



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS**

LUCIANA MASCENA SILVA

**ANÁLISES *IN VITRO* DE HÍBRIDOS DE BORRACHA NATURAL ORIGINADA
DA *HEVEA BRASILIENSIS*, NA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DE
OSTEOBLASTOS MURINOS**

FORTALEZA - CE

2022

LUCIANA MASCENA SILVA

**ANÁLISES *IN VITRO* DE HÍBRIDOS DE BORRACHA NATURAL ORIGINADA
DA *HEVEA BRASILIENSIS*, NA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DE
OSTEOBLASTOS MURINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Morfofuncionais
da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para a obtenção do título
de Doutora em Ciências Morfofuncionais.

Área de concentração: Morfofisiologia óssea e articular.

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Cláudia Carneiro Girão-Carmona

Co-orientador: Prof. Dr. Rodney Marcelo do Nascimento

FORTALEZA - CE

2022

Ficha catalográfica

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S581a Silva, Luciana Mascena.
Análises in vitro de híbridos de borracha natural originada da *Hevea brasiliensis*, na
viabilidade e proliferação de osteoblastos murinos / Luciana Mascena Silva. –
2022.
71 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Virginia Cláudia Carneiro Girão-Carmona.

Coorientação: Prof. Dr. Rodney Marcelo do Nascimento .

1. Biomaterial. 2. *Hevea brasiliensis*. 3. Borracha. 4. Látex. 5. Osteoblastos. I. Título.

CDD 611

LUCIANA MASCENA SILVA

**ANÁLISES *IN VITRO* DE HÍBRIDOS DE BORRACHA NATURAL ORIGINADA
DA *HEVEA BRASILIENSIS*, NA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DE
OSTEOBLASTOS MURINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Morfofuncionais.
Área de concentração: Morfofisiologia óssea e articular.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Virgínia Cláudia Carneiro Girão-Carmona (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Rodney Marcelo do Nascimento
Instituto Federal de Santa Catarina

Naiara Cipriano Oliveira
Universidade Regional do Cariri

Renata Ferreira de Carvalho Leitão
Universidade Federal do Ceará

Mirna Marques Bezerra
Universidade Federal do Ceará

Ana Beatriz Duarte
Universidade Federal do Ceará

A persistência é o caminho do êxito.

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por sua infinita misericórdia em minha vida, por me proporcionar saúde, força, paciência, determinação, persistência, fé e sabedoria, para então chegar onde cheguei, defendendo o tão sonhado doutorado.

Posteriormente gostaria de agradecer:

- A minha família, ao meu namorado e aos meus amigos, que por tantas vezes estive distante devido a dedicação do meu tempo aos experimentos e escrita da tese e dos artigos, e que mesmo assim, foram compreensivos e não desistiram de mim;
- A minha orientadora professora Virgínia Girão, por sua incansável ajuda, acolhimento e paciência, e ao meu co-orientador professor Rodney Nascimento, por suas ideias e importantes contribuições;
- A Naiara Oliveira e ao professor Amaury Jardim, por terem produzido e fornecido as amostras, bem como contribuído com diversas informações sobre o látex de borracha natural;
- Aos professores Airton Rocha, Gerly Anne Brito e Renata Leitão, pelo apoio e fornecimento dos reagentes, materiais descartáveis e as células;
- As professoras Mirna Bezerra e Ana Caroline Leite, pela contribuição na estatística e correção dos artigos;
- Aos colegas Arthur Lima, Eduarda Gonçalves, Cezanildo Silva, e especial ao Davide Joaquim, que muito contribuíram na construção do artigo de revisão integrativa;
- A professora Ana Paula Rodrigues e ao grupo do Lamofopa, pelos ensinamentos durante o mestrado, que muito me ajudaram e alicerçaram no doutorado;
- Aos meus queridos amigos do Nempi e da Morfologia, Luana Gaudêncio, Josiane Martins, Mariana Viana, Ana Beatriz Duarte, Carolina Martins, Mateus Brandão, Thâmara Bezerra, Lucianny Lima, Letícia Terceiro, Flávia Araújo, Júnior Lima, Ismael de Paula, Deiziane Viana, Valdo Nogueira, Laísa Albuquerque, Andréa Viana, Guilherme Ferreira e demais colegas da Morfologia, que estiveram comigo no laboratório, durante os experimentos e até mesmo tomando um cafezinho, me distraíndo e apoiando com palavras de

encorajadoras. São ajudas indiretas, mas que nos animam e nos encorajam nessa árdua trajetória da pesquisa;

- Aos professores do Departamento de Morfologia da UFC, pela contribuição nos ensinamentos, aprendizagem e partilhas durante as disciplinas;
- Aos porteiros, aos funcionários da limpeza, aos técnicos Sr. Rosa e Sr. Ivan, ao fotógrafo Sr. Péricles, pela presteza, atenção e contribuição;
- Aos laboratórios que me proporcionaram realizar os experimentos: NEMPI (Núcleo de Estudo em Microscopia e Processamento de Imagens), LAMFA (Laboratório de Materiais Funcionais Avançados) e LIO (Laboratório de Investigação em Osteoartropatias).
- Aos órgãos de fomento, FUNCAP (Fundação de apoio ao desenvolvimento científico) e CAPES (Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior), pelo apoio financeiro para compra de insumos e bolsa;

Enfim, meu muito obrigada a todos. Costumo dizer que ninguém chega a lugar nenhum sozinho. Vocês foram muito importantes para a realização desse trabalho e concretização do meu sonho.

RESUMO

Os sistemas híbridos de borracha natural (BN) obtidos a partir do látex de borracha natural da *Hevea brasiliensis* são o alvo atual de muitos pesquisadores devido às suas novas e superiores propriedades. Para aproveitar esses materiais na área médica, são necessários experimentos para avaliar a resposta celular. Este estudo apresenta análises *in vitro* das propriedades biocompatíveis de dois sistemas híbridos distintos desenvolvidos a partir da associação entre BN e fosfato de cálcio (CaP) e partículas de sílica (SiPs). Produzimos filmes de BN usando dois solventes orgânicos diferentes, clorofórmio (CHF) ou tolueno (TOL), e incorporamos CaP ou SiPs e investigou-se seus efeitos na morfologia, proliferação, atividade (atividade da fosfatase alcalina – ALP) e viabilidade (MTT) de osteoblastos murinos. Os BN-híbridos apresentaram diferentes distribuições heterogêneas e homogêneas ao longo da matriz polimérica dependendo da natureza das partículas, o que se traduz em afetar a molhabilidade da superfície. A proliferação celular foi aumentada em 48 e 72h com resultados semelhantes observados após a adição de CaP. As morfologias celulares também são afetadas pelo processo de hibridização, indicando os efeitos da natureza do solvente e da partícula. Por outro lado, a atividade da ALP foi maior quando o NR foi dissolvido em CHF e aumentado após a incorporação de CaP ou SiPs. A modificação da superfície dos filmes de NR, dissolvidos em CHF ou TOL, com adição de CaP ou SiPs, proporcionou um nível diferente de biocompatibilidade dependendo do solvente e da carga. Os efeitos na diferenciação osteoblástica estão correlacionados com a viabilidade celular preservada. Em conjunto, nossos dados mostram que esses novos sistemas híbridos de NR podem representar uma ferramenta biológica muito promissora com propriedades desejáveis que suportam o aumento ósseo.

Palavras-chave: biomaterial, *Hevea brasiliensis*, borracha, osteoblastos.

ABSTRACT

Natural rubber (NR) hybrid systems obtained from the latex of *Hevea brasiliensis* are the current target of many researchers due to their new and superior properties. To take advantage of these materials in the medical field, experiments to evaluate the cellular response are necessary. This manuscript presents a complete *in vitro* analysis of the biocompatible properties of two distinct hybrid systems developed from the association between NR and calcium phosphate (CaP) and silica particles (SiPs). We have produced NR films using two different organic solvents, chloroform (CHF) or toluene (TOL), and incorporated CaP or SiPs to investigate their effects on morphology, activity (alkaline phosphatase activity – ALP), and viability (MTT) of murine osteoblasts. The NR-Hybrids presented different heterogeneous and homogeneous distributions throughout the polymeric matrix dependent on the nature of the particles, which translates to affect surface wettability. Cell proliferation was increased at 48 and 72h with similar results observed after the addition of CaP. The cell morphologies are also affected by the hybridization process indicating the effects of both, solvent and particle nature. On the other hand, ALP activity was higher when NR was dissolved in CHF and enhanced after CaP or SiPs incorporation. The surface modification of NR films, dissolved in CHF or TOL, with the addition of CaP or SiPs, provided a different level of biocompatibility depending on the solvent, and charge. The effects on osteoblastic differentiation are correlated with preserved cell viability. Taken together, our data show that these novel NR hybrid systems may represent a very promising biological tool with desirable properties supporting bone augmentation.

Keywords: biomaterial, *Hevea brasiliensis*, rubber, osteoblasts.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Tecido ósseo.....	11
1.2 Características de um biomaterial.....	11
1.3 Látex de borracha natural.....	13
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	13
3. PROPOSIÇÕES.....	15
3.1 Objetivo geral.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4. CAPÍTULOS.....	15
4.1 Capítulo 1: Artigo 1:Látex de borracha natural e biomembrana em aplicações biomédicas: seus efeitos justificam seu uso? Uma revisão integrativa da literature.....	16
4.2 Capítulo 2: Artigo 2:Analysis of biocompatible properties of natural rubber hybrid systems of Hevea brasiliensis in the <i>in vitro</i> culture of murine osteoblasts.....	45
5. CONCLUSÃO GERAL.....	68
6. REFERÊNCIAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é uma variedade de tecido conjuntivo cuja matriz extracelular é mineralizada (DOWNEY and SIEGEL 2006). Exerce funções importantes no corpo, como suporte e proteção da medula óssea, órgãos vitais e tecidos moles (ROBLING et al., 2006; DATTA et al., 2008). Além disso, este tecido armazena e libera de maneira controlada, íons como cálcio e fosfato. É formado pela *matriz óssea*, uma estrutura complexa e organizada, que fornece suporte mecânico e exerce papel essencial na homeostase óssea (GREEN et al., 1995).

A matriz extracelular deste tecido é composta por uma parte orgânica (proteínas colágenas e não colágenas, proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fatores de crescimento e proteoglicanos (ASZODI et al., 2000; YAGAMI et al., 1999), e outra parte inorgânica (predominantemente íons fosfato e cálcio, além de bicarbonato, sódio, potássio, citrato, magnésio, carbonato, fluorita, zinco, bário e estrôncio) (DOWNEY and SIEGEL 2006). Além da matriz, o tecido ósseo é formado por osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e células de revestimento. Estas células participam de diferentes eventos que o envolvem, como a formação da matriz extracelular, remodelação e reabsorção óssea (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

A interação entre essas células, bem como entre a matriz óssea e as células, fornecem alto grau de remodelação e dinamismo ao tecido ósseo. Esta característica permite a reparação de fraturas ou de defeitos ósseos resultando na formação de um novo tecido (DALLAS et al., 2013; FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

1.2 Características de um Biomaterial

Biomaterial pode ser definido como uma ou mais combinação de substâncias, farmacologicamente inerte, podendo ser utilizado por um período de tempo, em uma parte ou em todo um sistema, visando melhorar, aumentar ou substituir parcial ou inteiramente tecidos, órgãos ou funções do corpo.

(SANTOS et al., 2003). Os biomateriais se classificam de acordo com a natureza química, podendo ser naturais (homólogo, autólogo e heterólogo) ou sintéticos (metálico, cerâmico, polímero e compósito). Esses materiais são usados e adaptados para aplicações médicas, sendo constantemente utilizados em cirurgia e liberação de medicamentos. Podem ter função benéfica, quando seu uso é para uma válvula cardíaca, por exemplo, ou bioativa, quando usado para propósitos mais interativos, como implantes de quadril (SANTOS, 2003).

Um biomaterial também pode ser definido como qualquer material natural ou artificial, que compreende toda ou parte de um elemento capaz de aumentar ou substituir uma função natural. Podem ser usados para uma válvula cardíaca, ou pode ser bioativo, como sendo usados para um propósito interativo, como implantes de quadril revestidos com hidroxiapatita (TATHE et al., 2010). Suas características são: biocompatibilidade, não ser tóxico nem carcinogênico, apresentar custo relativamente baixo e de fácil fabricação (PARK, 1980). Entretanto, faz-se necessário pesquisas para aperfeiçoar a biocompatibilidade dos biomateriais, principalmente no que se refere a engenharia de tecidos (osso e cartilagem), pois podem causar uma resposta sistêmica negativa quando implantados, mesmo sendo materiais inertes, visto que essas respostas dependem de vários fatores, como topografia de superfície, heterogeneidade e propriedades químicas e físicas (TATHE et al., 2010).

Dentre os diversos tipos de biomaterial, o látex de borracha natural é uma importante matéria-prima para vários produtos, incluindo pneus, luvas cirúrgicas, preservativos e travesseiros, e vem apresentando destaque em aplicações biomédicas. Estudos têm demonstrado que é capaz de induzir a cicatrização de feridas (MRUE et al., 2004; HERCULANO et al., 2010), angiogênese (FERREIRA et al., 2009) e a regeneração de tecidos (FRADE et al., 2001; HERCULANO et al., 2010), além de ter sido utilizado como matriz de administração de fármacos (HERCULANO et al., 2010) ou como prótese vascular (NEVES-JÚNIOR et al., 2006).

1.3 Látex de borracha natural

O látex de borracha natural é encontrado em cerca de 200 espécies de plantas, sendo que a seringueira *Hevea brasiliensis*, uma árvore nativa do Brasil, fornece aproximadamente 99% da produção mundial de borracha natural (CYR, 1991). É composto basicamente por água, proteínas, lipídios e poliisopreno (NEVES-JÚNIOR et al., 2006). A borracha natural é considerada uma importante matéria-prima para fabricação de vários produtos, incluindo pneus, luvas cirúrgicas e preservativos (FERREIRA et al., 2009), além de ser um material de baixo custo, biocompatível, possuir resistência à tração, elasticidade, conforto e possibilitar ajustes (FRADE et al., 2001).

Aproximadamente na década de 90, iniciaram-se estudos do látex em aplicações na área da saúde. O seu uso tem se mostrado promissor em várias aplicações biomédicas, como por exemplo como acelerador de reparo ósseo, estimulador da angiogênese, bem como da adesão celular e da formação de matriz extracelular. Estas e outras características têm alicerçado a sua utilização como biomaterial eficaz (BALABANIAN et al., 2006; MENDONÇA et al., 2010; ANDRADE et al., 2011).

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Os defeitos ósseos são desafiantes na prática de trauma e ortopedia, visto que o processo resulta na união óssea, e estudos estimam que em 5% a 10% das fraturas a cicatrização é prejudicada, resultando em união tardia ou não (TSIRIDIS et al., 2007; CALORI et al., 2007; TZIOUPIS e GIANNOUDIS et al., 2007; EINHORN, 1995). Além dos traumas, os defeitos ósseos podem resultar de patologias, como tumores ou infecções, e podem ser ainda considerados críticos em relação ao segmento esquelético envolvido e ao comprimento da perda óssea (CALORI et al., 2010).

Dentre as células ósseas, os osteoblastos desempenham importante papel no reparo ósseo, pois são responsáveis pela formação óssea, compreendem de 4 a 6% do total de células residentes do tecido ósseo, e possuem características das células sintetizadoras de proteínas, endoplasmático rugoso abundante, complexo de Golgi proeminente e várias vesículas secretoras (CAPULLI; PAONE; RUCCI, 2014). No que ser

refere a sintetização de proteínas, sintetizam e secretam alguns importantes para a formação do osso, como a fosfatase alcalina que tem sido utilizada como marcador de atividade osteoblástica (LEIBBRANDT et al., 2008).

Esses defeitos ósseos ocasionados por motivos traumatológicos ou patológicos, ainda é um problema importante e têm motivado o desenvolvimento de materiais. No entanto, os benefícios desses materiais não são garantidos e as complicações e morbidades são frequentes, portanto, biomateriais têm sido uma alternativa possível para reparação integrativa (CALORI et al., 2011; O'KEEFE et al., 2011; HOLZAPFEL et al., 2013).

Nos últimos anos, a borracha natural vem sendo utilizada como biomaterial em aplicações biomédicas, demonstrando a capacidade de induzir a cicatrização de feridas (HERCULANO et al., 2010), angiogênese (FERREIRA et al., 2009), regeneração de tecidos (HERCULANO et al., 2010), matriz de administração de fármacos (HERCULANO et al., 2010) ou como prótese vascular (NEVES-JÚNIOR et al., 2006).

Alguns solventes têm sido utilizados para diluir o látex, como clorofórmio e tolueno, que são considerados solventes com boa solubilidade e tensão interfacial entre solvente e água. O tolueno tem baixa volatilidade e evapora muito lentamente à temperatura ambiente, para permitir o resfriamento da superfície, que é necessário para condensar a água na superfície da solução (FERREIRA et al., 2009). Já o clorofórmio se destaca pela formação dos poros, que também é um parâmetro chave a ser considerado, visto que o seu tamanho e a regularidade afetam o processo de formação do filme (WAN et al., 2014).

Além do solvente utilizado para diluir o látex, podem ser adicionados componentes como o fosfato de cálcio, que está entre os materiais utilizados para a reposição e regeneração óssea por apresentarem baixa toxicidade local e respostas inflamatórias. Tais características são explicadas pela natureza química destes materiais que, por serem formados basicamente por íons cálcio e fosfato, participam ativamente do equilíbrio iônico com o fluido biológico. Os fosfatos de cálcio são utilizados em uma variedade de aplicações que envolvem o reparo ósseo, incluindo recobrimento de próteses, podendo estar

associados a materiais poliméricos, tais como colágeno e polietileno (TATHE et al., 2010).

A sílica também pode ser adicionada, visto ser um dos principais componentes utilizados para o enchimento de reforço da borracha, aumentando a utilidade, a resistência à tração e ao rasgo dos produtos de borracha. Além disso, observou-se que a boa dispersão da sílica melhorou as propriedades térmicas e mecânicas do composto de borracha. No entanto, a sobrecarga de sílica tende a reduzir a resistência da borracha devido ao problema de agregação, necessitando que o carregamento seja controlado, pois pode resultar na perda da vantagem mecânica (SARKAWI et. al., 2003).

3. PROPOSIÇÕES

3.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* as propriedades biocompatíveis de dois sistemas híbridos distintos desenvolvidos a partir da associação entre borracha natural (BN) e fosfato de cálcio (CaP) ou partículas de sílica (SiPs)

3.2 Objetivos específicos

Avaliar os sistemas híbridos dissolvidos em dois solventes orgânicos diferentes, clorofórmio (CHF) ou tolueno (TOL), e incorporados com CaP ou SiPs, para investigar seus efeitos na morfologia, atividade e viabilidade de osteoblastos murinos

4. CAPÍTULOS

Regimento

Esta Tese de Doutorado baseia-se no Artigo 37º do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado. Os resultados obtidos no presente trabalho

nos 2 artigos científicos abaixo, redigidos estão de acordo com as normas da revista escolhida para publicação.

Artigo 1:

Título: Látex de borracha natural e biomembrana em aplicações biomédicas: seus efeitos justificam seu uso? Uma revisão integrativa da literatura.

Periódico: Wiley online library

Qualis capes: A2

Fator de Impacto: 5.609

Artigo 2:

Título: Analysis of biocompatible properties of natural rubber hybrid systems of *Hevea brasiliensis* in the *in vitro* culture of murine osteoblasts

Periódico: Materials Science and Engineering: C

Qualis capes: B1

Fator de Impacto: 7.328

4.1 Capítulo 1: Artigo 1 - Revisão integrativa

**Látex de borracha natural e biomembrana em aplicações biomédicas:
seus efeitos justificam seu uso? Uma revisão integrativa da literatura**

Luciana Mascena da Silva¹, Davide Carlos Joaquim¹, Arthur Castro de Lima², Maria Eduarda Gonçalves², Débora Letícia Moreira Mendes¹, Lucas Gabriel Nunes Andrade¹, Francisco Cezanildo Silva Beneditos¹, Francisco Herculano Campos Neto³, Mirna Marques Bezerra⁴, Ana Caroline Rocha de Melo Leite² e Virgínia Cláudia Carneiro Girão-Carmona¹

¹Departamento de Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

²Universidade de Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, Ceará, Brasil

³Centro Universitário FAMETRO – UNIFAMETRO, Fortaleza, CE, Brasil

⁴Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Sobral, CE, Brasil

Resumo

Látex de borracha natural (LBN) destaca-se na biomedicina pela reduzida capacidade de rejeição, elevada resistência mecânica e habilidade de formar biofilme. Além do que, sua biomembrana é empregada como curativo, prótese vascular e substituto de recursos convencionais de liberação de drogas. Este trabalho objetivou reunir e descrever aplicações biomédicas do LBN. Trata-se de revisão integrativa, realizada em 2021, baseada na pergunta norteadora “Quais as aplicações biomédicas do LBN?”, elaborada a partir da estratégia PICO. A combinação de palavras “Natural Rubber” AND “Biomaterials” foi utilizada na busca nas bases de dados. Os artigos incluídos tinham, como objetivo/aplicação biomédica, avaliar o efeito da incorporação de fármacos/produtos à membrana de LBN, em fenômenos, como atuação microbiana, dor e eventos adversos. Conclui-se que os trabalhos concentraram-se em pesquisas abordando incorporação de fármacos/produtos de liberação à membrana de LBN, dependente de propriedades inerentes a ela e com diversos efeitos, sem prejuízo para diferentes tipos celulares.

Palavras-chave: Látex; Borracha; *Hevea brasiliensis*; Biomaterial; Aplicação biomédica.

Introdução

Desde as antigas civilizações, a procura por biomateriais capazes de substituir órgãos e tecidos naturais é uma realidade (Finch, 2011). Frente a esse desafio e com o progresso científico, a elaboração dessas substâncias tornou-se um dos mais relevantes focos de estudos na Medicina e Bioengenharia, especialmente pela capacidade de restituírem tecidos humanos acometidos por enfermidades ou lesionados por acidentes (Cesar et al., 2020a).

Diante desse contexto, muitos polímeros naturais e sintéticos passaram a ser utilizados como biomaterial, objetivando restabelecer, manter e aprimorar o tecido e a sua funcionalidade (César et al., 2020). Dentre eles, o látex de borracha natural (LBN), um biopolímero obtido da seringueira *Hevea brasiliensis* (Cesar et al., 2020b), destaca-se pelo seu emprego na área biomédica em decorrência do reduzido percentual de rejeição pelo organismo humano e indução de reações alérgicas, além de elevada resistência mecânica e habilidade de formar biofilme (Cesar et al., 2020b; Rosa et al., 2018) Somado a isso, esse látex apresenta potencial de exploração, fácil manipulação e baixo

custo (Aiello et al., 2014), associado a não transmissibilidade de agentes infecciosos (Rosa et al., 2018).

Obtido a partir da sangria dos tecidos da *H. brasiliensis*, particularmente os lactíferos, o LBN é um sistema coloidal, polifásico e polidisperso, constituído por uma fase borracha (composto por 96% de hidrocarboneto, 3% de lipídeos e 1% de proteínas, além de potássio, magnésio e cobre), componentes não borracha (formado por lutóides e partículas Frey Wyssling) e soro (composto por proteínas, açúcares, ácidos graxos, álcoois e minerais) (Prodóssimo, 2021). Sua biomembrana, oriunda de um método não tradicional de vulcanização, tida como delgada, elástica e porosa (Rosa et al., 2019), participa como barreira física contra agentes infecciosos (Cesar et al., 2020b), na angiogênese (Krupp et al., 2019a), adesão celular e produção de matriz extracelular (Cesar et al., 2020), o que tem propiciado o seu emprego como curativo (Lima et al., 2021a) e como prótese vascular (Moopayuk; Tangboriboon, 2018).

Ademais, a biomembrana de LBN tem substituído recursos convencionais de liberação de drogas (Ferreira et al., 2009; Tsai et al., 2016), especialmente pela indução de alterações morfológicas superficiais nessa membrana, visando controlar a cinética de liberação dos fármacos (Almeida et al., 2020).

Isto posto, para melhor compreender a aplicação do LBN e sua biomembrana, este estudo se propôs a reunir e descrever as aplicações biomédicas desse biopolímero de origem vegetal.

Método

Trata-se de uma revisão integrativa da literatura, a qual objetiva sintetizar e analisar o conhecimento obtido em estudos anteriores publicados sobre um determinado tema, oportunizando a construção de novos conhecimentos (Botelho; Cunha; Macedo, 2011).

Para a sua condução, foram seguidas as etapas propostas por Mendes et al. (2008), compreendidas por: 1 – Escolha do tema e definição da pergunta de pesquisa; 2 – Estabelecimento de critérios de inclusão e exclusão dos estudos; 3 – Definição das informações a serem extraídas dos artigos

selecionados; 4 – Avaliação dos trabalhos incluídos na revisão; 5 – Interpretação dos resultados; 6 – Apresentação da síntese do conhecimento.

Para a formulação da pergunta norteadora, foi utilizada a estratégia PICO, acrônimo em inglês, cujo significado corresponde a “paciente/população/problema, intervenção, comparação e resultados”. Assim, foram atribuídas, à letra P, as palavras látex de borracha natural, às letras I e C, não houve emprego dessas na pesquisa, e à letra O, foram utilizados os termos aplicações biomédicas. Com base nessa estratégia, foi obtida a seguinte questão norteadora: “Quais as aplicações biomédicas do látex de borracha natural?”

A busca nas bases de dados foi realizada em 27 de dezembro de 2021. Essas abrangeram o *U.S. National Library of Medicine* (PubMed), o *Web of Science*, o *Scopus* e o portal Biblioteca Virtual em Saúde (BVS). Como terminologia em saúde, foram usadas as expressões “Natural Rubber” e “Biomaterials”, incluídas nos Descritores em Ciência da Saúde (DeCS) e no Medical Subject Headings (MeSH). Como operador booleano, foi adotada a palavra inglesa AND.

A busca foi conduzida por dois pesquisadores, os quais padronizaram a sequência de utilização dos descritores e dos cruzamentos em cada base de dados, após o que, procederam com a comparação dos resultados. Para garantir a busca ampla, as bases de dados foram acessadas por meio do portal periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), reconhecida pela Universidade Federal do Ceará (UFC).

Para a seleção das publicações, foram adotados os seguintes critérios de inclusão: artigos disponíveis na íntegra, nos idiomas português, inglês ou espanhol, publicados nos últimos seis anos (de 2015 a 2021), cuja abordagem envolvia o uso de LBN, obtido da *Hevea brasiliensis*, na aplicação biomédica. Quanto aos critérios de exclusão, foram suprimidos os estudos de revisões. Para sistematizar esse processo, optou-se pela metodologia *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) (Page et al., 2021).

Para a extração e a síntese das informações, utilizou-se o instrumento de Lima et al., (2021a). Assim, foram trabalhadas as seguintes variáveis:

codificação dos artigos, base de dados, autores, ano e país da publicação; periódico; tipo de estudo; nível de evidência; principais resultados e aplicação biomédica.

A avaliação do nível de evidência científica seguiu a classificação proposta por Morais et al (2019), a qual estabelece sete níveis: 1 - Revisão sistemática e metanálise, ensaios clínicos randomizados controlados ou revisões sistemáticas de ensaios clínicos randomizados controlados; 2 - Ensaios controlados e randomizados; 3 - Estudos de coorte; 4 - Estudos de caso-controle; 5 - Relatório de casos/série de casos; 6 - Opinião/cartas de peritos; 7 - Pesquisa animal/estudo *in vitro* (estudos científicos básicos).

Para a avaliação da aplicação biomédica, os estudos foram classificados, de acordo com os autores, em cinco categorias, a saber: 1 – Estudos que utilizaram o LBN como matriz de liberação de fármacos/produtos; 2 – Estudos que utilizaram o LBN como curativo de uso tópico; 3 – Estudos que utilizaram o LBN na produção de material biomédico; 4 – Estudos que utilizaram o LBN na engenharia de tecidos; 5 – Estudos que utilizaram o LBN como adesivo transdérmico.

Resultados

A estratégia de busca permitiu identificar 350 publicações, das quais 69 foram excluídas por duplicidade. Após a leitura do título e resumo, foram excluídos 171 trabalhos. Dos 110 selecionados para análise na íntegra, 87 foram excluídos por serem revisões ou não abordarem a questão da pesquisa. Assim, 23 estudos compuseram a revisão (Figura 1).

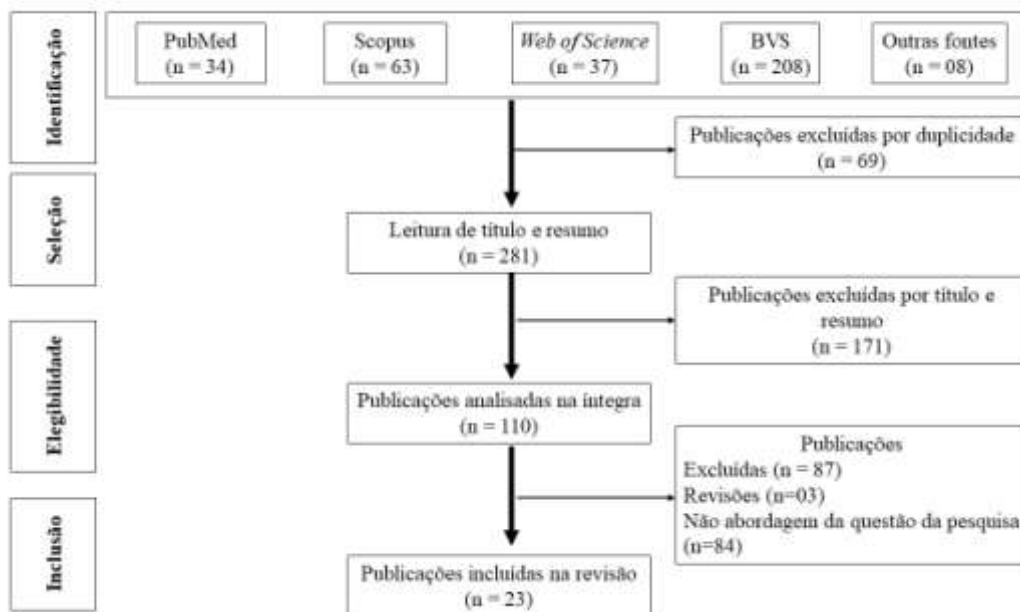


Figura 1- Fluxograma da seleção de artigos nas bases de dados adaptado do *Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses (PRISMA)*

Conforme Quadro 1, dos 23 estudos incluídos, 43,47% (n = 10) constavam na base de dados Scopus, 34,78% (n = 8) tinham sido publicados no ano de 2018 e 73,91% (n = 17) foram desenvolvidos no Brasil. Quanto ao periódico, 8,69% (n = 2) dos artigos foram publicados na revista *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, quantitativo igual ao periódico *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*.

Sobre o tipo de publicação e nível de evidência, 95,65% (n = 22) dos trabalhos tinham, como tipo de estudo, o animal/*in vitro*, número igual aos que tinham nível de evidência 7.

Quadro 1: Caracterização das publicações incluídas na revisão, segundo base de dados, autor, ano de publicação, país, periódico, tipo de estudo e nível de evidência. Fortaleza - CE, Brasil, 2020.

Nº	Base de dados	Autor/Ano	País	Periódico	Tipo de estudo	NE*
01	Scopus	Almeida et al., 2020	Brasil	Applied Surface Science	Estudo animal/ <i>in vitro</i>	7
02	Web of	Gemeinder	Brasil	Journal of	Estudo	7

	Science	et al., 2020		Biomaterials Science	animal/ <i>in vitro</i>	
03	BVS	Barros et al., 2019	Brasil	Skin Research and Technology	Estudo animal/ <i>in vitro</i>	7
04	Scopus	Garms et al., 2019	Brasil	Applied Microbiology and Biotechnology	Estudo animal/ <i>in vitro</i>	7
05	BVS	Krupp et al., 2019	Brasil	International Journal of Biological Macromolecules	Estudo animal/ <i>in vitro</i>	7
06	Scopus	Barros et al., 2018	Brasil	Biomedical Physics & Engineering Express	Estudo animal/ <i>in vitro</i>	7
07	BVS	George et al., 2018	Índia	Scientific Reports	Estudo animal/ <i>in vitro</i>	7
08	Web of Science	Guerra et al., 2018	Brasil	Journal of Polymer Research	Estudo animal/ <i>in vitro</i>	7
09	Pubmed	Miranda et al., 2018	Brasil	Amino Acids	Estudo animal/ <i>in vitro</i>	7
10	Scopus	Moopayuk; Tangboriboon, 2018	Tailândia	Key Engineering Materials	Estudo animal/ <i>in vitro</i>	7
11	Web of Science	Morise et al., 2018	Brasil	International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials	Ensaio controlado e randomizado	2
12	Pubmed	Suteewong et al., 2018	Tailândia	Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	Estudo animal/ <i>in vitro</i>	7
13	Scopus	Barros et al., 2017	Brasil	International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials	Estudo animal/ <i>in vitro</i>	7
14	Web of Science	Floriano et al., 2018	Brasil	Journal of Polymers and the Environment	Estudo animal/ <i>in vitro</i>	7
15	Web of Science	Garms et al., 2017	Brasil	British Journal of Pharmaceutical Research	Estudo animal/ <i>in vitro</i>	7

16	Pubmed	Miranda et al., 2017	Brasil	Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition	Estudo animal/ <i>in vitro</i>	7
17	Scopus	Watthanaphanit; Rujiravanit, 2017	Tailândia	International Journal of Biological Macromolecules	Estudo animal/ <i>in vitro</i>	7
18	Web of Science	Barros et al., 2016	Brasil	International Journal of Peptide Research and Therapeutics	Estudo animal/ <i>in vitro</i>	7
19	Scopus	Lee et al., 2016	Malásia	Journal of Applied Polymer science	Estudo animal/ <i>in vitro</i>	7
20	Scopus	Borges et al., 2015	Brasil	Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition	Estudo animal/ <i>in vitro</i>	7
21	Scopus	Marcartto et al., 2021	Brasil	Journal of Applied Polymer science	Estudo animal/ <i>in vitro</i>	7
22	Scopus	Miranda et al., 2021	Alemanha	Polymer Bulletin	Estudo animal/ <i>in vitro</i>	7
23	Pubmed	Lima et al., 2021	Brasil	Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials	Estudo animal/ <i>in vitro</i>	7

*Nível de Evidência.

Quando avaliados os objetivos/aplicação biomédica dos estudos, esses, em geral, envolveram a incorporação de fármacos/produtos à membrana de LBN, compreendendo desde antimicrobianos (especialmente antibióticos) e anti-inflamatórios a óleos vegetais, hormônio e produtos naturais/sintéticos (como própolis, poli(isopreno), quitosana e [W⁶] hilina a1), os quais visavam avaliar o efeito dessa incorporação em fenômenos, como atividade antimicrobiana, analgésica, reparação tecidual, liberação do leite materno e redução de eventos adversos (Quadro 2).

Com respeito aos resultados, as publicações apontaram, em geral, que os fármacos/produtos eram passíveis de incorporação à membrana de LBN, de forma dependente da densidade de poros e do seu tamanho, sem induzir alterações estruturais e sem apresentar interação significativa com a

membrana. Normalmente, a liberação ocorria, inicialmente, de forma rápida, seguida por um processo mais lento.

Os autores relataram ainda que a incorporação não demonstrou atividade hemolítica e tóxica, além de apresentar ação antibiótica contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Burkholderia lata*. Ademais, a agregação dos fármacos/produtos à membrana de LBN promoveu a formação de tecido de granulação, angiogênese e síntese de colágeno.

Especificamente, os estudos mostraram ainda uma maior porosidade, alongamento, molhabilidade e hidrofiliabilidade e menor força tênsil em membranas de LBN carregadas com glicerol ou própolis.

Quadro 2: Caracterização das publicações incluídas na revisão, segundo objetivo, principais resultados e aplicação biomédica. Fortaleza - CE, Brasil, 2020.

Nº	Objetivos	Principais resultados	Aplicação biomédica
01	Relatar a produção de microporos em uma membrana de LBN, por microusinagem a laser de femtossegundo. Avaliar a liberação de ciprofloxacina carregada nessa membrana.	A indução de poros por microusinagem a laser de femtossegundo não alterou a estrutura e biodegradabilidade da membrana de LBN; De acordo com a espectroscopia FTIR ^(a) , pelo método ATR ^(b) , houve uma interação entre a ciprofloxacina e a membrana; A liberação desse fármaco, inicialmente mais acelerada, foi maior em membrana com maior densidade de poro, ocorrendo de forma controlada; A concentração final desse fármaco dependeu linearmente da densidade de poros.	Matriz de liberação de fármaco/produto (Ciprofloxacina)
02	Incorporar sulfato de gentamicina em biomembranas de LBN para reduzir os efeitos colaterais da droga. Avaliar as propriedades antibióticas dessa biomembrana incorporada contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> presentes em úlceras cutâneas infectadas.	O sulfato de gentamicina pareceu ser absorvido, de forma dissipada, na superfície da biomembrana, sem induzir alterações estruturais, localizando-se nas camadas mais internas, além de apresentar uma maior solubilidade em ambiente ácido; A incorporação desse fármaco à biomembrana melhorou a sua	Curativos para úlceras cutâneas infectadas por bactérias (Sulfato de gentamicina)

		<p>performance mecânica e manteve a atividade antibacteriana da droga contra <i>S.aureus</i> e <i>E.coli</i>;</p> <p>Essa incorporação não demonstrou atividade hemolítica nem toxicidade em modelo animal de <i>C. elegans</i>, embora tenha reduzido a mobilidade de sua larva.</p>	
03	<p>Desenvolver e caracterizar um composto, com propriedades reparadoras e hidratantes e de baixo custo, para o alívio da dor e cicatrização das fissuras mamilares causadas pela amamentação.</p>	<p>A membrana de LBN carregada com glicerol apresentou maior densidade de poros, alongamento e molhabilidade e menor força ténsil do que a de LBN sozinho;</p> <p>A membrana de LBN apresentou citotoxicidade dose-dependente sobre os queratinócitos e fibroblastos. Entretanto, a membrana carregada e diluída mostrou-se atóxica para os fibroblastos e tóxica, de forma dose-dependente, para os queratinócitos;</p> <p>A membrana de LBN, independentemente da presença de glicerol, não induziu efeitos hemolíticos.</p>	<p>Curativo para fissuras mamárias (Glicerol)</p>
04	<p>Desenvolver um dispositivo polimérico para o tratamento de infecções e reparo tecidual.</p> <p>Explorar a eficácia desse biomaterial em cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Staphylococcus epidermidis</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Escherichia coli</i> para o tratamento de feridas crônicas infectadas.</p>	<p>A membrana de LBN carregada com moxifloxacina não apresentou efeito citotóxico, além de exibir ação antibiótica contra <i>S. aureus</i>, <i>S. epidermidis</i>, <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. Coli</i>;</p> <p>Diferentemente do observado, a membrana de LBN sozinha não mostrou qualquer atividade antibiótica frente a essas bactérias.</p>	<p>Curativos para feridas crônicas infectadas (Moxifloxacina)</p>
05	<p>Avaliar os efeitos da membrana de LBN associada ao extrato aquoso de própolis sobre a cicatrização em modelo de queimadura em ratos.</p>	<p>A membrana de LBN associada a própolis apresentou maior hidrofiliabilidade e porosidade em relação à membrana sozinha;</p> <p>A membrana, independentemente da presença de própolis, apresentou maior retração da lesão comparada ao grupo controle (sem tratamento);</p> <p>A análise histopatológica mostrou menor infiltrado inflamatório e uma organização de queratinócitos favorável à descamação da pele, incluindo o tecido necrótico, na presença da membrana de LBN</p>	<p>Curativos para queimaduras (Própolis)</p>

		com própolis, o que não ocorreu com a ausência desse; A membrana de LBN com própolis induziu a formação de tecido de granulação, angiogênese e síntese de colágeno.	
06	Desenvolver uma membrana de LBN carregada com extrato antioxidante de <i>Sarasinula marginata</i> . Avaliar essa atividade <i>in vitro</i> , comparando duas técnicas espectrométricas.	A análise FTIR ^(a) mostrou uma incorporação satisfatória do extrato de <i>S. marginata</i> ao LBN, podendo ser liberado pela membrana; A avaliação pela técnica DPPH ^(c) , especialmente a DPPH EPR ^(d) , manteve a atividade antioxidante do extrato após sua incorporação ao LBN.	Matriz de liberação de fármaco/produto (<i>Sarasinula marginata</i>)
07	Verificar se o grafeno associado ao LBN produz nanocompósitos de filme, capazes de serem resistentes à tração, alongarem-se e serem biocompatíveis.	Os testes demonstraram que a incorporação de grafeno ao LBN resultou em nanocompósitos com boas propriedades, como biocompatibilidade, citotoxicidade irrelevante, ausência de irritabilidade cutânea e boa resistência à tração e alongamento.	Produção de materiais biomédicos (luvas, cateteres e preservativos) (Grafeno)
08	Caracterizar quimicamente a modificação na estrutura do poli(isopreno) (PI), oriundo do LBN. Avaliar seu efeito na preparação de blendas de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) a fim de melhorar a compatibilidade química em relação à Cellprene ^{®(e)} (blenda de PLGA/PI) e aumentar suas aplicações na Engenharia de Tecidos.	O processo de epoxidação do PI aumentou polaridade desse em relação ao LBN; Quanto às blendas de PLGA/PI epoxidado, essas foram parcialmente miscíveis, divergindo do Cellprene ^{®(e)} , além de serem adequadas para aplicação em Engenharia de Tecidos Moles e biocompatíveis; PLGA/PI epoxidado apresentou maior proliferação e adesão celular comparado a PLGA/PI.	Viabilidade para aplicação em Engenharia de Tecidos [Poli(isopreno)]
09	Avaliar a incorporação e liberação de peptídeos, utilizando um transportador de biomembrana de LBN, para promover o desenvolvimento de curativos antimicrobianos que estimulem a reparação tecidual e evitem a infecção pelas substâncias contidas no látex.	A MEV ^(f) mostrou que parte do peptídeo, identificado por [W ⁶] hilina a1, ficou retida na superfície da biomembrana do LBN; Quanto à sua integridade, observou-se uma degradação enzimática do peptídeo por proteases presentes no látex.	Matriz de liberação de fármaco/produto ([W ⁶] hilina a1)
10	Avaliar se a semente de mangostão, associada ao emplastro de LBN, pode ser utilizada como sistema de liberação de fármaco, inclusive para o alívio da dor em pacientes com	Em termos de composição, o pó da semente de mangostão era constituído especialmente por lipídeo, seguido por carboidrato, fibras e proteínas;	Adesivo para administração de fármaco/produto (Pó de

	osteoartrite.	Em relação a características físicas, o pó da semente apresentou uma temperatura de degradação de 41,50°C; Observou-se, ainda, no emplastro de LBN, ângulos de contato com gotas de água e álcool de 80,8° e 0,0°, respectivamente, propiciados pela incorporação do pó; Quanto às suas propriedades mecânicas, essas foram semelhantes às apresentadas pelo emplastro na ausência do pó.	semente de mangostão)
11	Desenvolver um Sistema de Entrega Transdérmica de Drogas, usando membranas de LBN carregadas com butilbrometo de escopolamina para um futuro tratamento transdérmico de sialorreia.	A espectrofotometria UV-visível mostrou uma liberação rápida de 32% e mais lenta de 65,3% de butilbrometo de escopolamina da membrana de LBN após 24h e 72h, respectivamente; Evidenciou-se ainda que o butilbrometo de escopolamina não alterou o comportamento mecânico da borracha, além de exibir uma maior intensidade de bandas pela análise FTIR ^(a) ; Observou-se uma maior molhabilidade da membrana na presença do butilbrometo, além de nenhum efeito hemolítico foi constatado.	Matriz de liberação de fármaco/produto (Butilbrometo de escopolamina)
12	Desenvolver um sistema antibacteriano duplo, contendo quitosana e nanopartículas de prata, capaz de ser utilizado com substratos rígidos (polimetilmetacrilato) em filme de LBN.	A MEV ^(f) mostrou deposição de nanopartículas de prata e quitosana sobre o filme de LBN; A análise por MFA ^(g) não apontou significativa diferença de rugosidade entre o filme coberto ou não pelas nanopartículas de prata e quitosana; Em relação à atividade antimicrobiana, o filme contendo nanopartículas de prata e quitosana não inibiu o crescimento de <i>S. aureus</i> e apresentou um reduzido efeito sobre <i>E. coli</i> ; Quanto à deposição de nanopartículas de prata e quitosana sobre polimetilmetacrilato em filme de LBN, essa inclusão aumentou a rugosidade e a atividade antibacteriana desse filme.	Matriz de liberação de fármaco/produto (Quitosana, nanopartículas de prata e polimetilmetacrilato)

13	<p>Desenvolver membrana de LBN carregada com desmopressina. Caracterizar a liberação desse peptídeo <i>in vitro</i>, visando seu uso no tratamento de enurese.</p>	<p>A MEV^(f) exibiu cristais na superfície da membrana de LBN contendo desmopressina; A análise FTIR^(a) mostrou interações não covalentes entre a desmopressina e LBN; Quanto à liberação do peptídeo a partir da membrana, constatou-se uma liberação rápida de 35% da desmopressina em até 2 horas e uma mais lenta de 60%, em 96 horas; Sobre a atividade hemolítica, não foi observado qualquer ação pelo LBN, independentemente da presença do peptídeo.</p>	<p>Matriz de liberação de fármaco/produto o (Desmopressina)</p>
14	<p>Desenvolver um sistema de liberação transdérmica de cetoprofeno incorporado à membrana de LBN.</p>	<p>A MEV^(f) constatou a presença de cetoprofeno na superfície da membrana de LBN, inclusive com a formação de agregados sólidos; A análise FTIR^(a) revelou nenhuma interação significativa entre o fármaco e membrana; Sobre as propriedades mecânicas, a inclusão de cetoprofeno reduziu o enlogamento na ruptura e manteve a força tênsil do LBN; Com respeito à atividade hemolítica, a incorporação do fármaco não apresentou efeito hemolítico.</p>	<p>Matriz de liberação de fármaco/produto o (Cetoprofeno)</p>
15	<p>Desenvolver uma membrana de LBN carregada com ciprofloxacina para acelerar o reparo tecidual e controlar a infecção de feridas. Caracterizar o biomaterial quanto à sua estrutura, morfologia, resistência e atividade microbiológica.</p>	<p>A MEV^(f) apontou a presença de cristais de ciprofloxacina de diferentes tamanhos e formas, intimamente unidos; Na análise de difração de raio-X, constatou-se ausência de cristalinidade de ciprofloxacina na membrana de LBN; A análise FTIR^(a) mostrou estabilidade do fármaco após a sua incorporação à membrana; A avaliação termogravimétrica e a derivada evidenciou maior pirólise na membrana sem a incorporação de ciprofloxacina e modificação nos estágios de degradação pelo carregamento da membrana com o fármaco, respectivamente; Em relação à atividade microbiológica, a membrana de LBN</p>	<p>Curativos para feridas infectadas (Ciprofloxacina)</p>

		carregada com ciprofloxacina inibiu completamente a bactéria <i>Burkholderia lata</i> .	
16	Desenvolver um método para produzir membranas de LBN via liofilização, permitindo o controle da porosidade da membrana, por meio da adição de diferentes volumes de água e da liberação de albumina sérica bovina.	A MEV ^(f) mostrou uma relação direta entre o número de poros e o volume de água adicionado durante a formação da membrana de LBN; Com respeito à permeabilidade ao vapor de água, observou-se uma permeação constante da membrana, elevando-se com o tamanho do poro; Sobre a liberação de albumina sérica bovina, constatou-se um aumento da sua liberação com o aumento da porosidade da membrana; Sobre a atividade hemolítica, a membrana, independentemente da presença de poro, não apresentou esse tipo de atividade; Em relação à citotoxicidade, não foi detectado esse efeito pela membrana.	Curativos para feridas (Membrana de LBN por liofilização)
17	Produzir filme de LBN associado à sericina e quitina bigode como um produto alternativo para o tratamento de feridas. Desenvolver os novos curativos elásticos aplicáveis para as feridas em que é necessária a aplicação de pressão para “amortecer” a ferida.	A MEV ^(f) evidenciou pequenas protrusões na superfície do filme, especialmente produzidas pelo aumento de quitina; Sobre as propriedades mecânicas, observou-se uma maior tensão na ruptura pelo maior teor de sericina, reduzida pela presença de quitina bigode. Esse fenômeno foi também constatado no alongamento na ruptura; Em relação à capacidade de absorção de água, essa aumentou com a maior concentração de sericina, o que não ocorreu com a inclusão da quitina; A inclusão de pequena quantidade de quitina favoreceu a liberação de sericina da membrana; Sobre a viabilidade celular, essa foi maior com a sericina 20%.	Curativos elásticos para tratamento de feridas (Sericina e quitina bigode)
18	Desenvolver um novo sistema de liberação de ocitocina em membrana de LBN, visando o seu uso como adesivo dérmico para a liberação do leite materno.	A análise do inchamento em água da membrana de LBN apontou uma absorção de 1,08g desse líquido/grama dessa estrutura em um período de 16h; A avaliação termogravimétrica	Matriz de liberação de fármaco/produto (Ocitocina)

		<p>apontou uma semelhança na pirólise da membrana na presença ou ausência da ocitocina;</p> <p>A análise FTIR^(a) não constatou ligação covalente entre o hormônio e a membrana;</p> <p>A MEV^(f) evidenciou agregados sólidos de ocitocina na superfície da membrana;</p> <p>Em relação à liberação, observou-se uma cinética de liberação do hormônio inicialmente rápida, seguida por lenta;</p> <p>Com respeito à atividade hemolítica, essa não foi detectada na concentração de até 100 µg/mL da amostra ocitocina e membrana e LBN diluída.</p>	
19	<p>Descrever a preparação e caracterização do LBN plastificado com emulsões de óleo vegetal, visando a eficácia desse filme na redução da sobrevivência de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p>As microemulsões de óleo vegetal (óleo de palmiste, coco e soja) aumentaram o tamanho das partículas de LBN, em torno de 13,4% a 17,0%, diminuíram consideravelmente as suas propriedades mecânicas e elevaram o índice de inchamento;</p> <p>Em relação à atividade antimicrobiana, o LBN associado ao óleo vegetal apresentou atividade antimicrobiana contra <i>S. aureus</i>, mas não contra <i>E. coli</i>.</p>	<p>Curativo para feridas infectadas (Óleo de palmiste, coco e soja)</p>
20	<p>Criar um composto capaz de aprimorar as propriedades do fosfato de cálcio e LBN para aplicação biomédica.</p>	<p>A MEV^(f) apontou a presença de partículas de fosfato de cálcio sobre a superfície da biomembrana de LBN;</p> <p>Sobre a atividade hemolítica, a biomembrana, independentemente da presença de fosfato de cálcio, não induziu essa atividade até a concentração de 0,125 mg/mL.</p>	<p>Matriz de liberação de fármaco/produto (Fosfato de cálcio)</p>
21	<p>Produzir estruturas de ácido polilático, com duas geometrias diferentes em 3D, revestidas com LBN, visando aplicação biomédica.</p>	<p>A análise da estrutura de ácido polilático coberto com uma camada de LBN mostrou um nivelamento e uniformidade em relação à estrutura sem essa cobertura, o mesmo ocorrendo quando da presença de uma segunda camada. Não se observou redução do diâmetro dos poros;</p> <p>A análise FTIR^(a) indicou que o ácido</p>	<p>Estruturas 3D para cultivo celular</p>

		<p>não reagiu quimicamente com o LBN;</p> <p>Em relação aos testes mecânicos de compressão, a camada de LBN não alterou os alterou;</p> <p>Quanto à atividade hemolítica, essa não foi observada quando da cobertura com LBN.</p>	
22	<p>Avaliar o efeito do metronidazol e nanopartículas de prata incorporados à membrana de LBN como carreadores em um sistema de liberação controlado.</p>	<p>A MEV^(f) mostrou partículas aderidas à superfície da membrana de LBN, correspondendo às nanopartículas de prata, bem como estruturas em forma de nucleação, relacionadas principalmente aos cristais de metronidazol;</p> <p>A análise FTIR^(a) exibiu nenhuma mudança química na membrana após a incorporação de metronidazol e prata;</p> <p>Os testes de liberação <i>in vitro</i> apontaram uma ligação das nanopartículas com o fármaco, além de uma liberação mais rápida, pela adsorção desse complexo à membrana de LBN, e uma mais lenta, pela presença do fármaco no interior da membrana;</p> <p>A análise molecular evidenciou uma interação mais eficiente entre as nanopartículas e o metronidazol em relação à matriz do LBN. Observou-se ainda a retenção de várias moléculas do fármaco na matriz;</p> <p>Sobre a atividade hemolítica, a nanopartícula, o fármaco e o LBN não apresentaram esse tipo de ação.</p>	<p>Curativo para feridas infectadas (Metronidazol e nanopartículas de prata)</p>
23	<p>Incorporar ibuprofeno à membrana do LBN, visando a produção de um novo adesivo biocompatível para o tratamento de processos inflamatórios, capaz de reduzir os efeitos adversos.</p>	<p>Em termos de propriedades mecânicas, a incorporação de ibuprofeno à membrana de LBN reduziu o módulo de elasticidade e elevou o alongamento, além de ter aumentado em 33% a deformação e 43% a tensão de ruptura;</p> <p>A membrana incorporada não exibiu poros e sua absorção ocorreu na forma de cristais;</p> <p>Quanto à liberação de ibuprofeno, essa ocorreu efetivamente em meio básico, mais rapidamente, quando</p>	<p>Adesivo para administração de fármaco (Ibuprofeno)</p>

		presente na superfície da membrana, e mais lentamente, quando presente no seu interior; Sobre a atividade hemolítica, a membrana com o fármaco não apresentou essa atividade.	
--	--	---	--

^aFTIR- Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier; ^bATR- Reflexão total atenuada; ^cDPPH - Ensaio espectrofotométrico; ^dEPR - Ensaio de Ressonância Paramagnética Eletrônica; ^eCellprene® - blenda patenteada pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ^fMEV - Microscopia Eletrônica de Varredura; ^gMFA – Microscopia de Força Atômica.

Discussão

Esta revisão integrativa permitiu reunir e descrever as aplicações biomédicas do LBN, oriundo da *H. brasiliensis*, seringueira nativa da floresta amazônica e a principal fonte de borracha natural (Raia et al., 2018). Em particular, esse trabalho procurou explicar os achados gerais obtidos em estudos publicados em base de dados cientificamente relevantes, o que poderá contribuir com o desenvolvimento de pesquisas voltadas à prática clínica quanto ao uso de membranas de LBN e os diferentes mecanismos físicos, químicos e biológicos desencadeados pelo seu emprego.

Quando avaliadas as bases de dados dos artigos incluídos, o maior número de publicações na Scopus pode ser um reflexo da importância da temática aqui abordada e do fato de ser essa plataforma um ambiente vasto de produções científicas, nas mais diferentes áreas, fenômeno sustentado pelos periódicos nela cadastrados (Rebelo et al., 2015).

Sobre o ano dos trabalhos, o destaque para 2018 pode ser um reflexo da priorização, no período de 2019 a 2021, de pesquisas voltadas ao Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave-2 (SARS-CoV-2) e Doença Coronavírus - 19 (COVID-19). Pode-se supor ainda que tenha resultado do limitado apoio financeiro instituído pelo Governo Federal às pesquisas, vivenciado nos últimos anos (Moutinho et al., 2020).

Com relação ao país onde a pesquisa foi conduzida, o predomínio de artigos oriundos do Brasil pode ser compreendido se admitido que a *H. brasiliensis* é uma espécie botânica nativa da Amazônia, tendo, como a única

fonte de seu produto (borracha natural), o Brasil, até meados do século XX (Prodóssimo, 2021).

No que se refere ao periódico, o fato de todos os estudos terem sido publicados em revistas internacionais, especialmente na *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* (tida como a publicação oficial da Sociedade Internacional de Polímeros Biomédicos e Biomateriais Poliméricos) e *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* (revista que publica trabalhos relevantes no contexto das propriedades dos biomateriais poliméricos e sua interação com organismos vivos, particularmente no nível molecular e celular), foi surpreendente, visto que a maioria deles foi desenvolvido no Brasil.

Esse dado pode ser um indício de que há interesse dos pesquisadores nacionais por revistas internacionais, possibilitando uma maior visualização e alcance de informações, colaborando com a internacionalização da ciência brasileira (Antunes et al., 2019). Somado a isso, pode existir um maior interesse internacional pela biodiversidade brasileira (Raia et al., 2018).

No que diz respeito ao tipo de estudo e nível de evidência das publicações, o fato de que grande parte delas envolveu pesquisa animal/estudo *in vitro* e força de evidência 7 pode ser justificado pela pesquisa animal permitir a investigação do efeito de uma substância/produto sobre todo o organismo (Lima et al., 2021a). Além do que, esse tipo de estudo proporciona o esclarecimento de questões relacionadas aos processos fisiológicos e patológicos, com repercussão na prática clínica (Amorim et al., 2021).

Para o estudo *in vitro*, sua utilização por grande parte dos artigos contidos nessa revisão pode se basear no fato que esse tipo de pesquisa é capaz de obter informações importantes para o ser humano, ao fazer uso do cultivo de células, tecidos e órgãos em um meio externo ao organismo (Borges et al., 2017) .

Vale ressaltar que, apesar da reduzida força de evidência científica, pesquisas com animais ou *in vitro* são reconhecidas como cruciais para o avanço da Medicina e apoio contínuo às Ciências Morfofuncionais (Morais et al., 2019).

Quando analisados o objetivo e aplicabilidade médica dos trabalhos incluídos, a preponderância da utilização do LBN como matriz de liberação de fármaco/produto pode estar associada ao crescente interesse do setor farmacêutico em inovar e investigar sistemas de liberação capazes de aprimorar os efeitos terapêuticos, minimizar os efeitos colaterais (Dias Murbach et al., 2014), regular a liberação e ampliar a duração das drogas (Guerra et al., 2021). Tal interesse pode ser proporcionado pela membrana de LBN ser um potente sistema carreador associado à sua biocompatibilidade, baixo custo, facilidade de manipulação e indução de angiogênese e adesão celular (Aiello et al., 2014).

Especificamente, para a incorporação de antibióticos à membrana de LBN, conforme apontado nos artigos dessa revisão, essa conduta se justifica por serem um dos grupos de fármacos mais prescritos (Ribeiro Teixeira et al., 2019) e importantes no controle de infecções. Além do que, é possível uma alteração da cinética e do tempo de liberação dessas drogas pela simples mudança morfológica dessa membrana (Gemeinder et al., 2021).

Para os anti-inflamatórios, o interesse de sua integração à membrana pode estar fundamentado no seu elevado consumo mundial (Bitencourt & Alexandre Alves, 2021), associado à perspectiva de redução de seus efeitos adversos sistêmicos, inclusive graves, propiciada por sistemas de liberação transdérmica (Floriano et al., 2018). Sobre os óleos vegetais, seu estudo associado à membrana de LBN pode ser entendido se admitido que esses materiais renováveis e sustentáveis são capazes de atuarem como plastificantes de borracha natural (Petrović et al., 2013), reduzindo a sua viscosidade e custo. Ainda, eles podem aprimorar as propriedades de processamento dessa borracha e aumentar a flexibilidade, em baixa temperatura (Nasruddin & Susanto, 2018).

No tocante à incorporação de hormônio à membrana de LBN, esse propósito é compreensível se observada a importância que a terapia de reposição hormonal em situações de menopausa e andropausa apresenta, particularmente utilizando formulações, como adesivos (Mesquita et al., 2021). Esses, quando sensíveis à pressão e incorporados à borracha natural, são

muito adotados pelas propriedades dessa última de cristalizar sob estiramento (Mapari et al., 2021).

Sobre os produtos naturais/sintéticos associados à membrana de LBN, a utilização de própolis pode ser entendida se considerado que essa substância natural se sobressai como material adicional a curativos, apresentando efeitos antibacterianos, não hepatotóxicos e imunogênicos, além de regenerativos (como, a produção de colágeno e elastina e aumento da proliferação de queratinócitos) e anti-inflamatórios (Rojczyk et al., 2020).

Nomeadamente, a incorporação de própolis à membrana de LBN propicia à essa flexibilidade, porosidade e hidrofiliabilidade, propriedades que podem favorecer desde a angiogênese, formação do tecido de granulação e organização de uma barreira protetora à facilitação de drenagem do exsudato e maior aderência da membrana à lesão e aceleração da multiplicação celular (Krupp et al., 2019b).

Para a quitosana, a sua associação à membrana de LBN pode estar relacionada ao seu uso, como biopolímero, no tratamento de feridas e liberação de fármacos. Essa aplicabilidade se baseia em suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e similaridade com a matriz extracelular, além de promover cicatrização (Cristina Sampaio et al., 2018).

Especificamente, no artigo aqui incluído, a quitosana foi empregada para estabilizar as partículas de látex de poli (metacrilado de metila) carregado negativamente (Suteewong et al., 2019). Somado a isso, como o objetivo do estudo era desenvolver um sistema antibacteriano duplo, capaz de ser utilizado com substratos rígidos (polimetilmetacrilato) em filme de LBN, a quitosana foi também adotada por apresentar atividade antimicrobiana (Galindo et al., 2019).

No que se refere ao poli(isopreno), a sua aplicabilidade nos estudos se justifica por ser a borracha natural um polímero de isopreno, conferindo a ela uma simplicidade em sua composição e elasticidade, embora uma alta massa molecular média (Prodóssimo, n.d.). Com respeito ao [W⁶] hilina a1, composto peptídico modificado da hilina a1, peptídeo antimicrobiano oriundo da rã *Hypsiboas albopunctatus*, sua incorporação à membrana de LBN se fundamenta no fato de que esse composto apresenta atividade antimicrobiana,

favorecendo esse efeito nessa associação. Realmente, esse sistema pode agir como uma matriz de liberação de diferentes moléculas (Miranda et al., 2018), além de contribuir com a reparação tecidual (Guerra et al., 2021).

Quando investigados os resultados apresentados pelas publicações abordadas nesse trabalho, o fato de terem focado na incorporação à membrana de LBN dos fármacos/produtos ressalta o desejo de se utilizar esse látex como matriz para um sistema de liberação controlada de medicamentos (Borges et al., 2014). Em particular, esse tipo de sistema possibilita uma ação mais duradoura do princípio ativo, maior segurança, aderência e eficácia, além de menor frequência de administração e efeito tóxico (Júnior et al., 2021).

Nesse âmbito, vale relatar que a presença da droga/produto na superfície da membrana se associa à sua liberação mais acelerada para o meio, fenômeno denominado de liberação rápida. Essa envolve uma disponibilização quase espontânea de uma parte da substância para o meio externo (Lima et al., 2021b). Quanto à fase de liberação mais lenta, essa se caracteriza pela localização do fármaco/produto no interior da membrana.

Em relação à interferência da porosidade sobre a incorporação e liberação dos fármacos/produtos retratadas nas publicações dessa revisão, ela foi perceptível no artigo de Almeida et al. (2020), o qual afirmou que uma maior liberação de ciprofloxacina ocorreu em membrana de LBN com maior densidade de poros.

Embora esse fenômeno tenha ocorrido em membrana de LBN submetida à microusinagem a laser de femtossegundo, esse aumento de porosidade e, conseqüentemente, maior liberação da droga/produto (de Barros et al., 2019) poderia resultar do acréscimo de água durante o processo de produção dessa membrana, inclusive com aumento da permeabilidade ao vapor a essa molécula. Especificamente, essa estratégia se faz necessária para a amenização das reações alérgicas e citotoxicidade desencadeadas pela membrana de LBN, obtida por métodos convencionais (Miranda et al., 2017).

No tocante à ausência de alterações estruturais e interação significativa entre os fármacos/produtos e a membrana, independentemente da técnica utilizada para a incorporação dessas drogas/produtos à ela, esses achados

ratificam o seu emprego como sistema de liberação de fármacos, propiciando a disponibilização desses para o meio, sem interferir na sua composição.

Particularmente, esse resultado é surpreendente se considerado que o LBN é constituído por isopreno, um composto muito reativo (Silva et al., 2016). Contudo essa inexistência de alteração estrutural e ligação considerável entre os fármacos/produtos e a membrana de LBN podem ser entendidas ao se observar que, além da presença de água, unidades de poli(cis-1,4-isopreno) e de poli(trans-1,4-isopreno) e de grupos terminais de cadeia α e ω , esse tipo de látex apresenta carboidratos, proteínas e lipídios (Cesar et al., 2020b; Guerra et al., 2021), sendo os dois últimos responsáveis pela estabilidade coloidal (Zapata-Gallego & Álvarez-Láinez, 2019).

Ainda, em termos organizacionais, embora controverso, admite-se que o LBN é formado por um núcleo hidrofóbico envolvido por uma camada mista, composta por 84% de proteínas e 16% de fosfolipídios (Guerra et al., 2021). Nessa estruturação, espera-se que atuem forças eletrostáticas repulsivas, forças repulsivas estéricas, forças de solvatação e forças atrativas de Van der Waals (Cattinari et al., 2021).

No tocante à ausência de atividade hemolítica quando da incorporação de drogas/produtos à membrana de LBN, esse dado ressalta a segurança do uso desse sistema, inclusive em seres humanos, especialmente se considerado que esse tipo de teste se relaciona diretamente à toxicidade de substâncias, incluindo drogas (Zohra & Fawzia, 2014). Notadamente, esse tipo de análise se baseia na similaridade da membrana do eritrócito com a membrana das demais células, além da facilidade de acesso a sangue e isolamento desse tipo celular (Zohra & Fawzia, 2014).

À semelhança da avaliação da atividade hemolítica, a inexistência de toxicidade frente à associação de fármacos/produtos à membrana reforça a segurança do processo, particularmente por ser um passo obrigatório na investigação de novas moléculas/drogas. Ainda, por meio desse tipo de análise, pode-se definir a abrangência da ação terapêutica (Zotsenko et al., 2021).

No que diz respeito à ação antibiótica apresentada pelos fármacos/produtos incorporados à membrana de LBN, esse dado sustenta o

fato de que os antimicrobianos associados à membrana são liberados para o meio e exercem o seu efeito, o que pode ser ampliado pelos componentes da *H. brasiliensis*, representados por proteínas, como heveína, quitinase, β -1,3-glucanase e glucosidase, e amônia (Floriano et al., 2014; Guerra et al., 2021).

No que concerne à propriedade angiogênica das drogas/produtos incorporados à membrana, essa atuação pode ser percebida se admitido que essa membrana é capaz de liberar uma substância semelhante ao Fator de Crescimento do Endotélio Vascular, induzindo a restituição de artérias e veias (Guerra et al., 2021).

Para a formação do tecido de granulação e síntese de colágeno relatados pelos artigos dessa revisão, pode-se justificar pela membrana de LBN estimular a produção de Fator de Crescimento de Transformação- β 1 (TGF- β 1) (Parisi; Leite; Rosa, 2021), citocina responsável pela migração celular e síntese de matriz extracelular no processo de reparo (Pinto, 2015), bem como pela proliferação de fibroblastos (Ayavoo et al., 2021).

Com respeito à maior porosidade, hidrofiliidade e molhabilidade exibida por própolis associado à membrana de LBN, esse resultado já tinha sido observado por Silva et al. (2014). O aumento da porosidade pode decorrer da presença de poros na membrana, já que o filme de própolis é liso e suave. Sobre a maior hidrofiliidade e molhabilidade, esses fenômenos podem resultar do fato de que o própolis é totalmente hidrofílico, diminuindo o ângulo de contato entre o líquido e a superfície (Silva et al., 2014).

Para o glicerol, utilizado com a membrana para favorecer a hidratação na região do mamilo (Barros et al., 2019), o alongamento propiciado pela sua incorporação à membrana de LBN pode estar relacionado à ação desse plastificante entre as cadeias dos polímeros, diminuindo as interações e aumentando a mobilidade (Gonçalves et al., 2019). Quanto à menor força tênsil, ela pode estar associada à concentração de glicerol empregada, o que pode ser corroborado com o observado por Antunes et al. (2019). De acordo com os autores, o filme biodegradável de quitosana incorporado com glicerol suportou uma maior tensão de ruptura quando em menor concentração de glicerol.

Como limitações dessa revisão, cita-se, como a mais relevante, a deficiência de publicações nacionais e internacionais capazes de embasar a discussão de determinados resultados aqui relatados, especialmente no que se refere à interação física, química e molecular entre os fármacos/produtos de liberação e a membrana do LBN, bem como os mecanismos envolvidos na não toxicidade dessa membrana e seus efeitos biológicos.

Conclusão

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que os artigos mostraram qualidade na publicação, concentrando-se em revistas voltadas aos biomateriais poliméricos e em tipos de estudos relevantes para o progresso científico.

Os trabalhos evidenciaram ainda a concentração em pesquisas abordando incorporação de fármacos/produtos de liberação à membrana de látex de borracha natural, dependente de propriedades inerentes à membrana e com diferentes efeitos, sem prejuízo para os diferentes tipos celulares estudados.

REFERÊNCIAS

- Aielo, P. B., Borges, F. A., Romeira, K. M., Miranda, M. C. R., Arruda, L. B. D., Paulo, P. N., Drago, B. D. C., & Herculano, R. D. (2014). Evaluation of sodium diclofenac release using natural rubber latex as carrier. *Materials Research, 17*, 146–152. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392014005000010>
- Almeida, G. F. B., Cardoso, M. R., Zancanela, D. C., Bernardes, L. L., Norberto, A. M. Q., Barros, N. R., Paulino, C. G., Chagas, A. L. D., Herculano, R. D., & Mendonça, C. R. (2020). Controlled drug delivery system by fs-laser micromachined biocompatible rubber latex membranes. *Applied Surface Science, 506*. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.144762>
- Amorim, G. L., Guillen, M. R. S., Vieira, P. C., Borges, E. L., & Barcelos, L. da S. (2021). CONTRIBUTIONS OF NURSES IN BASIC RESEARCH: DRESSING FIXATION MODEL FOR EXCISIONAL CUTANEOUS WOUNDS OF MICE. *ESTIMA, Brazilian Journal of Enterostomal Therapy*. https://doi.org/10.30886/estima.v19.1038_in

- Antunes, J. L. F., Barros, A. J. D. de, & Minayo, M. C. de S. (2019). Caminhos da internacionalização dos periódicos de saúde coletiva. *Saúde Em Debate*, 43(122), 875–882. <https://doi.org/10.1590/0103-1104201912217>
- Ayavoo, T., Murugesan, K., & Gnanasekaran, A. (2021). Roles and mechanisms of stem cell in wound healing. In *Stem Cell Investigation* (Vol. 8). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/sci-2020-027>
- Azevedo Borges, F., Cesar Bolognesi, L. F., Trecco, A., de Camargo Drago, B., Baldo de Arruda, L., Noronha Lisboa Filho, P., Gonçalves Pierri, E., de Oliveira Graeff, C. F., Gonzaga dos Santos, A., Romeiro Miranda, M. C., & Donizetti Herculano, R. (2014). Natural Rubber Latex: Study of a Novel Carrier for *Casearia sylvestris* Swartz Delivery. *ISRN Polymer Science*, 2014, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2014/241297>
- Bitencourt, L. S., & Alexandre Alves, L. (2021). Perfil de dispensação de antiinflamatórios não esteroidais em uma farmácia no interior da Bahia. *Research, Society and Development*, 10(16), e502101624119. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i16.24119>
- Borges, F. A., de Barros, N. R., Garms, B. C., Miranda, M. C. R., Gemeinder, J. L. P., Ribeiro-Paes, J. T., Silva, R. F., de Toledo, K. A., & Herculano, R. D. (2017). Application of natural rubber latex as scaffold for osteoblast to guided bone regeneration. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(39). <https://doi.org/10.1002/app.45321>
- Brasileira de Dermatologia Brasil Neffa Pinto, S., Marcy, J., Pizani, S., & Brasileira de Dermatologia, S. (2015). Surgical & Cosmetic Dermatology. *Surgical & Cosmetic Dermatology*, 7, 61–64. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=265538320015>
- Cattinari, G., Steenkeste, K., le Bris, C., Canette, A., Gallopin, M., Couty, M., & Fontaine-Aupart, M. P. (2021). Natural rubber-carbon black coagulation: Following the nanostructure evolution from a colloidal suspension to a composite. *Journal of Applied Polymer Science*, 138(8). <https://doi.org/10.1002/app.50221>
- Cesar, M. B., Borges, F. A., Bilck, A. P., Yamashita, F., Paulino, C. G., & Herculano, R. D. (2020a). Development and Characterization of Natural Rubber Latex and Polylactic Acid Membranes for Biomedical Application. *Journal of Polymers and the Environment*, 28(1), 220–230. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01596-8>
- Cesar, M. B., Borges, F. A., Bilck, A. P., Yamashita, F., Paulino, C. G., & Herculano, R. D. (2020b). Development and Characterization of Natural Rubber Latex and Polylactic Acid Membranes for Biomedical Application. *Journal of Polymers and the Environment*, 28(1), 220–230. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01596-8>

Cristina Sampaio, W., Alcântara Neres de Carvalho, L., & Lemos Brettas Carneiro, M. (2018). *AVANÇOS NO DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS VISANDO TRATAMENTO DE FERIDAS CRÔNICAS*. 25, 70–105.

da Silva, C. M., Souza, E. C. C. A., da Silva, L. L., Oliveira, R. L., Arbilla, G., & Corrêa, S. M. (2016). Avaliação da eficiência do método to-15 para determinação de compostos orgânicos voláteis em condições típicas de ambiente urbano. *Química Nova*, 39(10), 1245–1253. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20160142>

de Barros, N. R., dos Santos, R. S., Miranda, M. C. R., Bolognesi, L. F. C., Borges, F. A., Schiavon, J. V., Marques, R. F. C., Herculano, R. D., & Norberto, A. M. Q. (2019). Natural latex-glycerol dressing to reduce nipple pain and healing the skin in breastfeeding women. *Skin Research and Technology*, 25(4), 461–468. <https://doi.org/10.1111/srt.12674>

De, S., Rodrigues, S., Rosa, F., Fleury, M. R., Guimarães, A., Domínguez, D., Federico, C., Avila, D., Marques Da, A., & Ferreira, S. (n.d.). *A TECNOLOGIA RAPHA E SUA INCORPORAÇÃO NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE-SUS: INOVAÇÃO DE BAIXO CUSTO DENTRO DOS SERVIÇOS DE SAÚDE*.

Dias Murbach, H., Jaques Ogawa, G., Azevedo Borges, F., Romeiro Miranda, M. C., Lopes, R., Roberto De Barros, N., Guedes Mazalli, A. V., Gonçalves Da Silva, R., Ferreira Cinman, J. L., de Camargo Drago, B., & Donizetti Herculano, R. (2014). Ciprofloxacin release using natural rubber latex membranes as carrier. *International Journal of Biomaterials*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/157952>

Ferreira, M., Mendonça, R. J., Coutinho-Netto, J., & Mulato, M. (2009). Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of *Hevea brasiliensis*. *Brazilian Journal of Physics*, 39(3), 564–569. <https://doi.org/10.1590/s0103-97332009000500010>

Finch, J. (2011). The ancient origins of prosthetic medicine. In *The Lancet* (Vol. 377, Issue 9765, pp. 548–549). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60190-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60190-6)

Florian, J. F., da Mota, L. S. L. S., Furtado, E. L., Rossetto, V. J. V., & Graeff, C. F. O. (2014). Biocompatibility studies of natural rubber latex from different tree clones and collection methods. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(2), 461–470. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-5089-9>

Florian, J. F., de Barros, N. R., Cinman, J. L. F., da Silva, R. G., Loffredo, A. V., Borges, F. A., Norberto, A. M. Q., Chagas, A. L. D., Garms, B. C., de Oliveira Graeff, C. F., & Herculano, R. D. (2018). Ketoprofen Loaded in Natural Rubber Latex Transdermal Patch for Tendinitis Treatment. *Journal*

of Polymers and the Environment, 26(6), 2281–2289.

<https://doi.org/10.1007/s10924-017-1127-x>

Galindo, M. V., Paglione, I. dos S., Balan, G. C., Sakanaka, L. S., & Shirai, M. A. (2019). Atividade antimicrobiana e antioxidante de filmes comestíveis de gelatina e quitosana adicionados de óleos essenciais. *Segurança Alimentar e Nutricional*, 26, e019008.

<https://doi.org/10.20396/san.v26i0.8653865>

Gemeinder, J. L. P., Barros, N. R. de, Pegorin, G. S., Singulani, J. de L., Borges, F. A., Arco, M. C. G. del, Giannini, M. J. S. M., Almeida, A. M. F., Salvador, S. L. de S., & Herculano, R. D. (2021). Gentamicin encapsulated within a biopolymer for the treatment of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* infected skin ulcers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 32(1), 93–111.

<https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1817667>

Gonçalves, S. S., Antunes, L. B., Araujo Silveira, M. F., Marques de Souza, A. R., & Carvalho, D. de M. (2019). EFEITO DO GLICEROL NAS PROPRIEDADES MECÂNICAS DE FILMES A BASE DE QUITOSANA. *DESAFIOS - Revista Interdisciplinar Da Universidade Federal Do Tocantins*, 6(Especial), 110–117.

<https://doi.org/10.20873/uft.2359365220196especialp110>

Guerra, N. B., Sant'Ana Pegorin, G., Boratto, M. H., de Barros, N. R., de Oliveira Graeff, C. F., & Herculano, R. D. (2021). Biomedical applications of natural rubber latex from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. In *Materials Science and Engineering C* (Vol. 126). Elsevier Ltd.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112126>

INTERDISCIPLINARIDADE NO CONTEXTO DAS DOENÇAS DOS PÉS NO DIABETES: TRATAMENTOS CLÍNICOS, POLÍTICAS PÚBLICAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE. (n.d.).

Júnior, J. R. de S., Araújo, J. F. A., Pinto, I. F., & Junior, T. N. (2021). Desenvolvimento de micropartículas de goma do cajueiro pela técnica de reticulação polimérica interfacial / Development of cashew gum microparticles by the interfacial polymeric harness technique. *Brazilian Journal of Health Review*, 4(1), 399–410. <https://doi.org/10.34119/bjhrv4n1-032>

Krupp, T., dos Santos, B. D., Gama, L. A., Silva, J. R., Arrais-Silva, W. W., de Souza, N. C., Américo, M. F., & de Souza Souto, P. C. (2019a). NATURAL RUBBER - PROPOLIS MEMBRANE IMPROVES WOUND HEALING IN SECOND-DEGREE BURNING MODEL. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 980–988.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.147>

Krupp, T., dos Santos, B. D., Gama, L. A., Silva, J. R., Arrais-Silva, W. W., de Souza, N. C., Américo, M. F., & de Souza Souto, P. C. (2019b).

NATURAL RUBBER - PROPOLIS MEMBRANE IMPROVES WOUND HEALING IN SECOND-DEGREE BURNING MODEL. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 980–988.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.147>

Lima, A. de F., Pegorin, G. S., Miranda, M. C. R., Cachaneski-Lopes, J. P., Silva, W. de M., Borges, F. A., Guerra, N. B., Herculano, R. D., & Batagin-Neto, A. (2021a). Ibuprofen-loaded biocompatible latex membrane for drug release: Characterization and molecular modeling. *Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials*, 19.

<https://doi.org/10.1177/22808000211005383>

Lima, A. de F., Pegorin, G. S., Miranda, M. C. R., Cachaneski-Lopes, J. P., Silva, W. de M., Borges, F. A., Guerra, N. B., Herculano, R. D., & Batagin-Neto, A. (2021b). Ibuprofen-loaded biocompatible latex membrane for drug release: Characterization and molecular modeling. *Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials*, 19.

<https://doi.org/10.1177/22808000211005383>

Mapari, S., Mestry, S., & Mhaske, S. T. (2021). Developments in pressure-sensitive adhesives: a review. In *Polymer Bulletin* (Vol. 78, Issue 7, pp. 4075–4108). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH.

<https://doi.org/10.1007/s00289-020-03305-1>

Mesquita, S. de M., Freitas, Z. M. F. de, & Monteiro, M. S. de S. B. (2021). Avaliação de géis transdérmicos na veiculação da terapia da reposição hormonal. *Research, Society and Development*, 10(16), e428101623891.

<https://doi.org/10.33448/rsd-v10i16.23891>

Miranda, M. C. R., Borges, F. A., Barros, N. R., Santos Filho, N. A., Mendonça, R. J., Herculano, R. D., & Cilli, E. M. (2018). Evaluation of peptides release using a natural rubber latex biomembrane as a carrier. *Amino Acids*, 50(5), 503–511. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2534-y>

Miranda, M. C. R., Prezotti, F. G., Borges, F. A., Barros, N. R., Cury, B. S. F., Herculano, R. D., & Cilli, E. M. (2017). Porosity effects of natural latex (*Hevea brasiliensis*) on release of compounds for biomedical applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 28(18), 2117–2130.

<https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1377024>

Moopayuk, W., & Tangboriboon, N. (2018). Drug delivery of adding mangosteen seed oil into natural rubber latex patch. *Key Engineering Materials*, 777 KEM, 612–616.

<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.777.612>

Morais, F. B., Arantes, T. E. F. e, Melo, G. B., & Muccioli, C. (2019). Levels of Evidence: What Should Ophthalmologists Know? *Revista Brasileira de Oftalmologia*, 78(6), 413–417. <https://doi.org/10.5935/0034-7280.20190173>

- Moutinho, L., Cesarino, P. de N., & Novaes, S. C. (2020). Scientific production in times of coronavirus. In *Revista de Antropologia* (Vol. 63, Issue 1, pp. 7–11). Universidade de Sao Paulo.
<https://doi.org/10.11606/2179-0892.ra.2020.169306>
- Nasruddin, & Susanto, T. (2018). The Effect of Natural Based Oil as Plasticizer towards Physics-Mechanical Properties of NR-SBR Blending for Solid Tyres. *Journal of Physics: Conference Series*, 1095(1).
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/1095/1/012027>
- Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., Shamseer, L., Tetzlaff, J. M., Akl, E. A., Brennan, S. E., Chou, R., Glanville, J., Grimshaw, J. M., Hróbjartsson, A., Lalu, M. M., Li, T., Loder, E. W., Mayo-Wilson, E., McDonald, S., ... Moher, D. (2021). The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. In *The BMJ* (Vol. 372). BMJ Publishing Group.
<https://doi.org/10.1136/bmj.n71>
- Petrović, Z. S., Ionescu, M., Milić, J., & Halladay, J. R. (2013). Soybean oil plasticizers as replacement of petroleum oil in rubber. *Rubber Chemistry and Technology*, 86(2), 233–249. <https://doi.org/10.5254/rct.13.87992>
- Prodóssimo, V. (n.d.). *SCIENTIA NATURALIS Polymer of industrial interest: a study on rubber ABSTRACT*.
<http://revistas.ufac.br/revista/index.php/SciNat>
- Raia, R. Z., Iwakiri, S., Trianoski, R., Andrade, A. S. de, & Bonfatti Junior, E. A. (2018). Influência da extração de látex nas propriedades físicas e químicas da madeira de Hevea brasiliensis. *Revista Ciência Da Madeira - RCM*, 9(3), 152–159. <https://doi.org/10.12953/2177-6830/rcm.v9n3p152-159>
- Ribeiro Teixeira, A., Flávia Costa Figueiredo, A., & Ferreira França, R. (n.d.). *RESISTÊNCIA BACTERIANA RELACIONADA AO USO INDISCRIMINADO DE ANTIBIÓTICOS*.
- Rojczyk, E., Klama-Baryła, A., Łabuś, W., Wilemska-Kucharzewska, K., & Kucharzewski, M. (2020). Historical and modern research on propolis and its application in wound healing and other fields of medicine and contributions by Polish studies. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 262). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113159>
- Suteewong, T., Wongpreecha, J., Polpanich, D., Jangpatarapongsa, K., Kaewsaneha, C., & Tangboriboonrat, P. (2019). PMMA particles coated with chitosan-silver nanoparticles as a dual antibacterial modifier for natural rubber latex films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 174, 544–552. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.037>
- Tsai, M.-T., Lee, I.-C., Lee, Z.-F., Liu, H.-L., Wang, C.-C., Choia, Y.-C., Chou, H.-Y., & Lee, J.-D. (2016). In vivo investigation of temporal effects

and drug delivery induced by transdermal microneedles with optical coherence tomography. *Biomedical Optics Express*, 7(5), 1865. <https://doi.org/10.1364/boe.7.001865>

Zapata-Gallego, N. T., & Álvarez-Láinez, M. L. (2019). Effect of the Phenological Stage in the Natural Rubber Latex Properties. *Journal of Polymers and the Environment*, 27(2), 364–371. <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1337-x>

Zohra, M., & Fawzia, A. (n.d.). *Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria*.

Zotsenko, L., Kyslychenko, V., Kalko, K., & Drogovoz, S. (n.d.). THE STUDY OF PHENOLIC COMPOSITION AND ACUTE TOXICITY, ANTI-INFLAMMATORY AND ANALGESIC EFFECTS OF DRY EXTRACTS OF SOME ELSHOLTZIA GENUS (LAMIACEAE) SPECIES. *Archives • 2021 •*, 2, 637–649. <http://pharmacologyonline.silae.it>

4.2 Capítulo 2: Artigo 2 – Experimental

Effect of natural rubber hybrid systems of hevea brasiliensis on osteoblast proliferation and activity

Luciana Mascena da Silva¹, Rodney Marcelo do Nascimento²;Naiara Cipriano Oliveira³, Ana Caroline Rocha de Melo Leite⁴, Mirna Marques Bezerra¹, Renata Ferreira de Carvalho Leitão¹, Amauri Jardim de Paula⁵, Francisco Airton Castro da Rocha⁶, Virgínia Cláudia Carneiro Girão-Carmona¹.

¹Department of Morphology, Medical School, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

²Federal Institute of Santa Catarina IFSC, 88040-900 Florianópolis-SC, Brazil and DvDt Startec: Research, Development and Training, 3690-000, Descalvado-SP, Brazil

³School of Medicine, Federal University of Ceará, Sobral, Ceará, Brazil

⁴University of International Integration of Afro-Brazilian Lusophony, Redenção, Ceará, Brazil

⁵Solid-Biological Interface Group (SolBIN), Department of Physics, Federal University of Ceará, P.O. Box 6030, 60455-900, Fortaleza, CE, Brazil

⁶School of Medicine, Federal University of Ceará, Postgraduate Program in Medical Sciences, Fortaleza, Ceará, Brazil

ABSTRACT

Natural rubber (NR) hybrid systems obtained from the latex of *Hevea brasiliensis* are the current target of many researchers due to their new and superior properties. To take advantage of these materials in the medical field, experiments to evaluate the cellular response are necessary. This manuscript presents a complete *in vitro* analysis of the biocompatible properties of two distinct hybrid systems developed from the association between NR and calcium phosphate (CaP) and silica particles (SiPs). We have produced NR films using two different organic solvents, chloroform (CHF) or toluene (TOL), and incorporated CaP or SiPs to investigate their effects on morphology, activity (alkaline phosphatase activity – ALP), and viability (MTT) of murine osteoblasts. The NR-Hybrids presented different heterogeneous and homogeneous distributions throughout the polymeric matrix dependent on the nature of the particles, which translates to affect surface wettability. Cell proliferation was increased at 48 and 72h with similar results observed after the addition of CaP. The cell morphologies are also affected by the hybridization process indicating the effects of both, solvent and particle nature. On the other hand, ALP activity was higher when NR was dissolved in CHF and enhanced after CaP or SiPs incorporation. The surface modification of NR films, dissolved in CHF or TOL, with the addition of CaP or SiPs, provided a different level of biocompatibility depending on the solvent, and charge. The effects on osteoblastic differentiation are correlated with preserved cell viability. Taken together, our data show that these novel NR hybrid systems may represent a very promising biological tool with desirable properties supporting bone augmentation.

Keywords: *Hevea brasiliensis*, natural rubber hybrid systems, calcium phosphate, silica, osteoblast, cell response

1. Introduction

Many polymers of synthetic or biological origin, such as polylactic acid (1), polycarbonate (2), polyamides (3), and polypropylene, have been investigated for applications as biomaterials. Natural Rubber (NR) extracted from *Hevea brasiliensis*, a polymer comprising colloidal particles stabilized by negatively charged proteins and lipids in a serum fraction (5), has gained prominence in several studies for biomedical applications. It has been proven to induce tissue repair, increasing vasculogenesis and influencing osteogenesis. It can be applied to dermal wounds, helping with healing, and used as occlusive membranes and devices to release bioactive compounds (6). Experimental studies on postharvest natural latex have been carried out to evaluate the natural characteristics (7). However, hybrid NR systems (e.g., combining the natural polymer with other materials, such as ceramic and metals) require further studies correlating the new physicochemical characteristics associated with cellular responses.

From a material science point of view, a key aspect of the production of NR hybrid materials aimed at medical applications is the control the possible changes in surface properties, such as surface wettability (8), after combination with other materials (9). NR exhibits a hydrophobic regime with a contact angle close to 90° and the incorporation of the new components can modify this parameter and, consequently, the cell viability due to changes to the inner and surface structures (10). Under bone tissue engineering point of view, the new NR hybrid systems need to be compatible with osteoblastic cells. Results obtained from *in vitro* experiments show osteogenic differentiation and cytocompatibility in NR-hydroxyapatite nanoparticles (11). On the other hand, it has been reported that NR can form apatite (the mineral phase of bone) and improve bone regeneration (12). An important question concerns the relation between morphological cell evolution on new NR compounds associated with composites like calcium phosphate particles (CaP) and the processing parameters, such as surface charge and surface energy. The need to establish a correlation between biological and physicochemical aspects of the NR hybrid,

such as CaP particles, taking into account the role of different parameters, such as time, type of solvents and cell viability is evident.

Another explored aspect in hybrid NR systems, which we wanted to elucidate, relates to the cell response to an NR polymeric matrix incorporated with silica particles (SiPs). Some authors suggested that silica gel nanoparticles stimulate the expression of Insulin-like growth factor 2 (IGF-2), a well-known factor that promotes osteogenic cell differentiation, which increases alkaline phosphatase (ALP) and osteoblast activities (14). Furthermore, osteogenic effects of silica were observed by inducing gene expression of bone markers such as bone morphogenetic protein (BMP)-2 (15). The effects of the SiPs, with different surface charges, combined with NR on osteoblastic cells remain unknown and is also a goal of our study. Herein, we show the potential applications of new hybrid NR systems incorporated with CaP and SiPs by associating the physicochemical characteristics and their effect on cell proliferation, cell activity, and osteoblastic cell viability.

2. Experimental

2.1 Materials

Calcium nitrate tetrahydrate ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 99%), ortho-phosphoric acid (H_3PO_4 , ≥ 85 wt.% in H_2O), ethylene glycol ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, 99.8%), methyl alcohol (CH_3OH , 99.5%), ammonium hydroxide (NH_4OH , 28–30%) and chloroform (CHCl_3 , 99%) acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) were used for the production of the bioactive ceramic powders based on CaP. Tetraethyl orthosilicate (TEOS, 98%), (3-aminopropyl) trimethoxysilane (APTMS, 97%), and fluorescein isothiocyanate (FITC, 97.5%) from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), ammonia solution (NH_4OH , 28–30%) from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil), absolute ethanol (EtOH , 99.5%) from Dinâmica (Indaiatuba, SP, Brazil), and ultra-pure from a Milli-Q® Direct Water Purification System (EMD Millipore, Burlington, MA, USA) were used for the production of the SiPs. NR latex was collected from *Hevea brasiliensis* trees (clone RRIM 600) located at Estância Regina farm, São Paulo State, Brazil (20°33'21.03"S 48°61'13.49"W). NR sample was collected from *Hevea brasiliensis* (clone RRIM 600) trees at the Estância Regina farm, São Paulo-Brazil, being immediately

transferred to propylene tubes containing 0.9% m/m ammonia and stored under refrigeration at 4 °C to avoid microbial contamination.

2.2 Preparation of the NR suspensions

An aliquot of 1.5 mL of the latex were added to 2 mL microcentrifuge tubes and centrifuged for 90 min at 24 °C in an Eppendorf 5418 R centrifuge for a separation of the NR cream phase. For each sample produced was employed a centrifugation speed of 14000g. After centrifugation, the cream phase was collected with a spatula and submitted to drying in an oven at 45 °C for 24 h. Then, the NR was dissolved in chloroform and toluene, for both organic solvents the concentration used was also 10 mg/mL. Subsequently, a volume of 100 µL of the NR suspensions produced from chloroform (CHF) and toluene (TOL) was carefully dropped on glass coverslips and dried at room temperature. The experimental protocol described here for the preparation of the NR suspensions used in the production NR-CaP and NR-SiPs hybrid films have already been established by our group in previous publications (1).

2.3 Production of NR-CaP hybrid films

The CaP was synthesized using the sol-gel method with calcium nitrate tetrahydrate and orthophosphoric acid as precursors in the proportion of 80:20 wt.% (Nascimento, 2014). For this, the precursors have dissolved in 15 mL of methyl alcohol: ethylene glycol solution (2:1 ratio). The mixture was maintained under magnetic stirring in ambient conditions for 1 h to produce the sol solution.

To produce the CaP powders, the obtained product was submitted to aging, drying, and annealing processes. First, it was maintained for 24 h at 50 °C under constant magnetic stirring, resulting in an opaque and viscose gel. The gel was dried for one h at 100 °C, then ground to powder with a mortar and pestle. The resultant powder was annealed for 1 h at 700 °C and stored under ambient conditions. The experimental protocol described here for the production of the CaP powders used in the NR-CaP hybrid films have already been established by our group in previous publications (2). Bioactive ceramic powders based on CaP containing Ca_5P_8 (47.8% by weight), $\text{Ca}(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (9.5% by weight), CaCO_3 (36.3% by weight), and Ca (6.3% by weight by

weight) were mixed with the NR suspensions produced from chloroform and toluene under magnetic suspension for 30 min. Then, a volume of 100 μL of the NR-CaP suspensions in chloroform (CHF-CaP) and toluene (TOL-CaP) was carefully dropped on glass coverslips and dried at room temperature. The final concentration of CaP in the NR-CaP hybrid films (CHF-CaP and TOL-CaP samples) was 0.2 mg/mL.

2.4 Production of NR-Si and NR-ASi hybrid films

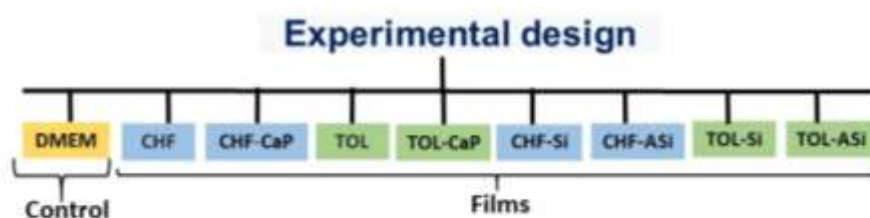
Spherical fluorescent SiPs were synthesized using a modified Stöber method (3). To produce the negatively charged SiPs (Si), first was dissolved 3.0 mg of FITC in 3 mL of absolute ethanol and then adding 3.2 μL of APTMS. This mixture was gently homogenized and allowed to react in the dark for 1h at room temperature. After, 1.5 mL of absolute ethanol, 800 μL of TEOS, and 6.3 mL of NH_4OH were added to the same container, in this order, respectively. The reaction was maintained under stirring at 60 ± 4 $^\circ\text{C}$ for 2 h. Lastly, the suspension was centrifuged at 48,200g and 4 $^\circ\text{C}$ for 30 min to remove the excess of reagents. The obtained supernatant was discarded, and the Si were suspended in absolute ethanol with an ultrasonic bath (Cole-Parmer, IL, USA). Cycles of centrifugation/resuspension were repeated three times. The concentration of Si was determined thermogravimetrically.

SiPs were amino-functionalized using a post-grafting method (Ho et al., 2013). To produce the positively charged SiPs (ASi), first, a mixture containing 28 μL of APTMS, 63 μL of NH_4OH , and 100 μL of ultrapure water was slowly added to 12 mL of SiPs suspension (20 mg/mL) under vigorous stirring. The resultant solution was stirred and refluxed at 75 ± 4 $^\circ\text{C}$ for 3 h to covalently bind APTMS to the SiPs surface. The suspension was centrifuged at 48,200g and 4 $^\circ\text{C}$ for 30 min to remove the excess of reagents. The obtained supernatant was discarded, and the ASi were suspended in absolute ethanol with an ultrasonic bath (Cole-Parmer, IL, USA). Cycles of centrifugation/resuspension were repeated three times. The concentration ASi was determined thermogravimetrically.

To avoid aggregation of the SiPs, they were first sonicated and then mixed with the NR suspended in either chloroform or toluene. Thereafter, a volume of 100 μL of the NR-SiPs suspensions was carefully dropped on glass coverslips and dried at room temperature. The final concentration of SiPs in the NR-SiPs hybrid films (CHF-Si, CHF-ASi, TOL-Si, and TOL-ASi samples) was 0.1 mg/mL.

2.5 Experimental design

A total of 180 wells containing DMEM and osteoblasts or NR associated with other substances, being DMEM; CHF; CHF-CaP; TOL; TOL-CaP; CHF-Si; CHF-ASi; TOL-Si and TOL-ASi; were evaluated, with n5 in each group, selected in the periods of 48 hours (n=60) and 72 hours (n=60). This amount was for each analysis, viability, and cellular activity. Viable osteoblasts were observed in culture medium (DMEM group) and in culture medium with NR hybrid films produced from chloroform (CHF, CHF-CaP, CHF-Si, and CHF-ASi) and toluene (TOL, TOL-CaP, TOL-Si, and TOL-ASi). The supplementary image summarizes the experimental design of the analyzed groups in this work.



Description of the Groups:

1. Control group: DMEM
2. Natural rubber film produced from Chloroform 10mg/ml: CHF
3. Natural rubber film produced from Chloroform with CaP in the ratio of NR:CaP of 5:1: CHF-CaP
4. Natural rubber film produced from Toluene 10mg/ml: TOL
5. Natural rubber film produced from Toluene with CaP in the ratio of NR:CaP of 5:1 : TOL-CaP
6. Natural rubber film produced from Chloroform 10mg/ml with Silica Negative 0,1 mg/mL: CHF-Si
7. Natural rubber film produced from Chloroform 10mg/ml with Silica Positive 0,1 mg/mL: CHF-ASi
8. Natural rubber film produced from Toluene 10mg/ml with Silica Negative 0,1 mg/mL: TOL-Si
9. Natural rubber film produced from Toluene 10mg/ml with Silica Positive 0,1 mg/mL: TOL-ASi

2.6. Culture of murine osteoblasts (OFCOL II)

Murine osteoblasts (OFCOL II) acquired from the cell bank of the Federal University of Rio de Janeiro (BCRJ) were used, maintained in Dulbecco's medium modified by Eagle (DMEM) containing 10% fetal bovine serum in the

presence of antibiotics (100 U/ ml of Penicillin and 100 µg/ml of Streptomycin) and antifungal (100U/ml of Amphotericin B), at 37°C in a humidified oven, incubated in an atmosphere of 5% CO₂. In this study, cells were used between passages 18-20. From the stock, a 25 cm³ culture bottle was prepared, containing 1 ml of cells, adding 4 ml of DMEM culture medium, enriched with 10% FCS. The cells were kept in an oven with automatic temperature control at 37°C and CO₂ pressure.

Cell growth was followed by observation under an inverted microscope (Nikon Eclipse TS100). These cells were subcultured after trypsinization when a confluent monolayer was formed. After a period of 3 minutes with 2 ml of 0.05% trypsin, the cells were removed by adding 6 ml of DMEM culture medium supplemented with 10% FBS. To release the cells from the bottle wall, a strong jet was used with the aid of an automatic pipettor. Then the cells were transferred to a 15 ml falcon, centrifuged (SOLAB SL-701) at 2000 rpm, 4°C for 5 minutes.

After this period, the supernatant was removed, and the cells resuspended with the addition of 4 ml of complete medium. From this volume, aliquots of at least 1 ml were removed and transferred to new bottles. Medium changes were performed every 48 hours.

2.7 Microscopic characterization of the NR hybrid films

We evaluated the spatial distribution of the CaP and SiPs in the NR-based hybrid films using a confocal laser scanning microscope (CLSM; Zeiss LSM 710, Munich, Germany). The samples were imaged using a 100× Zeiss EC Plan-Neofluor objective lens (NA = 1.3, working distance = 0.20 mm, oil immersion). A 405 nm laser was utilized to map the NR and NR-CaP components and a 488 nm laser to excite the FITC encapsulated within the core of the SiPs.

2.8 Surface characterization by contact angle measurements

Static droplet contact angle measurements (volume ~2 µL) were performed using a standard sessile droplet method on a Ramé-Hart 250-F1

tensiometer/goniometer. For each experiment, a drop of water was gently deposited on each surface enclosed in a glass chamber. A homogeneous white light system was positioned behind the sample to make the drop appear black. Side view images of the droplets were recorded with a CCD camera for subsequent characterization of surface wetting regimes as indicative of the hydrophobic-hydrophilic properties of the modified NR hybrid films. The sample's ambient temperature was adjusted to $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and the relative humidity was adjusted to $48 \pm 6\%$ at the beginning of the experiments. Surface energy (because of chemical components) and its subsequent cellular effects were calculated based on contact angle values obtained using liquids with different polarities. The theory behind this approach is based on the concept of short-range and long-range intermolecular interactions, called polar and dispersive interactions, respectively. At least five measurements were made in different areas of each sample using water ($\gamma_s^p = 51 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, $\gamma_s^d = 21.8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ and $\gamma_s = 72.8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) and diiodomethane ($\gamma_s^p = 0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, $\gamma_s^d = 50.8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ and $\gamma_s(\text{CHF}) = 50.8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$), where γ_s denotes the surface tension of the liquid and γ_s^p and γ_s^d are the polar and dispersive components of respectively. The surface energy (or surface tension) of the γ_s substrates was calculated using an approach based on polar dispersive components γ_s^d and γ_s^p of the free energy of the polar-non-polar liquid [40,41], as described by the relationships:

$$(1 + \cos\theta)\gamma_l = 2\sqrt{\gamma_l^d\gamma_s^d} + 2\sqrt{\gamma_l^p\gamma_s^p} \quad (1)$$

$$\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p \quad (2)$$

The theory behind this approach is based on the concept of short-range and long-range physicochemical interactions, called polar and dispersive interactions, respectively. On the one hand, the molecular interactions of charge fluctuation are the changes in long-range forces and, on the other hand, the short polar interactions. Estimating the substrate's γ_s^d and γ_s^p values require solving a two-equation system formed by observing two opposite extreme experimental scenarios for equations (1). In one scenario, diiodomethane is used as a fully non-polar liquid, in the other, deionized water is used as the polar liquid. Both scenarios are used on the same surfaces and under other

identical experimental conditions. Once estimated, the surface energy γ_s of each surface were obtained by equation (2) and are presented with their associated surface components.

2.9 Cell morphology

Osteoblasts were observed under an inverted optical microscope, CKX41SF Olympus, after 48 and 72 hours of cell culture. Pictures were taken at 400x magnification from DMEM; CHF; CHF-CaP; TOL; TOL-CaP; CHF-Si and CHF-ASi; TOL-Si and TOL-ASi groups. A descriptive analysis was performed by two independent pathologists (VCCG, ACRML) blinded to group allocation.

2.10 Cell viability

Cytotoxicity testing aims to assess the lethal or sublethal effects of a substance or product at the cellular level. For this work, the cytotoxicity test by the direct method with MTT was used. This test quantitatively assesses mitochondrial function by reducing tetrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide; Sigma) in formazan crystals. This reduction reaction occurs within the mitochondria through the enzyme succinate-dehydrogenase; therefore, the amount of formazan crystals is directly related to the reduction potential of tetrazolium MTT in mitochondria. To carry out the tests, OFCOLL II cells were used in 96-well plates containing NR hybrid films and cells in an amount of 100 μ l of culture medium with 3,000 cells per well for periods of 48 and 72 hours. After these periods, the middle of all wells was removed, keeping the latex in them. Then, 100 μ l was added per well of MTT diluted with the complete culture medium at a concentration of 1 mg/ml. MTT was incubated for 3 hours at a temperature of 37°C and 5% CO₂. After this period, 100 μ l of the supernatant was extracted and transferred to a 96-well plate and 100 μ l DMSO was added to each well under agitation for 30 seconds to solubilize the formazan crystals. Absorbance readings were performed in a spectrophotometer (Biotek) at a wavelength of 590nm (5).

2.11 Cell activity

Alkaline phosphatase is an enzyme found in many tissues in the body, with higher concentrations in the liver and bones. In bones, it is produced by osteoblasts, cells involved in the formation of new bone tissue, which continually rebuilds the structure of bones. Therefore, the measurement of bone alkaline phosphatase was performed to assess the activity of osteoblasts. For analysis of this parameter, samples of the medium supernatants from all wells were collected from the 24-well culture plates after periods of 48, 72 cell exposure to latex samples. After collection, the samples were used for the measurement of Bone Alkaline Phosphatase (FAO), using a specific "Kit", whose methodology follows the manufacturer's laboratory guidelines (LABTEST®). The method is based on the lability of the alkaline phosphatase bone isoform against heat. 100 µL aliquots of the sample were incubated in a water bath at 56 °C for 10 minutes and immediately transferred to an ice bath. The non-bone alkaline phosphatase activity (thermostable) will be determined directly in the spectrophotometer at a temperature of 30 °C with absorbance reading at 405 nm, having p-nitrophenylphosphate as substrate. The bone fraction, in turn, will be indirectly determined by subtracting the activity obtained from thermostable alkaline phosphatase from the total alkaline phosphatase (6).

2.12 Statistical Analysis

Data were analyzed using PRISMA, using ANOVA variance analysis and Turkey's post-test. The PCA was performed by Past 3.2 software. Data were presented as mean and standard deviation of the mean and $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Effects of the CaP incorporation on surface wettability and cell response

Firstly, we have characterized the effects of the calcium phosphate particles on the wettability and surface free energy. **Figure 2 (a)** displays the result of the confocal imaging of the NR-CaP hybrid films excited using 405. The CaP presented a heterogeneous spatial distribution throughout the NR matrix, with few individualized particles, thus forming micro-clusters (agglomerated) in the films. **Figure 2 (b)** shows the contact angle values and surface free energy of NR samples produced with both CHF and TOL solvents, CHF-CaP and TOL-CaP. The results show two findings concerning the surface properties: (1) the solvent affects surface wettability (contact angle values decrease from CHF to TOL) and (2) the surface wettability is independent of the CaP incorporation, that is, contact angle values and surface energy do not exhibit significant differences. Since modifications on wetting regimes of biomaterials influence cell behavior, we evaluated how the hybridization process of the NR affects cell viability.

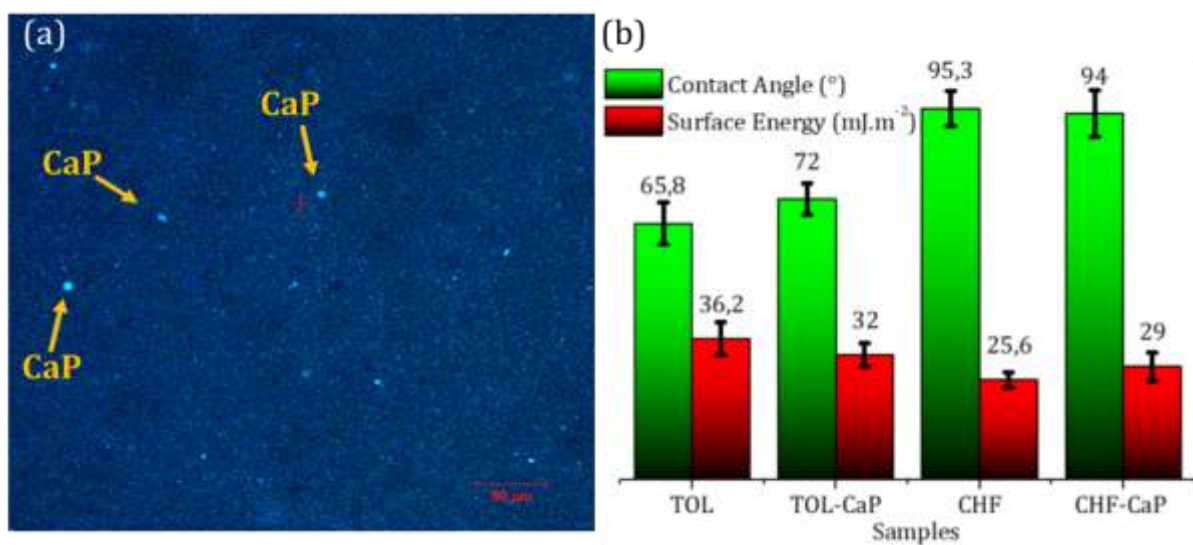
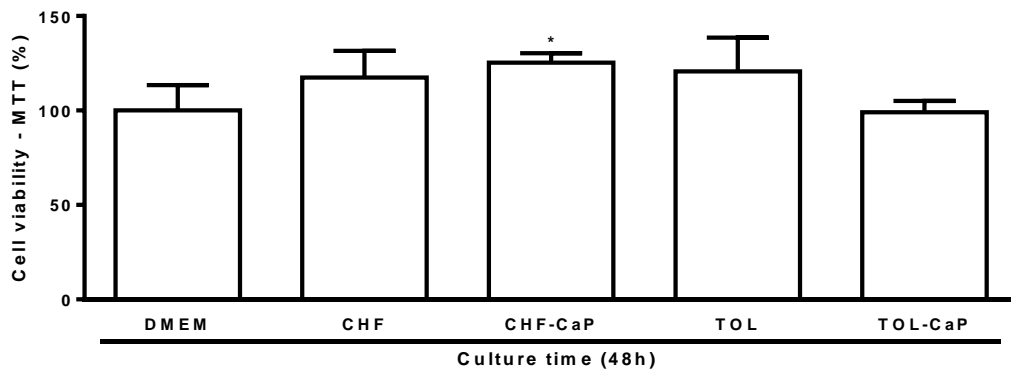


Figure 1. Physicochemical characteristic of the NR-CaP hybrid films: Confocal luminescence micrographs of the NR-CaP hybrid film (a). The NR-CaP autofluorescence was excited using 405 nm laser. Comparison of the Contact angle and surface energy values before and after hybridization processes by CaP using TOL and CHF solvents (b).

Figure 3 (a) shows the effects of Natural Rubber films from *Hevea brasiliensis* on cell response. The results of the cell viability *in vitro* culture of murine osteoblasts at 48h show that the addition of CaP does not affect the

biocompatibility of NR, that is, non-toxicity effects were observed. The NR films prepared with CHF solvent added with CaP increased ($P < 0.05$) cell viability when compared to DMEM and the NR films prepared with TOL. **Figure 3 (b)** shows the ALP activity of murine osteoblasts cells on the Natural Rubber (NR) films from *Hevea brasiliensis* dissolved in two different solvents (Chloroform – CHF or Toluene - TOL) over the cell culture period. At 48h, the cells in CHF and CHF-CaP groups presented a higher ($P < 0.05$) percentage of ALP activity than DMEM. The CHF group also showed a higher ($P < 0.05$) percentage of ALP activity when compared to the TOL and TOL-CaP groups **Figure 3 (b)**. The CHF-CaP group presented a higher ($P < 0.05$) percentage of ALP activity than the TOL and TOL-CaP groups.)

A



B

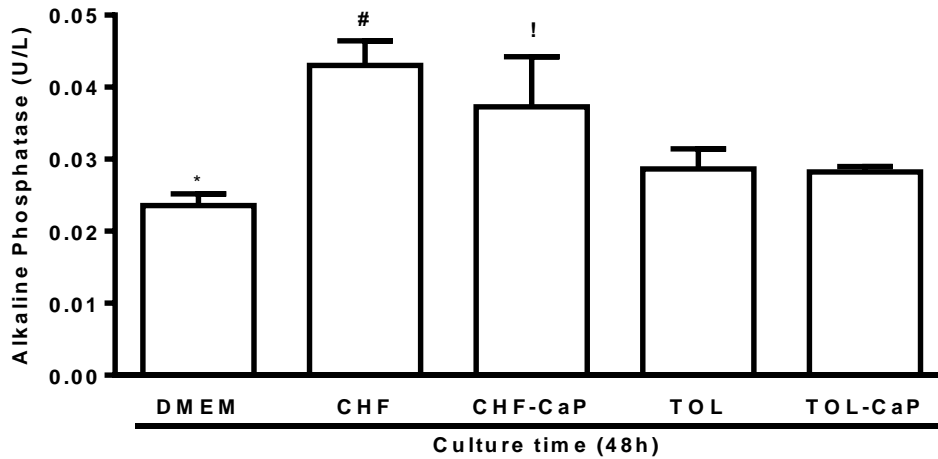


Figure 2. Effects of natural rubber films from *Hevea brasiliensis* dissolved in chloroform or toluene and filled with calcium phosphate in the cell viability **(A)** and activity of alkaline phosphatase **(B)** *in vitro* culture of murine osteoblasts at 48 hours. The groups: DMEM, CHF, CHF-CaP, TOL and TOL-CaP. * $P < 0.05$ CHF-CaP versus DMEM and TOL-CaP **(A)**. The groups: DMEM, CHF, CHF-CaP, TOL and TOL-CaP, * $P < 0.05$ DMEM versus CHF and CHF-CaP. # $P < 0.05$ CHF versus TOL and TOL-CaP. ! $P < 0.05$ CHF-CaP versus TOL and TOL-CaP **(B)**.

3.2. Effects of the positive and negative Si incorporation on Surface Wettability and cell response

Figure 4 (a) A displays the result of the confocal imaging of the NR-SiPs hybrid films excited using a 488 nm laser, respectively. The results show different spatial distributions depending on the charge of particles used for incorporating the natural polymer. In CHF-Si and TOL-Si, the negatively charged SiPs are heterogeneously distributed, with few agglomerates **Figure 4(c and e)**. While in CHF-ASi and TOL-ASi, the positively charged SiPs are homogeneously distributed. **Figure 4 (b)** shows the contact angle values and surface free energy of NR samples produced with both CHF and TOL solvents and Hybrid NR-Si samples with positive and negative Si particles. The incorporation of the positive Si particles increases the NR surface-hydrophilicity compared to NR control as indicated by contact angle reduction from $\theta \approx 94^\circ$ to $\theta \approx 68^\circ$. According to the dispersive energy component, the charge fluctuations, resulting from

intermolecular forces over long distances, were less intense than the permanent dipole moments (characterized by the polar components) after Si incorporation. In addition, with a reduction in contact angle, an increase in the polar component is observed, indicating that the surface becomes more hydrophilic. On the other hand, the dispersive component remains stable for TOL samples independent of the Si incorporation.

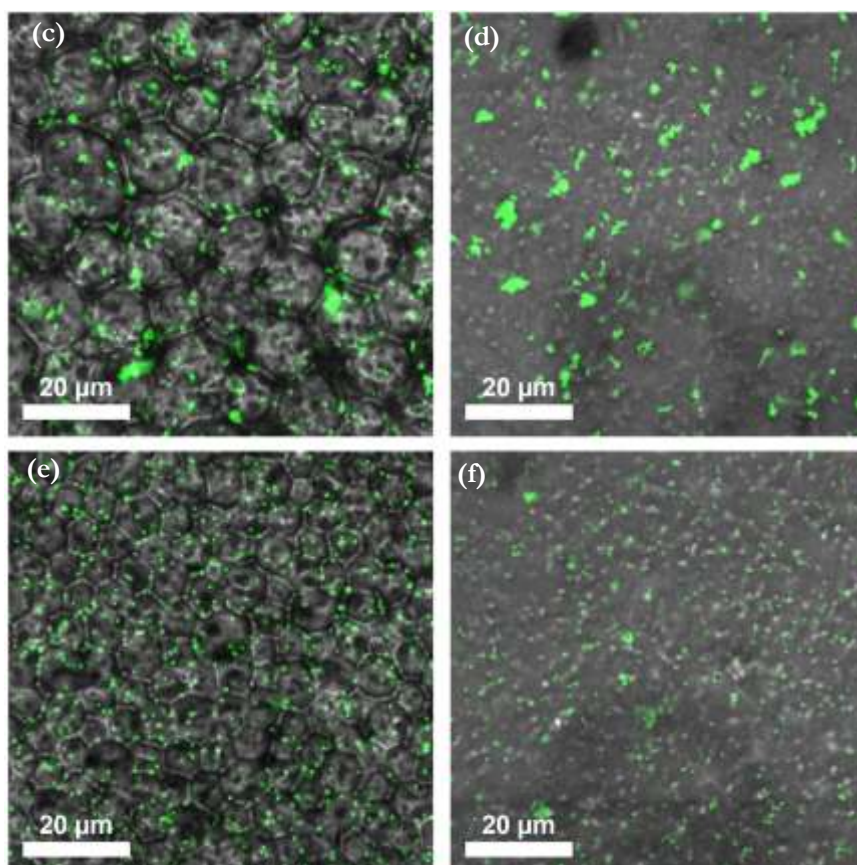


Figure 3 Physicochemical characteristic of the Hybrid NR-CaP: Confocal luminescence micrographs of the NR-SiPs hybrid films. (c) CHF-Si, (d) CHF-ASi, (e) TOL-Si, and (f) CHF-ASi. Mapping was performed using different laser wavelengths. The NR autofluorescence and NR-SiPs particles fluorescent cores were excited using 488 nm laser (g).

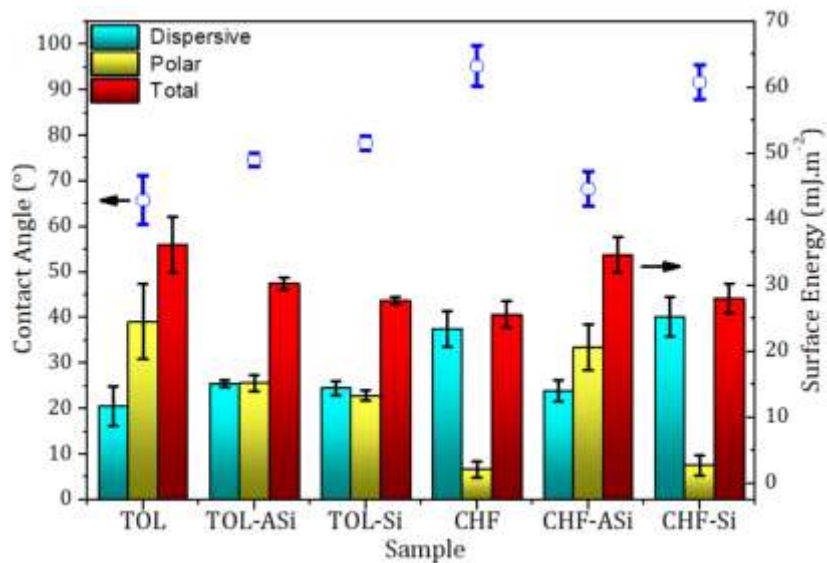
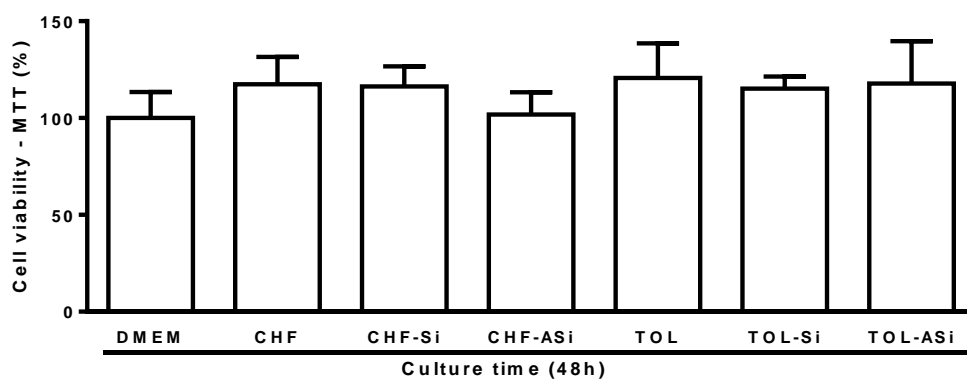


Figure 4 (a) shows the results of the cell viability *in vitro* culture of murine osteoblasts at 48h. When evaluating the influence of Si particles on cell viability, there was no difference between the groups ($P > 0.05$) at 48h. The **Figure 4 (b)** when analyzing natural rubber films after the addition of silica (Si), during the 48-hour period, the CHF group exhibited higher ($P < 0.05$) values of ALP activity than CHF-Si, CHF-ASi, TOL, and TOL-ASi groups. Furthermore, it was observed higher ($P < 0.05$) values of ALP activity in the TOL-Si group, when compared to TOL, TOL-ASi or CHF-Si groups

A



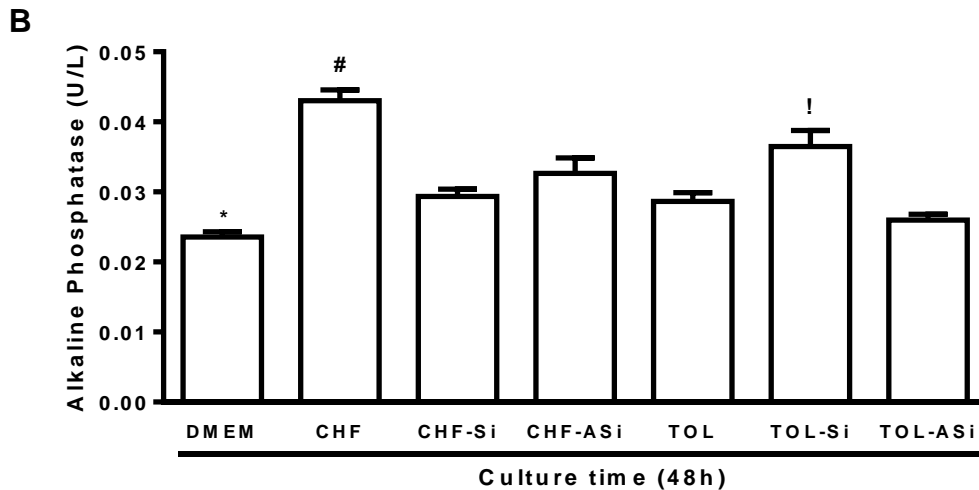


Figure 4 Effects of natural rubber films from *Hevea brasiliensis* dissolved in chloroform or toluene and filled with silica particles in the cell viability **(A)** and alkaline phosphatase (ALP) activity **(B)** *in vitro* culture of murine osteoblasts at 48 hours. The groups: DMEM, CHF, CHF-Si, CHF-ASi, TOL, TOL-ASi and TOL-Si. **(A)**. The groups: DMEM, CHF, CHF-Si, CHF-ASi, TOL, TOL-Si, TOL-ASi. * $P < 0.05$ DMEM versus CHF, CHF-Si and TOL-Si. # $P < 0.05$ CHF versus CHF-Si, CHF-ASi, TOL and TOL-ASi. ! $P < 0.05$ TOL-Si versus CHF-Si, TOL and TOL-ASi **(B)**.

4. Effects of hybridization of the NR on cell morphology *in vitro* culture of murine osteoblasts

Figure 5 shows optical micrographs of osteoblastic cells seeded on different surfaces for 48 and 72 hs. At 48h, osteoblasts from groups DMEM, CHF, and TOL were elongated. Osteoblasts cultivated in Natural Rubber films from *Hevea brasiliensis* filled with CHF-CaP or TOL-CaP revealed cell proliferation and contact area. The osteoblasts morphology on the hybrid NR-Si (CHF-ASi, CHF-Si, TOL-ASi, TOL-Si) were elongated in shape. On the other hand, it seems to have more dead osteoblasts than differentiated ones. However, in the TOL-ASi group some osteoblasts displayed contact areas.

At 72h, there was an improvement in osteoblasts proliferation in almost all groups, the cells showed a spindle shape, especially in the DMEM group. Natural Rubber films from *Hevea brasiliensis* filled with CHF-CaP, TOL-CaP or

TOL-CaP showed homogeneous distribution of cells on the surfaces with relatively low cell adhesion. On this hybrid materials (CHF-ASi, CHF-Si, TOL-ASi, TOL-Si) the osteoblastic cells were also elongated in shape but seems to exhibit a significant decrease in spreading and no contact area could be seen between the osteoblasts.

During cell growth and differentiation, osteoblast evolution occurs in four stages: proliferation, extracellular matrix (ECM) production, ECM maturation, and, subsequently, apoptosis (Stein et al., 2004). The addition of CaP in NR matrix seems to improve this osteoblast stage, independent of the solvent used. This find may be related to the enhancement of cell adhesion due to polar and dispersive and that was disclosed in groups CHF-CaP and TOL-CaP.

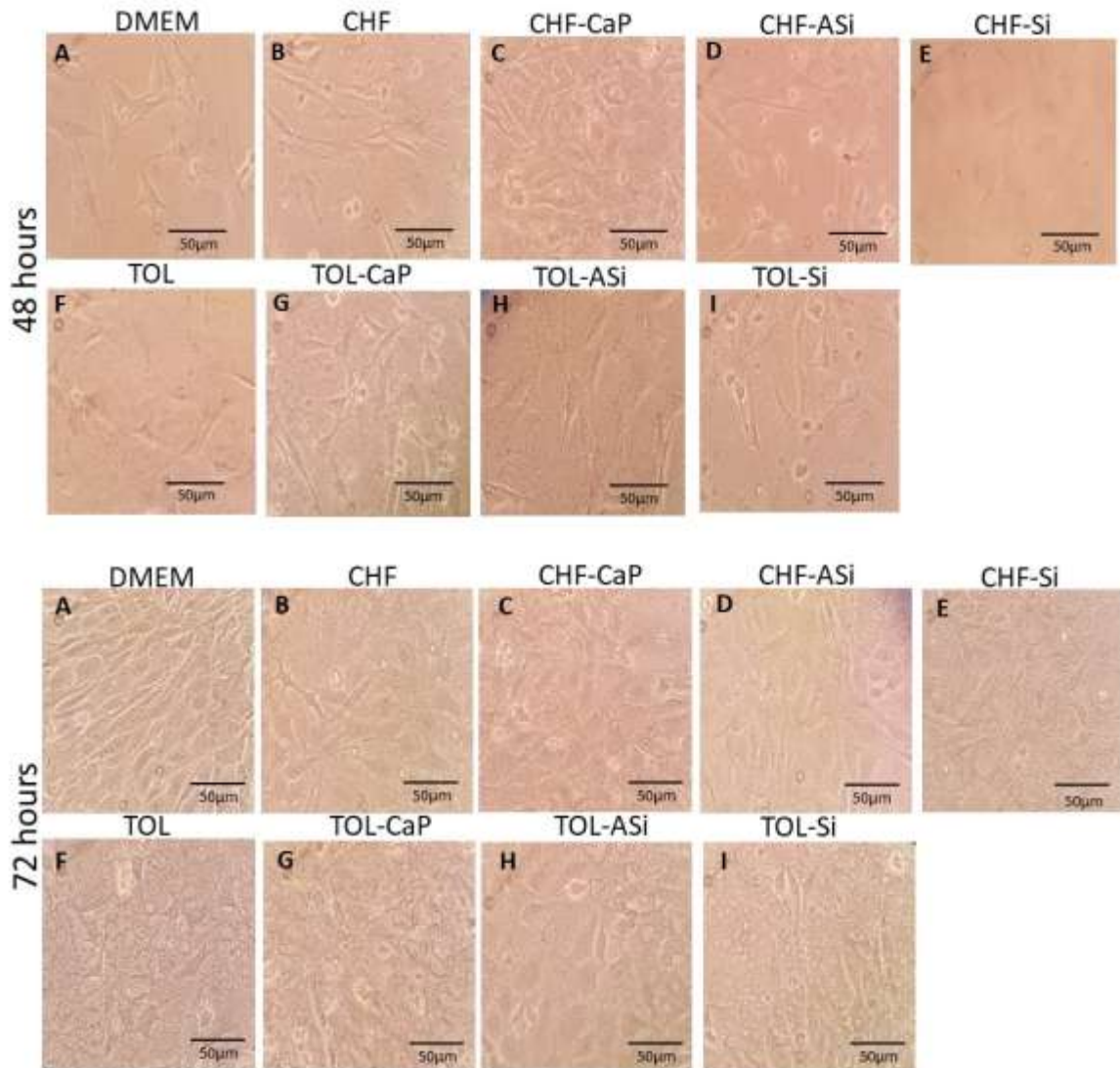


Figure 5 Images from *in vitro* culture of murine osteoblasts at 48 and 72 hours. Osteoblast morphology are shown in groups the following groups: DMEM (A), CHF (B), CHF-CaP (C), CHF-ASi (D), CHF-Si (E), TOL (F), TOL-CaP (G), TOL-ASi (H) and TOL-Si (I). Scale bars= 50 μ m.

5. Discussion

The NR hybridization process can entail possibilities for the design of materials for biomedical applications. Understanding the relationship between the physicochemical modifications of the polymeric characteristic/processing with other materials and the cell-material interactions is the first step to achieving applications. Herein, we report the physicochemical characteristic of two hybrid NR systems, as an alternative for bone tissue engineering.

As aforementioned, molecular rearrangement in the polymeric matrix submitted to process with different solvents and the incorporation of different particles may vary the surface properties of the films, in particular, its wettability. According to the results of contact angle measurements, the wetting regime of the NR is dependent on the solvent used for the processing and is non-dependent on the CaP incorporation (Figure 2). An opposite configuration is observed in hybrid NR-Si systems: the incorporation of the positively charged silica (ASi) changes the surface energy and decreases wettability (Figure 4). Such modifications may have been caused by topology, surface energy, or both. Surface energy depends on polar and dispersive interactions. We further analyzed the hybridization effects on energy components and the results show that the wetting regime is modified, especially by the increase of the polar component, which can be attributed to the migration of the charges in particles naturally present in NR. It notes that the both solvent and the presence of particles in the polymer induce the modifications in the components of surface free energy. The correlation between such physicochemical parameters with the cell viability is described by the multivariate correlation analysis.

We also elucidate the role of the solvents for material processing on cell response. When cell viability was evaluated in the presence of CaP and with NR dissolved in different solvents, an increase was observed at 48h in the CHF group (CHF-CaP). However, the TOL group (TOL-CaP) showed a

reduction in cell viability. This non-favorable effect can be associated with the pore formation process, as shown in Figure 2A. Therefore, our findings suggest that NR may exhibit a toxic effect when dissolved in toluene, independent of the CaP addition.

On the other hand, our results pinpoint chloroform as a strategic solvent in NR processes since it favors the size and regularity of the film, as it facilitates porosity in a honeycomb structure as shown in figure 5.

In consonance with the hole of the solvents, NR hybrid systems obtained by using CHF exhibited a reduction in toxicity and an increase in cell proliferation(3).These findings may explain the enhancement of cell viability when CaP is added to NR films dissolved in chloroform solvent, especially in the CHF-CaP group. On the other hand, SiPs, positively or negatively charged, added to NR films dissolved in chloroform or toluene showed cell viability upper to 50% after 48 h and this behavior was sustained after 72 h despite that CHF-Si and CHF-ASi groups presented a reduction in this parameter. This discreet reduction may be explained by possible changes in the cell microenvironment conditional to the SiPs charge. The results indicate that cells are few sensitive to NR-SiP nanoparticles, corroborating other studies correlating high metabolic and dehydrogenase activity in mouse calvaria preosteoblast (29)

Alkaline phosphatase activity (ALP) is considered a marker for osteogenic activity and differentiation in viable osteoblasts (7). ALP assay indicates cell proliferation and production of neo-osseous tissue matrix and high levels of ALP generally indicate active bone matrix mineralization and that osteogenesis is successful (8). We emphasize the importance of a more complet cell-substrate analysis by including ALP in biomaterial studies since it has been shown a positive correlation between cell activity and *in vitro*experiments in a mouse calvaria defects model following implantation of CaP materials (9). In the preset study we assessed ALP expression enzymatically over 48 and 72h to investigate the effect of NR hybrid systems on in-vitro osteogenesis. It was observed increases in ALP activity at 48h in CHF groups, including those added with CaP (CHF-CaP). The peculiar physicochemical characteristics of the CaP coating result in higher ALP activity in osteoblasts and can be associated with higher levels of mineralization (10). The deposition of phosphate ions seems to positively interact with bone cells

and CaP deposition may stimulate rapid osseointegration of bone implants and more bone formation (11). Beyond the effects on osteoblasts differentiation CaP may affect osteoclast formation during the hydrolysis process to hydroxyapatite, acting on the crosstalk between osteoclasts and osteoblasts which influences new bone formation (12). Furthermore, due to the similarity with the inorganic phase of the bone matrix (13), the mechanism of action of CaP-driven osteoinduction may include direct and indirect effect of the biomaterial, inflammatory response, and/or pathological ossification/bone formation (14). Our current data also showed that the addition of negatively charged SiPs to TOL group (TOL-Si) increased ALP activity. *In vivo* and *in vitro* studies showed that SiPs plays a role in the metabolic activity of osteoblast, the synthesis of type I collagen, affecting the metabolic activity of bone cells and mineralized tissue formation (15). Also, SiPs appears to be necessary for bone homeostasis, being essential for normal development of the skeleton and connective tissue (Nieves, 2013). Furthermore, SiPs has a dual effect on bone metabolism, since it stimulates osteoblast proliferation and differentiation and inhibits osteoclast formation and bone resorption *in vitro* (16). Although the addition of SiP to NR hybrid systems may confer resistance to the material, ensuring its bending strength (17), it has been demonstrated that SiPs may modulate osteoblasts and osteoclasts activity. Similar to our data it has been show that SiPs have osteogenic effects without cell toxicity (18). By speculating the mechanism of action of SiPs, some authors suggested that gel SiPs stimulate the expression Insulin-like growth factor 2 (IGF-2), a well-known factor which promotes osteogenic cell differentiation, which increases alkaline phosphatase (ALP) and osteoblasts activities (19).

Furthermore, Uribe et al (2020) reported osteogenic effects of SiPs through inducing gene expression of bone markers such as bone morphogenetic protein (BMP)-2 (20). Here, it is worth to mention that BMP-2 plays an important role in differentiation of mesenchymal stem cells by regulating ALP expression (21). Also, BMP-2 release increases mineralization in both *in vitro* and *in vivo* assays (22). In the present study, ALP activity was increased significantly in the presence of NR hybrid systems and its osteogenic activity when supplemented with SiPs or CaP was demonstrated in osteoblasts cells culture. Some authors also demonstrated that by using CaP as a scaffold

for delivery of BMP-2 was associated with increasing bone regeneration, evaluated by ALP dosage (23); (24). In fact, one of the bone matrix mineralization mechanisms of CaP includes its capacity of acting as concentrator of osteoinductive proteins (BMP) (14). These results suggested the potential use of these hybrid systems in bone tissue regeneration. Likewise, the putative involvement of BMP-2 in the osteogenic effect of silica, some authors suggested the contribution of antioxidant effects (25). In addition to stimulating properties on osteoblast activity, SiPs can prevent osteoclastogenesis by inhibiting the transcription factor nuclear factor activated T cells c1 (NFATc1), essential for osteoclast differentiation and its target gene RANK (26). Also, Beck et al (2012) showed that SiPs acts an antagonist of NF- κ B preventing an activation of a pathway necessary for bone resorption, but inhibitory to bone formation (27).

Synthetic-, animal-, or plant-origin membranes, such as rubber, collagen, cellulose, alginate, and chitosan, have been studied for biomedical applications. Among those vegetal-origin, the membranes produced from NR bring several advantages (28). The hybrid NR systems developed in this study can provide the natural characteristic of the polymer and act as a smart biomaterial with therapeutic potential for bone regeneration(29)(30). In particular, our results evidence the role of the inorganic particle, corroborating the strategies for nanomaterial-based therapy for bone tissue regeneration (15). Considering these present data, it may be suggested that NR from *Hevea brasiliensis* is an attractive biomaterial for bone tissue engineering. However, we can point out two main limitations of the present study: although the cell type (osteoblasts) and the bone marker (ALP) selected for the study provide valuable and reproductive results, the complexity of bone healing will require in vivo studies to apply these findings at translating results.

Conclusion

NR from *Hevea brasiliensis* hybrid systems displayed positive effects on osteoblastic differentiation and preserved cell viability. We demonstrated that the surface modification of NR films, dissolved in chloroform or toluene, through

the addition of CaP or Si are biocompatible depending on the nature of particle and charge. The CaP particles presented a heterogeneous distribution throughout the NR matrix with few individualized particles, while SiPs presented a homogeneous distribution throughout the polymeric matrix. Taken together, our data show that this novel NR hybrid systems may represent a very promising biological tool with desirable properties supporting bone healing.

REFERENCES:

1. do Nascimento RM, de Paula AJ, Oliveira NC, Alves AC, de Oliveira Aquino YML, Filho AGS, et al. Towards the production of natural rubber-calcium phosphate hybrid for applications as bioactive coatings. *Materials Science and Engineering C*. 2019 Jan 1;94:417–25.
2. Nascimento RM, Fanta FL, Agostini DLS, Job AE, Guimarães FEG, Bechtold IH. Production and characterization of natural rubber-Ca/P blends for biomedical purposes. *Materials Science and Engineering C*. 2014 Jun 1;39(1):29–34.
3. Maia MT, Noronha VT, Oliveira NC, Alves AC, Faria AF, Martinez DTS, et al. Silica Nanoparticles and Surface Silanization for the Fabrication of Water-Repellent Cotton Fibers. *ACS Appl Nano Mater*. 2022 Apr 22;5(4):4634–47.
4. Ho HO, Och R+, Ch S(. HSNUTUNG LU Fig. 2. Schematic diagram for synthesis of ASNPS by amino-functionalization of RSNPs with APTMS. Vol. 75, *COLLOID JOURNAL*. 2013.
5. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. Vol. 65, *Journal of Immunological Methods*. 1983.
6. Moss DW. Alkaline Phosphatase Isoenzymes Technical and Clinical Aspects.
7. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. Vol. 754, *Gene*. Elsevier B.V.; 2020.
8. Mahato A, De M, Bhattacharjee P, Kumar V, Mukherjee P, Singh G, et al. Role of calcium phosphate and bioactive glass coating on in vivo bone healing of new Mg–Zn–Ca implant. *J Mater Sci Mater Med*. 2021 May 1;32(5).
9. Sato T, Anada T, Hamai R, Shiwaku Y, Tsuchiya K, Sakai S, et al. Culture of hybrid spheroids composed of calcium phosphate materials and mesenchymal stem cells on an oxygen-permeable culture device to predict in vivo bone forming capability. *Acta Biomater*. 2019 Apr 1;88:477–90.

10. Vaquette C, Ivanovski S, Hamlet SM, Hutmacher DW. Effect of culture conditions and calcium phosphate coating on ectopic bone formation. *Biomaterials*. 2013 Jul;34(22):5538–51.
11. Florian F, Guastaldi FPS, Cominotte MA, Pires LC, Guastaldi AC, Cirelli JA. Behavior of rat bone marrow stem cells on titanium surfaces modified by laser-beam and deposition of calcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med*. 2021 Jun 1;32(6).
12. Shiwaku Y, Tsuchiya K, Xiao L, Suzuki O. Effect of calcium phosphate phases affecting the crosstalk between osteoblasts and osteoclasts in vitro. In: *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. John Wiley and Sons Inc.; 2019. p. 1001–13.
13. Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dental Materials*. 2015 Apr 1;31(4):351–70.
14. Chai YC, Carlier A, Bolander J, Roberts SJ, Geris L, Schrooten J, et al. Current views on calcium phosphate osteogenicity and the translation into effective bone regeneration strategies. Vol. 8, *Acta Biomaterialia*. Elsevier Ltd; 2012. p. 3876–87.
15. Fu Y, Cui S, Luo D, Liu Y. Novel inorganic nanomaterial-based therapy for bone tissue regeneration. Vol. 11, *Nanomaterials*. MDPI AG; 2021. p. 1–18.
16. Mladenović Ž, Johansson A, Willman B, Shahabi K, Björn E, Ransjö M. Soluble silica inhibits osteoclast formation and bone resorption in vitro. *Acta Biomater*. 2014;10(1):406–18.
17. Ribeiro T, Baleizão C, Farinha JPS. Functional films from silica/polymer nanoparticles. Vol. 7, *Materials*. MDPI AG; 2014. p. 3881–900.
18. Álvarez E, Estévez M, Jiménez-Jiménez C, Colilla M, Izquierdo-Barba I, González B, et al. A versatile multicomponent mesoporous silica nanosystem with dual antimicrobial and osteogenic effects. *Acta Biomater*. 2021 Dec 1;136:570–81.
19. Xue Y, Zhou J, Han J, Zhang L, Han Y. Silanized NaCa₂HSi₃O₉ nanorods with a reduced pH increase on Ti for improving osteogenesis and angiogenesis: In vitro. *J Mater Chem B*. 2020;8(4):691–702.
20. Uribe P, Johansson A, Jugdaohsingh R, Powell JJ, Magnusson C, Davila M, et al. Soluble silica stimulates osteogenic differentiation and gap junction communication in human dental follicle cells. *Sci Rep*. 2020 Dec 1;10(1).
21. Xu Y, Jiang Y, Xia CS, Wang Y, Zhao Z, Li T. Stem cell therapy for osteonecrosis of femoral head: Opportunities and challenges. Vol. 15, *Regenerative Therapy*. Japanese Society of Regenerative Medicine; 2020. p. 295–304.

22. Venkatesan J, Anil S, Kim SK, Shim MS. Chitosan as a vehicle for growth factor delivery: Various preparations and their applications in bone tissue regeneration. Vol. 104, International Journal of Biological Macromolecules. Elsevier B.V.; 2017. p. 1383–97.
23. Gronowicz G, Jacobs E, Peng T, Zhu L, Hurley M, Kuhn LT. Calvarial bone regeneration is enhanced by sequential delivery of fgf-2 and bmp-2 from layer-by-layer coatings with a biomimetic calcium phosphate barrier layer. Tissue Eng Part A. 2017 Dec 1;23(23–24):1490–501.
24. Gunnella F, Kunisch E, Horbert V, Maenz S, Bossert J, Jandt KD, et al. In vitro release of bioactive bone morphogenetic proteins (Gdf5, bb-1, and bmp-2) from a plga fiber-reinforced, brushite-forming calcium phosphate cement. Pharmaceutics. 2019 Sep 1;11(9).
25. Pinna A, Torki Baghbaderani M, Vigil Hernández V, Naruphontjirakul P, Li S, McFarlane T, et al. Nanoceria provides antioxidant and osteogenic properties to mesoporous silica nanoparticles for osteoporosis treatment. Acta Biomater. 2021 Mar 1;122:365–76.
26. Ha SW, Viggewarapu M, Habib MM, Beck GR. Bioactive effects of silica nanoparticles on bone cells are size, surface, and composition dependent. Acta Biomater. 2018 Dec 1;82:184–96.
27. Beck GR, Ha SW, Camalier CE, Yamaguchi M, Li Y, Lee JK, et al. Bioactive silica-based nanoparticles stimulate bone-forming osteoblasts, suppress bone-resorbing osteoclasts, and enhance bone mineral density in vivo. Nanomedicine. 2012 Aug;8(6):793–803.
28. do Nascimento RM, de Paula AJ, Oliveira NC, Alves AC, de Oliveira Aquino YML, Filho AGS, et al. Towards the production of natural rubber-calcium phosphate hybrid for applications as bioactive coatings. Materials Science and Engineering C. 2019 Jan 1;94:417–25.
29. Mendonça RJ, Maurício VB, de Bortolli Teixeira L, Lachat JJ, Coutinho-Netto J. Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. Phytotherapy Research. 2010 May;24(5):764–8.
30. Carlos BL, Yamanaka JS, Yanagihara GR, Macedo AP, Watanabe PCA, Issa JPM, et al. Effects of latex membrane on guided regeneration of long bones. J Biomater Sci Polym Ed. 2019 Sep 22;30(14):1291–307.

5. CONCLUSÃO GERAL

Este estudo investigou os efeitos da borracha natural como arboúço na cultura *in vitro* de osteoblastos murinos, quanto à viabilidade, proliferação, atividade e morfologia celular. Em particular, este estudo abordou duas investigações: 1) o efeito de diferentes solventes (clorofórmio e tolueno)

utilizados para diluir o látex e 2) o efeito dos compósitos (fosfato de cálcio e sílica) adicionados ao látex. Este trabalho também contribuiu para a pesquisa relacionada ao desenvolvimento de biomaterial biológico à base de borracha natural, útil para o tratamento de problemas ósseos, uma vez que os osteoblastos, células essenciais para a formação e regeneração óssea, cresceu facilmente sobre as amostras que foram utilizadas. Além do estudo experimental, foi realizada uma revisão integrativa que poderá contribuir significativamente com novos estudos envolvendo o látex de borracha natural, bem como aprofundamento dos estudos existentes relacionados as aplicações biomédicas.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, T.A, et al. The inflammatory stimulus of a natural látex biomembrane improves healing in mice. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**. v. 44, n. 10, p. 1036–47, 2011.

ASZODI, A., BATEMAN, J. F., GUSTAFSSON, E., BOOT-HANDFORD, R. and FASSLER, R. “Mammalian skeletogenesis and extracellular matrix: what can we learn from knockout mice? **Cell Structure and Function**, v. 25, n. 2, p. 73–84, 2000

BALABANIAN, CACA, COUTINHO-NETTO, J., LAMANO-CARVALHO, T.L., LACERDA, S.A., BRENTGANI, L.G. Biocompatibility of natural látex implanted into dental alveolys of rats. **Journal of Oral Science**,v. 48, n. 4, p. 201–5, 2006.

BEZZERA, A.V. **Efeito do ranelato de estrôncio na proliferação, viabilidade e ativação de osteoblastos murinos *in vitro***.TESE, Fortaleza – Ce, 2017.

WAN, L, S et al. Multiple interfaces in self-assembled breath figures. **Chem. Commun.**, v. 50, n. 31, p. 4024-4039, 2014.

SARKAWI, S. S.; AZIZ, Y. J TEKNOL.Ground Rice Husk as Filler in Rubber Compounding, **Science and Engineering**, v.39, p. 135, 2003.

CALORI, G., MAZZA, E., COLOMBO, M., RIPAMONTI, C. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs? **Injury**, v. 42, p. S56–63, 2011.

CAPULLI, M.; PAONE, R.; RUCCI, N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. Archives of Biochemistry and Biophysics, [Washington], v. 561, p. 3-12, 2014.

DALLAS, S. L. *et al.* The osteocyte: an endocrine cell ... and more. **Endocrine Reviews**, Washington, v. 34, n. 5, p. 658-90, 2013.

DATTA, H. K., NG, W. F., WALKER, J. A., TUCK, S. P. and VARANASI, S. S. "Te cell biology of bone metabolism," **Journal of Clinical Pathology**, v. 61, n. 5, p. 577–587, 2008.

FERREIRA, M. Natural Rubber Latex LbL Films: Characterization and Growth of Fibroblasts. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, p. 2137–2147, 2012.

DOWNEY, P. A. and SIEGEL, M. I. "Bone biology and the clinical implications for osteoporosis," **Physical Therapy**, v. 86, n. 1, p. 77–91, 2006.

EINHORN, T.A. Enhancement of fracture-healing. **J Bone Joint Surg**, v. 77, p. 940–56, 1995.

FLORENCIO-SILVA, R. *et al.* Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **Biomed Research International**, [Cairo],v. 2015, 2015.

FRADE, M. A. C. VALVERDE, R. V., DE ASSIS, R. V. C., COUTINHO NETTO, J., FOSS, N. T. Chronic phlebopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. **International journal of dermatology**, v. 40, p. 238, 2001.

GREEN, J., SCHOTLAND, S., STAUBER, D. J., KLEEMAN, C. R. AND CLEMENS, T. L. "Cell-matrix interaction in bone: type I collagen modulates signal transduction in osteoblast-like cells," **The American Journal of Physiology—Cell Physiology**, v. 268, n. 5, p. C1090–C1103, 1995.

HERCULANO, R. D., GUIMARAES, S. A. C., BELMONTE, G. C., DUARTE, M. A. H., DE OLIVEIRA, O. N., KINOSHITA, A., GRAEFF, C. F. D. Metronidazole Release Using Natural Rubber Latex as Matrix. **Materials Research - Ibero-american Journal of Materials**, v. 13, p. 57-61, 2010.

HOLZAPFEL B. M., REICHERT JC, SCHANTZ JT, GBURECK U, RACKWITZ L, NOETH U, JAKOB F, RUDERT M, GROLL J, HUTMACHER DW. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 581–603, 2013.

LEIBBRANDT, A., PENNIGER, J.M. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1143, p. 123-50, 2008.

MARTIN I., WENDT D., HEBERER M. The role of bioreactors in tissue engineering. **Trends Biotechnol**, 2004.

MENDONÇA, R.J., MAURICIO, V.B., DE BORTOLLI TEIXEIRA, L., LACHAT, J.J., COUTINHO-NETTO, J. Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 5, p. 764–8, 2010.

MRUE´, F., NETTO, J. C., CENEVIVA, R., LACHAT, J. J., THOMAZINI, J. A., TAMBELINI, H. **Materials Research - Ibero-american Journal of Materials**, v. 7, p. 277, 2004.

NEVES-JUNIOR, W. F. P.; FERREIRA, M.; ALVES, M. C. O.; GRAEFF, C. F. O.; MULATO, M.; COUTINHO-NETTO, J.; BERNARDES, M. S. Influence of fabrication process on the final properties of natural-rubber latex tubes for vascular prosthesis. **Brazilian Journal of Physics**, v. 36, p. 586-591, 2006.

O'KEEFE R.J., MAO J. Bone tissue engineering and regeneration: from discovery to the clinic—an overview. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 17, p. 389–392, 2011.

PARK, J.B. “Biomaterials: an introduction”, **New York: Plenum Press**, 1980.

ROBLING, A. G., CASTILLO, A. B. and TURNER, C. H. “Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling,” **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, p. 455–498, 2006.

SANTOS, F. P.; CAMPOS, Elson de; MELO, F. C. L.; HONDA, R. Y.; MOTA, R. P.; COSTA, M. . Superficial modifications in TiO₂ and Al₂O₃ ceramics. **Materials Research** , v. 6, n. 3, p. 353-357, 2003.

TATHE, A. GHODKE, M and NIKALJE, A. P. A brief review: biomaterials and their application, **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v 2, Suppl 4, 2010.

TSIRIDIS, E., UPADHYAY, N., GIANNOUDIS, P. Molecular aspects of fracture healing which are the important molecules? **Injury**, v. 38, p. S11–25, 2007.

TZIOUPIS, C., GIANNOUDIS, P.V. Prevalence of long-bone non-unions. **Injury**, v. 38, p. 3–9, 2007.

WILLIAMS, D. F. Definitions in biomaterials. Amsterdam: **Elsevier**, 1987.