foram cuidadosamente depositados na superfície da membrana usando um equipamento controlado por software. Os valores do ângulo de contato foram medidos a partir dessas imagens, e os resultados foram obtidos a partir da média de dez valores medidos.

2.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Todas as amostras LNCP, BN e LP6, foram metalizadas com uma camada de ouro de 20 nm usando um metalizador por pulverização catódica Leica EM ACE600. Em seguida, foi realizada a análise com Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (FEI Quanta 250) operando a uma tensão de aceleração de 3 kV e um detector de elétrons secundário. Imagens de baixa ampliação da morfologia da superfície de cada amostra foram analisadas.

2.11 Caracterização Biológica - Citotoxicidade Direta e Citoquímica

Para o ensaio de viabilidade celular a membrana de LNCP, BN e LP6 foram preparadas direto na lamínula de vidro de 13 mm e esterilizadas em luz UV germicida por 12 horas. Foram utilizadas células Vero, derivadas de células renais de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Essas células foram provenientes do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, Brasil). Esta linha celular específica é recomendada para investigar citotoxicidade e interações célula-biomateriais de acordo com padrões internacionais (ASTM F813-20, 2011; ISO 10993-5, 2009; ISO 10993-12, 2012). As células foram cultivadas em meio 199 (Lonza, EUA) suplementado com 10 % de SFB (Nutricell, Campinas, SP, Brasil) e mantidas a 37 °C em atmosfera com 5 % de CO₂.

Para o ensaio de citotoxicidade da membrana, fragmentos de cada material (LNCP, BN e LP6) foram colocados assepticamente em placa de cultura celular de 24 poços e imersos em meio (Lonza) suplementado com 10 % de SFB (Nutricell). A proporção entre fragmentos de material e meio foi mantida em 0,6 cm³/ml e nenhuma agitação foi aplicada. A placa foi então incubada a 37 °C com 5 % de CO₂ por 24 horas. Posteriormente, o meio resultante, considerado extrato, foi coletado para cultura celular. As células Vero foram introduzidas em placas de cultura nas concentrações anteriormente mencionadas, permitindo aderir durante 2 horas. Em seguida, o meio de cultura foi substituído pelos extratos obtidos anteriormente. As células Vero foram então cultivadas por mais 24 horas dentro desses extratos a 37 °C com 5 % de CO₂.

As imagens microscópicas foram capturadas usando um microscópio de luz invertida Zeiss Axio Vert A1 (Zeiss) com óptica de contraste de fase e objetiva de 20 x. Após o período de cultura, as células foram fixadas com 100 µL de solução de formaldeído a 10 % (em tampão fosfato 0,1 M em pH 7,2) por 30 minutos. Após a fixação, as células foram enxaguadas com água destilada e coradas com 100 µL de Cristal Violeta (CV) por 20 minutos para facilitar a análise morfológica. Para análise quantitativa, as amostras foram submetidas a duas lavagens com água destilada seguida de incubação em solução de citrato de sódio a 5 % (em metanol a 20 %) por 30 minutos. A absorbância das amostras foi lida utilizando o leitor de microplacas Epoch (Biotek) em um comprimento de onda de 540 nm sob todas as condições experimentais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR-ATR)

Os espectros de FTIR (**Figura 2**) mostraram as principais bandas características do látex, indicativas de poli (cis-1,4-isopreno), em 3036, 2915 e 2850 cm^{-1} , atribuídos ao estiramento assimétrico e simétrico de ligações $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$. O pico em 1665 cm^{-1} é atribuído ao estiramento das ligações $\text{C}=\text{C}$, enquanto os picos em 1446 e 1377 cm^{-1} atribuídos à deformação dos grupos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$, e em 845 cm^{-1} associado à vibração de flexão fora do plano das ligações $=\text{CH}$ de cis-1,4 (BARROS et al. 2019).

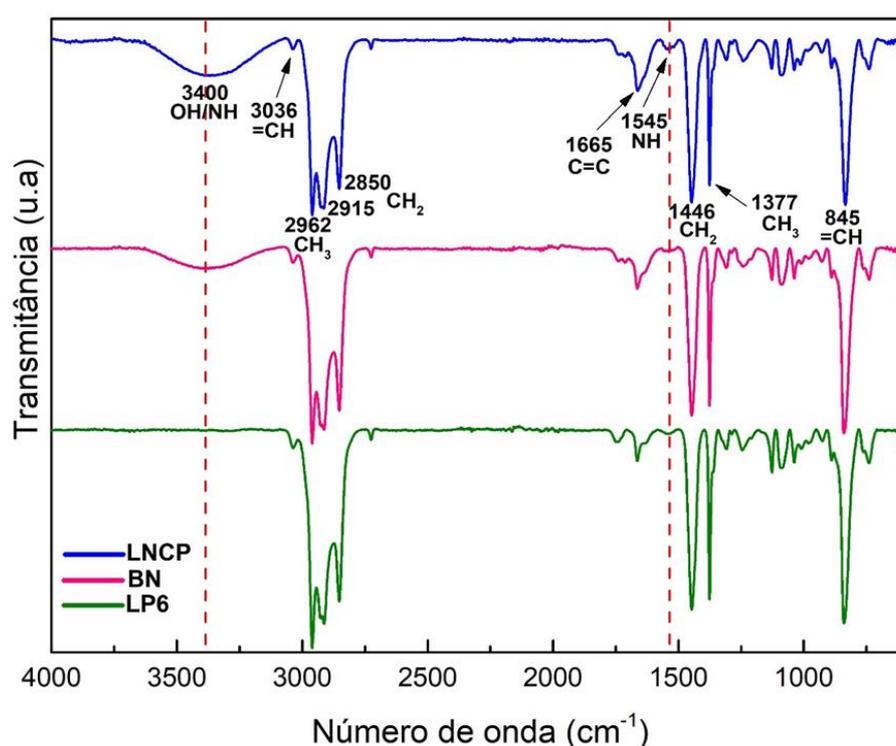


Figura 2. Espectroscopia do FTIR de látex não centrifugado e purificado (LNCP), borracha natural (BN) e látex purificado 6 vezes (LP6).

O espectro da amostra LP6 revelou ausência de banda em 3400 cm^{-1} , característica dos grupos OH/NH , diferentemente dos demais grupos. Esta banda está possivelmente ligada ao grupo amina (NH) presente nas proteínas do látex, o qual demonstrou uma diminuição da intensidade do pico de 1545 cm^{-1} relacionada à vibração das ligações C-N nos grupos amida II ($\text{N-C}=\text{O}$). Esta vibração corresponde a ligações peptídicas que contribuem para a estrutura da proteína no látex natural (ROLERE et al. 2015; CIFRIADI et al. 2017). FUKUHARA et al. (2015) e BONFILS et al. (2007) demonstraram que

solventes polares podem extrair lipídios e ácidos graxos, separando esses componentes das partículas de borracha e conseqüentemente criando mais lacunas dentro delas. Assim, é provável que a amostra submetida a seis processos de purificação (LP6) apresente ausência do grupo amina e conseqüentemente menor quantidade de proteínas em sua composição.

Desta forma, é evidente que um maior número de processos de purificação aplicados ao látex resulta num elevado grau de desproteíntização. Este resultado corrobora com a extração de proteínas do látex através de mecanismos baseados em solvente. Uma observação paralela foi feita por HAYEEMASAE et al. (2022), que destacaram que submeter o látex à desproteíntização por centrifugação mais de duas vezes, diminui significativamente a sua eficácia.

3.2 Análise de Termogravimétrica (TG)

As curvas TG e DTG das amostras de LNCP, BN e LP6 são mostradas na

Figura 3.

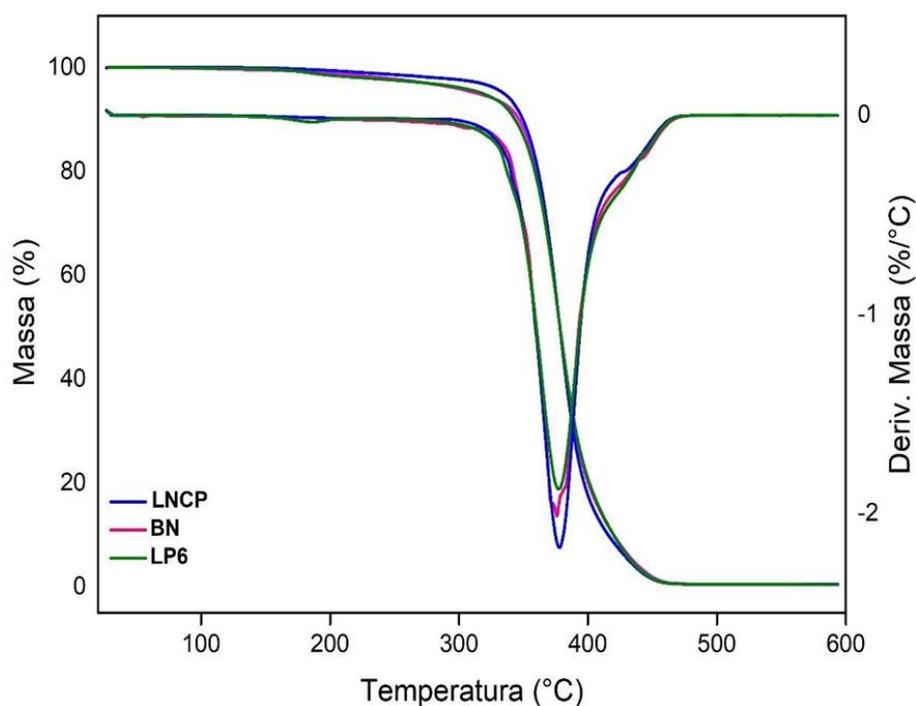


Figura 3. Curvas de TG e DTG de amostras de látex não centrifugado e purificado (LNCP), borracha natural (BN) e látex purificado 6 vezes (LP6).

Com base nos resultados da TG, foi observado que todas as amostras apresentaram um único evento térmico. O início de perda de massa ocorreu em aproximadamente 350 °C (T_{onset}) e o término em torno de 437 °C (T_{endset}). A temperatura na qual a perda de massa é máxima (T_{max}) foi observada na análise DTG em 377 °C (**Figura 3**). Conforme indicado por DUY et al. (2020), esse fenômeno é atribuído à degradação térmica do látex. No entanto, verificou-se que a intensidade do pico DTG das amostras LP6 e BN diminuiu gradativamente em comparação com a amostra LNCP. CUIET et al. (2020) mostraram que a BN associada ao outro polímero apresenta um pico com menor intensidade que a BN pura, indicando uma taxa de degradação mais lenta para o copolímero do que para a BN pura. Este fenômeno pode ser atribuído à alta interação química entre os grupos funcionais presentes no copolímero e ao reduzido teor de cadeias insaturadas em sua estrutura. Conseqüentemente, a decomposição da BN associada a outro polímero exige mais energia, proporcionando assim maior estabilidade térmica.

3.3 Análise de Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

As amostras LNCP, BN e LP6 foram submetidas à análise de análise DSC, referente ao segundo aquecimento, conforme mostrado na **Figura 4**.

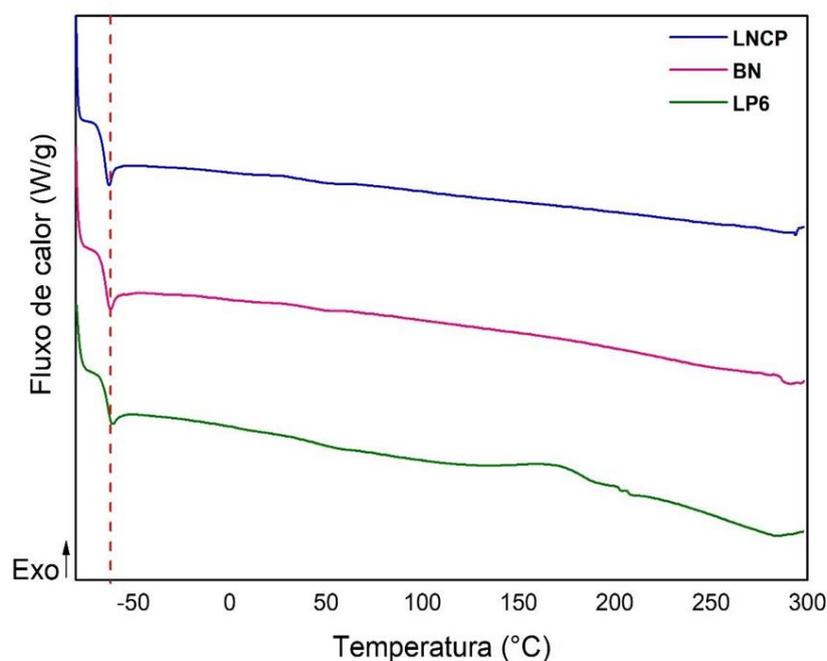


Figura 4. Curvas de DSC de amostras de látex não centrifugado e purificado (LNCP), borracha natural (BN) e látex purificado 6 vezes (LP6).

Verificou-se que todas as amostras apresentaram a temperatura de transição vítrea (T_g) em torno de $-65\text{ }^\circ\text{C}$. Este valor de T_g é atribuído à fase poli(cis-1,4-isopreno), de acordo com observações documentadas por PICHAYAKORN et al. (2012) e PICHAYAKORN et al. (2013). A presença de uma T_g distinta destaca uma maior relaxação molecular da estrutura amorfa do elastômero (WANG e DUAN 2019). Os valores de T_g identificados demonstraram que os processos de purificação não conduzem a alterações na estrutura molecular do elastômero. Neste contexto, torna-se evidente que os processos de centrifugação e purificação não impactam as propriedades térmicas e intrínsecas do látex. Como as propriedades mecânicas dos polímeros são dependentes da temperatura (SMITH et al. 2009; ESPÍNDOLA et al. 2023), a estabilidade da T_g apresentada pelo material garante essa estabilidade mecânica, sendo importante para aplicações biomédicas (ESPÍNDOLA et al. 2023). Além disso, a mobilidade molecular em torno da T_g pode influenciar a taxa de substâncias farmacológicas liberadas do material para o ambiente circundante, apresentando também uma estabilidade nesse âmbito (KARAVELIDIS et al. 2010).

2.3 Ensaio De Intumescimento

Os resultados do ensaio de intumescimento das amostras de LNCP, BN e LP6 estão apresentados na **Figura 5**. A amostra LNCP apresentou alta capacidade de intumescimento, atingindo aproximadamente 75 % ao final do teste (240 h). A amostra BN apresentou um percentual de intumescimento de aproximadamente 40 % ao final do teste (240 h). Por fim, a amostra LP6 apresentou menor percentual de intumescimento em comparação às demais amostras (BN e LNCP), com capacidade máxima inferior a 10 % no período de 144 h. A média de 3 amostras do teste apresentou desvio padrão inferior a 5 %.

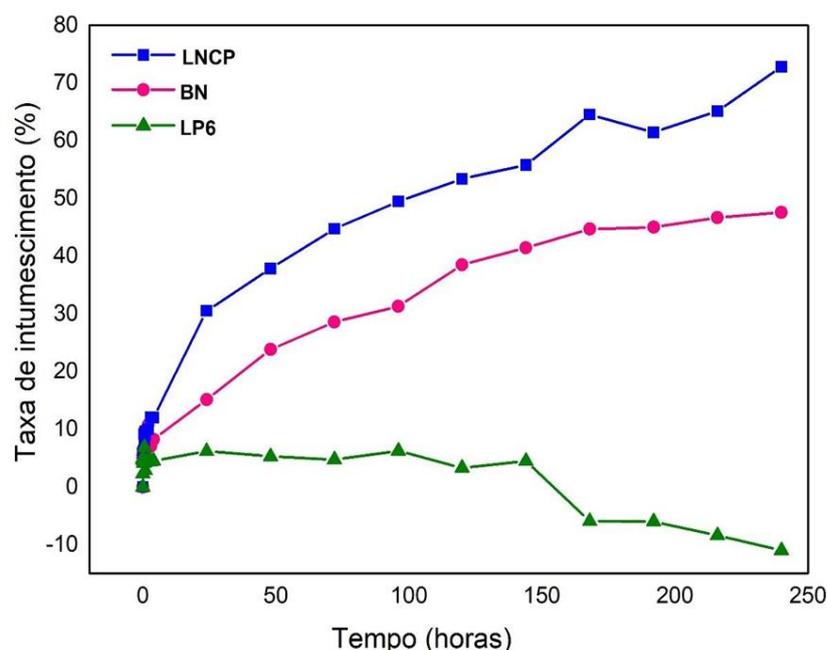


Figura 5. Gráfico da taxa de intumescimento (%) vs tempo (horas) das amostras de látex não centrifugado e não purificado (LNCP), borracha natural (BN), e látex purificado 6 vezes (LP6).

A capacidade de expansão de diferentes categorias de processamento de BN pode estar ligada à sua composição química. WADEESIRISAK et al. (2017) documentaram que o arranjo e a interação de proteínas e lipídios na interface das partículas de borracha podem influenciar a capacidade absorvente do látex, afetando consequentemente sua característica final. O processo de purificação contribui para a remoção de proteínas e lipídios situados na superfície do sistema coloidal da borracha, expondo a cadeia polimérica hidrofóbica constituída pelo poli(cis-1,4-isopreno), restringindo consequentemente sua capacidade de absorção de água (BARROS et al. 2021).

Além disso, a redução da massa da amostra LP6 observada no gráfico, poderia estar potencialmente associada à redução das características físicas inerentes ao látex, nomeadamente às suas propriedades mecânicas. Esta ocorrência pode estar ligada à contagem de interações de purificação de látex. De acordo com HAYEEMASAE et al. (2022), que utilizaram a centrifugação para fins de desproteinização, um aumento na quantidade de ciclos de centrifugação está correlacionado com um declínio nas redes de ligação às proteínas do látex, resultando em modificação substancial nos atributos mecânicos do material.

Assim, uma maior taxa de intumescimento garante que o material seja promissor para aplicações biomédicas, bem como como carreador de medicamentos. Estudos de BARROS et al. (2021) demonstraram que membranas à base de látex com alginato

proporcionaram maior taxa de intumescimento, biocompatibilidade e proliferação celular, indicando material promissor para tratamento de feridas diabéticas, acelerando o processo de cicatrização.

3.5 Análise do Potencial Zeta

O gráfico do potencial zeta em função do pH, ilustrado na **Figura 6**, revelou uma carga superficial negativa em todas as amostras, independentemente dos valores de pH. Porém, para as amostras BN e LNCP, o potencial zeta apresentou variações em função do pH. À medida que o pH aumentou, a carga superficial exibiu maior negatividade, registrando valores de -35 mV para a amostra BN e -28 mV para a amostra LNCP em pH 9,0. Em contraste, a amostra LP6 apresentou uma carga superficial ligeiramente menos negativa em comparação com as outras amostras (BN e LNCP), obtendo um valor de -13 mV em pH 9,0. Esta diferença nos valores de potencial zeta pode ser atribuída ao processo de desproteíntização por purificação aplicado à amostra LP6, resultando na diminuição da hidrofiliçidade.

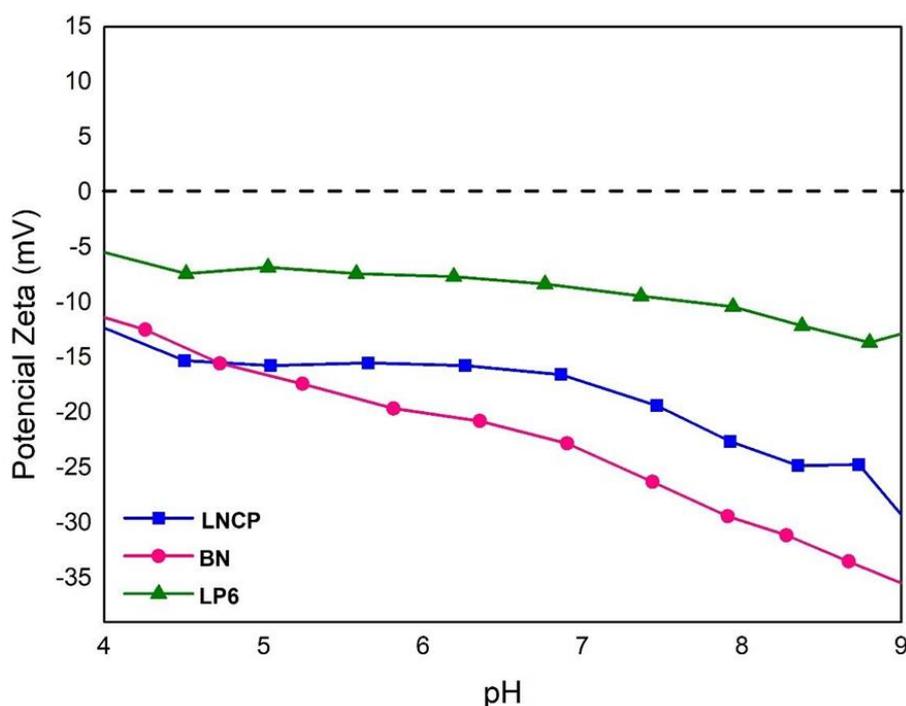


Figura 6. Gráfico do potencial Zeta em função do pH das amostras de látex não centrifugado e não purificado (LNCP), borracha natural (BN) e látex purificado 6 vezes (LP6).

Conforme indicado por SANSATSADEEKUL et al. (2011), o látex apresentou carga superficial negativa atribuída à ionização de grupos ácidos carboxílicos presentes na superfície das partículas de borracha. Neste contexto, a carga superficial das partículas de borracha aumenta com a adsorção de ácidos graxos e proteínas na superfície. No entanto, processos de desproteínização, como a centrifugação, podem resultar em uma diminuição na carga superficial negativa do látex (SANSATSADEEKUL et al. 2011) uma vez que os lipídios contribuem para a alta carga negativa na superfície da borracha (AMBEGODA et al. 2020). ARIYAWIRIYANAN et al. (2013) também mostraram que a remoção de proteínas da superfície do látex contribui para a redução da carga negativa das partículas de borracha.

Além disso, THEVENOT et al. (2008) mostraram que superfícies de biomateriais com cargas negativas possuem interações favoráveis com as células, levando assim ao aumento do crescimento e adesão celular. Isto implica que uma carga negativa elevada numa superfície aumenta a atividade celular. Por outro lado, as superfícies funcionalizadas com grupos como porções de amina (NH_2) elevam a internalização celular (ARIMA e IWAT, 2007), bem como a ligação e proliferação celular (HAO et al. 2016). No caso do látex, a desproteínização eliminou os grupos amina inerentes à estrutura (conforme confirmado pela análise FTIR), influenciando potencialmente na adesão celular. Esse declínio na adesão celular foi discernível na avaliação *in vitro* da amostra LP6, que sofreu a purificação mais extensa e conseqüentemente apresentou diminuição da quantidade de grupos NH_2 em sua composição, culminando na diminuição da adesão celular. Portanto, as cargas negativas presentes na superfície do látex são vantajosas para aplicações biomédicas devido à sua capacidade de induzir resposta celular (NASCIMENTO et al. 2018).

3.6 Ângulo de Contato

Os resultados das medidas do ângulo de contato, conforme ilustrado na Figura 7, destacaram a influência do processo de purificação nos valores dos ângulos registrados das amostras. Especificamente, medidas de ângulo de contato de $73,00^\circ (\pm 0,03)$, $79,40^\circ (\pm 0,40)$ e $87,00^\circ (\pm 0,02)$ foram obtidas para LNCP, BN e LP6, respectivamente. Esses valores elucidam a extensão da molhabilidade, que significa a interação entre uma superfície líquida e uma superfície sólida. Um ângulo de contato $< 90^\circ$ significa uma alta molhabilidade do material, enquanto $> 90^\circ$ indica um menor grau de molhabilidade

(YUAN e LEE 2013). Comparando as amostras, LP6 apresentou o ângulo de contato mais substancial, enquanto o menor ângulo foi registrado para LNCP. A média de 5 análises de ângulo de contato apresentou desvio padrão inferior a 5 %.

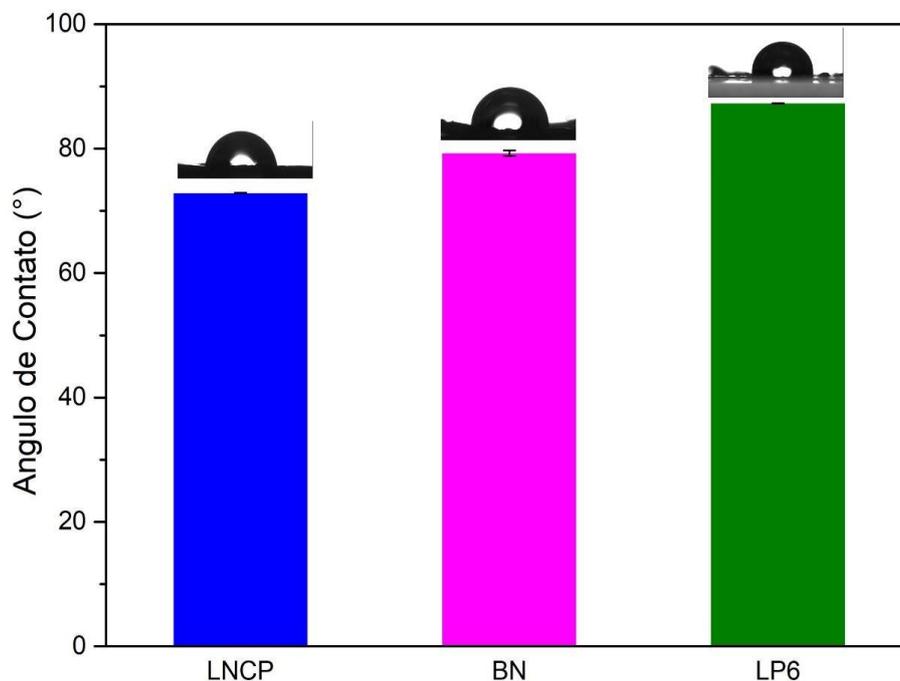


Figura 7. Valores do ângulo de contato (em graus) para amostras de látex não centrifugado e não purificado (LNCP), borracha natural (BN) e látex purificado 6 vezes (LP6).

Os procedimentos de purificação utilizados no LP6 facilitaram a exposição de unidades de isopreno dentro da cadeia polimérica, levando a um aumento no ângulo de contato e uma diminuição na hidrofiliabilidade (CHAGAS et al. 2021). Essa observação reforçou os resultados dos testes de intumescimento, que mostraram menor grau de intumescimento no LP6 quando comparado às demais amostras. Este fenômeno pode ser atribuído às suas características hidrofílicas reduzidas resultantes de processos de purificação.

O menor valor de ângulo de contato observado nas amostras LNCP e BN podem ser atribuídos à existência de proteínas envolvendo as partículas de látex. Essas proteínas estão relacionadas a grupos funcionais polares como os ácidos carboxílicos, o que poderia aumentar a hidrofiliabilidade do material. As medições de ângulo alinham-se com os resultados da análise do potencial zeta, revelando cargas superficiais negativas para LNCP e BN. Esta carga negativa pode ser atribuída à presença de ácidos carboxílicos nas proteínas que envolvem a estrutura do isopreno.

Segundo CHAGAS et al. (2021), o ângulo de contato tem influência significativa na proliferação e adesão celular quando aplicado a biomateriais, desempenhando um papel crucial na interação entre as superfícies desses materiais e as células. Além de influenciar fortemente a proliferação e adesão celular, a hidrofobicidade moderada do material também pode contribuir para a proteção e hidratação do local da ferida, evitando assim a contaminação bacteriana (MADDALOZZO et al. 2022).

3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi realizada para analisar a superfície das membranas de LNCP, BN e PL6, conforme mostrado na **Figura 8**.

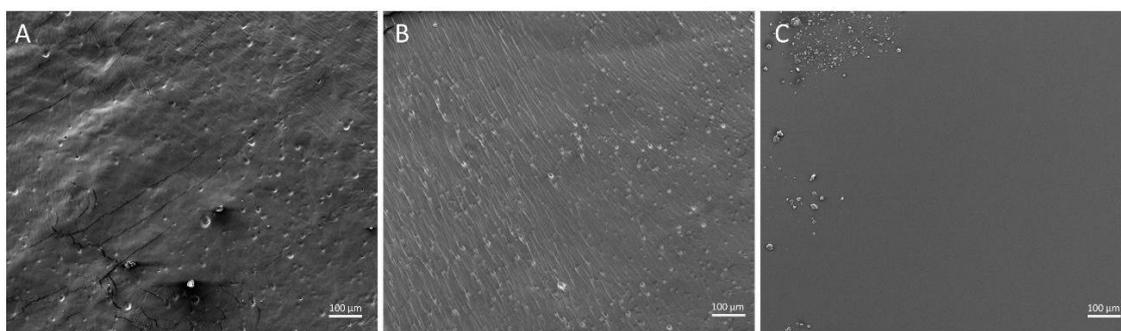


Figura 8. Imagens de MEV de amostras de látex. A: látex não centrifugado e não purificado (LNCP); B: Borracha natural (BN) e C: Látex purificado 6 vezes (LP6). Ampliação de 500 x. Barra de escala: 100µm.

A micrografia apresentada na **Figura 8A** ilustra a superfície irregular da amostra LNCP com formação irregular e com rugosidades. Esta irregularidade foi provavelmente devido à evaporação de solventes durante o processo de secagem (STROPA et al 2016; MASUDA e OLIVEIRA 2019). A capacidade aumentada de intumescimento do LNCP, resultante da presença de proteínas e lipídios em sua estrutura, poderia impactar a cinética de evaporação do solvente durante a secagem, contribuindo assim para o desenvolvimento de uma superfície mais irregular.

Na **Figura 8B**, as amostras de BN apresentaram uma superfície uniforme pela presença de estrias. Esse fenômeno, como também notado por CESAR et al. (2020), o qual foi atribuído estrias da membrana. A superfície lisa do LP6 na **Figura 8C** pode estar relacionada à eliminação de impurezas, como proteínas e lipídios, através do processo de purificação, resultando em um material mais homogêneo.

De acordo com METWALLY et al. (2020), materiais com superfícies mais lisas possuem uma capacidade de adesão celular reduzida e conseqüentemente menor contagem de células em comparação com superfícies rugosas. Além disso, a rugosidade e a carga superficial contribuem para a formação do tecido, promovendo a regeneração tecidual. Estudos de FLORIANO et al. (2018) e BARROS et al. (2019) demonstraram que as superfícies mais rugosas e porosas presentes no látex são suscetíveis à adsorção, permeação e incorporação de fármacos e extratos, garantindo a liberação sustentada desses componentes. Além disso, a presença de poros proporciona um ambiente favorável para a absorção de exsudatos, permitindo a troca gasosa com o ambiente circundante e mantendo a hidratação do local (PHAECHAMUD et al. 2016). Essas características são evidentes na morfologia da membrana LNCP (**Figura 8A**), tornando-a ideal para aplicações biomédicas, utilizando como um sistema de liberação controlada e permeação de gás.

3. 8 Ensaio de Citotoxicidade

Os resultados foram a partir de cultivos de células vero derivados do rim do macaco verde africano, com padrões internacionais (ASTM F813-20, 2011; ISO 10993-5, 2009; ISO 10993-12, 2012).

A **Figura 9** apresentou os dados obtidos no teste de citotoxicidade por contato direto após 24h de incubação observada sob contraste de fase. No grupo CT- (controle), foi observada uma monocamada celular conflúente, com algumas células alongadas e outras mais retraídas, dependendo da densidade celular, espalhadas pela placa de cultura, o que é consistente com a morfologia da divisão celular. No grupo CT+ (positivo) foi observado menor número de células, completamente arredondadas e retraídas, formando aglomerados celulares, indicando possível morte celular. Devido à espessura e translucidez das diferentes amostras, não foi possível visualizar diretamente as células nelas contidas. Em vez disso, a análise concentrou-se nas células que rodeiam os materiais. Não foram observadas alterações citoplasmáticas aparentes ou características morfológicas indicativas de morte celular. No caso das amostras LNCP e BN, foi observada uma monocamada celular não conflúente com alguma vacuolização ou granulação citoplasmática. A amostra LP6 apresentou indícios de células arredondadas e/ou retraídas, assemelhando-se ao grupo CT+.

No teste de citotoxicidade do extrato, os controles apresentaram características semelhantes às descritas para o teste de citotoxicidade direta, citado acima. Porém, foram observados padrões morfológicos distintos nos extratos de células LNCP e BN em comparação com o grupo CT-. No entanto, as células LNCP e BN não foram capazes de formar uma camada monocelular confluenta, e as células da amostra LP6 estavam muito mais retraídas e espaçadas (**Figura 9**). Em todos estes casos, células retraídas ou vacuolizadas eram comuns na monocamada. Dados semelhantes também foram observados sobre a citotoxicidade pelo extrato quando observado em contraste de fase (**Figura 9**).

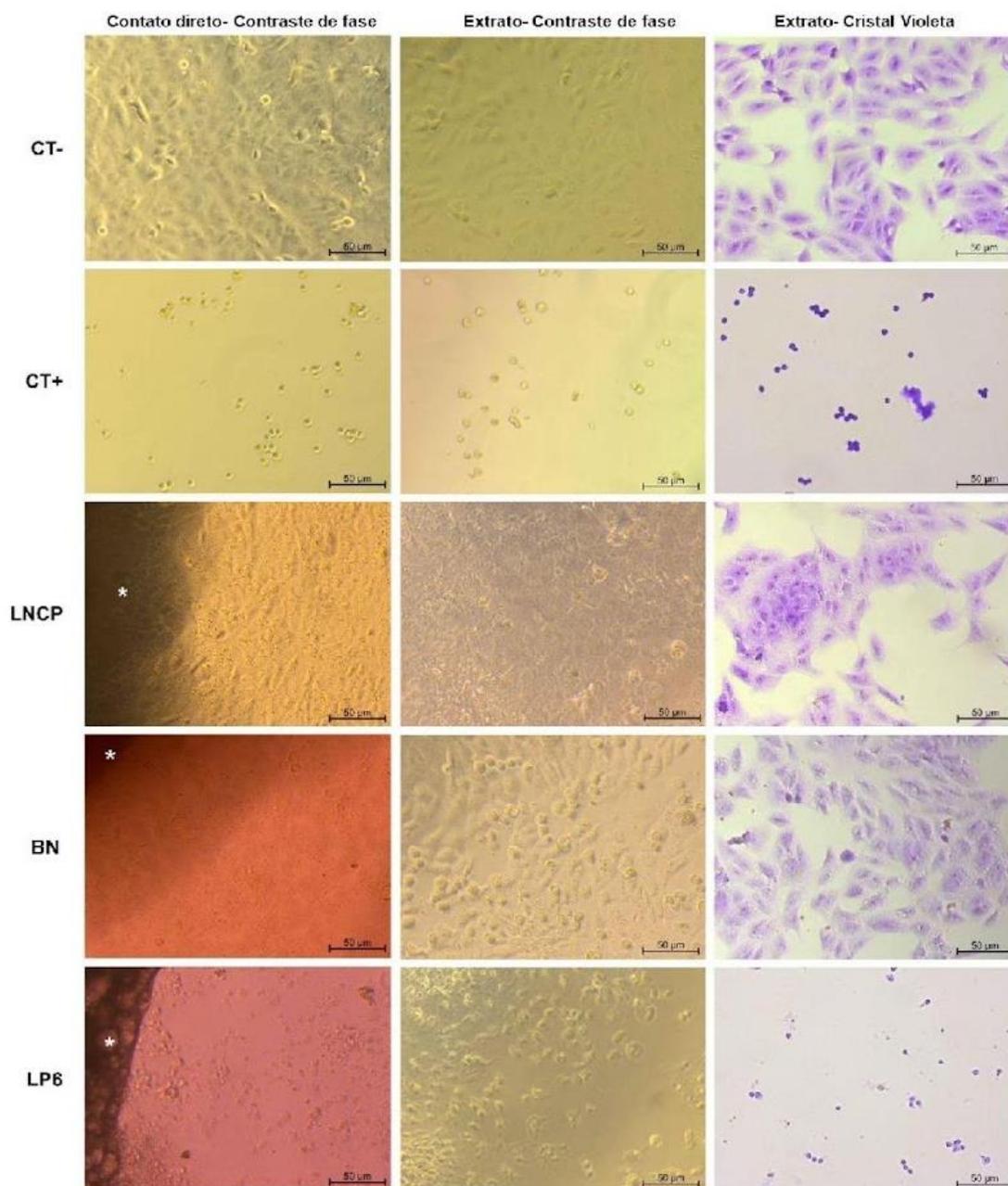


Figura 9. Análise morfológica da citotoxicidade direta e de extrato. Nos diferentes grupos experimentais as células vero foram observadas após 24 h de incubação em duas condições: na primeira coluna, citotoxicidade por contato direto (analisada por contraste de fase) na segunda coluna citotoxicidade por extrato (contraste de fase) e na terceira coluna, citotoxicidade por extrato (analisado por CV). As abreviaturas correspondem ao controle negativo: CT-, controle positivo: CT+, BN: Borracha Natural, LNCP: Látex Não Centrifugado e Purificado e LP6: Látex Purificado 6 vezes. O (*) indica o material em contato direto. Barra de escala: 50 µm.

Foi identificada no CT-, por meio da coloração de CV, uma camada celular com regiões de confluência e semiconfluência, presença de células com núcleos basófilos e

descondensados e núcleos evidentes. O citoplasma das células apresentava leve basofilia e sem sinais de vacuolização. No grupo de toxicidade CT+, as células estavam retraídas e arredondadas, com núcleos picnóticos e quase nenhum citoplasma visível. LP6 indicou citotoxicidade por extrato, apresentando alterações celulares e morfologia consistente com CT+. As células tanto do LNCP quanto do BN apresentaram um padrão semelhante ao CT-. Porém, o número de células na BN foi menor do que o observado neste controle (Figura 10).

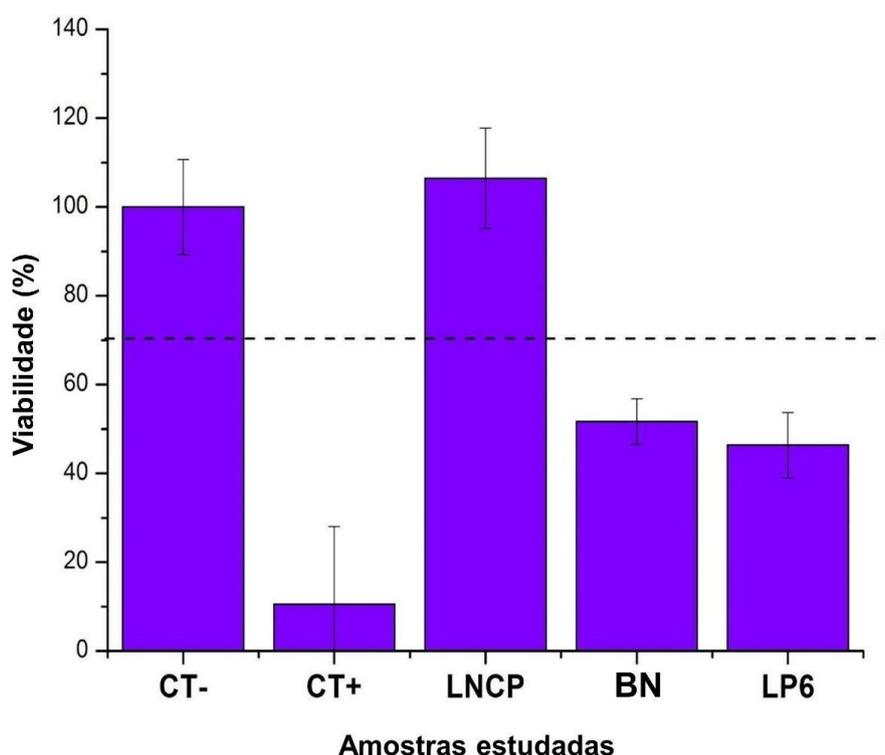


Figura 10. Viabilidade celular pelo cultivo das células vero, por extrato das diferentes amostras estudadas. A linha tracejada indica o limiar de citotoxicidade. Controle negativo CT-, controle positivo CT+, látex não centrifugado e purificado (LNCP), borracha natural (BN) e látex purificado 6 vezes (LP6).

As características da superfície e a composição de um material impactam diretamente as respostas celulares. As estratégias de purificação utilizadas na amostra LP6, que resultaram em uma superfície mais lisa (conforme observado nas imagens MEV), podem ter influenciado a absorção proteica e as cargas superficiais, conforme indicado pelo teste de potencial zeta de superfície. Segundo NASCIMENTO et al. (2018) a hidrofobicidade dos materiais pode afetar o crescimento e a adesão celular. No entanto, estudos de MOLINA et al. (2011) mostraram que superfícies hidrofóbicas com rugosidade em sua morfologia podem promover a proliferação e adesão celular. Os

resultados do MEV confirmam que os grupos LNCP e BN apresentaram superfícies mais rugosas em comparação ao grupo LP6, que apresentou superfície mais lisa. Isto corrobora diretamente com os resultados obtidos para crescimento e adesão celular. Além disso, deve-se notar que a cor do meio contendo amostras de LP6 mudou após a inoculação com células Vero (dados não mostrados). Sugere-se que grupos químicos presentes nas amostras de LP6 foram solubilizados ou liberados no meio, potencialmente alterando seu pH. Essa mudança no pH pode levar à acidose e subsequente morte celular.

SANTOS et al. (2012) demonstraram que elásticos ortodônticos à base de látex podem resultar em menor viabilidade celular em comparação com produtos similares sem látex em sua composição. Porém, deve-se ressaltar que no estudo o látex referido pelos autores é a borracha natural e não o látex puro. Portanto, os dados obtidos são consistentes com esses resultados. O estudo também investigou o impacto de diferentes níveis de pH (5,0; 6,0 e 7,5) nos elásticos ortodônticos em termos de viabilidade celular. Foi encontrada uma correlação significativa entre a diminuição do pH e as interações entre os grupos de pH e as células controle. Na fisiologia humana, a concentração de íons H⁺ nos fluidos corporais é normalmente mantida em um nível baixo, com o pH sendo inversamente proporcional à concentração de H⁺. O limite inferior de pH no qual uma pessoa pode viver por mais de algumas horas é de aproximadamente 6,8, enquanto o limite superior é de cerca de 8,0. Portanto, os níveis de pH alcalino são geralmente mais bem tolerados (GUYTON e HALL 2021).

Considerando que o látex contém propriedades alergênicas (ALLERGEN.ORG), o presente resultado mostrou que as células cultivadas em extratos de LNCP apresentam padrão semelhante ao CT⁻, indicando que esta amostra pode ser considerada não citotóxica (ALLERGEN.ORG). De acordo com BERTHELOT et al. (2014), as principais proteínas responsáveis por desencadear alergias nos indivíduos são REF (fator de alongamento de borracha) e SRPP (proteína de pequenas partículas de borracha). No entanto, estas alergias foram tipicamente observadas em indivíduos que usam frequentemente luvas de látex. Em contraste, embora as células BN e LP6 apresentassem maior crescimento celular em comparação com CT⁺, a redução na viabilidade foi inferior a 30 % do controle CT⁻. De acordo com a ISO 10993-5, uma redução na viabilidade celular superior a 30 % é considerada um efeito citotóxico. LEITE et al. (2020) relataram resultados favoráveis na cicatrização/reepitelização de lesões cutâneas em ratos utilizando soro de látex de *Hevea brasiliensis* a 1 %, que foi submetido a filtração para

remoção de proteínas de até 10 kDa. Isto destaca os impactos das variações de processamento nas respostas celulares, incluindo a composição das superfícies que rodeiam as partículas de látex e a libertação de grupos químicos solúveis no meio.

Outros efeitos benéficos das proteínas BN podem ser observados em estudos *in vivo*. CURY et al. (2019) demonstraram que a presença de proteínas BN em suturas utilizadas para reparo do tendão de Aquiles em ratos melhorou a síntese de colágeno tipo I e reduziu a expressão de MMP-2 (metaloproteinases de matriz), necessárias para a matriz extracelular do tendão e da homeostase.

4. CONCLUSÃO

Os resultados evidenciaram que o látex purificado seis vezes (LP6) apresentou um material menos estável, com alterações notáveis em sua estrutura física, menor taxa de intumescimento, diminuição da adesão celular e uma carga de superfície negativa reduzida. Esses achados sugerem que o processo de purificação tem um impacto notável nas características físico-químicas e biológicas do látex. Em contraste, a BN derivado do látex da árvore *Hevea brasiliensis* não necessita da fase de desproteinização dependendo da aplicação requerida. As proteínas e lipídios presentes no grupo LNCP poderiam potencialmente ter uma influência positiva em sua estrutura e melhorar seu desempenho em diversas aplicações médicas. No entanto, é importante enfatizar que a necessidade de desproteinização e purificação do BN derivado do látex natural deve ser considerada para cada aplicação pretendida do material.

Capítulo IV

Development and Characterization of Latex and Poly (Vinyl Alcohol) - based Membranes and their Potential as Dermal Wound Dressings

Esse artigo foi submetido ao periódico *Macromolecules* com fator de impacto 5.1.

Submissão em 20/08/2024

Desenvolvimento e Caracterização de Membranas à Base de Látex e Poli(Álcool Vinílico) e seu Potencial como Curativos Dérmicos

Jessica Asami^{a,b*}, Bruna V. Quevedo^{b,c}, Arnaldo R. Santos Jr^d, Luciana Pastena Giorno^d, Elidiane C. Rangel^f, Daniel Komatsu^{b,e}, Eliana Aparecida de Rezende Dueka^{b,c,e}

^aMechanical Engineering Faculty (FEM), State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

^bLaboratory of Biomaterials, Faculty of Medical Sciences and Health (FCMS), Pontifical Catholic University of São Paulo (PUC-SP), Sorocaba, SP, Brazil.

^cPostgraduate Program in Materials Sciences (PPGCM), Federal University of São Carlos (UFSCar), Sorocaba, SP, Brazil.

^dCenter of Natural and Human Sciences, Federal University of ABC (UFABC), São Bernardo do Campo, SP, Brazil.

^ePost-Graduation Program of Biomaterials and Regenerative Medicine (PPGBMR), Surgery Department, PUC-SP, Sorocaba, Brazil.

^fLaboratory of Technological Plasma, Institute of Science and Technology, São Paulo State University (UNESP), Sorocaba, SP, Brazil.

Resumo

A pesquisa em regeneração cutânea ganhou importância na medicina, visando minimizar o processo irregular de cicatrização de feridas, que aumenta a suscetibilidade a infecções crônicas. Embora tratamentos convencionais, como enxertos de pele, terapia celular e fatores de crescimento, sejam amplamente utilizados, eles frequentemente implicam em altos custos e exigem procedimentos cirúrgicos. Portanto, a busca por produtos dermatológicos de baixo custo, eficazes e fáceis de usar é crucial. O látex, um polímero natural derivado da seringueira, e o polímero sintético Poli(álcool vinílico) (PVA) adquirem características como biocompatibilidade, elasticidade, facilidade de processamento, estímulo à angiogênese, além de baixos custos de produção. O estudo foi

conduzido comparando quatro diferentes proporções de látex/PVA na membrana, especificamente 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10, respectivamente. As técnicas empregadas incluíram espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TG), calorimetria diferencial de varredura (DSC), teste de intumescimento, teste de tração mecânica, análise Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), medição do potencial zeta e ensaio biológico *in vitro*. Os resultados demonstraram que as membranas com uma composição de 75/25 e 80/20 exibiram propriedades físico-químicas e mecânicas superiores para aplicação dérmica. A análise por MEV revelou homogeneidade, porosidade e rugosidade superficial nas membranas com essas duas composições. Consistente com os ensaios biológicos *in vitro*, que mostraram melhor adesão e proliferação celular na superfície da membrana, indicando seu potencial promissor como curativo para feridas dérmicas.

Palavras-chave: *Hevea brasiliensis*, cicatrização dérmica, curativo dérmico, biomaterial, engenharia tecidual.

1. INTRODUÇÃO

A pele saudável desempenha um papel vital na proteção do corpo contra patógenos, radiação ultravioleta e perda de água, além de contribuir para a homeostase através das percepções sensoriais das condições normais KATIYAR et al. (2022). Quando a pele é afetada por trauma ou doença, suas funções fisiológicas são comprometidas e sua aparência é danificada (WEI et al. 2021). A busca por terapias que combinem o processo de cicatrização da ferida cutânea (processo convencional), a refuncionalização da área lesionada e, simultaneamente, o desempenho estético (processo regenerativo) da pele torna-se um desafio para o campo biomédico (TOTTOLI et al. 2020).

Os biomateriais, por sua vez, exibem alta funcionalidade no campo da pesquisa em regeneração dérmica, possuindo características que auxiliam no processo de cicatrização e regeneração, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades anti-inflamatórias e hemostáticas, propriedades antibacterianas, bem como propriedades bioativas (KONOP et al. 2022).

Considerando esses aspectos dos biomateriais, o látex é uma solução coloidal extraída da *Hevea brasiliensis*, mais conhecida como seringueira. A composição do látex

consiste em aproximadamente 40 % de polímero natural (cis-1,4-poliisopreno), 50 % de água e aproximadamente 10 % de constituintes não borracha, incluindo lipídios, carboidratos e proteínas (ANDRADE et al. 2022). A não citotoxicidade, as propriedades físicas inerentes e a capacidade angiogênica (HERCULANO et al. 2024) do látex o tornam um biomaterial promissor para várias aplicações biomédicas, especialmente para a regeneração da pele (TORRES et al. 2023).

Um estudo *in vivo* indicou que o látex e suas frações aceleraram o processo de cicatrização de feridas em roedores, bem como aumentaram a proliferação celular na área da lesão. Além disso, as proteínas do látex mostraram aumento na síntese de colágeno por células fibroblásticas (MORAIS et al. 2024). Segundo ZANCANELA et al. (2019), experimentos realizados *in vitro* demonstraram que membranas de látex incorporadas com extrato de própolis liberaram o extrato no meio, exibiram ação antibacteriana e não apresentaram citotoxicidade para células fibroblásticas de ratos. Além disso, a membrana à base de látex natural poderia atuar como barreira contra agentes infecciosos e fornecer proteção química e mecânica na região da ferida.

O Poli(álcool vinílico) (PVA) é um polímero sintético macromolecular com biodegradabilidade, biocompatibilidade e propriedades físico-químicas e mecânicas que contribuem para o uso em aplicações biomédicas (ZHONG et al. 2024). A estrutura do PVA pode ser customizada para tais aplicações, tanto na forma de hidrogéis (CHEN, 2022) quanto em sua forma reticulada, que pode ser obtida através de reticulação a baixa temperatura ou química (FERREIRA et al. 2020; BERSANETTI et al. 2019). As características intrínsecas do PVA contribuem para aplicações como engenharia de tecidos, liberação de fármacos, cicatrização de feridas e dispositivos médicos (PEREIRA et al. 2023; TURKOGU et al. 2024).

O PVA puro, por sua vez, não possui as propriedades mecânicas exigidas para aplicações biomédicas; portanto, estudos visam melhorar e controlar sua estrutura e função através da incorporação de diferentes materiais e componentes, tornando-o um candidato ideal para vários tratamentos, bem como para o desenvolvimento de curativos (ZHONG et al. 2024). Além disso, o polímero é comumente utilizado em conjunto com outros tipos de biomateriais, como polímeros naturais (NICÁCIO e LEITE 2022) e cerâmicas (KUMAR et al. 2019), que melhoram o desempenho do material final.

Estudos têm mostrado que o PVA incorporado com fibroína melhora as características físicas, mecânicas e biológicas (*in vitro* e *in vivo*) para aplicação dérmica,

tornando-se um material capaz de regenerar a pele (ZHOU et al. 2023). Além disso, de acordo com ARRIAGA et al. (2021), o PVA demonstrou ser um material com grande potencial para a liberação sustentada de fármacos sintéticos, devido à sua significativa influência na reticulação e biodegradabilidade, mostrando-se promissor em aplicações para feridas cirúrgicas.

Trabalho recente de ZHOU et al. (2022) demonstrou em sua análise bibliométrica que os biomateriais representam áreas de pesquisa promissoras no campo da regeneração da pele. Além disso, os autores mencionaram os biomateriais mais utilizados em pesquisas relacionadas ao avanço de curativos dérmicos, como colágeno, alginato, gelatina, ácido hialurônico, celulose e seda. Considerando esse fato, o desenvolvimento de curativos baseados em outros biomateriais, como látex e PVA, torna-se relevante nesta área, pois são biomateriais inovadores para aplicação na regeneração dérmica. Diante dessa circunstância, o objetivo deste estudo foi formular membranas à base de látex/PVA em várias proporções (50/50, 75/25, 80/20 e 90/10) para uso como curativos dérmicos, visando utilizar materiais de baixo custo e facilmente escaláveis. Além disso, nosso objetivo foi desenvolver uma solução eficaz para tratar diferentes tipos de feridas e promover a regeneração da pele.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Síntese da Solução de Látex/PVA

Para a solução de látex (LNCP) 10 %, foi utilizado 6 g do material em 60 mL de clorofórmio P.A (Labsynth[®]) e mantido sob agitação magnética em temperatura ambiente até completa dissolução. Já para a solução de PVA (Merck/Sigma[®]) 10 %, foi utilizado 6 g do polímero em 60 mL de água destilada mantido em agitação magnética com temperatura de aproximadamente 80 °C até a diluição do material.

2.2 Preparação da Membrana de Látex/PVA

As soluções de látex/PVA foram preparadas de acordo com dados da **Tabela 1**.

Tabela 1. Volume utilizado para o desenvolvimento de cada membrana com diferentes porcentagens de látex/PVA, respectivamente.

Proporção de látex/pva (%)	Volume de látex (ml)	Volume de pva (ml)	Volume final da membrana (ml)
50/50	7,5	7,5	15
75/25	11,25	3,75	15
80/20	12	3	15
90/10	13,5	1,5	15

As soluções foram homogeneizadas manualmente com o auxílio de um bastão de vidro, nas composições previamente descritas (**Tabela 1**) colocadas em placas de petri de teflon e congeladas no freezer (-20 °C) por 24 h. Após as 24 h de congelamento, foram retiradas do freezer e deixadas em temperatura ambiente para evaporação do solvente por aproximadamente 8 horas. Esse processo de congelamento e descongelamento foi repetido por 2 vezes, para a reticulação do PVA. As amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 4 dias para que o solvente fosse evaporado por completo.

2.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR foi para identificar e caracterizar a estrutura química das amostras de látex puro, PVA puro, látex/PVA 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10, utilizando um espectrofotômetro Perkin Elmer em modo ATR (Spectrum 65 FT-IR). A análise foi realizada na faixa de número de onda de 4000 a 600 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e 64 varreduras.

2.4 Análise de Termogravimetria (TG)

A estabilidade térmica das amostras látex puro, PVA puro, látex/PVA 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10, foi avaliada usando análise TG com um equipamento modelo Discovery TGA 55 da TA Instruments (TA Instruments, EUA). Aproximadamente 5 mg de cada amostra foi aquecido de 25 a 300 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio.

2.5 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise DSC foi realizada usando um equipamento TA Instruments Discovery DSC 25. Amostras látex puro, PVA puro, látex/PVA 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10, com 5 mg foram hermeticamente seladas em recipientes de alumínio e submetidas a

aquecimento de 25 a 150 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹. Após atingir a temperatura de 150 °C, as amostras foram resfriadas até -50 °C a uma taxa de resfriamento de 10 °C.min⁻¹ e mantidas a essa temperatura por 1 minuto. Por fim, as amostras foram aquecidas novamente (taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹) até 300 °C. A análise foi conduzida sob uma atmosfera de nitrogênio com uma taxa de fluxo de 5 mL.min⁻¹.

2.6 Ensaio de Intumescimento

As amostras látex puro, PVA puro, látex/PVA 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10 foram submetidas a um teste de intumescimento usando uma membrana com 3,0 cm (comprimento) x 1,5 cm (largura). As amostras foram pesadas e, em seguida, imersas em 10 mL de solução de PBS a 37 °C por um total de 10 dias. No primeiro dia de análise, as amostras foram pesadas nos seguintes intervalos: 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos. Após o primeiro dia, as amostras foram pesadas a cada 24 horas. O teste de intumescimento foi realizado em duplicata. O percentual de intumescimento (%) de cada amostra foi calculado usando seu peso inicial (W_0) e seu peso após absorção (W_t), usando a equação 1 descrita por ALVES et al. (2016):

$$\text{Intumescimento}(\%) = \left[\frac{W_0 - W_t}{W_0} \right] \times 100 \quad (1)$$

2.7 Análise de Potencial Zeta

A análise de potencial zeta foi realizada por um analisador eletrocínético (SurPASS, Anton Paar GmbH, Áustria). O potencial zeta das superfícies das amostras, látex puro, PVA puro, látex/PVA 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10 foram medidas em função das alterações de pH de uma solução eletrolítica de cloreto de potássio 0,001 M. O pH da solução foi ajustado adicionando 0,05 M de HCl ou 0,05 M de NaOH usando a unidade de titulação automática do instrumento. As amostras foram fixadas em um suporte plano de amostra medindo 20 mm (comprimento) e 10 mm (largura) de cada lado, com a distância entre as superfícies ajustada para $100 \pm 10 \mu\text{m}$. O potencial zeta foi realizado em duplicata e todas as medições foram conduzidas à temperatura ambiente.

2.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Todas as amostras látex puro, PVA puro, látex/PVA 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10 foram metalizadas com uma camada de ouro de 20 nm usando um metalizador por pulverização catódica Leica EM ACE600. Em seguida, foi realizada a análise com Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (FEI Quanta 250) operando a uma tensão de aceleração de 3 kV e um detector de elétrons secundário. Imagens de baixa ampliação da morfologia da superfície de cada amostra foram analisadas.

2.9 Ensaio Mecânico de Tração

As propriedades mecânicas das membranas de látex puro, PVA puro, látex/PVA de 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10 foram avaliadas pelo teste de tensão/ deformação. Para a realização das medidas foi utilizado um equipamento universal de ensaios mecânicos da marca Instron modelo EMIC 23-30 com célula de carga de 50 kg, seguindo a norma ASTM D412 com as amostras nas seguintes dimensões 44 mm de comprimento x 15 mm de largura x 0,5 mm de espessura. O ensaio foi realizado em quintuplicata à temperatura ambiente e com taxa de deslocamento de garras de 500 mm/ min, como estabelecido pela norma.

2.10 Caracterização Biológica - Citotoxicidade Direta e Citoquímica

Para o ensaio de viabilidade celular membranas de látex puro, PVA puro, látex/PVA de 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10 foram preparadas direto na lamínula de vidro de 13 mm e esterilizadas em luz UV germicida por 12 horas. Foram utilizadas células Vero, derivadas de células renais de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Essas células foram provenientes do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, Brasil). Esta linha celular específica é recomendada para investigar citotoxicidade e interações célula-biomateriais de acordo com padrões internacionais (ASTM F813-20, 2011; ISO 10993-5, 2009; ISO 10993-12, 2012). As células foram cultivadas em meio 199 (Lonza, EUA) suplementado com 10 % de SFB (Nutricell, Campinas, SP, Brasil) e mantidas a 37 °C em atmosfera com 5 % de CO₂.

Para o ensaio de citotoxicidade da membrana, fragmentos de cada material (LNCP, BN e LP6) foram colocados assepticamente em placa de cultura celular de 24 poços e imersos em meio (Lonza) suplementado com 10 % de SFB (Nutricell). A proporção entre fragmentos de material e meio foi mantida em 0,6 cm³/ml e nenhuma

agitação foi aplicada. A placa foi então incubada a 37 °C com 5 % de CO₂ por 24 horas. Posteriormente, o meio resultante, considerado extrato, foi coletado para cultura celular. As células Vero foram introduzidas em placas de cultura nas concentrações anteriormente mencionadas, permitindo-lhes aderir durante 2 horas. Em seguida, o meio de cultura foi substituído pelos extratos obtidos anteriormente. As células Vero foram então cultivadas por mais 24 horas dentro desses extratos a 37 °C com 5 % de CO₂.

As imagens microscópicas foram capturadas usando um microscópio de luz invertida Zeiss Axio Vert A1 (Zeiss) com óptica de contraste de fase e objetiva de 20 x. Após o período de cultura, as células foram fixadas com 100 µL de solução de formaldeído a 10 % (em tampão fosfato 0,1 M em pH 7,2) por 30 minutos. Após a fixação, as células foram enxaguadas com água destilada e coradas com 100 µL de Cristal Violeta (CV) por 20 minutos para facilitar a análise morfológica. Para análise quantitativa, as amostras foram submetidas a duas lavagens com água destilada seguida de incubação em solução de citrato de sódio a 5 % (em metanol a 20 %) por 30 minutos. A absorbância das amostras foi lida utilizando o leitor de microplacas Epoch (Biotek) em um comprimento de onda de 540 nm sob todas as condições experimentais.

Para a segunda fase, foi realizado o mesmo procedimento de cultivo celular descrito anteriormente, nas amostras de látex/PVA nas composições de 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10, além do CT- (apenas células), CT+ (células submetidas a morte), látex puro e PVA puro. Adicionalmente à coloração de CV, a cultura celular da segunda etapa do trabalho foi analisada também por coloração de Xylidine Ponceau (XP) em pH 2,5 e Azul de Toluidina (AT) em pH 4,0. Essas colorações foram realizadas com o objetivo de analisar: (1) a morfologia, (2) as proteínas totais e (3) o DNA, RNA e glicosaminoglicanos, respectivamente.

2.11 Avaliação da Adesão e Morfologia Celular - Microscopia Eletrônica de Varredura

Para analisar o padrão de adesão celular nos materiais, as células foram inoculadas (1×10^5 células/ml), cultivadas por 24h, fixadas com 3 % de glutaraldeído em tampão salino fosfato 0,1 M pH 7,2 (PBS), lavadas em PBS, desidratadas em etanol, secas em um secador de ponto crítico (Leica EM CPD300), revestidas com ouro (Sputtering Leica EM ACE 200), e observadas em microscopia eletrônica de varredura FEI Quanta 250.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A **Figura 1** apresentou as imagens macroscopicamente das membranas de látex/PVA nas composições de 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10, respectivamente. Verifica-se que há diferença na morfologia da superfície de cada amostra. Tais amostras foram obtidas através do processo de casting.

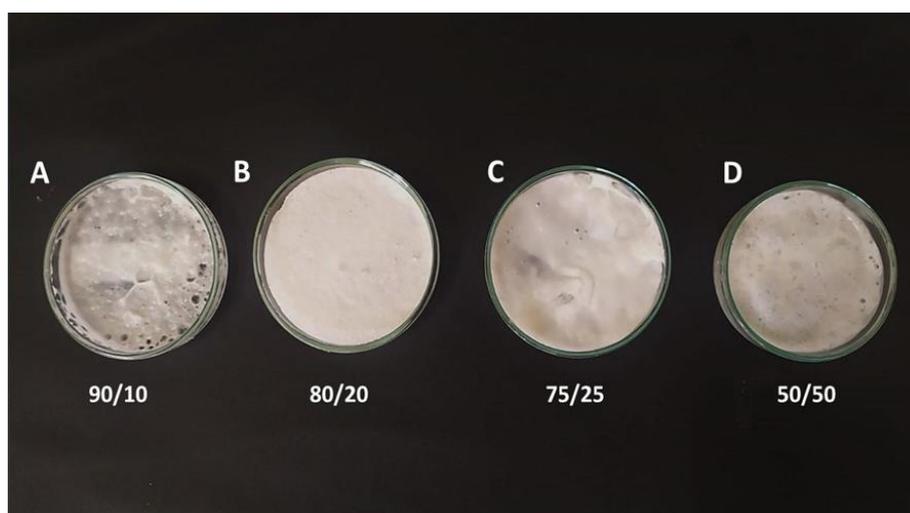


Figura 1. Imagem macroscópica das membranas de Látex/PVA nas seguintes composições, respectivamente: A) 90/10, B) 80/20, C) 75/25 e D) 50/50.

3.1 Análise de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR ATR)

Os espectros obtidos pela análise de FTIR para amostras de látex puro, PVA puro e látex/PVA nas diferentes composições de 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10 foram apresentados na **Figura 2**.

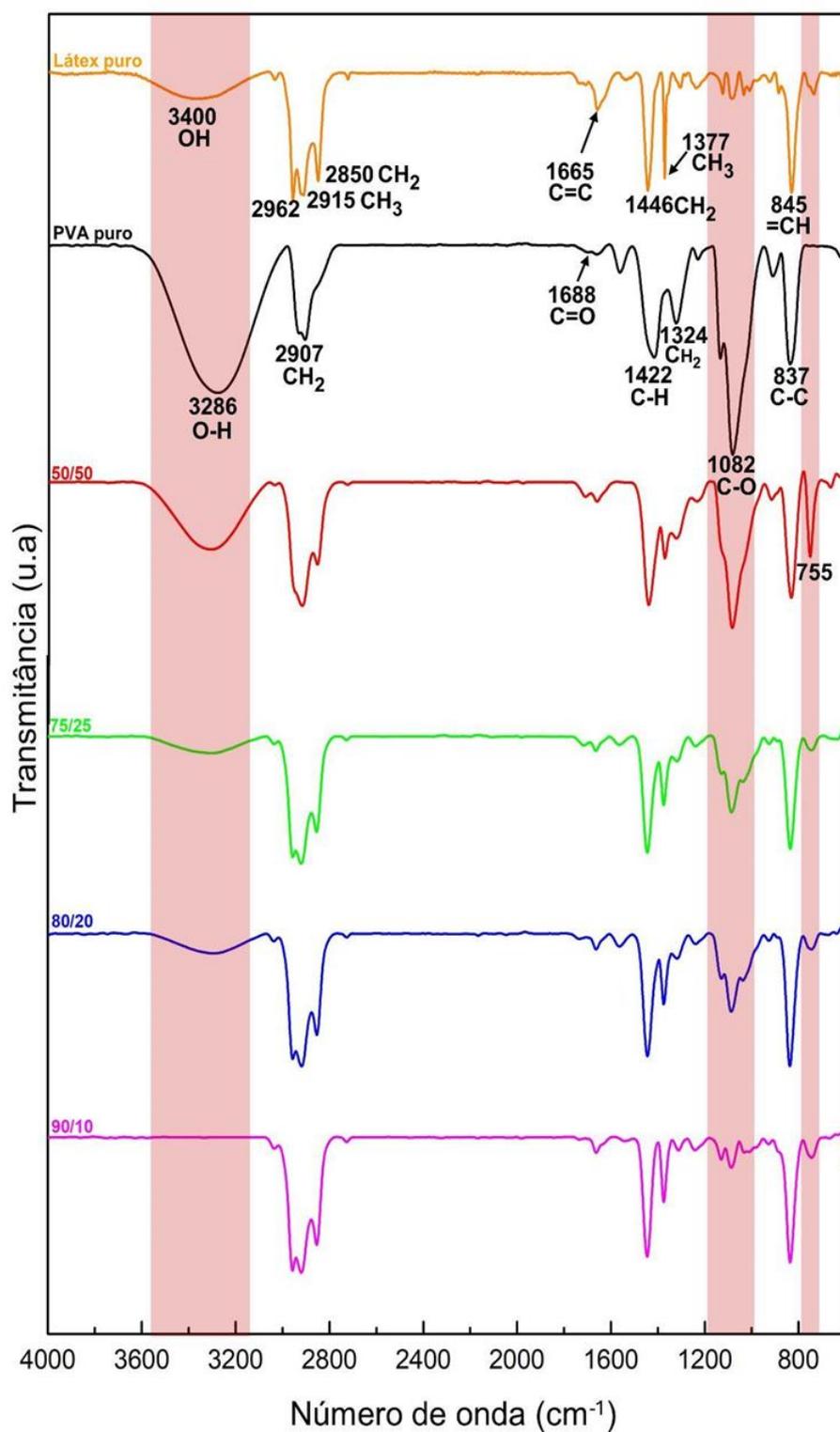


Figura 2. Análise de FTIR do látex puro, PVA puro e nas respectivas composições de látex/PVA, 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10, respectivamente.

O látex puro apresentou os principais picos em 3400, 2915 e 2850 cm^{-1} , atribuídos aos estiramentos -OH dos grupos hidroxilas, estiramentos simétrico e assimétrico das

ligações =CH, respectivamente. O pico em 1665 cm^{-1} foi associado à vibração de estiramento das ligações C=C, enquanto os picos em 1446 e 1377 cm^{-1} foram relacionados à distorção dos grupos CH_2 e CH_3 . Adicionalmente, o pico em 845 cm^{-1} indicou a vibração de flexão das ligações =CH localizadas fora do plano molecular, indicando a presença de cis-1,4 assim como evidenciado por BARROS et al. (2019) e ASAMI et al. (2023). Os principais picos característicos do PVA, por sua vez, foram observados em 3280 , 2917 , 1688 , 1422 , 1324 , 1082 e 837 cm^{-1} . Esses picos foram atribuídos à vibração de estiramento O–H do grupo hidroxila, vibração assimétrica de estiramento CH_2 , estiramento carbônico C=O, vibração de flexão C–H do CH_2 , vibração de deformação C–H, estiramento C–O de grupos acetil e vibração de estiramento C–C, respectivamente (KHARAZMI et al. 2015).

Foi observado que o pico em 3278 cm^{-1} relacionada ao OH, da estrutura do PVA, esteve presente nos espectros dos grupos 50/50, 75/25 e 80/20, com picos que variam de intensidade devido às diferentes amostras. Esse resultado também foi constatado por PAN et al. (2020) o qual variou a proporção de PVA com ácido hialurônico na membrana em questão. Na membrana de látex/PVA 90/10 não foi evidente o pico, uma vez que a proporção de PVA é diminuída em relação às outras amostras, assim demonstrados em estudos de CHOO et al. (2016). Por sua vez, as amostras de látex/PVA com as diferentes composições exibiram uma combinação das principais bandas presentes nos distintos polímeros (látex puro e PVA puro). Entretanto, a amostra composta por 50/50 exibiu um aparecimento de um pico em 755 cm^{-1} , indicando uma possível interação química entre os polímeros nessa dada proporção (FONFRIA, 2020).

3.2 Análise De Termogravimétrica (TG)

Com a finalidade de avaliar a estabilidade térmica das amostras de látex puro, PVA puro e das membranas compostas por látex/PVA nas diferentes composições (50/50, 75/25, 80/20 e 90/10), foi realizada a análise de TG e DTG (**Figura 3A e B**).

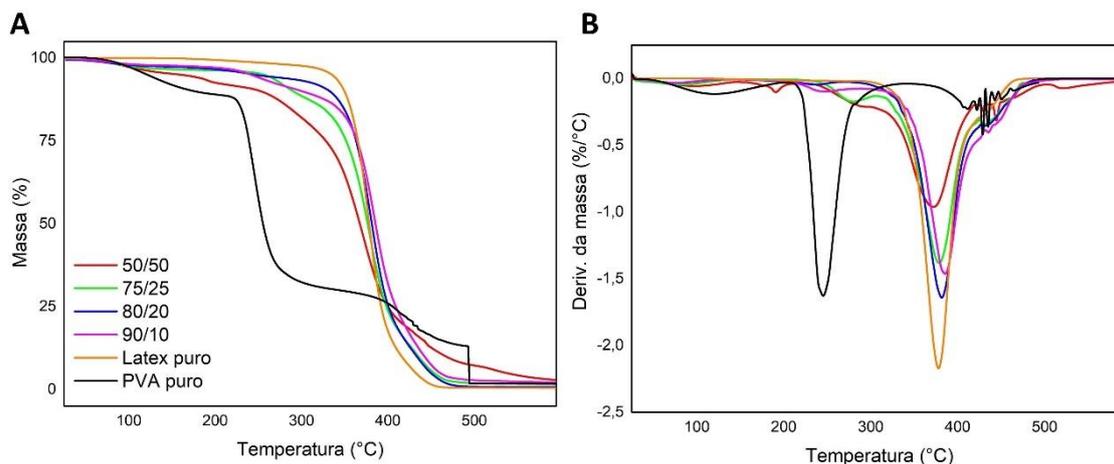


Figura 3. Curvas de (A) TG e (B) DTG da membrana de látex puro, PVA puro e látex/PVA nas composições de 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10, respectivamente.

Conforme observado na curva de TG (**Figura 3A**), o látex puro apresentou uma única etapa de perda de massa, com temperatura de início e fim (T_{onset} e T_{endset}) em 355 °C e 419 °C, respectivamente. Enquanto a sua temperatura onde a perda de massa é máxima (T_{max}) ocorreu em 378 °C. Este evento foi associado à degradação das cadeia poliméricas, atribuídas a cisão das ligações insaturadas do poli(cis 1,4- isopreno) (ASAMI et al. 2023). O PVA, por sua vez, exibiu três eventos térmicos. O primeiro evento ocorreu entre 77 °C e 138 °C e foi associado a evaporação das moléculas de água da estrutura hidrofílica do PVA. Em contrapartida, o segundo estágio acentuado de perda de massa (63 %) ocorreu entre 230 °C e 265 °C com T_{max} em 246 °C foi atribuído à perda dos grupos -OH e desacetilação das cadeias poliméricas do PVA. Por fim, o terceiro evento entre 400 °C e 500 °C, com aproximadamente 16 % de perda de massa, foi associado a degradação da cadeia polimérica (AWADA e DANEULT 2019).

Os eventos significativos de perda de massa, obtidos através das curvas da análise térmica de TG e DTG de todas as amostras analisadas, estão detalhadamente representados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Propriedades térmicas determinadas por TG e DTG em amostras de látex puro, PVA puro, látex/PVA nas composições de 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10, respectivamente.

Amostra	Eventos	T _{onset} (°C)	T _{endset} (°C)	T _{max} (°C)	Perda de massa (%)
Látex puro	1	355	419	378	99
	1	77	138	120	7
PVA puro	2	230	265	245	63
	3	-	-	428	16
50/50	1	-	-	100	4
	2	-	-	190	4
	3	256	316	290	10
	4	342	394	371	66
	5	-	-	428	13
75/25	1	-	-	83	3
	2	248	293	279	7
	3	348	394	378	72
	4	-	-	430	12
80/20	1	-	-	77	2
	2	-	-	236	3
	3	340	395	382	71
	4	-	-	433	17
90/10	1	-	-	74	2
	2	-	-	245	6
	3	354	398	385	70
	4	-	-	436	15

As amostras de látex/PVA em todas as composições investigadas (50/50, 75/25, 80/20 e 90/10) exibiram, de forma pouco acentuada, nas curvas de TG e DTG (**Figura 3 A e B**), a volatilização das moléculas de água em torno de 100 °C, o que foi atribuído a hidrofiliabilidade do PVA. Além disso, a amostra composta por 50/50 também apresentou um evento relacionado a evaporação de moléculas de água ligadas à estrutura do PVA em 190 °C (HONG et al. 2018).

Logo, a membrana na proporção 50/50 exibiu uma perda de massa de 10 % entre 256 e 316 °C com T_{max} em 290 °C. Do mesmo modo, a membrana de 75/25 apresentou uma perda de massa de 7 % entre 248 e 293 °C com T_{max} em 279 °C, tais eventos

térmicos foram atribuídos à desacetilação das cadeias de PVA (AWADA e DANEULT 2015). Por sua vez, a degradação térmica do látex nas respectivas membranas foi observada em aproximadamente 342 °C e 394 °C, o qual correspondeu a uma perda de massa em 66 e 72 % para as amostras compostas por 50/50 e 75/25, respectivamente. Ambas as amostras exibiram um ligeiro deslocamento dos eventos térmicos para temperaturas intermediárias aos eventos dos polímeros individuais. Tal comportamento indica uma fraca interação dos polímeros presentes na membrana (COSTA, MATTOSO, e FERREIRA, 2013).

Por conseguinte, as amostras nas composições de 80/20 e 90/10 apresentaram a desacetilação do PVA através de uma modesta T_{max} em 236 e 245 °C, respectivamente. Esse resultado pode estar associado a menor proporção de PVA nas membranas. Entretanto, a degradação do látex ficou evidenciada por meio da perda de massa acentuada de aproximadamente 71 % para ambas as amostras, entre 340 e 398 °C. Por fim, todas as amostras analisadas exibiram uma perda de massa entre 400 a 500 °C, o qual foi associada à degradação da cadeia polimérica do PVA presente nas membranas (AWADA e DANEULT 2015).

2.2 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O comportamento térmico das membranas compostas por 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10 foram analisadas por DSC, conforme mostra a **Figura 4**.

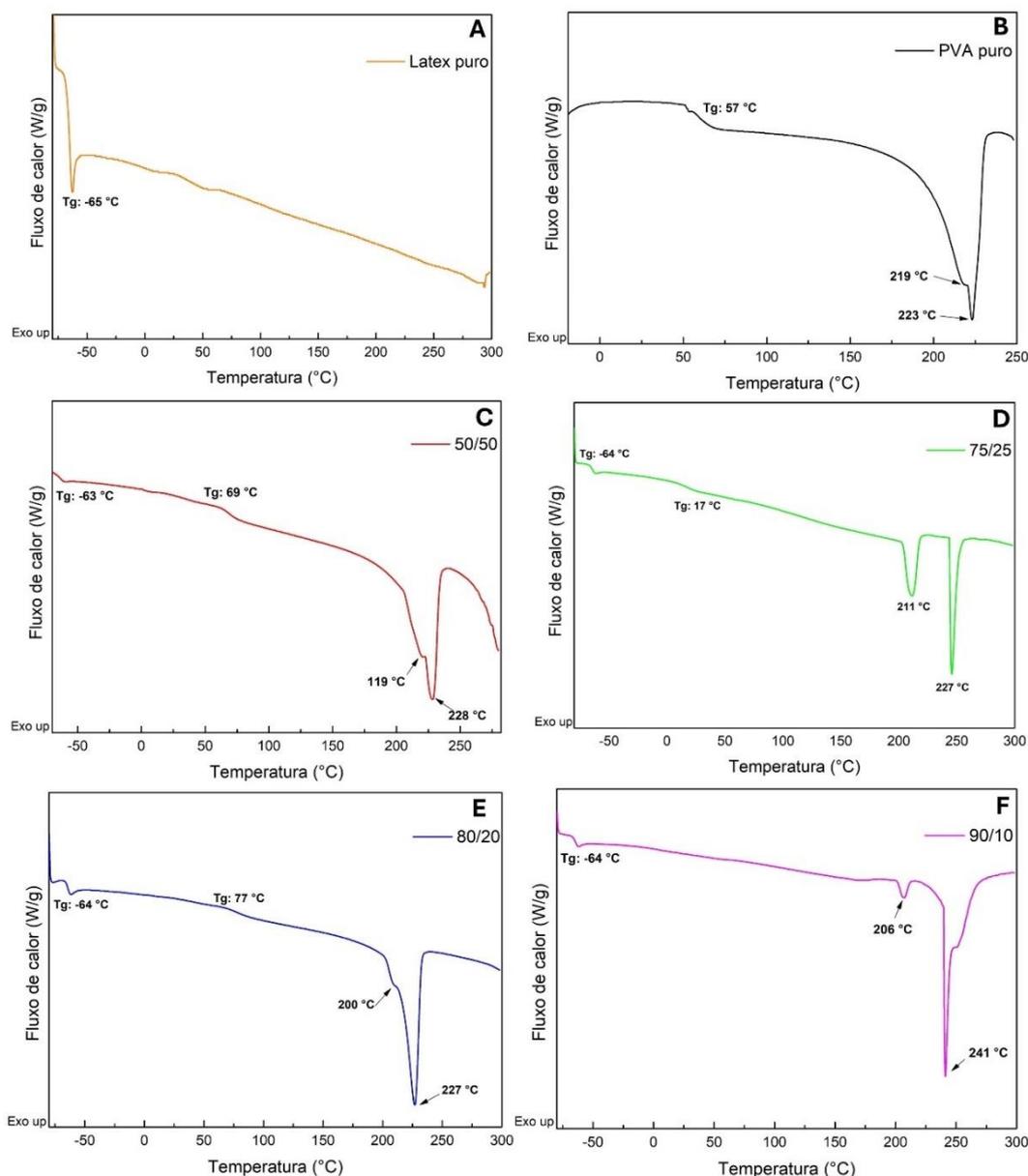


Figura 4. Curvas de DSC das amostras de (A) látex puro, (B) PVA puro, (C-F) das membranas de látex/PVA nas composições de 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10, respectivamente.

A análise de DSC do látex puro (**Figura 4A**) apresentou apenas a temperatura de transição vítrea (T_g) em -65 °C, comprovando sua natureza amorfa. O acentuado evento associado a T_g observado na amostra de látex puro, representa uma maior relaxação da cadeia elastomérica do polímero (CANEVAROLO Jr. 2017). Em contrapartida, a amostras de PVA puro (**Figura 4B**) revelou uma T_g em 57 °C, enquanto eventos endotérmicos em 219 e 223 °C foram associados à fusão da estrutura cristalina do PVA (TIAN et al. 2017).

As amostras compostas por 75/25 e 80/20 (**Figura 4D e E**), no entanto, apresentaram duas distintas T_{gs} associadas aos polímeros individuais presentes na membrana. A presença da T_g em $-64\text{ }^{\circ}\text{C}$ para ambas as amostras foi associada ao látex, enquanto as T_{gs} presentes em $17\text{ }^{\circ}\text{C}$ (75/25) e $77\text{ }^{\circ}\text{C}$ (80/20) foram atribuídas ao PVA. Este fenômeno indicou uma fraca interação de ambos os materiais presentes na membrana, bem como o deslocamento de T_g da epoxidação do látex com o PLA mostrado em estudos de BIJARIMI et al. 2014. Em contrapartida, a amostra na proporção de 50/50 apresentou um comportamento distinto das demais amostras, evidenciando o aparecimento de duas T_{gs} , em $-63\text{ }^{\circ}\text{C}$, relacionado ao Látex e um deslocamento de T_g em $69\text{ }^{\circ}\text{C}$, relacionado ao PVA. Tal deslocamento está associado a uma miscibilidade entre ambos os polímeros nessa dada proporção, mostrando uma mobilidade do polímero quando submetidas ao calor (GUERRA et al. 2018). Da mesma maneira, PINTO et al. (2024) evidenciaram uma única T_g em $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando 1,5 % de borracha natural associado ao PLDLA, mostrando uma possível miscibilidade entre os polímeros. Esse resultado corrobora com os observados na análise de FTIR (**Figura 2**).

A amostra composta por 90/10 (**Figura 4F**) também apresentou o aparecimento de uma única T_g em $-64\text{ }^{\circ}\text{C}$, valor este associado a T_g do látex. Esse resultado aponta para maior concentração de látex na membrana. Por fim, todas as amostras evidenciaram eventos endotérmicos em 200 e $241\text{ }^{\circ}\text{C}$, o qual foi atribuído a cristalização do PVA (HONG et al. 2018).

3.4 Análise de Intumescimento das Membranas de Látex/PVA

O ensaio foi realizado para analisar o comportamento de intumescimento da membrana de látex puro, PVA puro e látex/PVA nas composições previamente estabelecidas, tais como 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10, respectivamente (**Figura 5**).

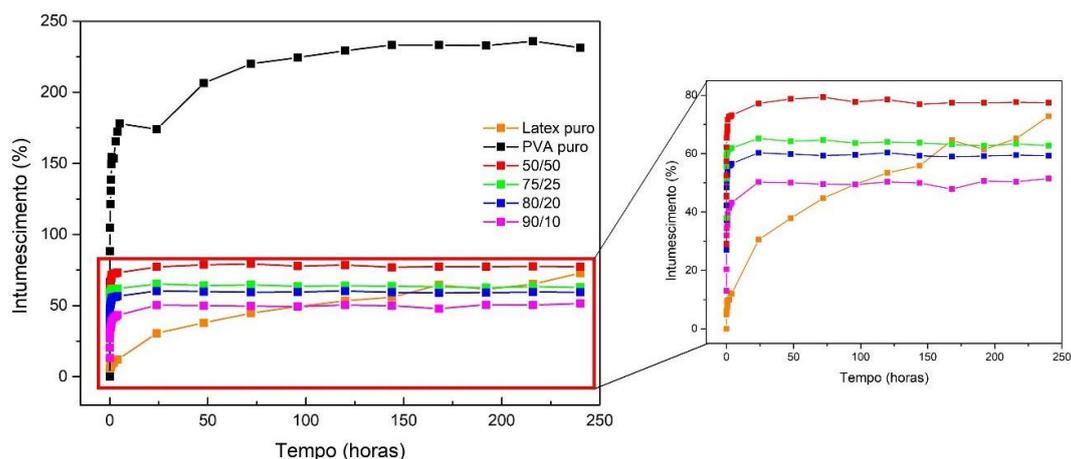


Figura 5. Gráfico do ensaio de intumescimento da membrana de Látex/PVA nas composições de 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10, respectivamente.

No gráfico da porcentagem de intumescimento, foi observado que a membrana de PVA puro apresentou um perfil de intumescimento maior que as demais amostras, mostrando uma taxa de intumescimento em torno de 225 % em 250 horas. Esse comportamento demonstra a característica hidrofílica inerente do PVA (CARDOSO et al. 2024).

Consequente, foi evidenciado que o material com proporção de 50/50, se mostrou com maior taxa de intumescimento ao longo do tempo, aproximadamente 80 % e apresentou uma maior estabilidade física. A proporção de 75/25 e 80/20 tiveram taxa de intumescimento semelhantes, em torno de 60 %. Na amostra de 90/10 houve uma pequena perda de massa do material ao longo do tempo, além de uma menor taxa de intumescimento. Sabe-se que o látex é um material hidrofóbico (NUINU et al. 2022) e o PVA mais hidrofílico (LIU et al. 2019), deste modo, quanto maior a proporção de PVA no material, maior será a taxa de intumescimento do mesmo. O látex, por possuir tais características, estudos tendem a incorporar outros materiais e utilizar processos para melhorar as características, tornando-o material mais hidrofílico, bem como tratamentos por plasma (GARCIA et al. 2021), incorporação com produtos naturais (fécula de batata) (MAHMMOND et al. 2021), modificação com fibras de colágeno (LI et al. 2020) entre outros. De acordo com JOHNS e RAO (2008) mostrou que a hidrofobicidade do látex diminuiu com a presença da quitosana, melhorando a sua permeabilidade estrutural.

Além disso, foi evidenciado que a mistura do látex e PVA em todas as composições melhora a performance de ambos os materiais, uma vez que o PVA tem uma capacidade de intumescimento alta por ser hidrofílico, chegando a valores maiores que

100 % em poucas horas de análise (entre 10 a 20 horas) (ASY-SYIFA et al. 2021) e o látex apresenta uma taxa de intumescimento menor por sua característica hidrofóbica, chegando a valores de até 75 % de intumescimento em um período mais prolongado (250 horas) (ASAMI et al. 2023). Nesse caso, a presença de PVA melhorou tanto a taxa quanto o tempo de intumescimento do látex. Essa taxa equilibrada de intumescimento é importante em aplicações para curativos dérmicos, uma vez que essa capacidade de intumescimento absorve os exsudatos das feridas dérmicas (LIU et al. 2023).

3.5 Ensaio Mecânico de Tração

O ensaio mecânico de tração, apresentado na **Figura 6**, mostrou as curvas típicas de tensão-deformação das amostras de látex puro, PVA puro e látex/PVA em diferentes composições (50/50, 75/25, 80/20 e 90/10).

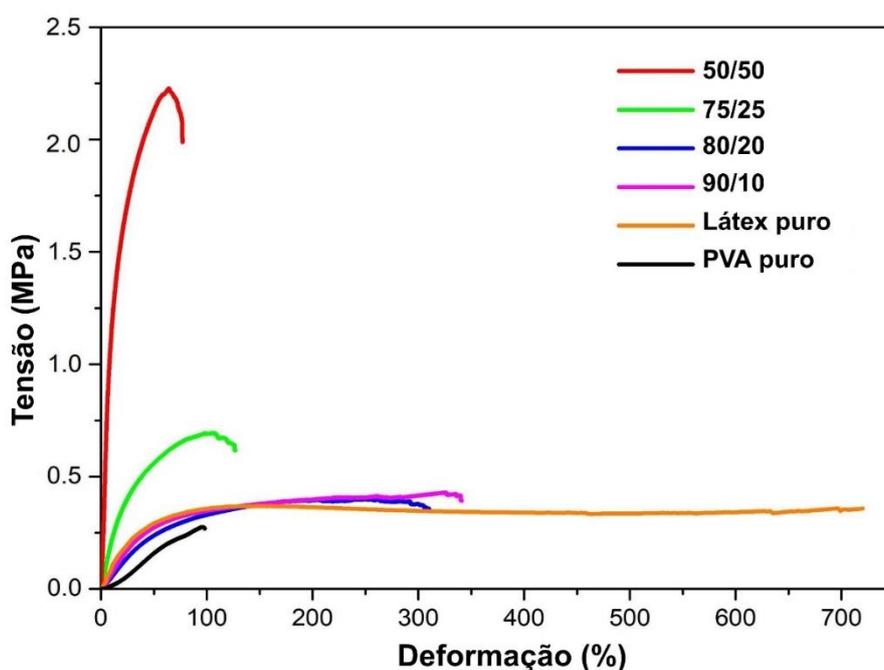


Figura 6. Gráfico dos valores médios de tensão-deformação da amostra de látex/PVA nas composições 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10.

A **Figura 6** apresentou a curva típica de tensão-deformação resultante do ensaio de tração das amostras composta exclusivamente por látex. Conforme evidenciado, o látex apresentou comportamento típico de elastômero, demonstrando uma elevada capacidade de deformação (719 %), acompanhada de uma baixa resistência à tração na ruptura (0,35 MPa) (LIMA et al. 2023). Por outro lado, a amostra composta apenas por

PVA apresentou um comportamento distinto ao látex puro. Embora também tenha exibido uma baixa resistência à tração (0,27), a amostra de PVA apresentou uma baixa capacidade de deformação (96 %), característica típica de materiais dúcteis (AKSAKAL, YARGI, SAHINTURK, 2017).

No entanto, as curvas de tensão-deformação indicam que o aumento gradual da concentração de PVA no sistema de mistura binária constituído por látex e PVA influenciou diretamente nas propriedades mecânicas. A amostra de látex/PVA, na proporção 50/50, apresentou maior resistência à tração (2,2 MPa), porém valor de deformação reduzida (66 %) em comparação com as amostras em menor composição. Tal comportamento indicou características de fragilidade na amostra 50/50. No entanto, ZHOU et al. (2007) e NARASAGOUDR et al. (2020) apontaram que a interação intermolecular entre o PVA e outro componente de uma blenda, como o látex, pode promover um aumento na resistência mecânica do material. Assim, é possível que o processo de reticulação física da amostra tenha facilitado essa interação, como evidenciado pelo espectro de FTIR (**Figura 2**) nesta proporção (50/50), resultando em um material com morfologia mais homogênea, conforme observada na análise MEV (**Figura 7A**), o que contribui para o aumento da resistência mecânica. Comparado à amostra composta por 50/50, a amostra na proporção 75/25 apresentou uma redução significativa da resistência mecânica (0,68 MPa). Entretanto, houve um aumento de 107 % na capacidade de deformação, embora inferior ao observado nas amostras com menor concentração de PVA (80/20 e 90/10). Os resultados obtidos para as amostras 50/50 e 75/25 sugerem que a adição de PVA pode restringir a flexibilidade das cadeias de poli(cis-1,4 isopreno) do látex, resultando em uma diminuição da capacidade de alongamento da amostra (BARROS et al. 2021).

Por outro lado, as amostras contendo uma elevada concentração de látex (80/20 e 90/10), exibiram comportamento intermediário aos componentes puros. Ambas as amostras, exibiram resultados semelhantes de resistência à tração com características de ductilidade e capacidade aprimorada de deformação, além de valores máximos de resistência a tração de aproximadamente 0,38 e 0,41 MPa com deformação de 301 e 338 %, respectivamente. Esse comportamento pode ser atribuído à natureza elastomérica do látex presente na blenda. BARROS et al. (2019) mostra que o látex possui elevada capacidade de deformação (1424,22%) sob baixas tensões (1,454 MPa) e um baixo Módulo de Young (0,078). Estudos realizados por BENJARIMI et al. (2014) indicaram

que um aumento na concentração de látex pode reduzir os valores de tensão de tração na ruptura em todas as composições da mistura. Por se tratar de um elastômero, o látex exibe propriedades intrínsecas de flexibilidade, podendo desempenhar um papel de componente de suporte de carga, facilitando o início e a propagação da deformação. Contudo, a presença de rugosidade, assim como porosidade observada na análise MEV (**Figura 7C e D**) para as amostras compostas por 80/20 e 90/10, também podem ter influenciado na propriedade mecânica observadas para o material (ZHANG et al. 2022). Os valores de Módulo de Young (MPa), tensão máxima de escoamento (MPa) e alongamento (%) são apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Valores médios e respectivos desvios padrão do Módulo de Young, tensão máxima e tensão de ruptura para a blenda látex/PVA nas composições de 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10.

Amostra	Módulo de Young (mpa)	Tensão Máxima de Escoamento (mpa)	Alongamento (%)
Látex puro	0,69 ± 0,08	0,36 ± 0,006	719
Pva puro	5,01 ± 0,07	0,22 ± 0,02	96
50/50	12,41 ± 1,41	2,46 ± 0,07	66
75/25	2,17 ± 0,57	0,71 ± 0,11	105
80/20	0,43 ± 0,27	0,40 ± 0,02	301
90/10	0,56 ± 0,22	0,43 ± 0,04	338

Todas as amostras analisadas demonstraram tendência semelhante em relação à tensão máxima de escoamento e tensão máxima na ruptura. Isto ocorre devido a tensão de tração no ponto máximo da curva de tensão-deformação ocorrer próximo à tensão de ruptura. Por outro lado, observou-se que o Módulo de Young obtido é inversamente proporcional ao alongamento (MUSA e HAMEED 2020). O Módulo de Young reflete os valores de resistência à deformação plástica dos corpos de prova (GUERRA et al. 2018). Por ser um material elastomérico, o látex puro apresentou um valor de Módulo de Young (0,69 MPa) relativamente menor que o observado para o PVA puro (5,01 MPa). Assim, as amostras com menor teor de PVA, 80/20 e 90/10, apresentaram uma redução de aproximadamente 95% no módulo de Young em comparação com as amostras 50/50 e 75/25. A inclusão de látex contribuiu para uma significativa redução na rigidez no material (HUANG et al. 2008; BARROS et al. 2019). De acordo com GUERRA et al. (2018), valores de Módulo de Young inferiores a 1 MPa são considerados adequados para

engenharia de tecidos dérmicos. Os baixos valores de Módulos de Young obtido para as blendas 80/20 e 90/10 (**Tabela 3**), sugerem que o biomaterial formado pode ser aplicado em tecidos moles, conforme indicado por CARAZZAI et al. (2021). Estudos indicam que um curativo ideal não necessariamente requer uma alta resistência à tração, mas deve possuir características como flexibilidade para cobrir o tecido lesionado, maciez e de facilidade de manuseio, criando um ambiente propício para auxiliar no processo de reparo tecidual (GUO et al. 2022; RAO et al. 2021; EGRI e EDERMIR 2019; RAFIEIAN et al. 2019).

3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A **Figura 7** mostrou as eletromicrografias obtidas por MEV da superfície das membranas de látex puro, PVA puro, látex/PVA nas diferentes composições, 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10, respectivamente.

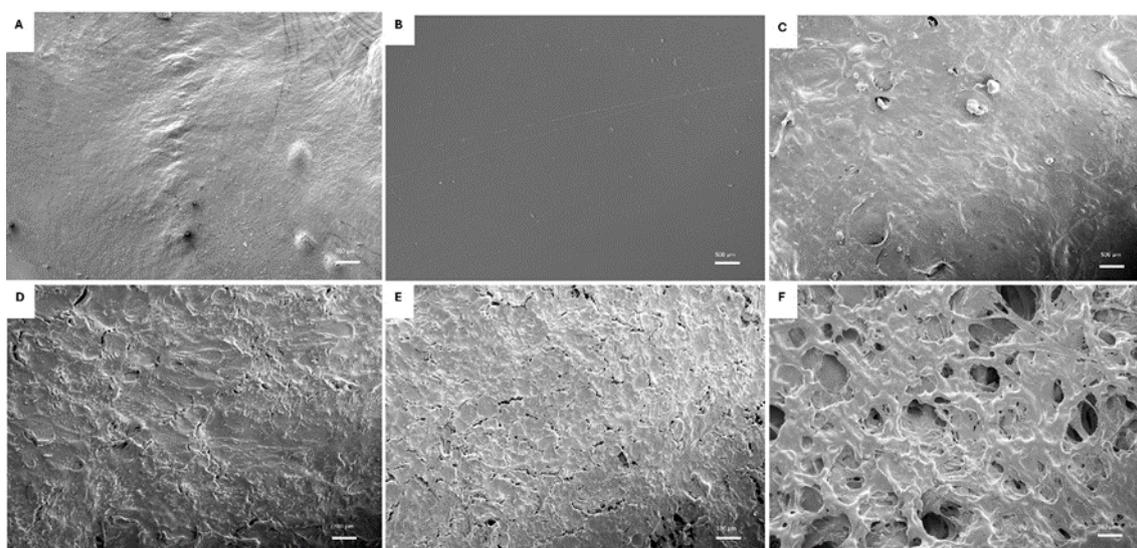


Figura 7. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das membranas de Látex/PVA onde A: látex puro; B: PVA puro, C: 50/50; D: 75/25; E: 80/20 e F: 90/10.

A estrutura superficial dos materiais látex puro e PVA puro (**Figura 7A e B**) são muito bem descritos na literatura (ASAMI et al. 2023; HOANG et al. 2019; HOANG et al. 2020). O látex puro se apresenta com uma superfície rugosa, com algumas estrias ao longo da membrana (ASAMI et al. 2023). Em contrapartida, o PVA puro possui uma superfície lisa, sem rugosidades e estrias (HOANG et al. 2019; HOANG et al. 2020).

A superfície da membrana de Látex/PVA, conforme demonstrado pelas imagens de MEV, varia de acordo com suas respectivas composições. A **Figura 7C** da amostra de Látex/PVA na proporção de 50/50 mostrou uma superfície mais homogênea sem muitas estrias e poros, com morfologia semelhante ao PVA puro. Essa morfologia se dá pela proporção de PVA contida na mistura. Segundo JAHAN et al. (2017) a superfície do PVA apresenta uma morfologia mais plana, bem como HAI et al. (2019) o qual mostrou que o PVA obtém uma superfície mais lisa e regular.

Na **Figura 7D e E**, as composições de 75/25 e 80/20, respectivamente, mostraram uma superfície mais estriada relacionado ao látex misturada ao PVA, ambas similares entre si, isso devido à pequena diferença nas suas composições. Segundo ASAMI et al. (2023) a superfície do látex apresenta uma morfologia mais irregular com a configuração de poros e estrias. Conforme KALIYATHAN et al. (2020) relatou em seu trabalho, essas estrias são linhas de ruptura que representam a interação e a compatibilidade entre as fases e o que resulta também numa maior resistência à tração. Já a **Figura 7F** mostrou a proporção de 90/10 o qual é evidenciado uma maior porosidade na superfície, com menos estrias e menor presença da morfologia intrínseca do PVA. O aumento de poros no grupo 90/10 se dá pela maior quantidade de látex incorporado à amostra e isso pode estar relacionado à evaporação do solvente do látex durante o processo de secagem da membrana (STROPA et al. 2016; MASUDA et al. 2019).

KALIYATHAN et al. (2020), por análise de MEV, relataram que as blendas a partir da borracha natural de látex apresentaram separação de fase. Desta forma é compreensível as diferenças morfológicas encontradas nos grupos distintos de látex/PVA com as demais composições.

O equilíbrio entre a composição de látex e PVA na membrana se mostrou promissor como um curativo dérmico, uma vez que a presença de látex proporcionou maiores quantidades de poros sendo propício à proliferação e migração celular no local da ferida (LI et al. 2023) e a presença de PVA permite uma maior taxa de intumescimento, como demonstrado pela análise anteriormente, que possibilita a retenção do exsudado no local da ferida e auxiliando no processo de cicatrização da pele (EL-KASED et al. 2017).

3.7 Potencial Zeta

A **Figura 8** apresenta a análise de potencial zeta das amostras de látex puro, PVA puro, látex/PVA nas seguintes composições, 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10, respectivamente, em função do pH.

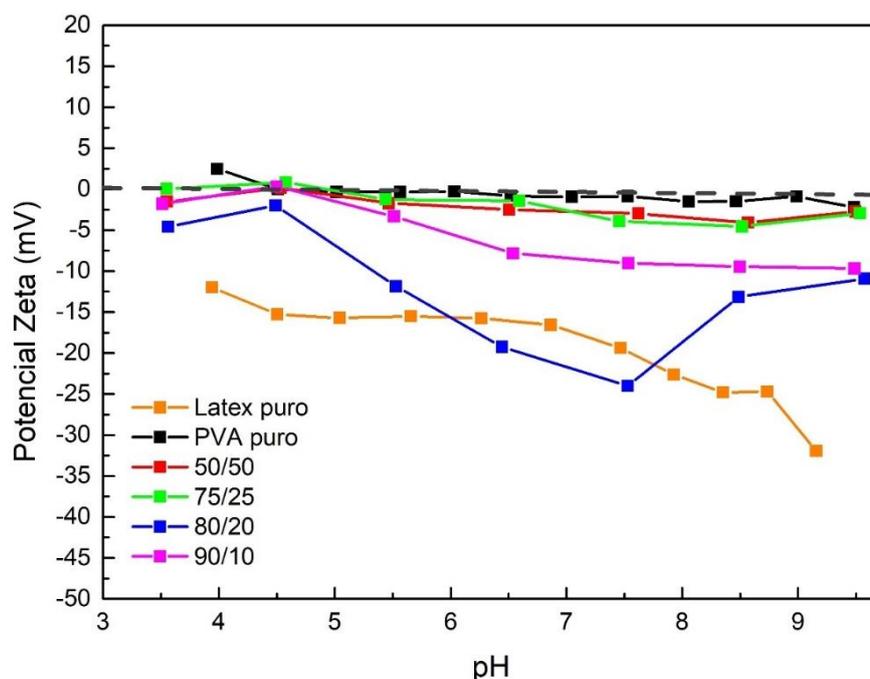


Figura 8. Gráfico de potencial zeta da membrana de látex puro, PVA puro e de látex/PVA nas respectivas composições de 50/50, 75/25, 80/20 e 90/10, respectivamente.

O gráfico de potencial zeta do látex puro mostrou que a carga de superfície se tornou mais negativa à medida que o pH aumentou, atingindo valor de aproximadamente -35 mV no pH 9,5, como já demonstrado em estudos de ASAMI et al. (2023). O PVA puro apresentou uma carga de superfície com pequenas alterações em função do pH variando entre 2 mV em pH 4 a -2,5 mV em pH 9,5. Esse resultado também foi observado em trabalhos de WISNIEWSKA et al. (2015).

Todas as amostras obtiveram um potencial zeta abaixo de 0 a partir do valor de pH 4,5 a 5. As amostras de 50/50 e 75/25 apresentaram resultados similares variando o potencial zeta entre -2 e -1 mV em todos os valores de pH. Foi evidenciado na amostra 80/20 uma carga de superfície mais negativa em valores de pH entre 6 a 7, obtendo um de potencial zeta entre -20 e -25 mV, respectivamente, e valores de potencial zeta -14 e -15 mV em pH, 5,5, 8,5 e 9,5. A amostra referente à proporção 90/10 apresentou valores

próximos ao grupo 50/50 e 75/25 com a carga de superfície mais negativa de -10 mV em pH 9,5.

Segundo estudos de DRECHSLER et al. (2019) o PVA apresentou cargas de superfícies que variaram de 2 a -12 mV em valores de pH de 3 a 10, explicando o comportamento do PVA puro em relação ao potencial zeta demonstrado no gráfico (**Figura 8**). Além disso, a presença de PVA aumentou a carga superficial do material, deixando-o menos negativo, como demonstrado por WISNIEWSKA et al. (2016). Isso explica o comportamento similar das amostras de 50/50 e 75/25 em relação ao PVA puro, o qual possuem maiores composições de PVA na sua composição. Por outro lado, trabalhos de ASAMI et al. (2023) mostraram que o látex apresentou cargas de superfície negativas, corroborando com as cargas de superfície das amostras de 80/20 e 90/10, o qual possuem uma proporção de látex maior.

Da mesma maneira, trabalhos de KHADIVAR et al. (2022), demonstraram que materiais que apresentam cargas mais negativas, são mais estáveis e promissores para a cicatrização de feridas dérmicas. Essa estabilidade física se dá por altos valores do potencial zeta, seja negativamente ou positivamente, o qual evita a aglomeração e coagulação das partículas do material (SHALABY et al. 2023).

3.8 Caracterização Biológica - Citotoxicidade Direta e Citoquímica

A **Figura 9** apresentou resultados da análise do contraste de fase e citoquímica das membranas de látex puro, PVA puro e látex/PVA nas composições de 50/50, 75/25, 80/20 e 90/20, após 24 h de incubação com a célula Vero. Utilizou-se como controle negativo (CT-) células diretamente na placa e controle positivo (CT+) células que foram induzidas a morte. No CT- observaram-se células bem espalhadas formando uma monocamada confluyente e, por vezes, de difícil delimitação delas. Em contrapartida, o tratamento CT+ apresentou a morte celular pela morfologia esférica e pela perda de aderência celular. Foi verificado, assim, o encolhimento celular, resultando em uma aparência mais compacta, condensada e, por vezes, vacuolada.

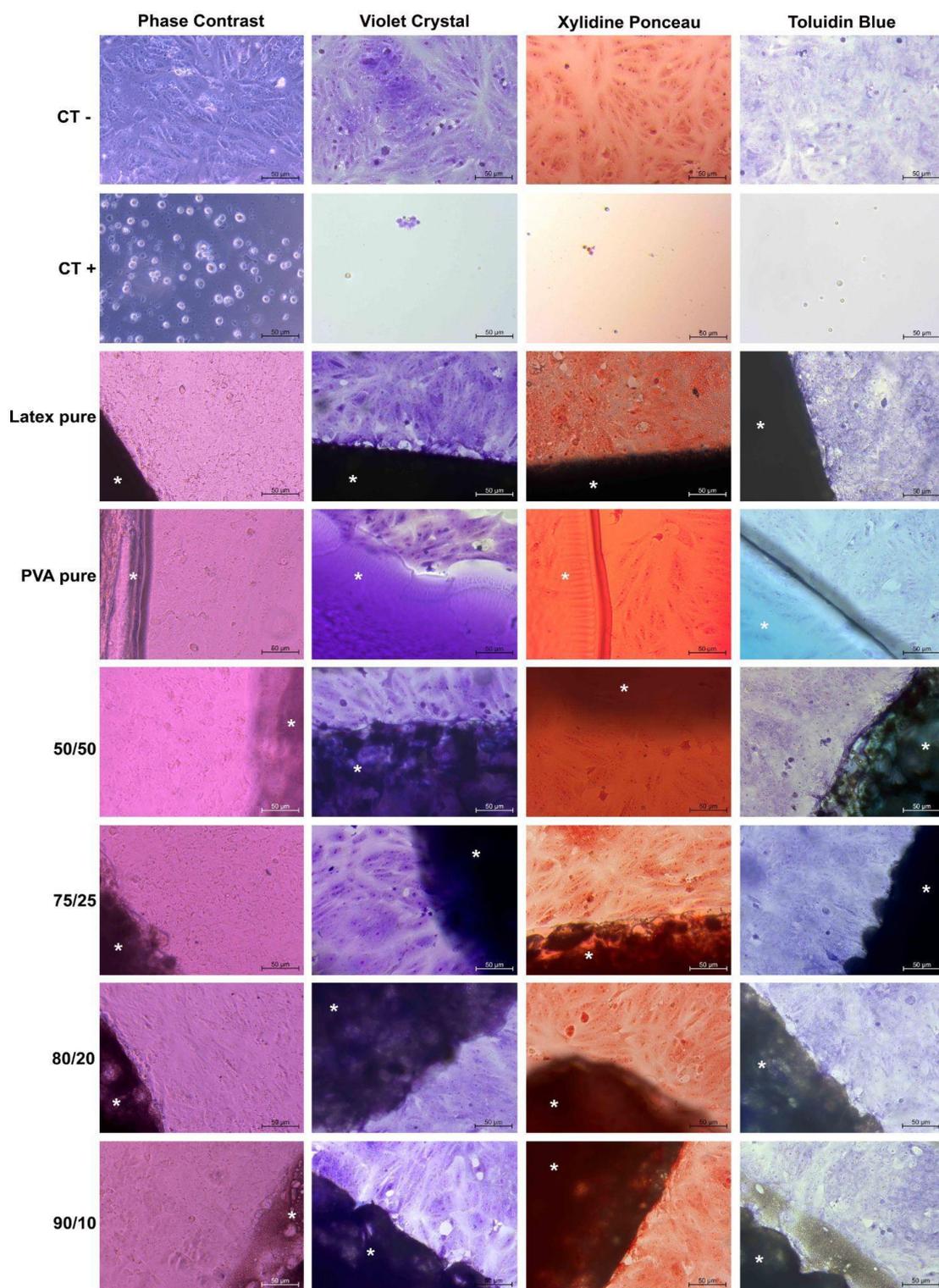


Figura 9. Citotoxicidade direta das diferentes amostras cultivadas com células Vero após 24 horas. Análise do contraste de fase e citoquímica dos materiais, utilizando as colorações: Cristal Violeta (CV); Xylidine Ponceau (XP) e Azul de Toluidina (AT). Os asteriscos (*) representam a identificação do material; a sigla CT- corresponde à citotoxicidade negativa e CT+ à citotoxicidade positiva. São indicadas as variações de concentração do látex e do PVA na margem esquerda da figura. Barra de escala = 50 µm.

Embora a concentração de látex e PVA tenha variado no presente estudo, a morfologia das células Vero nos materiais foi comparável à do CT-, mostrando, em geral, uma monocamada celular confluenta. As células nesses materiais mostraram-se alongadas e aderidas ao substrato, com morfologia mais achatada.

Nas amostras coradas com Cristal Violeta (CV), sugere-se pouca diferença morfológica entre os materiais após 24 horas de cultivo. As amostras coradas por Azul de Toluidina (AT) e Xylidine Ponceau (XP) mostraram aspectos basófilo e acidófilo, respectivamente (**Figura 9**). Um citoplasma basófilo indicou uma região de carga elétrica negativa e tende a se corar mais intensamente, como é observado no AT das amostras, em especial na amostra de látex puro. Em células com citoplasma basófilo sugeriu-se a presença de ribossomos livres e retículo endoplasmático rugoso, que são estruturas celulares responsáveis pela síntese de proteínas. Por outro lado, a acidofilia indicou uma carga elétrica positiva na região do citoplasma e tende a se corar mais intensamente com corantes ácidos, o que corresponde a proteínas totais (JUNQUEIRA; CARNEIRO 2017; ALBERTS et al. 2017). Essa coloração intensa é evidenciada em todas as amostras estudadas e corrobora os resultados achados com o AT.

A aderência e proliferação celular da amostra de látex puro e das demais amostras variando a proporção de látex corroboram com estudos de ASAMI et al. (2023) o qual evidenciou as mesmas características morfológicas e comportamentais das células vero em amostras de látex. De acordo com SPIN et al. (2021) em um estudo clínico, mostrou que as membranas a base de látex mostraram uma cicatrização completa da lesão no palato após 30 dias, não havendo efeitos adversos. Além disso, foi observado em estudos de SUHAERI et al. (2018) a proliferação e aderência das células em membranas à base de PVA, ou seja, demonstrando que o material não apresenta citotoxicidade e corroborando com a aplicação de interesse. Da mesma maneira, FAHMY et al. (2015) evidenciaram que membranas de ácido hialurônico associados ao PVA não apresentaram citotoxicidade sendo promissor para o uso como curativo de feridas dérmicas.

Assim, a combinação de látex e PVA se torna um material promissor para tratamentos de feridas e lesões causadas por doenças dérmicas raras, a fim de desenvolver um curativo que seja de baixo custo e acessível para toda a população.

3.9 Avaliação da Morfologia e Adesão Celular

Na superfície do látex puro, foram observadas vesículas de secreção ou microvilosidades (**Figura 10A e B**), indicando uma maior interação com o ambiente ou uma atividade secretora mais intensa das células. Adicionalmente, foi evidenciada a presença de extensões celulares como filopódios e lamelipódios. Estruturas mais arredondadas também indicaram divisão mitótica no material. De modo geral, o látex mostrou maior atividade celular em comparação com o PVA puro. Em contraste, na superfície do PVA, observou-se uma textura relativamente lisa, dificultando a discernir a presença e os limites das células.

Os resultados de adesão celular mostrados na amostra de látex puro corroboraram com estudos de FURUYA et al. (2017) e ANDRANDE et al. (2022). Em contraste, o PVA puro demonstrou menor adesão celular, pois sua superfície lisa e alta hidrofiliabilidade contribuíram para esse comportamento celular, conforme evidenciado por HUANG et al. (2016) e MOHANAPRIYA e RAJ (2018).

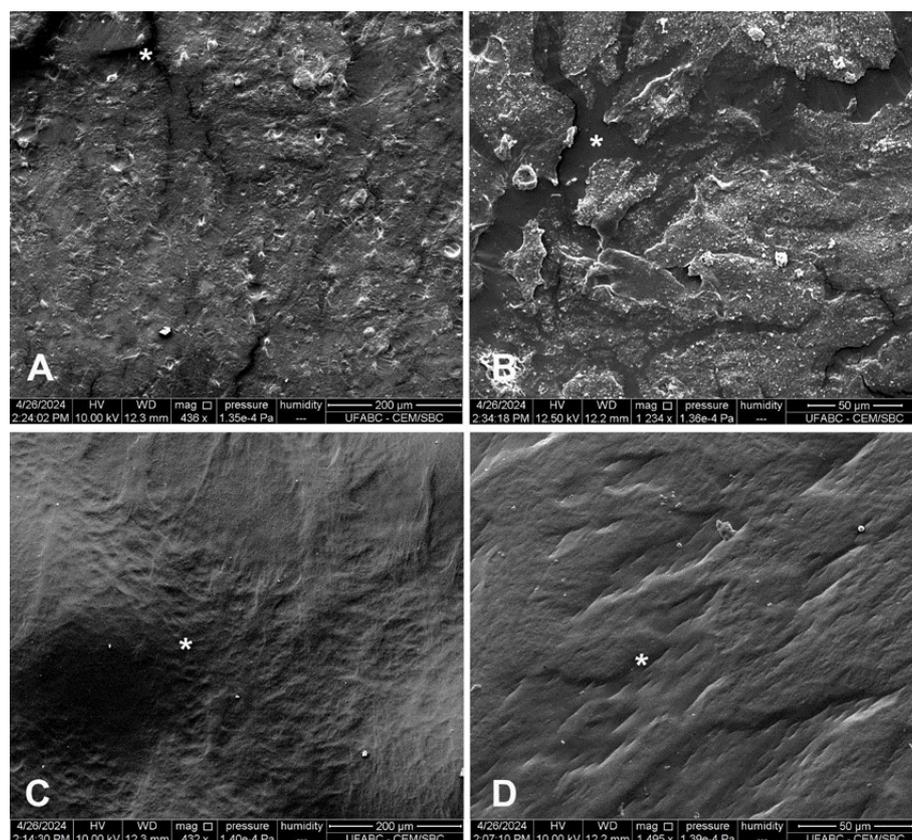


Figura 10. Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das diferentes amostras de cultura de células Vero após 24 horas. As letras alfabéticas representam: A e B látex puro; C e D PVA puro. Os asteriscos (*) denotam a identificação dos materiais. Barra de escala = 200 µm e 50 µm.

A **Figura 11** sugeriu uma interação específica entre células Vero e a composição do material, destacando a influência das composições de látex e PVA na adesão e morfologia celular. Nesse contexto, as amostras exibiram uma distribuição irregular de células, com regiões de maior ou menor densidade dependendo da área do material. Nas **Figuras 11A e B** (50/50), houve um pequeno número de células, indicando que o material não estimulou a adesão celular. As poucas células presentes interagiram entre si, crescendo em formas agregadas. Além disso, foi observada uma superfície relativamente lisa nessas regiões. Nas **Figuras 11C e D** (75/25) e **Figuras 11E e F** (80/20), foi observada uma camada celular semi-confluyente com morfologia irregular tanto na borda do material quanto na região central. As células exibiram uma maior quantidade de vesículas de secreção ou microvilosidades em sua superfície, juntamente com estruturas mais arredondadas, sugerindo divisão mitótica próxima ao material. Nas **Figuras 11G e H** (90/10), as células aderiram e se espalharam sobre o material, também apresentando uma superfície celular rica em vesículas de secreção ou microvilosidades. Esses achados para todas as amostras, exceto (50/50), foram consistentes com a atividade celular nos materiais.

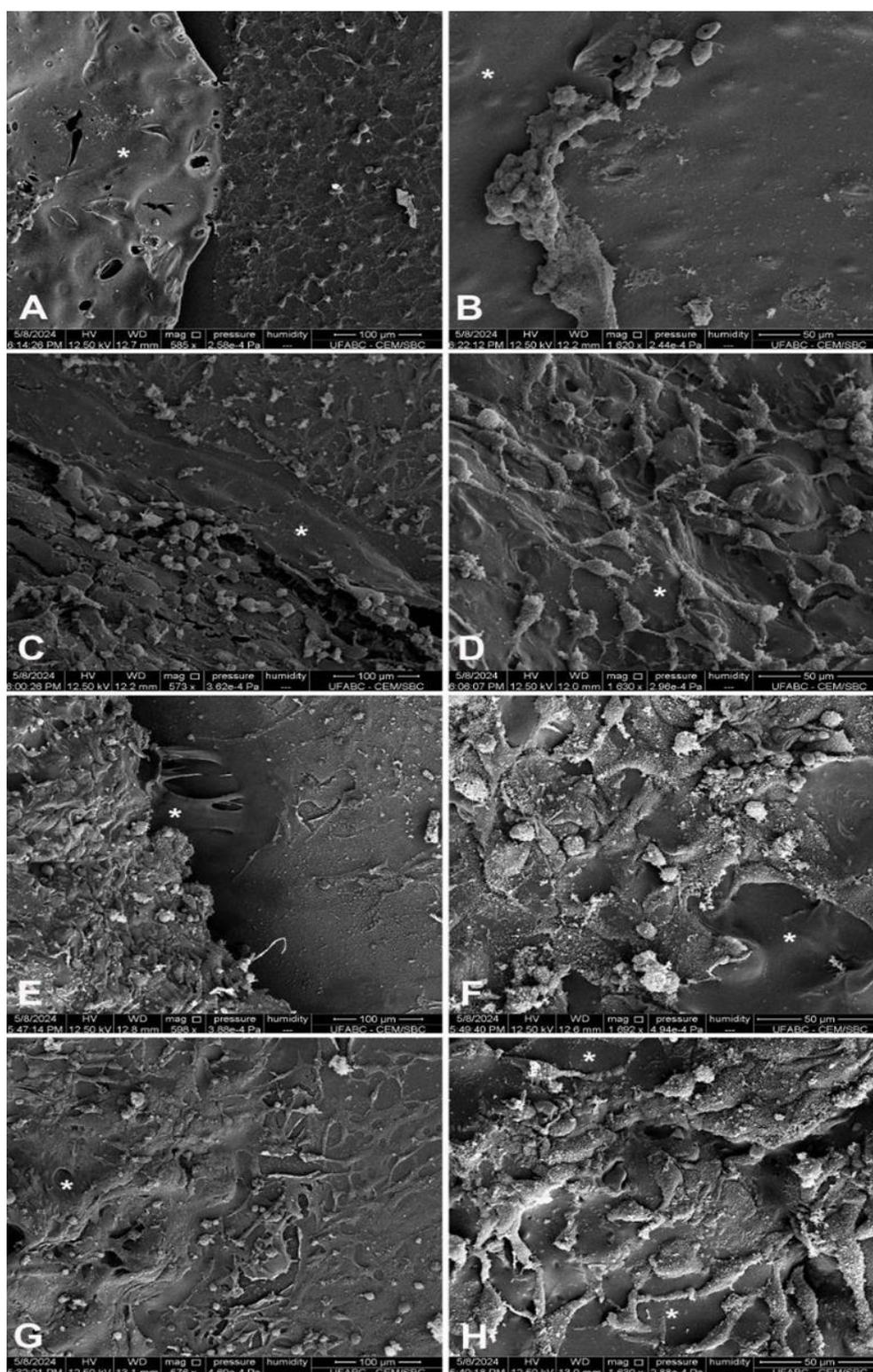


Figura 11. Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de diferentes amostras de culturas de células Vero após 24 horas. As letras alfabéticas representam: A e B 50/50; C e D 75/25; E e F 80/20; G e H 90/10. Asteriscos (*) denotam a identificação do material. Barra de escala = 100 µm e 50 µm.

FIGUEIREDO et al. (2014) desenvolveram uma membrana à base de álcool polivinílico (PVA) como sistema de liberação para proteínas solúveis extraídas do látex

de *Calotropis procera* (LP) e determinaram a eficácia do LP na remodelação tecidual e cicatrização de feridas após tratamento tópico em camundongos. A membrana de PVA contendo LP (0,2 % e 1 %), ao contrário da membrana de PVA isolada, acelerou significativamente a cicatrização de feridas por meio da formação mais rápida de neotecido, exibindo fibroplasia aumentada e deposição de colágeno conforme mostrado pela análise microscópica. Esses dados corroboram os resultados do nosso estudo, pois o látex parece estimular a proliferação celular, também indicando alta atividade celular com a presença de vesículas e microvilosidades.

Em outro estudo, voltado para aspectos do mecanismo subjacente ao desempenho da biomembrana de PVA-proteína de látex na cicatrização de feridas, RAMOS et al. (2016) encontraram que, ao contrário do PVA isolado, a biomembrana de PVA-proteína de látex induziu uma migração mais intensa de leucócitos (neutrófilos) e degranulação de mastócitos durante a fase inflamatória do processo de cicatrização, acelerando a fase inicial do processo inflamatório por meio do aumento da liberação de citocinas. Os autores concluíram que o LP-PVA era um recurso biológico adequado para a engenharia biomédica. Além disso, também permitiu modificações antibacterianas conforme demonstrado em estudos de AZARIAN et al. (2019). Assim, este estudo fornece insights promissores, uma vez que a proporção do material reflete na resposta celular.

4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados, as amostras com composições de 75/25 e 80/20 apresentaram maior capacidade de inchamento, carga superficial e adesão celular em comparação com as amostras com composições de 50/50 e 90/10. Além disso, as membranas nessas composições específicas exibiram uma superfície mais estriada, irregular e áspera. Todas as amostras de látex/PVA demonstraram adesão celular e não apresentaram citotoxicidade, conforme evidenciado pela semelhança na morfologia e confluência celular com o controle negativo da linha celular Vero. Além disso, o látex mostrou superioridade na adesão celular em comparação com o PVA. Esses resultados sugerem que composições com uma proporção maior de látex em relação ao PVA proporcionaram um ambiente mais favorável para o crescimento e adesão celular, tanto nas bordas quanto na superfície dos materiais. Consequentemente, as amostras de látex/PVA com composições de 80/20 demonstraram ser promissoras para aplicações como curativos dérmicos.

Incorporação do Extrato Natural de *Calêndula officinalis* (CO) em Diferentes Concentrações na Membrana de Látex/PVA na Composição 80/20

Terceira etapa do trabalho desenvolvido.

1. INTRODUÇÃO

A *Calêndula officinalis* (CO) é um extrato mundialmente conhecido pelos seus inúmeros constituintes que auxiliam nas atividades biológicas, bem como, antiinflamatórias, cicatrização de feridas, anticancerígena, antimicrobianas e outras ações (JAN et al. 2017).

Por apresentar características benéficas para a saúde, o extrato de CO é utilizado em estudos associados aos biomateriais, bem como polímeros naturais e sintéticos, e componentes bioativos (IONESCU et al. 2021; PELIN et al. 2023; RAD, et al. 2019), com o intuito de melhorar as propriedades terapêuticas do material.

Estudos *in vitro* e *in vivo* de RATHOD et al. (2022) mostraram que a presença da CO na membrana a base de colágeno não apresentou citotoxicidade e quando aplicado no rato, a ferida dérmica foi rapidamente cicatrizada quando comparado com a membrana de colágeno isento de CO, o que significa que os componentes biológicos característicos da CO surtiram efeito no processo de cura da lesão. BUZZI et al. (2015) evidenciou em seu estudo clínico que pacientes com úlceras dérmicas com feridas a mais de três meses, após o tratamento com extrato de CO associado a um curativo dérmico comercial apresentaram uma melhora significativa em relação às feridas, cuja cicatrização foi completa após 15 e 30 dias de tratamento. Além disso, ARORA et al. (2013) relatou que nos estudos clínicos que utilizam o CO, são raras as pessoas que têm efeitos colaterais ou alérgicas ao extrato.

Segundo uma pesquisa detalhada na base de dados Web of Science, utilizando palavras-chave como, “*Calendula officinalis extract*”, com limitações de busca apenas para artigos científicos e de revisão que utilizaram o extrato de CO, foi verificado que a base de trabalhos científicos de extrato de CO como uma alternativa para o tratamento de cicatrização de feridas é escasso (**Figura 1**).

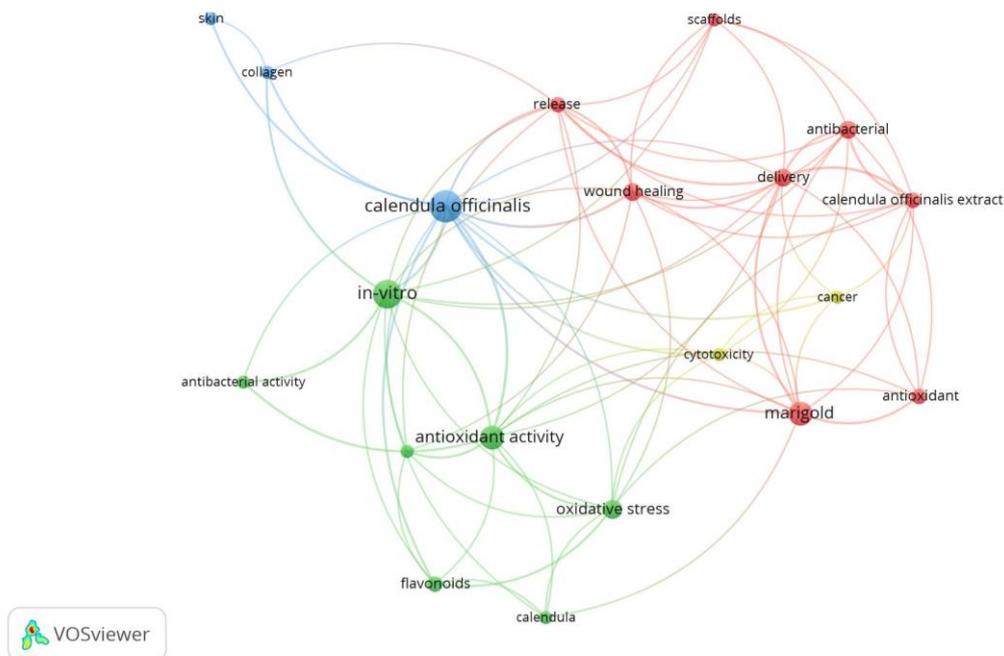


Figura 1. Mapa das palavras-chave relacionado ao extrato de CO. Fonte: imagem retirada do programa VOSviewer.

Assim como as doenças raras atinge uma parcela mínima da população mundial, a preocupação voltada ao desenvolvimento de tratamentos para essas pessoas é limitada. Segundo as plataformas Web of Science e VOSviewer, foi observado que nos últimos 10 anos, apenas 28 trabalhos referentes a estudos com CO para tratamentos de lesões foram publicados internacionalmente. A **Figura 1** mostrou que existem apenas 17 autores principais que trabalham com a CO para esses fins. Nenhum dado foi encontrado quando utilizado as palavras-chave, “*Calendula officinalis* for rare skin diseases”.

Diante desse fato, o desenvolvimento de uma membrana a base de Látex/PVA incorporado com extrato de CO se torna um potencial promissor como alternativa fácil, barata e acessível para a população necessitante, visando minimizar os problemas causados por essas doenças raras que muitas vezes não tem cura.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Incorporação do Extrato de *Calêndula officinalis* (CO) na Membrana de Látex/PVA

O extrato fluído de CO foi adquirido comercialmente da empresa DV Naturais (Cod: 47467, São Paulo-Brasil) e o extrato foi submetido a liofilização (LIOTOP modelo:

K105) por 24 h para maior concentração dele. Para cada 50 mL liofilizado, renderam aproximadamente 1g de extrato de consistência espessa. Foram utilizadas as concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL de extrato de CO para a incorporação na membrana de látex/PVA na composição de 80/20, respectivamente. Essas concentrações de extrato, foram adaptadas dos estudos de DAVOUDABADI et al. (2023) e FERREIRA et al. (2023). As concentrações de extrato de CO solubilizadas em água foram homogeneizadas manualmente na porção de PVA (20 %) (já solúvel em água). Após a homogeneização das diferentes concentrações do extrato na solução de PVA, o mesmo foi misturado manualmente na porção de látex (80 %) para a obtenção das membranas de látex/PVA e extrato de CO. As mesmas foram vertidas em placas de teflon de 5 cm de diâmetro e realizado o processo de reticulação do PVA, previamente descrito.

2.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR foi para identificar e caracterizar a estrutura química das amostras de Látex/PVA 80/20 puro, extrato de CO puro e Látex/PVA com extrato de CO nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL (25CO, 50CO e 100CO), utilizando um espectrofotômetro Perkin Elmer em modo ATR (Spectrum 65 FT-IR). A análise foi realizada na faixa de número de onda de 4000 a 600 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e 64 varreduras.

2.3 Termogravimetria (TG)

A estabilidade térmica das amostras Látex/PVA 80/20 puro, extrato de CO puro e Látex/PVA com extrato de CO nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL (25CO, 50CO e 100CO), foi avaliada usando análise TG com um equipamento modelo Discovery TGA 55 da TA Instruments (TA Instruments, EUA). Aproximadamente 5 mg de cada amostra foi aquecido de 25 a 600 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio.

2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise DSC foi realizada usando um equipamento TA Instruments Discovery DSC 25. As amostras de Látex/PVA 80/20 com extrato de CO nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL (25CO, 50CO e 100CO), com 5 mg foram hermeticamente seladas em recipientes de alumínio e submetidas a aquecimento de 25 a 150 °C a uma taxa de

aquecimento de 10 °C.min⁻¹. Após atingir a temperatura de 150 °C, as amostras foram resfriadas até -80 °C a uma taxa de resfriamento de 10 °C.min⁻¹ e mantidas a essa temperatura por 1 minuto. Por fim, as amostras foram aquecidas novamente (taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹) até 300 °C. A análise foi conduzida sob uma atmosfera de nitrogênio com uma taxa de fluxo de 5 mL.min⁻¹. Para o extrato puro de CO foi realizado apenas um de aquecimento que foi de 25°C até 300 °C. O grau de cristalinidade foi calculado estimando a entalpia de fusão a partir da área sob o pico endotérmico, traçando uma linha de base linear arbitrária desde o primeiro início da fusão até o último traço de cristalinidade. O grau de cristalinidade do polímero pode ser definido como na equação apresentada (1) (PATEL et al. 2014):

$$X_c = \frac{\Delta H_f(T_m)}{\Delta H_f^0(T_m^0)} \quad (1)$$

Onde X_c é a extensão da fração em massa da cristalinidade, ΔH_f(T_m) é a entalpia de fusão medida no ponto de fusão T_m e ΔH_f⁰(T_m⁰) é a entalpia de fusão do polímero totalmente cristalino medida do ponto de fusão de equilíbrio T_m⁰ (PATEL et al. 2014).

2.5 Formação de Biofilme via Ensaio de Cristal Violeta

Para realizar o ensaio de Cristal Violeta, as amostras de Látex/PVA puro (CT+) e Látex/PVA com extrato de CO nas concentrações de 25, 50, 100 mg/mL (25CO, 50CO e 100CO) foram submetidas à formação de biofilme pela bactéria *S. aureus*. O ensaio de biofilme foi adaptado de LENCOVA et al. (2021). Após esse período, as amostras foram transferidas para uma nova placa de 24 poços, lavadas três vezes com água destilada estéril, secas à temperatura ambiente por 45 minutos, e em seguida, coradas com Cristal Violeta a 0,1 % (Exodus Scientific, São Paulo, Brasil) pelo mesmo período. As amostras foram lavadas e incubadas com 600 μL de etanol a 85 % (v/v) por 15 minutos à temperatura ambiente. A solução foi ressuspensa e transferida para uma placa de 96 poços para leitura da absorbância a 595 nm em um leitor de microplacas colorimétrico (ELX800UV Biotek[®], Winooski, EUA). A cultura bacteriana foi realizada diretamente na superfície das membranas de Látex/PVA isento de extrato de CO (amostra controle CT+). Os valores de absorbância foram transformados em valores percentuais através de uma equação:

$$\text{Crescimento de Biofilme (\%)} = \left(\frac{\text{Biofilme com CO}}{\text{Biofilme sem CO}} \right) \times 100\% \quad (2)$$

2.6 Ensaio de Antibiograma

Cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Escherichia coli* (ATCC 1122) foram utilizadas como referência para o ensaio de antibiograma. As cepas foram mantidas e cultivadas conforme descrito por MALHOTRA et al. (2019). As membranas Látex/PVA 80/20 puro e membranas de Látex/PVA nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL de extrato de CO foram cortadas em um tamanho de 5 mm de diâmetro e esterilizadas usando luz UV germicida. A membrana Látex/PVA 80/20 isento de extrato de CO foi utilizada como controle negativo, e um disco estéril comercial com doxiciclina foi utilizado como controle positivo. As amostras esterilizadas foram colocadas em placas preparadas com meio de cultura Mueller-Hinton Agar semeado com cepas bacterianas (*S. aureus* e *E. coli*) previamente cultivadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI). Cada experimento foi replicado três vezes, cada uma em duplicata para cada grupo testado. As amostras foram incubadas por 24 horas em incubadora bacteriológica a 37 °C. Após o período de incubação, foram medidos os tamanhos dos halos de inibição. Foi realizado uma duplicata para cada grupo de amostra.

2.7 Ensaio de Liberação

Para avaliar o perfil de liberação, amostras de 8 mm de diâmetro de membranas de Látex/PVA incorporadas com concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL de extrato aquoso de CO (25CO, 50CO e 100CO) foram imersas em 6 mL de solução PBS, seguidas de agitação em temperatura ambiente. Alíquotas de 3 mL foram coletadas e substituídas pelo mesmo volume em intervalos de tempos pré-determinado durante 144 horas (6 dias). A liberação de extrato CO foi medida em um espectrofotômetro UV (Femto Cirrus 80, São Paulo, Brasil) a 380-200 nm. A quantificação do extrato de CO liberado foi calculada utilizando a média obtida em triplicata, comparada a uma curva padrão contendo concentrações conhecidas. O perfil de liberação de CO foi avaliado por quatro modelos matemático: Korsmeyer-Peppas (SCAFFARO et al. 2017), Higuchi (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2022), Primeira Ordem e Ordem Zero (SHEN et al., 2020) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Fórmulas matemáticas de perfil de liberação dos modelos de Korsmeyer-Peppas, Higuchi, Primeira Ordem e Ordem Zero.

Korsmeyer-Peppas	$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$	<p>Onde M_t = quantidade de CO liberados em um tempo arbitrário t; M_∞ = quantidade de CO adicionado inicialmente à membrana; k = é a constante de taxa de liberação, e n indica o expoente de liberação, sugerindo a natureza do mecanismo de liberação.</p>
Higuchi	$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^{0,5}$	<p>Onde k representa a constante de dissolução no modelo de Higuchi. M_t é a quantidade de CO liberada em um tempo arbitrário (t) de liberação. M_∞ é a quantidade inicial de CO adicionada à membrana</p>
Primeira Ordem	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - e^{-k_1t}$	<p>Onde k_1 representa a constante de liberação do modelo de primeira ordem. M_t e M_∞ representam a quantidade de CO liberado em um tempo (t) de equilíbrio e a quantidade inicial de CO adicionado à membrana</p>
Ordem Zero	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_0t$	<p>Onde k_0 é a constante de liberação no modelo de Ordem Zero. M_t é a quantidade de CO liberada em um tempo (t) de liberação em equilíbrio. M_∞ é a quantidade inicial de CO adicionada à membrana</p>

2.8 Ensaio de Citotoxicidade - MTT

O ensaio foi conduzido de acordo com as normas internacionais para citotoxicidade e interação célula-biomaterial (ASTM F813-20, 2011; ISO 10993-5, 2009; ISO 10993-12, 2012). A cultura de células Vero (células epiteliais renais extraídas do macaco verde africano) foi adquirida comercialmente (Banco de Células do Rio de Janeiro - código 0245, Rio de Janeiro, Brasil) e mantida em frascos de cultura de 75 cm² até a confluência. Após alcançar a confluência/alta densidade nos frascos, as células foram transferidas para as amostras de membranas de Látex/PVA nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL, em placas de cultura celular de 48 poços, em uma concentração de 1×10^5 células/mL, utilizando 1000 µL de suspensão celular. As culturas foram então incubadas em ambiente a 37 °C e 5 % de CO₂ por 1 dia e 3 dias. A membrana pura de Látex/PVA foi utilizada como controle positivo (CT+), o controle negativo (CT-), as células foram semeadas diretamente na placa de poços, e o controle de morte (CT morte), células submetidas à morte induzida, e as amostras de Látex/PVA com extrato de CO nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL (25CO, 50CO e 100CO), foram utilizados como referências neste experimento.

O ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi realizado após períodos de tempo preestabelecidos. O meio de cultura celular foi removido, e as células foram incubadas a 37 °C em uma atmosfera de 5 % de CO₂ e 95 % de ar com 1000 µL de MTT a uma concentração de 1 mg/mL em meio de cultura fresco isento de SFB e antibiótico. Após uma incubação de 1 hora, o meio de cultura contendo MTT foi removido, e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em 400 µL da solução de dimetilsulfóxido (DMSO). A quantidade de formazan presente foi então medida a uma absorvância de 570 nm usando um leitor de placas (Elx-800, Biotek©).

2.9 Análise Estatística

Os cálculos estatísticos foram realizados usando o software GraphPad (Prism 10.0.2, EUA). As comparações estatísticas entre diferentes pontos de tempo foram feitas usando ANOVA com o pós-teste de Tukey. Foi utilizado um intervalo de confiança de 95%, e um nível de significância de $p < 0,05$ (*) foi considerado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato aquoso de CO foi incorporado à membrana de Látex/PVA na composição 80/20, com concentrações de 25 mg/mL (25CO), 50 mg/mL (50CO) e 100 mg/mL (100CO). A **Figura 2** mostra a membrana final de Látex/PVA com o extrato de CO, evidenciando uma diferença tanto na coloração (quanto maior a concentração de CO, mais cor âmbar é evidenciado), quanto no aspecto da estrutura da membrana. O aspecto da membrana foi alterado conforme a concentração incorporada de extrato, deixando a membrana com maior concentração (100CO) mais regular, e estável. Enquanto as de menores concentrações (25Co e 50CO) apresentaram aspecto rugosa, com facilidade de enrolar (devido a presença de látex).



Figura 2. Imagem macroscópica das membranas de Látex/PVA nas concentrações de 25 mg/mL (25CO), 50 mg/mL (50CO) e 100 mg/mL (100CO).

3.1 Análise de FTIR

Os espectros de FTIR das amostras da membrana de Látex/PVA, extrato de CO puro e membranas de Látex/PVA com extrato de CO nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL (25CO, 50CO e 100CO), estão apresentados na **Figura 3**.

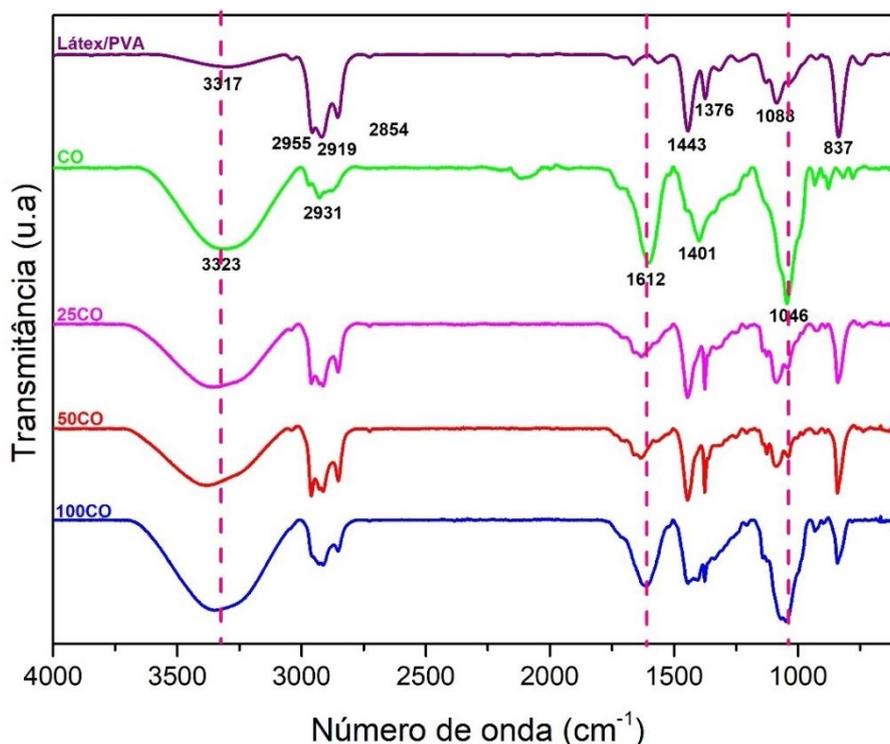


Figura 3. Espectro de FTIR das amostras da membrana de Látex/PVA, extrato de CO puro e membranas de Látex/PVA com extrato de CO nas concentrações de 25 mg/mL (25CO), 50 mg/mL (50CO) e 100 mg/mL (100CO).

Foi observado na membrana de Látex/PVA 80/20 os principais picos referentes ao látex, bem como, os picos em 3317, 2919 e 2854 cm^{-1} atribuídos aos estiramentos -OH dos grupos hidroxilas, estiramentos simétricos e assimétricos das ligações =CH, respectivamente. Os picos 1443 e 1376 cm^{-1} foram relacionados a distorção dos grupos CH_2 e CH_3 (BARROS et al. 2019; ASAMI et al. 2023). Os principais picos relacionados ao PVA são evidenciados em 2919, 1088 e 837 cm^{-1} , os quais foram atribuídos à vibração assimétrica de estiramento CH_2 , estiramento C-O de grupos acetil e vibração de estiramento C-C, respectivamente (KHARAZMI et al 2015).

O espectro do extrato de CO puro mostrou os principais picos em 3323 cm^{-1} , relacionado aos grupos hidroxilas -OH, 2931 cm^{-1} , correspondente aos grupos alcalinos C-H, 1612 cm^{-1} , referente aos grupos amidas I, 1401 cm^{-1} , aos grupos metil e em 1046 cm^{-1} , aos compostos terpenoides e flavonoides contidos no extrato natural de CO (RAD et al. 2019).

Os espectros das amostras contendo as diferentes concentrações de extrato de CO mostraram os principais picos, tanto da membrana de Látex/PVA quanto da CO. Além disso, foi observado uma diminuição dos principais picos de CO conforme a variação da

concentração de CO nas respectivas membranas (25CO, 50CO e 100CO). Alguns picos foram sobrepostos ou tiveram um pequeno deslocamento no espectro e isso pode estar relacionado a uma interação dos materiais em que o extrato natural está associado (RAD et al. 2019). Entretanto, não houve o aparecimento de um novo pico após a adição de CO à membrana de Látex/PVA, indicando que não houve ligação química entre os componentes, o que permitirá a liberação rápida de CO para o meio (PINTO et al. 2024). Assim, os espectros mostrados na **Figura 3** comprovaram a incorporação do extrato à membrana nas diferentes concentrações de CO.

3.2 Análise de TG

A fim de avaliar a estabilidade térmica das membranas de Látex/PVA, extrato de CO puro e membranas de Látex/PVA com extrato de CO nas concentrações 25CO, 50CO e 100CO, foi realizada a análise de TG e DTG (**Figura 4A e B**).

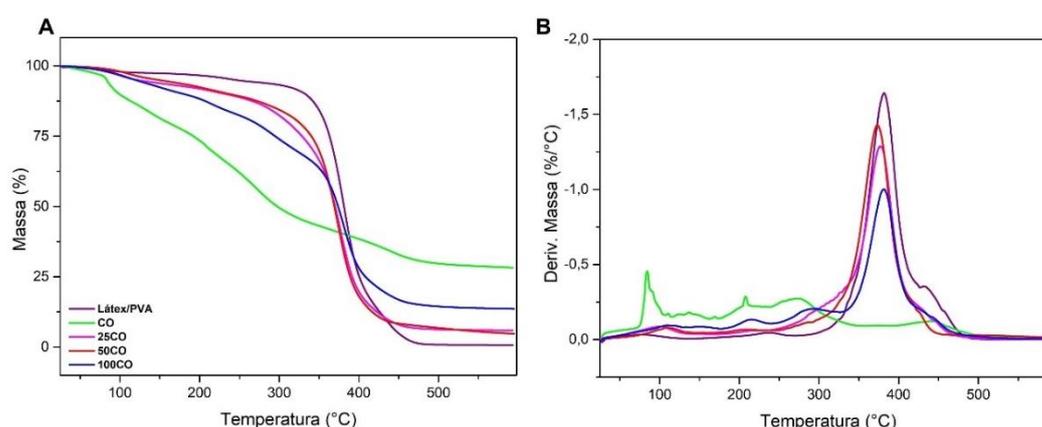


Figura 4. Curvas de (A) TG e (B) DTG da membrana de Látex/PVA, extrato de CO puro e membrana de Látex/PVA com extrato de CO nas concentrações de 25CO, 50CO e 100CO.

A análise de TG (**Figura 4**) mostrou que a CO exibiu um perfil de decomposição contínua com aparecimento de cinco eventos associados à perda de massa. Os vários eventos de perda de massa observado estão relacionados a diversas substâncias presentes em CO (SHAHANE et al. 2023), o que acaba dificultando a identificação da estabilidade térmica do extrato. Assim, o primeiro evento com 10 % de perda de massa foi identificado entre 25-99 °C, com Tmax em 84 °C, o qual foi relacionada à evaporação de umidade adsorvida em CO. Por sua vez, o segundo evento apresentou vários picos de decomposição entre 100-179 °C, com 13 % de perda de massa. Esse evento foi

relacionado aos carotenoides e as luteínas presente no extrato (BUNGHEZ e ION 2011). Enquanto o terceiro e quarto evento, ocorreram em uma faixa de temperatura de 180-347 °C com T_{max} em 207 e 273 °C, com 13 e 21 % de perda de massa, respectivamente. Tais eventos foram associados à degradação de compostos fenólicos e flavonoides presentes em CO (STOYANOVA et al. 2023). Por fim, o quinto evento, com 14 % de perda de massa, ocorreu entre 373-512 °C em uma T_{max} de 441 °C, foi atribuído à carbonização do extrato natural, com 99 % de massa residual (DEBBARMA et al. 2024).

Conforme discutido anteriormente (**Capítulo IV, Figura 2**) a membrana de Látex/PVA na composição de 80/20 apresentou T_{max} em 382 °C (degradação das cadeias poliméricas do poli-isopreno) e em 236 °C (desacetilação do PVA). Por outro lado, além dos eventos associados à degradação térmica do Látex/PVA (isento de CO), as amostras de Látex/PVA com diferentes concentrações de extrato de CO (25CO, 50CO, 100CO), exibiram o aparecimento de eventos associados à presença de CO na membrana. Deste modo, as amostras compostas por 25CO e 50CO, exibiram inicialmente T_{max} em 77 e 91 °C, que pode ser atribuída a evaporação de moléculas de água, bem como compostos voláteis presentes em CO. Por sua vez, a amostra composta por 100CO exibiu uma decomposição gradativa entre 25 até 327 °C, com aparecimento de três T_{max} em 108, 213 e 290 °C, respectivamente. Esse fenômeno pode estar associado a evaporação de moléculas de água, compostos voláteis, fenólicos e flavonoides, conforme evidenciado na análise térmica da CO. A evidente decomposição observada na amostra foi atribuída a maior concentração de CO (100CO).

No entanto, foram observadas que a incorporação de 25CO e 50CO na membrana de Látex/PVA fez com que ocorresse uma diminuição na T_{onset} e T_{max} das respectivas amostras em relação ao Látex/PVA isento de CO. Assim, a amostra com 25CO apresentou uma T_{onset} em 279 °C com T_{max} em 376 °C, enquanto a amostra de 50CO exibiu uma T_{onset} em 327 °C com T_{max} em 372°C. A presença de CO na membrana de Látex/PVA pode acarretar um deslocamento de temperatura de degradação térmica para temperaturas mais baixas devido a uma interação entre o extrato e o material (STOYANOVA et al. 2023). Contudo, a amostra 100CO apresentou uma T_{onset} em 350 °C, sem alteração nos valores de T_{max} que se mantiveram em 380 °C, temperatura observada para Látex/PVA isento de CO.

3.3 Análise de DSC

O comportamento térmico das membranas de Látex/PVA, extrato de CO puro e membranas de Látex/PVA com extrato de CO nas concentrações de 25CO, 50CO e 100CO, foram analisadas por DSC (Figura 5).

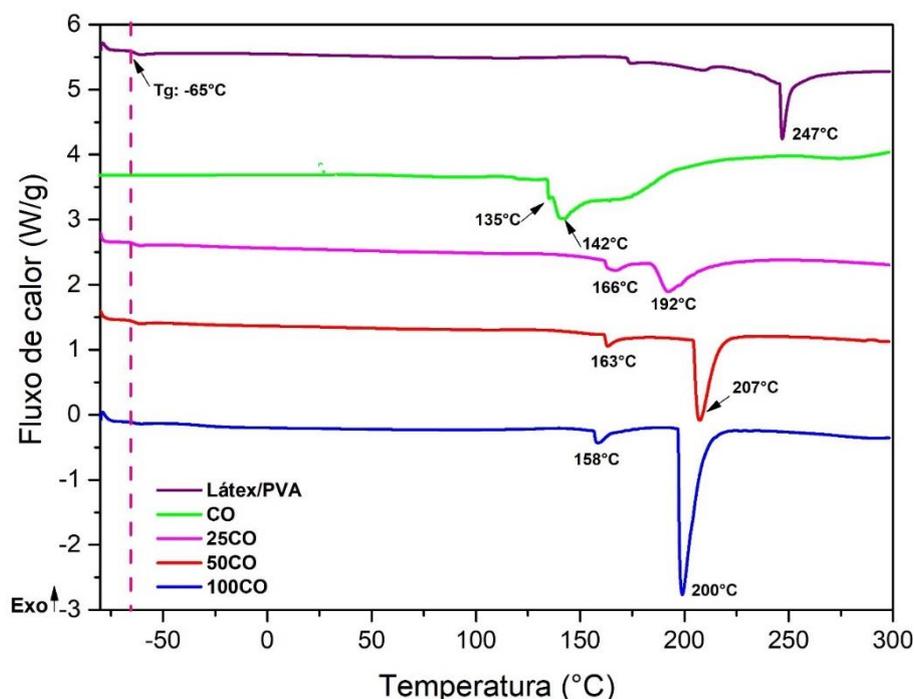


Figura 5. Curvas de DSC das amostras de Látex/PVA, extrato de CO (CO), membranas de Látex/PVA com extrato de CO nas concentrações de 25mg/mL (25CO), 50 mg/mL(50CO) e 100 mg/mL (100CO).

A análise de DSC do Látex/PVA na concentração de 80/20 apresentaram as principais características relacionado aos dois materiais. A temperatura de transição vítrea (T_g) do látex foi evidenciado em -65 °C enquanto o pico de fusão do PVA foi apresentado em 247 °C, comportamento que corrobora com a literatura (CANEVAROLO Jr. 2017; TIAN et al. 2017). O extrato de CO por sua vez apresentou um pico de fusão em 135 °C e em 142 °C, temperaturas evidenciadas também por MATTA et al. (2022). Todas as amostras de Látex/PVA contendo extrato de CO mostraram a T_g relacionado ao látex. Contudo, os picos endotérmicos evidenciados nas amostras de 25CO (166 e 192 °C), 50CO (163 e 207 °C) e 100CO (158 e 200 °C), relacionados à temperatura de fusão da CO e do PVA respectivamente, tiveram um pequeno deslocamento para temperaturas maiores em comparação com a o extrato de CO e para temperaturas menores em comparação com a amostra de Látex/PVA isento de CO (**Tabela 2**). Esses deslocamentos podem estar relacionados a uma possível interação entre o extrato de CO com a membrana

de Látex/PVA, mais precisamente com o PVA, uma vez que o extrato foi incorporado no PVA e posteriormente criorreticulado junto ao látex.

Tabela 2. Valores obtidos a partir da curva de DSC das amostras de Látex/PVA, extrato de CO e membrana de Látex/PVA nas concentrações de 25CO, 50CO e 100CO.

Amostra	Temperatura de Transição Vítrea (T _g) (°C)	Temperatura de Fusão (T _m) (°C) da CO	Temperatura de Fusão (T _m) (°C) do PVA	Grau de Cristalinidade (%)
Látex/PVA	-65	-	247	24
CO	-	135/142	-	-
25CO	-65	166	192	28
50CO	-65	163	207	41
100CO	-65	158	200	85

Além disso, a partir da **Tabela 2** foi possível observar o grau de cristalinidade do PVA presente na membrana de Látex/PVA e do PVA das membranas contendo CO. A cristalinidade do PVA foi maior conforme o aumento da concentração de extrato incorporado (25, 50 e 100 mg/mL), com grau de cristalinidade de 28, 41 e 85%, respectivamente. Tal comportamento também foi observado nos estudos de PATEL et al. (2014).

3.4 Ensaio Microbiológico

3.4.1 Análise da formação de biofilme por Cristal Violeta

A formação de biofilme das bactérias *S. aureus*, após o período de 24h, nas membranas de Látex/PVA (CT+) e nas membranas de Látex/PVA com extrato de CO nas concentrações de 25CO, 50CO e 100CO, foram mostradas na **Figura 6**.

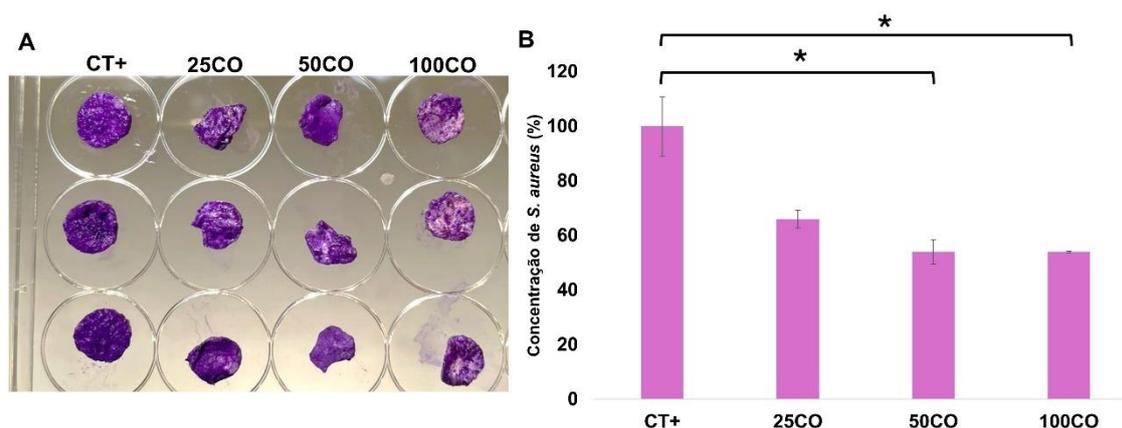


Figura 6. Formação de biofilme de *S. aureus* a partir da coloração por Cristal Violeta. A) imagem macroscópica da membrana de látex/PVA (CT+) e membranas com extrato de CO nas concentrações de 25 mg/mL (25CO), 50 mg/mL (50CO) e 100 mg/mL (100CO) coradas com Cristal Violeta. B) Gráfico da quantidade de *S. aureus* nas diferentes amostras. O símbolo (*) indica significância estatística ($p < 0.05$).

A partir da coloração por Cristal Violeta, foi notado que a amostra CT+ obteve uma formação de biofilme, com crescimento de 100 % das bactérias na membrana, enquanto nas amostras incorporadas com extrato de CO a formação de biofilme variou conforme a concentração de extrato de CO. A amostra de 25CO apresentou um crescimento de 66 % e as amostras de 50CO ($*p < 0.05$) e 100CO ($*p < 0.05$) mostraram um crescimento de 54 % (**Figura 6B**), porcentagem significativamente abaixo quando comparada com a amostra CT+. As diferenças notadas na formação de biofilme puderam ser evidenciadas na **Figura 6A**, o qual a coloração por Cristal Violeta foi mais intensa nas amostras que obtiveram maior crescimento.

Estudos mostram que o extrato de CO possui características antimicrobianas (FATIMA et al 2018; CHAKRABORTHY, 2008). Em contrapartida, crescimento de bactérias nas membranas contendo o extrato CO pode ser explicado pelo fato de o extrato ser a base de água. KRYSZCZUK et al (2023) relatou que a maioria dos extratos naturais são a base de solventes para a extração dos princípios ativos do componente e por isso uma maior eficácia na ação antimicrobiana, contudo, o autor considerou que extratos a base de água deionizada são tendências atuais, uma vez que são de baixo custo e ecologicamente correto. Além disso, os solventes podem ser prejudiciais para a saúde humana, sendo um componente nocivo para o organismo (KUSHWAHA, 2010,

CVETANOVIC, 2019) e causar problemas dérmicos, bem como irritação e dermatite (ROWSE e EMMETT, 2004).

Desta maneira, o extrato de CO incorporado à membrana de Látex/PVA, mesmo não apresentando uma total inibição da bactéria, as amostras de 50CO e 100CO evidenciaram uma atividade antibacteriana quando comparado à membrana de Látex/PVA isento de extrato (CT+), mostrando que a CO pode diminuir a formação de biofilme e desta forma diminuir a uma possível infecção numa lesão dérmica.

3.4.2 Antibiograma

O ensaio de antibiograma das amostras da membrana de Látex/PVA isento de extrato de CO e membrana de Látex/PVA nas concentrações de 25CO, 50CO e 100CO, foram elucidados pela **Figura 7**.

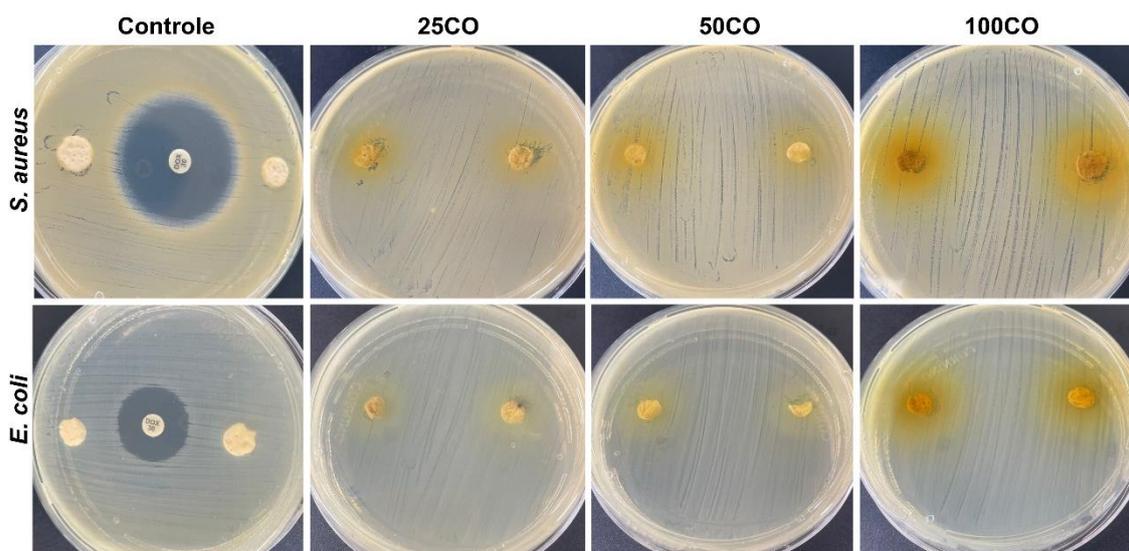


Figura 7. Difusão do extrato de CO incorporado à membrana de Látex/PVA nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL, após 24h em cultura de *S. aureus* e *E. coli*. A Doxiciclina foi utilizada como controle de antibiótico comercial e a membrana de Látex/PVA isento de CO foi utilizado como Controle Positivo.

Foi observado na **Figura 7** que as membranas de Látex/PVA isento de CO não apresentou nenhuma inibição tanto para *S.aureus* quanto para *E. coli*, enquanto que a doxiciclina mostrou um maior halo de inibição para *S. aureus*, seguido da *E. coli*, após 24 h de cultura. Em contrapartida, a membrana de Látex/PVA com extrato de CO nas diferentes concentrações um halo difuso do extrato de CO após 24 h de cultura de *S.*

aureus, sendo a concentração de 100CO o qual apresentou um maior halo de difusão, seguido do 50CO e 25CO. Já para a cultura de *E. coli*, os halos de difusão do extrato foi evidenciado com menor tamanho e intensidade. Segundo PINTO et al. (2023) extratos naturais, bem como o óleo de copaíba, apresentaram uma característica bacteriostática em 8 horas, seguido de uma diminuição de halo após 24h de cultura, para concentrações de 25, 50 e 75% de extrato.

O efeito do extrato de CO incorporado na membrana de Látex/PVA pode ser diminuído pelo fato do extrato estar incorporado ao material (PVA) o que retarda a liberação do extrato, quando comparado ao extrato direto no disco de papel (PELIN et al. 2023). Além disso, o efeito não inibitório do extrato de CO para a *S. aureus* e a *E. coli*, pode estar relacionada à quantidade de princípios ativos contidos no extrato. De acordo com JAN et al. (2017) cada princípio ativo da CO tem uma função diferente, bem como as plastoquinonas, umbeliferona, que estão relacionadas a atividade antimicrobiana. Desta forma, é válido uma nova análise em 8h de cultura para evidenciar uma possível formação de halo bacteriostático, lembrando que o extrato natural é a base de água e desta forma não há solventes que possam mascarar os resultados inibitórios.

3.5 Ensaio de Liberação

A **Figura 8** apresentou a liberação do extrato de CO na membrana de Látex/PVA em diferentes concentrações (25CO, 50CO e 100CO).

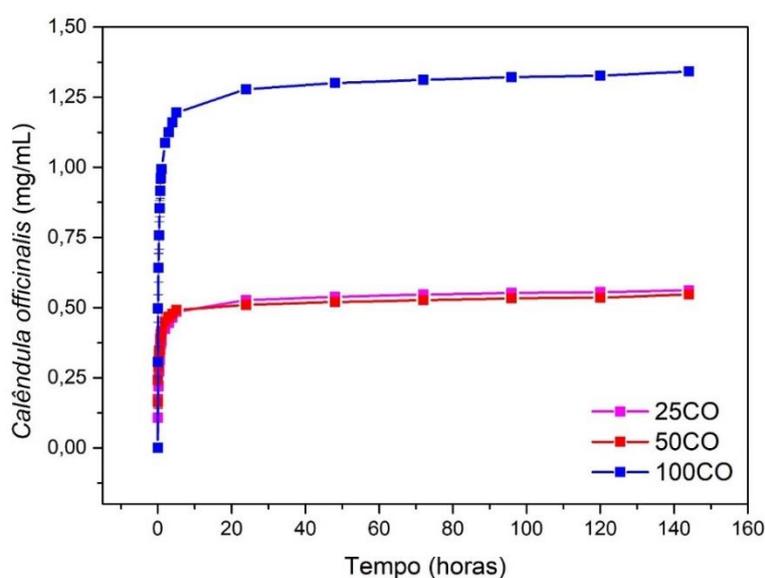


Figura 8. Gráfico da liberação controlada do extrato de CO na membrana de Látex/PVA nas concentrações de 25 mg/mL (25CO), 50 mg/mL (50CO) e 100 mg/mL (100CO).

Um perfil de liberação do extrato de CO foi evidenciado em todas as amostras em questão, o qual tiveram a liberação em explosão (efeito *burst release*) nas primeiras horas (**Figura 8**) e uma liberação mais prolongada nas demais horas. A amostra 100CO obteve uma liberação maior em comparação com as demais amostras, chegando a 1,34 mg/mL em 24 horas. Já as amostras de 25CO e 50CO obtiveram uma liberação de 0,56 mg/mL e 0,54 mg/mL, respectivamente. A liberação chegou no seu platô após 24 horas de experimento, característica intrínseca da liberação sustentada. Essa diferença notada da liberação do extrato está intimamente relacionada a concentração que foi incorporada na membrana, sendo a amostra 100CO com maior concentração de CO seguido da amostra 50CO e 25CO. Esse efeito de liberação em explosão nas primeiras horas pode estar relacionado à incorporação física do extrato na membrana de Látex/PVA. É sabido que o PVA é hidrofílico e devido a isso, seu perfil de liberação é rápida (ZHOU et al. 2019). Já a liberação prolongada observada nos dias seguintes pode estar relacionada ao Látex o qual possui caráter hidrofóbico (AMBEGODA et al. 2020).

Essa liberação em explosão nas primeiras horas também foi demonstrada no estudo de MOMENI et al (2024), com liberação do extrato de CO em explosão em 160 minutos e chegou no platô após 540 minutos. Pelo extrato de CO possuir propriedades anti-inflamatórias, esse extrato justifica-se para ser aplicado com uma alta taxa de liberação. A mesma característica foi evidenciada por PELIN et al (2023), onde a rápida liberação do extrato de CO incorporada ao hidrogel de Pullalan/PVA aconteceu nos primeiros 15 minutos, sendo gradual depois de 8h e mais lentamente após 24 h. Tal característica pode estar relacionada ao grau de hidrofobicidade dos materiais, ou seja, tanto o látex quanto o PVA estão influenciando na liberação do extrato natural para o meio. Essa cinética de liberação se mostra promissora, uma vez que estudos mostraram que uma liberação controlada, ou seja, com liberação em explosão nas primeiras horas e uma liberação sustentada nas demais horas, levam a um sucesso na cicatrização de feridas dérmicas, o qual resultado numa cicatrização mais rápida, impulsionando uma resposta angiogênica aprimorada (JOHNSON e WANG, 2015; LI et al. 2009; XIE et al. 2013).

Para melhor compreensão do perfil de liberação evidenciado pela membrana de Látex/PVA com extrato de CO nas concentrações de 25CO, 50CO e 100CO, foram aplicados os modelos cinéticos de Korsmeyer-Peppas, Higuchi, Primeira Ordem e Ordem Zero, descritos na **Tabela 3**. Devido ao perfil de “burst release” apresentado neste

trabalho, todos os modelos matemáticos anteriormente mencionados foram ajustados em duas fases (primeira fase: primeiras horas de experimento e segunda fase: demais horas de experimento) de liberação como estudos de SCAFFARO et al. (2017) e LOPEZ-MUÑOZ et al (2022).

Tabela 3. Valores de modelos matemáticos de Korsmeyer-Peppas, Higuchi, Ordem Zero e Primeira Ordem aplicados aos perfis de liberação do extrato de CO.

Modelos	Ajuste	Parâmetros	25 CO	50 CO	100 CO
Korsmeyer-Peppas	1	R ²	0,97	0,98	0,95
		n	0,27	0,19	0,23
	2	R ²	0,99	0,94	0,98
		n	0,03	0,03	0,03
Higuchi	1	R ²	0,91	0,72	0,88
		k	0,03	0,03	0,006
	2	R ²	0,98	0,96	0,98
		k	0,0008	0,0008	0,0001
Ordem Zero	1	R ²	0,57	0,70	0,49
		k ₀	0,01	0,01	0,002
	2	R ²	0,94	0,96	0,95
		k ₀	0,00005	0,00005	0,000006
Primeira Ordem	1	R ²	0,46	0,44	0,41
		k	0,19	0,13	0,16
	2	R ²	0,94	0,96	0,94
		k	0,00005	0,00005	0,0004

Baseado nos resultados observados na análise dos modelos matemáticos aplicados para o perfil de liberação, o modelo que se mostrou, em média, com R² mais aceitável foi o de Korsmeyer-Peppas para os dois ajustes de liberação, bem como observado na **Figura 9**.

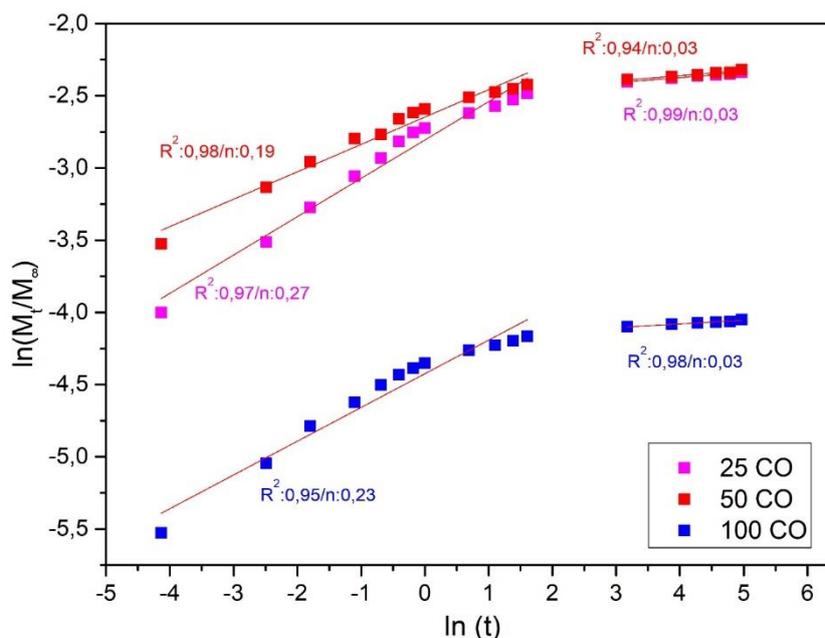


Figura 9. Modelo matemático de Korsmeyer-Peppas aplicado ao perfil de liberação do extrato de CO nas concentrações de 25Co, 50Co e 100CO.

A **Figura 9** evidenciou que o modelo cinético aplicado aos dois intervalos de tempo foi satisfatório uma vez que o R^2 obteve valores igual ou superior a 0,95 (BULBUL et al. 2020). Os valores de $n < 0,5$ demonstrado na figura indicou que o perfil de liberação ocorrida no sistema foi por difusão Fickiana (AHMED et al. 2019). Esse sistema compreende no processo de transporte do penetrante (água) impulsionado pelo gradiente de concentração de penetrante (SMITH 2000). Estudos de SITTIWONG et al. (2012) evidenciaram o processo de difusão Fickiana a partir de uma liberação utilizando PVA como carreador. Bem como mostrou estudo de o qual o processo de liberação evidente a partir da utilização de Látex foi por difusão, mostrando que ambos os polímeros envolvidos na composição das membranas possuem tais características de liberação (ANDRADE et al. 2022).

Além disso, as menores concentrações de extrato de CO liberadas da membrana de Látex/PVA pode estar relacionada a vários constituintes (princípios ativos) que compõe o extrato. Segundo BUTNARIU e CORADINI (2012), mostraram que para cada componente no extrato de CO a leitura do comprimento de onda altera. Isso significa que a concentração mostrada neste trabalho pode estar relacionada a alguns tipos de constituintes que são lidos num comprimento de onda de 232 nm.

3.6 Análise de Citotoxicidade por MTT

Os resultados obtidos a partir da análise de MTT da viabilidade celular das membranas de Látex/PVA com extrato de CO nas concentrações de 25CO, 50CO e 100CO, foram observados no gráfico da **Figura 10**, nos períodos de 1e 3 dias.

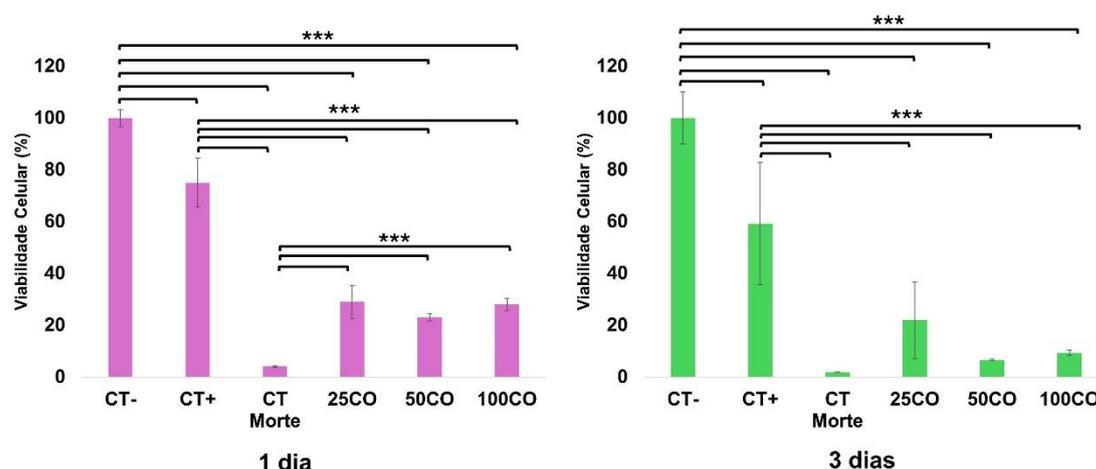


Figura 10. Viabilidade celular das membranas de Látex/PVA com extrato de CO nas concentrações de 25mg/mL (25CO), 50 mg/mL (50CO) e 100 mg/mL(100CO). O controle negativo (CT-) refere-se as células semeadas direto na placa; controle positivo (CT+) a membrana de Látex/PVA isenta de CO e o controle morte (CT Morte) o qual as células foram submetidas a morte. O símbolo (***) indica significância estatística ($p < 0,001$) comparando os grupos no período de 24h e 72h.

Com base nos resultados apresentados foi verificado uma maior viabilidade das células Vero no grupo CT+ (Látex/PVA isento de CO) no período de 1 dia, com porcentagem de 75 %. Enquanto no período de 3 dias o CT+ apresentou uma viabilidade de 60 %, valores significativamente abaixo do valor encontrado no CT- ($p < 0,001$), contudo, sendo maior que 50 % de viabilidade celular, mostrando que tanto o látex quanto o PVA não mostraram citotoxicidade, corroborando com os resultados biológicos da etapa 2 do trabalho.

Os grupos 25CO, 50CO e 100CO mostraram uma porcentagem de viabilidade celular de 29 %, 23 % e 28 %, respectivamente, no período de 1 dia, resultados esse significativamente menores quando comparados com o CT- e CT+ ($p < 0,001$). Após 3 dias de cultivo, os mesmos grupos obtiveram valores de 22 %, 9 % e 10 %, mostrando uma maior citotoxicidade perante o extrato de CO em comparação ao CT- e CT+ ($p > 0,001$).

De acordo com FONSECA et al. (2010) concentrações menores ou iguais a 15 mg/mL de extrato de CO não apresentam citotoxicidade, enquanto valores maiores ou

iguais a 30 mg/mL apresentam efeito citotóxicos. Em contrapartida, o mesmo autor em um ensaio *in vivo*, demonstrou que as concentrações de 150 a 300 mg/Kg, garantem a eficácia do extrato de CO para feridas causadas pelas irradiações UV na pele do animal. Esses dados apontam que a concentração utilizada nesse estudo, ainda que se apresente citotóxico em meio *in vitro*, para aplicações *in vivo* e clínico, a dosagem pode ser promissora para os tratamentos de feridas dérmicas. Estudos de ASHWLAYAN et al. (2018) relataram que para cada potencial terapêutico da CO a dose é adaptada, seja para efeitos anti-inflamatórios, antibacteriano, antioxidante entre outros. Para atividades antioxidantes necessitam de concentrações de CO entre 400 a 2000 mg/mL. Assim, o extrato de CO é muito promissora para diferentes ações terapêuticas o que vai depender é a dose estabelecida para determina aplicação.

4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados de FTIR, TG e DSC, o extrato de CO foi incorporado na membrana de Látex/PVA (80/20) nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL (25CO, 50CO e 100CO). O ensaio microbiológico por Cristal Violeta evidenciou uma diminuição da formação de biofilme de bactérias *S. aureus* nas membranas compostas por 25CO, 50CO e 100CO quando comparado ao Látex/PVA isento de extrato. Além disso, a membrana de Látex/PVA nas diferentes concentrações garantiu uma liberação do extrato de forma controlada até 144h. Ensaio *in vitro* mostraram uma pequena viabilidade celular em todas as concentrações (25CO, 50CO e 100CO) quando comparado com o CT morte no período de 1d. Mais ensaios irão assegurar que a membrana de Látex/PVA com extrato de CO pode garantir a eficácia e a segurança para aplicações nas doenças dérmicas raras.

Capítulo VI

1. CONCLUSÕES FINAIS

Os resultados obtidos da primeira etapa do trabalho evidenciaram que o látex purificado com solvente seis vezes (LP6) apresentou um material menos estável, com alterações notáveis em sua estrutura física, taxa de intumescimento, proliferação celular e uma carga superficial negativa reduzida. Esses resultados sugerem que o processo de purificação altera as características físico-químicas e biológicas do látex. As proteínas e lipídios presentes no grupo LNCP podem potencialmente ter uma influência positiva em sua estrutura e melhorando seu desempenho em diversas aplicações médicas e de saúde. Já na segunda etapa as amostras com as composições 75/25 e 80/20 se mostraram com capacidade de intumescimento, carga de superficial maiores em comparação às amostras 50/50 e 90/10. Além disso, as membranas nessas respectivas composições apresentaram uma superfície mais estriada, rugosa e com poros. Todas as composições de látex/PVA demonstraram aderência celular, assim como um caráter não citotóxico, evidenciado pela semelhança na morfologia e na confluência celular entre o controle negativo da linhagem células Vero. Resultados de FTIR e análises térmicas mostraram uma incorporação do extrato de CO em diferentes concentrações (25CO, 50CO e 100CO), na membrana de Látex/PVA da composição 80/20. O ensaio de liberação mostrou que o extrato obteve um perfil de liberação controlada nas diferentes concentrações em um período de 144 h. As análises microbiológicas por Cristal Violeta evidenciaram uma queda da formação de biofilme bacteriano na membrana com extrato de CO, mostrando que o extrato obteve efeitos antibacterianos. Portanto, a membrana de Látex/PVA incorporada com extrato de CO revela-se uma alternativa promissora para aplicações em curativos voltados ao tratamento de doenças dérmicas raras.

2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante dos resultados evidenciados neste trabalho, a membrana a base de Látex/PVA na composição de 80/20 incorporado com extrato de CO em diferentes concentrações se mostraram promissores para aplicações de curativos dérmicos para doenças dérmicas raras, levando em consideração suas características físico-químicas e biológicas. Desta forma, ensaios complementares, bem como, análises de adesão e permeabilidade de membrana e ensaios de cicatrização *in vitro*, podem enriquecer o conhecimento sobre a membrana, bem como sua futura aplicação final.

Referências

REFERÊNCIAS

AMBEGODA, V. T. et al. Enhancement of hydrophobicity of natural rubber latex films using diatomaceous Earth. *Journal of Applied Polymer Science*. 138, 12, 50047, 2020.

ABDEL-MOHSEN, A. M., et al. Eco-Synthesis of PVA/Chitosan Hydrogels for Biomedical Application. *Journal of Polymers and the Environmental*. 19:1005-1012, 2011.

ADEOSUN, S. O., et al. Biomaterials for Drug Delivery: Sources, Classification, Synthesis, Processing, and Applications. *Advanced Functional Materials*. 1-25, 2020.

AGARWAL, C. et al. An acellular dermal matrix allograft (Alloderm®) for increasing keratinized attached gingiva: A case series. *J Indian Soc Periodontol*, 19(2): 216–220, 2015.

AGARWAL, K. M., et al. Comprehensive Study Related to Advancement in Biomaterials for Medical Applications. *Sensors International*, 1, 10055, 2020.

AHMED, L. et al. Study the Using of Nanoparticles as Drug Delivery System Based on Mathematical Models for Controlled Release. *International Journal of Latest Technology in Engineering, Management & Applied Science*. 3, 5, 52-56, 2019.

AK, G. et al. Chemical composition and biological activities of essential oils from *Calendula officinalis* L. flowers and leaves. *Flavour and Fragrance Journal*, 36,5, 554-563, 2021.

AKSAKAL, B. et al. Uniaxial tensile and structural properties of poly(vinyl alcohol) films. The influence of heating and film thickness. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(23), 2023.

ALBERTS, B. et al. (Orgs.). *Biologia Molecular da Célula - 6° Ed.* 2017, Ed. Artes Médicas, Porto Alegre.

ALLERGEN.ORG [Internet]. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee. Available:http://www.allergen.org/search.php?allergen_source=Hevea+brasiliensis.

ALSARAF, K. M., ABBAS, I. S. e HASSAN, E. F. Extraction and Clinical Application of *Calendula Officinalis* L. Flowers Cream. *Materials Science and Engineering*, 571, 1-10, 2019.

ALVES, N. O., et al. Chitosan/poly(vinyl alcohol)/ bovine bone powder biocomposite: A potential biomaterial for the treatment of atopic dermatitis-like skin lesions, *Carbohydrate Polymers*. 148, 115-124, 2016.

AMBEGODA, V. T. et al. Enhancement of hydrophobicity of natural rubber latex films using diatomaceous earth, *Journal of Applied Polymer Science*, 138, 2020.

ANDRADE, K. L., et al. Latex and natural rubber: recent advances for biomedical applications. *Polímeros*, 32 (2), 1-12, 2022.

ARAMWIT, P. Introduction to biomaterials for wound healing. *Wound healing Biomaterials*, 3-38, 2016.

ARAUJO, T. A. T., et al. Collagen Membranes for Skin Wound Repair: A Systematic Review. *Journal of Biomaterials Applications*, 36(1), 95-112, 2021.

ARIMA, Y.; IWAT, H. Effects of surface functional groups on protein adsorption and subsequent cell adhesion using self-assembled monolayer, *Journal of Materials Chemistry*. 17, 4079-4087, 2007.

ARIYAWIRIYANAN, W. et al. The Mechanical Properties of Vulcanized Deproteinized Natural Rubber, *Energy Procedia*. 34, 728-733, 2013.

ARORA, D. et al. A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula*. *Pharmacogn Ver.* 7(14): 179–187, 2013.

ARRIAGA, J. C. F., et al. Synthesis of a PVA drug delivery system for controlled release of a Tramadol–Dexketoprofen combination. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 32:64, 1-11, 2021.

ASAMI, J., et al. The impact of non-deproteinization on physicochemical and biological properties of natural rubber latex for biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 126782, 2023.

ASHWLAYAN, V. D., et al. Therapeutic Potential of Calendula Officinalis. *Pharmacy & Pharmacology International Journal*, 6(2), 149-155, 2018.

ASTM F813-20. Standard Practice for Direct Contact Cell Culture Evaluation of Materials for Medical Devices. *Annu B ASTM Stand;07(Reapproved 2012):5-8* (2011).

ASY-SYIFA, N., et al. The Study of the Swelling Degree of the PVA Hydrogel with varying concentrations of PVA. *Journal of Physics: Conference Series*, 2243, 012053, 2022.

AWADA, H. DANEAULT, C. Chemical Modification of Poly(Vinyl Alcohol) in Water, *Applied Sciences*, 5, 840-850, 2015.

AZARIAN, M. H. et al. Biocompatibility and biodegradability of filler encapsulated chloroacetated natural rubber/polyvinyl alcohol nanofiber for wound dressing. *Materials Science and Engineering: C*. 103:109829, 2019.

BAGHAIE, S., et al. Wound healing properties of PVA/starch/chitosan hydrogel membranes with nano Zinc oxide as antibacterial wound dressing material. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 28:18, 2220-2241, 2017.

BAHADORAN, M. et al. Development of a polyvinyl alcohol/sodium alginate hydrogel-based scaffold incorporating bFGF-encapsulated microspheres for accelerated wound healing. *Scientific Reports*, 10, 7342, 2020.

BARDHAN, A., et al. Epidermolysis bullosa. *Nature Reviews disease primers*. 6, 78, 1-27, 2020.

BARROS, N. R. et al., Natural rubber latex: Development and in vitro characterization of a future transdermal patch for enuresis treatment, *Int. J. Polym. Mater.* 66(17), 871-876, 2017.

BARROS, N. R., et al. Highly absorptive dressing composed of natural latex loaded with alginate for exudate control and healing of diabetic wounds. *Materials Science and Engineering: C*, v. 119, p. 111589, 2021.

BARROS, N. R., et al. Natural latex-glycerol dressing to reduce nipple pain and healing the skin in breastfeeding women. *Skin Research And 93 Technology*, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 461-468, 9 jan. 2019.

BATES, N.M et al. Evaluation of the Effect of Crosslinking Method of Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogels on Thrombogenicity. *Cardiovasc Eng Technol.* 11(4): 448–455, 2020.

BERSANETTI, P.A. et al. Enzymatically obtaining hydrogels of PVA crosslinked with ferulic acid in the presence of laccase for biomedical applications. *Eur. Polym. J.* 112, 610-618, 2019.

BERTHELOT, K., et al. Hevea brasiliensis REF (Hev B 1) and SRPP (Hev b 3): An overview on rubber particle proteins, *Biochimie.* 106, 1-9, 2014.

BIJARIMI, M., AHMAD, S., RASID, R. Mechanical, thermal and morphological properties of poly (lactic acid)/epoxidized natural rubber blends. *Journal of Elastomers & Plastics*, v. 46, n. 4, p. 338-354, 2014.

BISWAL, T. Biopolymers for tissue engineering applications: A review. *Materials Today: Proceedings*, 4, 397-402, 2021

BOKELMAN, J. M. Calendula (*Calendula officinalis*): Flower. *Medicinal Herbs in Primary Care*, 263-267, 2022.

BONFILS, F., et al. Enhanced Solvent Extraction of Polar Lipids Associated with Rubber Particles from *Hevea brasiliensis*, *Phytochem. Anal.* 18, 103-108, 2007.

BOONME, P., TAWEEPRED, W. e PICHAYAKORN, W. Novel process in preparation of deproteinized natural rubber látex. *Advanced Materials Research*, 844, 462-465, 2014.

BORGES, F. A., et al. Natural rubber Latex: Study of a Novel Carrier for *Casearia sylvestris* Swartz Delivery, 1-5, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Diretrizes para atenção integral às pessoas com doenças raras no sistema único de saúde-SUS. Portaria GM/MS nº199 de 30/01/2014.

BROWN, D. J. e DATTNER, A. M. Phytotherapeutic approaches to common dermatologic conditions. *Archives of Dermatology*, 134(11), 1998.

BULBUL, Y. E. et al. Development of PCL/PEO electrospun fibrous membranes blended with silane-modified halloysite nanotube as a curcumin release system. *Applied Clay Science*, v. 186, p. 105430, 2020.

BUNGHEZ, I. R., ION, R. M. Complex spectral characterization of active principles from marigold (*calendula officinalis*). *Journal of Science and Arts*, 11, 1(14), 59-64, 2011.

BUTNARIU, M. e CARADINI, C. Z. Evaluation of Biologically Active Compounds from *Calendula officinalis* Flowers using Spectrophotometry. *Chemistry Central Journal*, 6:35, 1-7, 2012.

BUZZI, M. et al. Pressure ulcer healing with Plenusdermax® *Calendula officinalis* L. extract. *Revista Brasileira de Enfermagem REBEN*. 69(2):230-6, 2016.

CANEVAROLO JR. S.V. Técnicas de Caracterização de Polímeros, Artiliber, São Paulo, 2017.

CARAZZAI, R., et al. Electrospun natural rubber latex biocomposite for scaffolds in tissue engineering. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 36, n. 5, p. 351-364, 2021.

CARDOSO, C. S. et al. New approaches to second-degree burn healing: Polyvinyl alcohol membrane loaded to arnica combined to laser therapy. *Journal of Biomaterials Applications*, 12:8853282241238609, 2024.

CESAR, M. B., et al. Development and Characterization of Natural Rubber Latex and Polylactic Acid Membranes for Biomedical Application. *Journal of Polymers and the Environment*, 28:220-230, 2020.

CHAGAS, P. A. M., et al. Bilayered electrospun membranes composed of poly(lactic acid)/natural rubber: A strategy against curcumin photodegradation for wound dressing application, *Reactive and Functional Polymers*. 163, 104889, 2021.

CHAKRABORTHY, G. S. Antimicrobial activity of the leaf extracts of *calendula officinalis* (linn.). *Journal Herbal Medicine and Toxicology*. 2(2), 65-66, 2008.

CHAIKUMPOLLERT, O. et al., Preparation and characterization of protein-free natural rubber, *Polym Adv Technol*. 23, 825-828, 2011.

CHEN, Y. Et al. Synthesis and properties of Poly(vinyl alcohol) hydrogels with high strength and toughness. *Polym. Test.* 108, 107516, 2022.

CHENG, A. SAINT-CYR, M. Comparison of Different ADM Materials in Breast Surgery. *Clinics in Plastic Surgery*, 39, 167-175, 2012.

CHOO, K., et al. Preparation and Characterization of Polyvinyl Alcohol-Chitosan Composite Films Reinforced with Cellulose Nanofiber. *Materials*, 9, 644, 2016.

CIFRIADI, A., et al. Effect of urea deproteinization on catalytic hydrogenation of Natural Rubber Latex, *IOP Conf. Ser.: Materials Science and Engineering: A.* 223, 1-12, 2017.

CLIMOV, M., et al. Natural biomaterials for skin tissue engineering. *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 145-161, 2016.

COMMITTEE ON HERBAL MEDICINAL PRODUCTS (HMPC). Assessment report on *Calendula officinalis* L., flos. European Medicines Agency- Science Medicines Health, 1-37, 2018.

COSTA, L. M. M.; MATTOSO, L. H. C.; FERREIRA, M. Electrospinning of PCL/natural rubber blends. *Journal of materials science*, v. 48, n. 24, p. 8501-8508, 2013.

CUIET, Y., et al. Poly-acrylic acid grafted natural rubber for multi-coated slow release compound fertilizer: Preparation, properties and slow-release characteristics, *International Journal of Biological Macromolecules.* 146, 540-548, 2020.

CURY, D. P., et al. Application of a Purified Protein from Natural Latex and the Influence of Suture Type on Achilles Tendon Repair in Rats, *The American Journal of Sports Medicine* 47(4), 901-914, 2019.

CVETANOVIC, A. Extractions Without Organic Solvents: Advantages and Disadvantages. *Chemistry Africa.* 2(3), 2019.

DARULIZA, K., et al. Anti-fungal effect of *Hevea brasiliensis* latex C-serum on *Aspergillus niger*. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 15, 1027-1033, 2011.

DATTA, S. Chapter 12- Elastomer Blends. *The Science and Technology of Rubber.* 4, 547-589, 2013.

DAVOUDABADI, M. et al. Wound healing and antibacterial capability of electrospun polyurethane nanofibers incorporating *Calendula officinalis* and Propolis extracts. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 34, 11, 1491-1516, 2023.

DEBBARMA, S. et al. Marigold (*Tagetes*) petals as a novel green bio-based heterogeneous catalyst for biodiesel production from palm oil. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*. 46, 1, 3964–3978, 2024.

DEVENE, J. L. et al. Single-institution outcome experience using AlloDerm® as temporary coverage or definitive reconstruction for cutaneous and soft tissue malignancy defects. *The American Surgeon*, 79(5):476-82, 2013.

DIAS, M. C., et al. Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*, 26, 5377, 2021.

DICK, T. A. e SANTOS, L. A. In situ synthesis and characterization of hydroxyapatite/natural rubber composites for biomedical applications. *Materials Science & Engineering C*, 77, 874-882, 2017.

DORKHANI, E. et al. Biomedical properties and hemostatic efficacy of polyvinyl alcohol (PVA) based hydrogel in experimental rat liver injury model. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 21, 2023.

DRECHESLER, A., et al. Surface modification of poly(vinyl alcohol) fibers to control the fiber-matrix interaction in composites. *Colloid and Polymer Science*, 297:1079-1093, 2019.

DULF, F. V., et al. Fatty acid composition of lipids in pot marigold (*Calendula officinalis* L.) seed genotypes. *Chemistry Central Journal*, 7:8, 1-11, 2013.

DUY, H. N., et al. Improvement of thermal properties of Vietnam deproteinized natural rubber via graft copolymerization with styrene/acrylonitrile and diimide transfer hydrogenation, *Polymers for Advanced Technologies*, 32(2), 736-747, 2020.

EGRI, O. ERDEMIR, N. Production of *Hypericum perforatum* oil-loaded membranes for wound dressing material and in vitro tests. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47, 1, 2019.

ELDEEB, A. E., et al. Biomaterials for Tissue Engineering Applications and Current Updates in the Field: A Comprehensive Review. *AAPS Pharm Sci Tech*, 23:267, 2022.

EL-KASED, R. F., et al. Honey-based hydrogel: In vitro and comparative In vivo evaluation for burn wound healing. *Scientific Reports*, 7:9692, 2017.

ESPÍNDOLA, S. P., et al. The Glass Transition Temperature of Heterogeneous Biopolymer Systems, *Biomacromolecules*. 24(4), 1627-1637, 2023.

FAHMY, A. et al. Poly(vinyl alcohol)-hyaluronic Acid Membranes for Wound Dressing Applications: Synthesis and in vitro Bio-Evaluations. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26 (7) , 2015.

FAN, C. et al. Biobrane dressing for paediatric burns in Singapore: a retrospective review. *Singapore Medicine Journal*, 59(7), 360-365, 2018.

FARAG, M. M. Recent trends on biomaterials for tissue regeneration applications: review. *Journal of Materials Science*. 58:527-558, 527-558, 2023.

FATIMA, S. S. et al. In vitro analysis of ethanolic extract of flowers of *Calendula officinalis* for antioxidant, antimicrobial and uv-h2o2 induced DNA damage protection activity. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 7(5), 2378-2383, 2018.

FERNANDES, I.S. et al. Delivery kinetics of natural active agents by PVA hydrogels intended for wound care. *Matéria (Rio J.)* 28 (3), 2023.

FERREIRA, M., et al. Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of *Hevea brasiliensis*. *Brasizilian Journal of Physics*. 39(3), 564-569, 2009.

FERREIRA, L. M. M. C. et al. Polyacrylamide Hydrogel Containing Calendula Extract as a Wound Healing Bandage: In Vivo Test. *International Journal of Molecular Sciences*. 24(4):3806, 2023.

FERREIRA, R. V. Reticulated PVA Foams: Preparation, Characterization and in vitro Evaluation for Potential 3D Microbiological Culture. *Materials Research*, 23(6), 2020.

FIGUEIREDO, I. S. T. et al. Efficacy of a membrane composed of polyvinyl alcohol as a vehicle for releasing of wound healing proteins belonging to latex of *Calotropis procera*. *Process Biochemistry*. 49: 512–519, 2014.

FITZGERALD, B. W. The physiology of impenetrable skin: Colossus of the X-Men. *Advances in Physiology Education*, 42:529-540, 2018.

FLORIANO, J. F., et al. Ketoprofen Loaded in Natural Rubber Latex Transdermal Patch for Tendinitis Treatment. *Journal of Polymers and the Environment*. 26 2281-2289, 2018.

FONFRIA, V. A. L. Infrared Difference Spectroscopy of Proteins: From Bands to Bonds. *Chemical Reviews*, 120, 3466-3576, 2020.

FUKUHARA, L., et al. Removal of Proteins from natural Rubber Latex and Gloves, *KGK rubberpoint*, 68(3), 24-29, 2015.

FURUYA, M. et al. Fabrication of biocomposites composed of natural rubber latex and bone tissue derived from MC3T3-E1 mouse preosteoblastic cells. *Nanocomposites*, 3(2), 76–83, 2017.

GAO, T., et al. Patterned Polyvinyl Alcohol Hydrogel Dressings with Stem Cells Seeded for Wound Healing. *Polymers*, 11, 171, 2019.

GARCIA, C. S. C., et al. Natural Rubber Films Incorporated with Red Propolis and Silver Nanoparticles Aimed for Occlusive Dressing Application. *Materials Research*, 24(2):e20200415, 2021.

GARMS, B. C., et al. Characterization and Microbiological Application of Ciprofloxacin Loaded in Natural Rubber Latex Membranes. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 15(1): 1-10, 2017.

GIVOL, O., et al. A systematic review of *Calendula officinalis* extract for wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 27, 548-561, 2019.

GONZALEZ, J. C. C., et al. Risk factors associated with actinic prurigo: a case control study. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 92(6), 774-8, 2017.

GUERRA, N. B., et al. Biomedical applications of natural rubber latex from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *Materials Science & Engineering C*, 126, 1-18, 2021.

GUERRA, N. B., et al. Chemical and in vitro characterization of epoxidized natural rubber blends for biomedical applications. *Journal of Polymer Research*, v. 25, p. 1-9, 2018.

GUNASEKARAN, S., NAYAGAM, A. A. J. e NATARAJAN, R. Wound healing potentials of herbal ointment containing *Calêndula officinalis* Linn. on the alteration of immunological markers and biochemical parameters in excision wounded animals. *International Journal of Phytomedicine and Phytotherapy*, 6:77, 2020.

GUO, C., et al. Sulfonated, quaternized, and chlorogenic acid composited sodium alginate hydrogels/*Eucommia ulmoides* rubber films as in vitro antibacterial wound dressings for accelerating wound healing. *Industrial Crops and Products*, v. 190, p. 115885, 2022.

GUYTON & HALL - *Tratado De Fisiologia Médica - 14ª Edição*. John E. Hall e Michael E. Hall. Ref.: GUA8610 ... Edição. 14ª/2021).

HAI, V. L., et al. Green Nanocomposites Made With Polyvinyl Alcohol and Cellulose Nanofibers Isolated From Recycled Paper. *Journal of Renewable Materials*, 7 (7), 621-628, 2019.

HAO, L., et al. Surface chemistry from wettability and charge for the control of mesenchymal stem cell fate through self-assembled monolayers, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 148, 549-556, 2016.

HAYEEMASAE , N., et al. Influence of Centrifugation Cycles of Natural Rubber Latex on Final Properties of Uncrosslinked Deproteinized Natural Rubber, *Polymers*. 14, 1-14, 2022.

HERCULANO, R. D. et al. Metronidazole release using natural rubber latex as matrix, *Materials Research*, 13, 57-61, 2010.

HERCULANO, R. D. et al. Aloe vera-loaded natural rubber latex dressing as a potential complementary treatment for psoriasis, *Int. J. Biol. Macromol.* 1, 124779, 2023.

HERCULANO, R. D., et al. Recent advances and perspectives on natural latex serum and its fractions for biomedical applications. *Biomaterials Advances*, 157, 213739, 2024.

HERNÁNDEZ, G. R., et al. Polyvinyl alcohol based-drug delivery systems for cancer treatment. *International Journal of Pharmaceutics*. 600, 120478, 2021.

HO. C. C. CHAPTER 4: The Production of Natural Rubber from *Hevea brasiliensis* Latex: Colloidal Properties, Preservation, Purification and Processing. Natural Rubber Materials, Volume 1: Blends and IPNs, 2013.

HOANG, B. N. et al. Enhanced selective adsorption of cation organic dyes on polyvinyl alcohol/agar/maltodextrin water-resistance biomembrane. *Journal of Applied Polymer Science*, 48904, 2019.

HOANG, B. N. et al. Removal of crystal violet from aqueous solution using environment-friendly and water-resistance membrane based on polyvinyl/agar/maltodextrin. *Materials Today: Proceedings*, 2020.

HONG, X., et al. Dry-wet spinning of PVA fiber with high strength and high Young's modulus. *OP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 439, 042011, 2018.

HU, J. et al., Chitin nanocrystals reticulated self-assembled architecture reinforces deproteinized natural rubber latex film, *J. Appl. Polym. Sci.* 137(39), 49173, 2020.

HUANG, C. Y. et al. Comparison of cell behavior on pva/pva-gelatin electrospun nanofibers with random and aligned configuration. *Sci Rep.* 6, (2016).

HUANG, M. H.; YANG, M. C. Evaluation of glucan/poly (vinyl alcohol) blend wound dressing using rat models. *International journal of pharmaceutics*, v. 346, n. 1-2, p. 38-46, 2008.

ILOMUANYA, M. O., et al. Polymeric Biomaterials for Wound Healing Incorporating Plant Extracts and Extracellular Matrix Components. *Recent Advances in Wound Healing*, 2021.

INTERNATIONAL STANDARD. ISO 10993-5 (E): Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods, International Standard, 2009.

INTERNATIONAL STANDARD. ISO 10993-5 (E): Biological evaluation of medical devices. Part 12: Sample preparation and reference materials, 2012.

IONESCU, O. M. et al. New Hyaluronic Acid/Polyethylene Oxide-Based Electrospun Nanofibers: Design, Characterization and In Vitro Biological Evaluation. *Polymers (Basel)*. 13(8): 1291, 2021.

ISO 10993-12 (E): Biological evaluation of medical devices. Part 12: Sample preparation and reference materials, (2012).

ISO 10993-5 (E): Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods, (2009).

JAHAN, Z., NIAZI, M. B. K., GREGERZEN, O. W. Mechanical, thermal and swelling properties of cellulose nanocrystals/PVA nanocomposites membranes. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 1-12, 2017.

JALANI, B. S. e RAMLI, O. Production Systems and Agronomy/Rubber. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 970-978, 2003.

JAN, N., ANDRABI, K. I. e JOHN, R. *Calendula officinalis*- An Important Medicinal Plant with Potential Biological Properties. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 83, 4, 769-787, 2017.

JAYADEVAN, J. et al., Deproteinized natural rubber latex grafted poly (dimethylaminoethyl methacrylate)–poly (vinyl alcohol) blend membranes: synthesis, properties and application, *Int. J. Biol. Macromol.* 107, 1821-1834, 2018.

JAYADEVAN, J. et al., Effect of glycerol and dibutyl phthalate on modified natural rubber latex-based drug delivery systems, *Int. J. Biol. Macromol.* 231, 123386, 2023.

JIN, S.G. Production and Application of Biomaterials Based on Polyvinyl alcohol (PVA) as Wound Dressing. *Chem Asian J.* 2;17(21):e202200595, 2022.

JOHNS, J. RAO, V. Characterization of Natural Rubber Latex/Chitosan Blends. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 13, 280-291, 2008.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica – texto e atlas*. 13ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. ISBN: 9788527731812.

JOHNSON, N. R. WANG, Y. Drug Delivery Systems for Wound Healing. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 16(7), 621-629, 2015.

KALIYATHAN, A. V., et al. Rubber–rubber blends: A critical review. *Progress in Rubber, Plastics and Recycling Technology*, 36(3), 196-242, 2020.

KANOKWIROON, K., et al. Antimicrobial activity of a protein purified from the latex of *Hevea brasiliensis* on oral microorganisms. *Mycoses*, 51, 301-307, 2008.

KARAS, L., et al. The impact of the Orphan Drug Act on Food and Drug Administration-approved therapies for rare skin diseases and skin-related cancers. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 81:3, 867-877, 2019.

KARAVELIDIS, V., et al. Nanoencapsulation of a water-soluble drug in biocompatible polyesters. Effect of polyesters melting point and glass transition temperature on drug release behavior, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 41(5), 636-643, 2010.

KATELARIS, C. H. Rare diseases and expensive drugs. *Asia Pacific Allergy*, 4(2): 73-74, 2014.

KATIYAR, S. et al. Novel strategies for designing regenerative skin products for accelerated wound healing. *3 Biotech*. 12:316, 2022.

KAUR, A., et al. Functional Skin Grafts: Where Biomaterials Meet Stem Cells. *Stem Cells International*, 1-20, 2019.

KAUR, G., et al. Biomaterials-Based Regenerative Strategies for Skin Tissue Wound Healing. *ACS Applied Bio Materials*, 5, 2069-2106, 2022.

KERSHE-SILVA, L. E., Cavalcante, D. G. S. M. and Job, A. E. Natural Rubber Latex Biomaterials in Bone Regenerative Medicine. *Biomaterials in Regenerative Medicine*, 305-317, 2018.

KHADIVAR, P., KHAJENIAZI, S., KARIMI, A. Preparation of a carboxymethylated diethyl aminoethyl cellulose-collagen nanocomposite scaffold as a candidate for skin tissue engineering. *Journal of Materials Research and Technology*, 19:3966-3979, 2022.

KHARAZMI, A., et al. Structural, optical, opto-thermal and thermal properties of ZnS-PVA nanofluids synthesized through a radiolytic approach. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6, 529-536, 2015.

KHODAKARAMI, M. e ALAGHA. High-Performance Polymers for Separation and Purification Processes: An Overview. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 56:18, 2019-2042, 2017.

KIM, J. e LEE, C. M. Wound healing potential of a polyvinyl alcohol-blended pectin hydrogel containing *Hippophae rhamnoides* L. extract in a rat model. *International Journal of Biological Macromolecules*, 99, 586-593, 2017.

KINOSHITA, M., et al. Biocomposites composed of natural rubber latex and cartilage tissue derived from human mesenchymal stem cells. *Materials Today Chemistry*, 12, 315-323, 2019.

KONOP. M. Biomaterials in Skin Wound Healing and Tissue Regenerations—An Overview. *Pharm.* 14, 1291, 2022.

KRUPP, T., et al. Natural rubber- própolis membrane improves wound healing in second-degree burning model. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 980-988, 2019.

KRYSZCZUK, I. P. e PANKIEWICZ, U. Assessment of the Fungistatic Properties of *Calendula officinalis* L. Water Extract and the Effect of Its Addition on the Quality of Wheat Bread. *Applied Sciences*.13, 7286, 2023.

KUMAR, S., PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 162750, 2013.

KUO, T. C., et al. A rare skin disease database to link drugs with potential drug targets for rare skin diseases. *Scientific data*. 9:521, 1-7, 2022.

KUSHWAHA, P. Need to Discontinue the Use of Solvents for the Extraction of Edible Oils for Ensuring Safety of Public Health. *International Journal of Pharmaceutical Research*. 2, 4, 7-14, 2010.

LAM, K. L., et al. Latex C-serum from *Hevea brasiliensis* induces non-apoptotic cell death in hepatocellular carcinoma cell line (HepG2). *Cell Proliferation*, 45(6):577-85, 2012.

LEE, H.J. KIM, M. Challenges and Future Trends in the Treatment of Psoriasis. *Int. J. Mol. Sci.* 24(17), 13313, 2023.

-
- LEITE, M. N., et al. Healing effects of natural latex serum 1% from *Hevea brasiliensis* in an experimental skin abrasion wound model, *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 95, 418-27, 2020.
- LENCOVA, S., et al. Bacterial Biofilms on Polyamide Nanofibers: Factors Influencing Biofilm Formation and Evaluation. *Appl. Mater. Interfaces*, 13, 2277–2288, 2021.
- LI, B. et al. The Effect of the Local Delivery of Platelet-derived Growth Factor from Reactive Two-Component Polyurethane Scaffolds on the Healing in Rat Skin Excisional Wounds. *Biomaterials*. 30(20): 3486-3494, 2009.
- LI, T. et al., High antibacterial and barrier properties of natural rubber comprising of silver-loaded graphene oxide. *Int. J. Biol. Macromol.* 195, 449-455, 2022.
- LI, M., et al. Smart and versatile biomaterials for cutaneous wound healing. *Materials Research*, 27:87, 2023.
- LI, S. et al. Ultradurable Superhydrophobic Natural Rubber-Based Elastomer Enabled by Modified Multiscale Leather Collagen Fibers. *Advanced Materials Interfaces*, 7, 13, 2000344, 2020.
- LIMA, L. R. M., et al. Evaluation of tensile, thermal, and biological properties of natural rubber-based biocomposite with biosilicate and 45S5-K bioglass. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 140, n. 22, p. e53894, 2023.
- LIU, J., et al. Natural History and Real-World Data in Rare Diseases: Applications, Limitations, and Future Perspectives. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 62(S2) S38-S55, 2022.
- LIU, N., et al. Construction of multifunctional hydrogel with metal-polyphenol capsules for infected full-thickness skin wound healing. *Bioactive Materials*, 24, 69-80, 2023.
- LIU, X., et al. Biomaterial strategies for the application of reproductive tissue engineering. *Bioactive Materials*, 14, 86-96, 2022.
- LIU, Y., et al. Hydrophilic modification on polyvinyl alcohol membrane by hyaluronic acid. *Biomedical Materials*, 14(5), 05509, 2019.

LÓPEZ-MUÑOZ, R. et al. Preparation and release behavior of poly(methyl methacrylate-co-methacrylic acid)-based electrospun nanofibrous mats loaded with doxorubicin. *Polymer Bulletin*, p. 1-20, 2022.

LOVENE, A., et al. Bioactive Polymeric Materials for the Advancement of Regenerative Medicine. *Journal of Functional Biomaterials*, 12(1), 2021.

MADDALOZZO, A. E. D., et al. Development and characterization of natural rubber latex wound dressings enriched with hydroxyapatite and silver nanoparticles for biomedical uses. *Reactive and Functional Polymers*. 177, 105316, 2022.

MAHENDRA, I. P. et al., Protein Removal from Natural Rubber Latex with Fe₃O₄@Al₂O₃ Nanoparticle, *J. Braz. Chem. Soc.* 32(2), 320-328, 2021.

MAHMMOUD, M. M., et al. Improvement of hydrophilicity of Natural Rubber Latex/Potato-Starch blend by grafting with hydrophilic monomers. *Iranian Polymer Journal*, 30:1273-1284, 2021.

MARCELINO, M. Y., et al. Antifungal activity of fluconazole-loaded natural rubber latex against *Candida albicans*, *Future Microbiology*, 13(3), 359-367, 2018.

MARQUES, D. R., et al. In vitro evaluation of poly (lactic-co-glycolic acid)/polyisoprene fibers for soft tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B*. 105, 2581–2591, 2017.

MARQUES, L. et al., Performance on Bone Regeneration of a Silver Nanoparticle Delivery System Based on Natural Rubber Membrane NRL-AgNP, *Coatings*. 10(4), 323, 2020.

MASUDA, M. K.; OLIVEIRA, L. C. S. Síntese e Caracterização de Nanoesferas de Óxido de Cobre II (CuO) Obtido por Técnica Hidrotérmica e Suportado em Látex de Seringueira (*Hevea brasiliensis*), 71^a Reunião Anual da SBPC, 1.06.99 – Química, 2019.

MATTA, B. K. A., et al. Comparative Evaluation of the Effectiveness of a Combination of Absorbable Gelatin Sponge and *Calendula officinalis* with Absorbable Gelatin Sponge Used Alone as a Hemostatic Agent—An In-Vitro Study. *Dentistry Journal*. 10(5), 76; 2022.

MELLERIO, J.E. et al. Emergency management in epidermolysis bullosa: consensus clinical recommendations from the European reference network for rare skin diseases. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 15, 142, 2020.

MENDES-JUNIOR, D., et al. A New Dermal Substitute Containing Polyvinyl Alcohol with Silver Nanoparticles and Collagen with Hyaluronic Acid: In vitro and in Vivo Approaches. *Antibiotics*, 10, 742, 2021.

MENDONÇA, R. J., et al. Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*, *Phytotherapy Research*. 24, 764–768, 2010.

METWALLY, S., et al., Surface potential and roughness-controlled cell adhesion and collagen formation in electrospun PCL fibers for bone regeneration, *Materials & Design*, 194, 108915, 2020.

MOHANAPRIYA, S., RAJ, V. Tuning biological properties of poly (vinyl alcohol) with amino acids and studying its influence on osteoblastic cell adhesion. *Materials Science and Engineering: C*. 86, 70-82, 2018.

MOLINA, P. M., et al. Role of Wettability and nanoroughness on interactions between osteoblast and modified silicon surfaces, *Acta Biomaterialia*. 7, 771-778, 2011.

MOMENI, P., et al. The engineering, drug release, and in vitro evaluations of the PLLA/HPC/Calendula *Officinalis* electrospun nanofibers optimized by Response Surface Methodology. *Heliyon*. 10, e23218, 2024.

MORAIS, P. C. R. et al. Comparing the wound healing potential of natural rubber latex serum and F1-protein: An in vivo approach. *Materials Advances*, 157, 213754, 2024.

MURRAY, R. Z., et al. Development and use of biomaterials as wound healing therapies. *Burns & Trauma*. 7:2, 1-9, 2019.

MUSA, B.H. HAMEED, N.J. Study of the mechanical properties of polyvinyl alcohol/starch blends. *Materials today: proceedings*, v. 20, p. 439-442, 2020.

NARASAGOUDR, S. S., et al. Ethyl vanillin incorporated chitosan/poly (vinyl alcohol) active films for food packaging applications. *Carbohydrate polymers*, v. 236, p. 116049, 2020.

-
- NASCIMENTO, R. M., et al. Wettability Study on Natural Rubber Surfaces for Applications as Biomembranes, *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 4, 2784–2793, 2018.
- NEDELGUTA, R. M., et al. Collagen-based biomaterials with possible therapeutic effects. *Journal of Mind and Medical Sciences*. 8(2):324-329, 2021.
- NICOLAUS, C., et al. In vitro studies to evaluate the wound healing properties of *Calendula Officinalis* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 196, 94-103, 2017.
- NUCERA, E., et al. Latex Allergy: Current Status and Future Perspectives. *Journal of Asthma and Allergy*. 13:385-398, 2020.
- NUINU, P., et al. Preparation of environment-friendly hydrophilic rubber from natural rubber grafted with sodium acrylate by reactive melt mixing. *Polymer Engineering and Science*, 62, 6, 1833-1846, 2022.
- NYSTROM, A. e BRUCKNER-TUDERMAN, L. Injury- and inflammation-driven skin fibrosis: The paradigm of epidermolysis bullosa. *Matrix Biology*, 68-69, 547-560, 2018.
- OKAMOTO, M. Potential Application for tissue engineering in natural rubber latex. *Nippon Gomu Kyokaishi*, 91(9), 331-336, 2018.
- OKAMOTO, Y. OKAMOTO M. Biocomposites composed of cartilage and natural rubber latex, *Int J Phys Med Rehabil*. 8(1), 40-41, 2023.
- OLIVEIRA, R. N., et al. Mechanical properties and in vitro characterization of polyvinyl alcohol-nano-silver hydrogel wound dressings. *Interface Focus*, 4:20130049, 2014.
- ONG, M. T., et al. Susceptibility of HeLa (Cancer-origin) Cells to a Sub-fraction of Latex B-serum. *Journal of Rubber Research*, 12(3):117-124, 2009.
- ORKAR, T.K. et al. The use of a non-medicated dressing for superficial-partial thickness burns in children: a case series and review. *Scars, Burns & Healing*, 5: 1–8, 2019.
- PAN, N. C., et al. Films Based on Blends of Polyvinyl Alcohol and Microbial Hyaluronic Acid. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 63, 1—14, 2020.

-
- PANDIYAN,R., et al. Fabrication and Characterization of in vitro 2D skin model-Na attempt to establish scaffold for tissue engineering. *Process Biochemistry*, 109, 169-177, 2021.
- PARADOSSI, G., CSVALIERI, F. e CHIESSI, E. Poly(vinyl alcohol) as versatile biomaterial for potential biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 14, 687-691, 2003.
- PARISI, C. A. S., et al. Update on látex allergy: New insights into na old problem. *World Allergy Organization Journal*, 14:100569, 1-14, 2021.
- PARRELLA, F. W., GASPARI, A. A., Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment, *Methods*. 27, 77-86, 2002.
- PARRELLA, F.W. GASPARI, A.A. Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment, *Methods* 27, 77–86, 2002.
- PEARCE, A. K. e O'REILLY, R. K. Polymers for Biomedical Applications: The Importance of Hydrophobicity in Directing Biological Interactions and App Efficacy. *Biomacromolecules*, 22, 11, 4459-4469, 2021
- PELIN, I. M., et al. Pullulan/Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Loaded with Calendula officinalis Extract: Design and In Vitro Evaluation for Wound Healing Applications. *Pharmaceutics*, 15(6), 1674, 2023.
- PENHAVEL, M. V. C. et al. Effect of Hevea brasiliensis latex sap gel on healing of acute skin wounds induced on the back of rats. *Rev. Col. Bras. Cir.* 43(1): 048-053, 2016.
- PEREIRA, B. L. et al. Biomedical Applications of Polyvinyl Alcohol-Based Bionanocomposites. *Wiley Online Library*, (2023).
- PETAL. A. K., et al. On the crystallinity of PVA/palm leaf biocomposite using DSC and XRD techniques. *Microsyst Technol*, 20:41–49, 2014.
- PHAECHAMUD, T., et al., Gentamicin sulfate-loaded porous natural rubber films for wound dressing, *International Journal of Biological Macromolecules*. 85, 634-644, 2016.

PICHAYAKORN, W., et al. Nicotine transdermal Patches using Polymeric Natural Rubber as the Matrix Controlling System: Effect of Polymer and plasticizer blends, *Journal of Membrane Science*. 81-90, 2012.

PICHAYAKORNET, W. et al. Deproteinized natural rubber used as a controlling layer membrane in reservoir-type nicotine transdermal patches, *Chemical Engineering Research and Design*. 91(3), 520-529, 2013.

PILE, H. D., CRANE, J. S. Actinic Prurigo. 2023 Jun 28. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.

PINTO, M. F. et al. Electrospun Membrane Based on Poly(L-co-D,L lactic acid) and Natural Rubber Containing Copaiba Oil Designed as a Dressing with Antimicrobial Properties. *Antibiotics*, 12(5), 898, 2023.

PINTO, M. F., et al. Development of co-electrospun membrane composed poly(L-co-D,L-lactic acid) and natural rubber with potential application in dermal dressing. *Journal of Applied Polymer Science*, e55573, 2024.

POMMIER, P., et al. X. Phase III Randomized Trial of Calendula Officinalis Compared with Trolamine for the Prevention of Acute Dermatitis During Irradiation for Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 22, 8, 1447-1453, 2005.

PRODINGER, C., et al. Epidermolysis bullosa: Advances in research and treatment. *Experimental Dermatology*. 28:1176-1189, 2018.

QIN, J., et al. Recent Advances in Bioengineered Scaffolds for Cutaneous Wound Healing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 1-18, 2022.

QURESHI, D., et al. Fabrication and Characterization of Poly (vinyl alcohol) and Chitosan Oligosaccharide-Based Blend Films. *Gels*, 7(2): 55, 1-23, 2021.

RAFIEIAN, S. et al. Improved mechanical, physical and biological properties of chitosan films using Aloe vera and electrospun PVA nanofibers for wound dressing applications. *Journal of Industrial Textiles*, v. 50, n. 9, p. 1456-1474, 2021.

RAD, Z. P., et al. Calendula officinalis extract/PCL/Zein/Gum arabic nanofibrous bio-composite scaffolds via suspension, two-nozzle and multilayer electrospinning for skin tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 135, 530-543, 2019.

RAMOS, M. V., et al. Laticifers, Latex, and Their Role in Plant Defense. *Trends in Plant Science*, 24, 9, 2019.

RAMOS, M. V. Wound healing modulation by a latex protein-containing polyvinyl alcohol biomembrane. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 389(7), (2016), 747–756.

RAO, K. M., et al. Fungal-derived carboxymethyl chitosan blended with polyvinyl alcohol as membranes for wound dressings. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 190, p. 792-800, 2021.

RATHOD, L. et al. Calendula flower extract loaded collagen film exhibits superior wound healing potential: Preparation, evaluation, in-vitro & in-vivo wound healing study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 72, 103363, 2022.

ROLERE, S., et al. Investigating Natural Rubber Composition with Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy: A Rapid and non-Destructive Method to Determine Both Protein and Lipid Contents Simultaneously, *Polymer Testing*. 43, 83-93, 2015.

ROSA, S. S. R. F., et al. Evidence in Practice of tissue healing with latex biomembrane: Integrative Review. *Journal of Diabetes Research*, 1-17, 2019.

ROWSE, D. H. EMMETT, E. A. Solvents and the skin. *Clinics in Occupational and Environmental Medicine*. 4, 657-730, 2004.

SALMAN, S. A., BAKR, N. A. e HOMAD, H. T. DSC and TGA Properties of PVA Films Filled with Na₂S₂O₃.5H₂O Salt. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 8, 2, 1-11, 2018.

SALOMEZ, M., et al. Micro-organisms in látex and natural rubber coagula of *Hevea brasiliensis* and their impact on rubber composition, structure and properties. *Journal of Applied Microbiology*, 117(4), 921-929, 2014.

SANCHEZ, A. S., et al. Cellular human tissue-engineered skin substitutes investigated for deep and difficult to heal injuries. *Regenerative Medicine*, 35, 1-23, 2021.

SANSATSADEEKUL, J., SAKDAPIPANICH, J., ROJRUTHAI, P. Characterization of associated proteins and phospholipids in natural rubber latex, *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 111, 6, 628-634, 2011.

SANTANA, J. C. D., et al. Blau Syndrome: subepithelial infiltrates as uncommon ophthalmologic manifestation. *Revista Brasileira de Oftalmologia*. 78(1):62-4, 2019.

SANTOS, R. L., et al. The influence of pH levels on mechanical and biological properties of nonlatex and latex elastics. *The Angle Orthodontist*. 82(4), 709-14, 2012.

SATCHANSKA, G., DAVIDOVA, S., PETROV, P. D. Natural and Synthetic Polymers for Biomedical and Environmental Applications. *Polymers*, 16(8), 1159, 2024.

SCAFFARO, R. et al. PLA graphene nanoplatelets nanocomposites: Physical properties and release kinetics of an antimicrobial agent. *Composites Part B: Engineering*, v. 109, p. 138-146, 2017.

SCHNEIDER, F., DANSKI, M. T. R. e VAYEGO, S. A. Usage of *Calendula officinalis* in the prevention and treatment of radiodermatitis: a randomized double-blind controlled clinical trial. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, 49 (2):221-8, 2015.

SETH, A.K. et al. “Nasal Reconstruction Using the Integra® Dermal Regeneration Template”. *Plast Reconstr Surg*, 144(4): 966–970, 2019.

SETH, D., et al. Global Burden of Skin Disease: Inequities and Innovations. *Current Dermatology Reports*, 6(3), 204-210, 2017.

SHAHANE, K. et al. An Updated Review on the Multifaceted Therapeutic Potential of *Calendula officinalis* L. *Pharmaceuticals*, 16, 611, 2023.

SHALABY, M., et al. Nanoparticles fabricated from the bioactive tilapia scale collagen for wound healing: Experimental approach. *PLOS ONE*, 18(10), e0282557, 2023.

SHANKAR, S. M., et al. Efficacy of *Calendula officinalis* Extract (Marigold flower) as an Antimicrobial Agent Against Oral Microbes: An In vitro Study in Comparison with Chlorhexidine Digluconate. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11(10), 1-9, 2017.

-
- SHARMA, K.S. et al. Engineering of Accepted Skin-Equivalent Tissue for Tissue Repair: Current State and Perspectives. *Encyclopedia of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 285-298, 2019.
- SHEIKH, Z., et al. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. *Biomaterials Research*, 21, 9, 1-20, 2017.
- SHEN, Y. et al. Synthesis and characterization of double-network hydrogels based on sodium alginate and halloysite for slow release fertilizers. *International journal of biological macromolecules*, v. 164, p. 557-565, 2020.
- SHITAKE, A. A., et al. Design and engineering of polyvinyl alcohol based biomimetic hydrogels for wound healing and repair. *Journal of Polymer Research*, 26:201, 2019.
- SILVA, D., et al. Anti-inflammatory activity of *Calêndula Officinalis* L. flower extract. *Cosmetis*, 8, 21, 1-7, 2021.
- SIMOES, F.V. et al. Effectiveness of skin protectors and calendula officinalis for prevention and treatment of radiodermatitis: an integrative review. *Rev Bras Enferm.*73(Suppl 5): e20190815, 2020.
- SINGHAL, A. K., et al. A Case of Peeling Skin Syndrome. *Indian Dermatology Online Journal*. 8(3), 208-210, 2017.
- SITTIWONG, J. et al. Electric Field-Controlled Benzoic Acid and Sulphanilamide Delivery from Poly (Vinyl Alcohol) Hydrogel. *AAPS PharmSciTech*, 13, 4, 2012.
- SMITH, K. E., et al. The effect of the glass transition temperature on the toughness of photopolymerizable (meth) acrylate networks under physiological conditions. *Polymer*. 50(21), 5112-5123, 2009.
- SMITH, P. A. Carbon Fiber Reinforced Plastics-Properties. *Comprehensive Composite Materials*. 107-150, 2000.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. Doenças Raras incluem muitas de pele: Dia Mundial é celebrado hoje, 2023. Disponível em: <https://www.sbd.org.br/doencas-raras-incluem-muitas-de-pele-dia-mundial-e-celebrado-hoje/>.

-
- SPIN, J. R. et al. Effect of natural latex membranes on wound repair of palate donor areas: A pilot randomized controlled trial study, including the membranes characterization. *Materials Today Communications*, 27, 102390, 2021.
- STOYANOVA, N. et al. Electrospun PLA-Based Biomaterials Loaded with *Melissa officinalis* Extract with Strong Antioxidant Activity. *Polymers*. 15(5), 1070, 2023.
- STROPA, J. M., et al. Membrana de Borracha Natural Crua Utilizados Como Suporte para Partículas de Dióxido de Titânio: Síntese, Caracterização e Avaliação Térmica por TG-DTG e DSC, *Brazilian Journal of Thermal Analysis*. 5(1), 2016.
- SUBMUTH, K., et al. Ichthyoses in everyday practice: management of a rare group of diseases. *Journal of the German Society of Dermatology*. 18(3):225-243, 2020.
- SUHAERI, M. et al. Novel skin patch combining human fibroblast-derived matrix and ciprofloxacin for infected wound healing. *Theranostics*, 8(18):5025-5038, 2018.
- SUKSAEREE, J., et al. Deproteinization of Natural Rubber Latex and Its Pale-Colored Thin Films. *Sustainability*, 15, 10015, 1-20, 2023.
- SUKUMAR, T. et al., Cytotoxicity of Formulated Graphene and Its Natural Rubber Nanocomposite Thin Film in Human Vaginal Epithelial Cells: An Influence of Noncovalent Interaction, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 6, 2007-2019, 2020.
- TANAKA, J. L. et al., Natural rubber dressing loaded with silver sulfadiazine for the treatment of burn wounds infected with *Candida* spp, *Int. J. Biol. Macromol.* 189, 597-606, 2021.
- TAUPIN, P. et al. Integra® Dermal Regeneration Template: From Design to Clinical Use. *Cureus*, 15(5): e38608, 2023.
- THAN-ARDNA, B. et al., Improving deproteinized skim natural rubber latex with a further leaching process, *Eng. Appl. Sci. Res.* 46(1), 64-71, 2019.
- THEVENOT, P., et al. Surface Chemistry influences implant biocompatibility, *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 8(4), 270-280, 2008.
- TORRES, G. B. et al. Natural Rubber Latex on Medical Applications. *JCMPH*. 4: 089-093, 2023.

TOTTOLI, E. M. et al. Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration. *Pharm.* 12(8), 735, 2020.

TSUNEIZUMI, Y., et al. Chemical recycling of poly(lactic acid)-based polymer blends using environmentally benign catalysts. *Polymer Degradation And Stability*, 95, 8, 1387-1393, 2010.

TURKOGLU, G. C. et al. PVA-Based Electrospun Materials-A Promising Route to Designing Nanofiber Mats with Desired Morphological Shape-A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 30, 25(3): 1668, 2024.

UITTO, J. Rare heritable skin diseases: Targets for regenerative medicine. *Journal Investigation Dermatology*, 132 (11): 2485-8, 2012.

ULLAH, A. et al. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules*, 25, 5243, 2020.

VERMA, P. K., et al. Phytochemical ingredients and pharmacological potential of *calêndula officinalis* linn. *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 4(2), 1-17, 2018.

XIE, Z., et al. Dual Growth Factor Releasing Multi-functional Nanofibers for Wound Healing. *Acta Biomaterialia*. 9(12):9351-9, 2013.

WADEESIRISAK, K., et al. Rubber particle proteins REF1 and SRPP1 interact differently with native lipids extracted from *Hevea brasiliensis* latex, *BBA – Biomembrane*, 2017.

WANG, M.; DUAN, B. Materials and their biomedical applications, *Encyclopedia of Biomedical Engineering*, 135-152, 2019.

WEI, C. et al. Biomaterials in skin tissue engineering. *Int. J. Polym. Mater.* 0:0, 1-19, 2021.

WISNIEWSKA, M. et al. Impact of poly(vinyl alcohol) adsorption on the surface characteristics of mixed oxide $MnxOy-SiO_2$. *Adsorption*, 22:417- 423, 2016.

WISNIEWSKA, M. et al. Investigation of the polyvinyl alcohol stabilization mechanism and adsorption properties on the surface of ternary mixed nanooxide AST 50 (Al₂O₃–SiO₂–TiO₂). *Journal of Nanoparticle Research*, 17:12, 2015.

WONG, L.S. YEN, Y.T. Chronic Nodular Prurigo: An Update on the Pathogenesis and Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 23(20), 12390, 2022.

WOUTERS, C. H., et al. Blau Syndrome, the prototypic auto-inflammatory granulomatous disease. *Pediatric Rheumatology*. 12:33, 1-9, 2014.

YASUNO, G., et al. Influence of Purification Process on the Function of Synthetic Polymer Nanoparticles. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 69, 773-780, 2021.

YEANG, H. Y. et al., Allergenic proteins of natural rubber latex, *Methods*. 27, 32-45, 2022.

YUAN, Y.; LEE, T. R. Contact Angle and Wetting Properties .In: Bracco, G., Holst, B. (eds) *Surface Science Techniques*, Springer Ser. Surface Science, 51, 2013.

YUSOF, N. H. et al., Preparation of super-low Protein Natural Rubber, *KGK rubberpoint*, 68(4), 46-51, 2015.

ZANCANELA, D. C., et al. Natural rubber látex membranes incorporated with three different types of propolis: Physical-chemistry and antimicrobial behaviors. *Materials Science & Engineering C*, 97, 576-582, 2019.

ZHANG, Y., et al. Nanofibrous tissue engineering scaffold with nonlinear elasticity created by controlled curvature and porosity. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 126, p. 105039, 2022.

ZHAO, W., et al. RNA delivery biomaterials for the treatment of genetic and rare diseases. *Biomaterials*. 217, 119291, 2019.

ZHONG, Y., et al. Construction methods and biomedical applications of PVA-based hydrogels. *Frontiers in Chemistry*, 1.21, 2024.

ZHOU, H., et al. The progress and challenges for dermal regeneration in tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1208-1218, 2017.

ZHOU, J. et al. Deciphering the focuses and trends in skin regeneration research through bibliometric analyses. *Frontiers in Medicine*, 9, 2022.

ZHOU, X. et al. Controlled released of drug from doubled-walled PVA hydrogel/PCL microspheres prepared by single needle electrospraying method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 187, 110645, 2020.

ZHOU, Y. S.; YANG, D. Z.; NIE, J. Effect of PVA content on morphology, swelling and mechanical property of crosslinked chitosan/PVA nanofibre. *Plastics, rubber and composites*, v. 36, n. 6, p. 254-258, 2007.

APÊNDICE A

Artigo publicado na revista International Journal of Biological Macromolecules (2023), Fator de Impacto: 8.2; Qualis A1 pela CAPES.

International Journal of Biological Macromolecules 253 (2023) 126782



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac



The impact of non-deproteinization on physicochemical and biological properties of natural rubber latex for biomedical applications

Jessica Asami^{a,b,*}, Bruna V. Quevedo^{b,c}, Amaldo R. Santos Jr.^d, Luciana Pastena Giomo^d, Daniel Komatsu^b, Eliana Aparecida de Rezende Duek^{a,b,c}

^a Mechanical Engineering Faculty (FEM), State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

^b Laboratory of Biomaterials, Faculty of Medical Sciences and Health (FCMS), Pontifical Catholic University of São Paulo (PUC-SP), Sorocaba, SP, Brazil

^c Postgraduate Program in Materials Sciences (PPGCM), Federal University of São Carlos (UFSCar), Sorocaba, SP, Brazil

^d Center of Natural and Human Sciences, Federal University of ABC (UFABC), São Bernardo do Campo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Purification
Hevea brasiliensis
Characterization
Proteins
Biomaterials

ABSTRACT

Latex is a colloidal suspension derived from the *Hevea brasiliensis* tree, derived from natural rubber, poly (isoprene), and assorted constituents including proteins and phospholipids. These constituents are inherent to both natural rubber and latex serum. This investigation was undertaken to examine the impact of the deproteinization process on chemical and biological dynamics of natural rubber latex. Natural Rubber (NR) extracted from the pure latex (LNCP) was obtained through centrifugation, followed by six rounds of solvent purification (LP6). The structure was characterized using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA), differential scanning calorimetry (DSC), swelling test, surface zeta potential (ζ), scanning electron microscopy (SEM) and *in vitro* assay. The results revealed that the LP6 group presented decreased swelling kinetics, reduced cell adhesion and proliferation, and a smoother surface with decreased negative surface charge. Conversely, the LNCP group shown accelerated swelling, heightened adhesion and cellular growth, and a more negatively charged and rougher surface. As such, the attributes of latex serum and proteins have potential usage across numerous biomedical applications.

1. Introduction

Natural rubber (NR) is sourced from the latex of the *Hevea brasiliensis* tree, which exudes a milky sap [1]. The latex is primarily composed of 35.62 % rubber, 1.65 % acetone extract (consisting of lipids, resins, and waxes), 2.03 % proteins, 0.34 % carbohydrates, 0.70 % ash, and 59.62 % water [2]. The constituents present in latex, including proteins and phospholipids, are believed to be organized within the serum fraction and distributed around the surface of rubber particles. This coating, composed of proteins and phospholipids, presents the capacity of colloidal stability of NR [3]. Typically, NR has been used in production of items such as gloves, baby bottles, condoms, and pacifiers [4]. Nonetheless, NR is demonstrating potential in biomedical engineering field [5,6]. Within the scope of medical applications, NR extracted from latex shows utility across a range of disciplines. It is applied for sustained drug release, transdermal drug delivery systems, and in regenerative medicine, aiming to facilitate the regeneration of skin, bone, cartilage,

and various organ tissues [7].

According to the study conducted by Jayadevan and colleagues (2023) [8], the utilization of NR combined with plasticizers such as glycerol and dibutyl phthalate presents potential to function as a carrier in the transport of medicinal substances. This system presents promising prospects for its application as transdermal adhesive patches. Similarly, studies by Barros et al. (2019) [9] indicate that NR can be used as a solid matrix for sustained release of pharmacologically relevant compounds, such as glycerol, which can be used to assist in the healing of nipple fissures occurring in postpartum women due to breastfeeding. Other *in vivo* studies involving rabbits also demonstrate that NR may have favorable biocompatibility, and when in direct contact with penile and vaginal skin, it does not induce irritations or dermal sensitizations in the animal [10].

Other investigations further reinforce the capacity of NR as a carrier for therapeutic agents, both synthetic and of natural origin. Studies have addressed its utilization in the treatment of conditions such as psoriasis

* Corresponding author at: Biomaterials Laboratory, Faculty of Medical and Health Science (PUC/SP), Road Joubert Wey, 290, Sorocaba CEP 18030-070, São Paulo, Brazil.

E-mail address: jessicasami@gmail.com (J. Asami).

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126782>

Received 26 June 2023; Received in revised form 29 August 2023; Accepted 5 September 2023

Available online 9 September 2023

0141-8130/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

APÊNDICE B

Autorização da editora para a incorporação do artigo no corpo da tese.

22/09/2023, 14:40

Gmail - Re: Authorization to insert an article in thesis [230914-025726]



Jéssica Asami <jessicaasami@gmail.com>

Re: Authorization to insert an article in thesis [230914-025726]

1 mensagem

Permissions Helpdesk <permissionshelpdesk@elsevier.com>
Responder a: Permissions Helpdesk <permissionshelpdesk@elsevier.com>
Para: jessicaasami@gmail.com

21 de setembro de 2023 às 14:28

Dear Dr. Asami,

Thank you for contacting us.

As an Elsevier journal author, you retain the right to Include the article in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially) whether in full or in part, subject to proper acknowledgment; see <https://www.elsevier.com/about/policies/copyright> for more information. As this is a retained right, no written permission from Elsevier is necessary.

As outlined in our permissions licenses, this extends to the posting to your university's digital repository of the thesis provided that if you include the published journal article (PJA) version, it is embedded in your thesis only and not separately downloadable.

Thank you.

Kind regards,

Thomas Rexson Yesudoss
Copyrights Specialist
ELSEVIER | HCM - Health Content Management

Visit [Elsevier Permissions](#)

From: John Anthony Arpoja
Date: Wednesday, September 20, 2023 07:32 AM GMT

Dear Ms. Asami,

Thank you for reaching out to us and apologies for the delay in correspondence.

This is to confirm receipt of your email regarding your query below. Your request is currently being handled. You will receive regular updates on the progress of your query, right through to resolution.

Please respond to this email if you have any further questions or information to add.

In the meantime, your utmost patience and kind understanding are highly appreciated.

Kind regards,