UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:

UNICAMP BIBLIOTECA CENTRAL SECÃO CIPCO STATE

# DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

# "OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS NA BLENDA BIORREABSORVÍVEL POLI(β-HIDROXIBUTIRATO) (PHB) / POLI(L-ÁCIDO LÁCTICO) (PLLA)"

AUTORA: MSc. Mirela Vanin ORIENTADOR: Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Eliana A. de Rezende Duek

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutor em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo Maio, 2003



CM00187266-2

### FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP



Tese de doutorado defendida por Mirela Vanin e aprovada em 23 de maio de 2003 pela banca examinadora constituída pelos Doutores:

Ceron

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Sacalu

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Maria Malmonge

benhatt Eavagle

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

RCOSSEALS

Main Man Dep-

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisa Masumi Beppu

Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química.

Cesce faiture

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana (Orientador)

# IMPORTÂNCIA

Na vida, não vale tanto o que temos nem tanto importa o que somos.

Vale o que realizamos, com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós.

(Francisco Xavier)

Dedico

Ao meu esposo Heron, pelo amor, compreensão, paciência e constante incentivo. Ao meu filho Leonardo pela existência e alegria.

#### AGRADECIMENTOS

Esta TESE DE DOUTORADO resulta de muito esforço, estudo, dedicação e aprendizado. Porém, tal resultado só é alcançado através da interação de conhecimentos entre pessoas valiosas; por isso, gostaria de expressar aqui minha mais profunda gratidão a essas pessoas sem as quais não teria atingido esse resultado.

- A DEUS;
- Ao Prof. Dr. CESAR COSTAPINTO SANTANA, não apenas pela orientação segura e objetiva, mas também, pela amizade, incentivo e credibilidade;
- À Profa. Dra. ELIANA APARECIDA DE REZENDE DUEK, pela constante colaboração, dedicação e amizade;
- Ao Prof. Dr. MÁRIO BICA DE MORAES do Laboratório de Processos de Plasma do Instituto de Física da UNICAMP pelas medidas de espessura do filme no equipamento Perfilômetro;
- À Profa. Dra. MARIA ISABEL FELISBERTI do Instituto de Química UNICAMP pela utilização da estufa à vácuo;
- Aos técnicos RITA, JOSÉ LUÍS e CLAUDINETE da Faculdade de Engenharia Mecânica – UNICAMP pelas análises de DSC, TGA, SEM, DMA e ensaio mecânico de flexão;
- À Profa. Dra. ÍRIS. L. TORRIANI do Instituto de Física UNICAMP e Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - LNLS e a TOMÁS PRIVELIC do LNLS, pelas valiosas contribuições nas discussões dos resultados das análises de SAXS e WAXS;
- Ao LNLS pelas análises de WAXS e SAXS;
- Ao Prof. Dr. EDISON BITTENCOURT, do Departamento de Tecnologia de Polímeros da FEQ – UNICAMP, pelo empréstimo do equipamento de "Spin-Coater";

- Ao Dr. PAULO DE TARSO VIEIRA E ROSA pelo auxílio na utilização inicial do equipamento de Eletroforese Capilar;
- Ao Departamento de Tecnologia de Polímeros da FEQ UNICAMP pelas análises de TGA e GPC.
- Ao Laboratório de Uso Comum da FEQ UNICAMP pelas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM);
- À colega Dra. BETINA MARA PEREIRA FERREIRA ex-aluna da pós-graduação do DEMA/FEM – UNICAMP, pela contribuição em discussões e sugestões;
- Aos PROFESSORES e FUNCIONÁRIOS do Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado;
- Aos meus COLEGAS do DPB pela amizade, troca de conhecimentos e pelo agradável ambiente de trabalho;
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP, pela concessão da bolsa de estudo e suporte financeiro para conclusão deste trabalho;
- Aos meus pais, GABRIELE e NEIVA, pelo incentivo, amor, carinho e exemplo de luta para a conquista de meu objetivo;
- A todos aqueles que de alguma forma colaboraram pelo êxito deste trabalho.

#### RESUMO

A utilização de materiais poliméricos biodegradáveis na área médica foi um importante avanço biotecnológico, esses materiais podem ser utilizados como implantes temporários substituindo uma função particular do organismo por um período prédeterminado e degradar "in vivo" evitando cirurgia para a retirada do implante. O material a ser escolhido depende das necessidades da aplicação e da biocompatibilidade do material com o organismo vivo. O presente trabalho teve por objetivo estudar blendas de poli(Lácido láctico) (PLLA) / polihidroxibutirato (PHB) para aplicação na área médica. As blendas foram preparadas por dois métodos: evaporação do solvente e por fusão, obtendose amostras nas formas de filmes e pinos, respectivamente. Os filmes foram caracterizados por: análise termogravimétrica (TGA), calorimetria diferencial de varredura modulada (MDSC), microscopia eletrônica de varredura (SEM), análise dinâmico mecânica (DMA), difração de raios-X (WAXS) e espalhamento de raios-X à baixos ângulos (SAXS); os pinos, além das técnicas citadas acima, foram caracterizados por ensaio mecânico de flexão. Foi feito um estudo "in vitro" das blendas PHB/PLLA, avaliando-se a degradação hidrolítica. Foram realizados ensaios de adsorção de proteínas do sangue humano, albumina (HSA), imunoglobulina G (HIgG) e fibrinogênio (HFg), sobre a superfície dos biomateriais (PHB, PLLA e PHB/PLLA), empregando a técnica de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) acoplado à técnica de reflectância total atenuada (ATR) em um sistema de fluxo contínuo simulando em tempo real as condições fisiológicas, com a finalidade de estudar um tipo de biocompatibilidade dos biomateriais. Tal estudo foi complementado utilizando análises de Eletroforese Capilar. Os resultados obtidos mostraram que as blendas PHB/PLLA são imiscíveis apresentando separação de fases; porém, com alguma interação entre as fases. Os pinos apresentaram superfície de fratura densa assim como os filmes de PHB e PLLA puros enquanto que as blendas eram porosas. As blendas PHB/PLLA apresentaram melhores propriedades térmicas e mecânicas que o PHB puro, sugerindo que o PLLA implicou em tais melhorias. No estudo de degradação observou-se que o PLLA é mais susceptível ao meio biológico degradando mais rapidamente, assim como os filmes em relação aos pinos. Notou-se também, que apesar do PHB apresentar propriedades mecânicas inferiores ao PLLA, este conseguiu mantê-las por mais tempo durante o processo de degradação. Durante a degradação as amostras apresentaram tendência a cristalizar, aumentando provavelmente as lamelas cristalinas. No estudo de adsorção de proteínas, os resultados de densidade de proteínas adsorvidas, HSA e HIgG, na superficie dos materiais, apresentaram valores próximos aos de outros biomateriais citados na literatura. Assim, pode-se sugerir que as blendas PHB/PLLA possuem potencialidade para emprego na área médica como biomateriais biorreabsorviveis.

**Palavras-chaves:** biomateriais, polímeros biorreabsorvíveis, degradação, poli(L-ácido láctico), polihidroxibutirato, adsorção de proteínas, FT-IR (ATR), eletroforese capilar.

### ABSTRACT

The use of polymeric biodegradable materials in medicine is an important progress in biotechnology. These materials can be used like temporary implants as substitute a specific function of the organism for a pre-determined period, and its degradation "in vivo", so that there is no need for subsequent surgery to remove the implant. The choice of the material will depend on the needs demanded for a certain application and the biocompatibility material/organism. The aim of this work was to study  $poly(\beta$ hvdroxybutyrate) (PHB) / poly(L-lactic acid) (PLLA) blends for medical area application. The blends were prepared from two different methods: casting and melting, obtaining samples in the forms of films and pins, respectively. The films were characterized by thermogravimetric analysis (TGA), modulated dynamical scanning calorimetry (MDSC), dynamical mechanical analysis (DMA), scanning electron microscopy (SEM), wide-angle X-ray scattering (WAXS), small-angle X-ray scattering (SAXS), and the pins, besides the techniques mentioned above, were characterized by flexural mechanical test. The "in vitro" study of the PHB/PLLA blends was accomplished and their hydrolytic degradation was evaluated. Experiments of human protein adsorption (albumin - HSA, imunoglobulin G -HIgG, fibrinogen – HFg) onto biomaterials surfaces (PHB, PLLA PHB/PLLA) were made. These experiments used the Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) coupled with attenuated total reflectance (ATR) in a continuous flow system, and simulated the physiological conditions in real time to study the biomaterials biocompatibility. The biocompatibility study was complemented using capillary electrophoresis analysis. The results showed that the PHB/PLLA are immiscible, with phase separation; however, with some interaction among the phases. Pins showed dense fracture surfaces, like films of pure PHB and PLLA, while the blends of films showed porous fracture surface. The PHB/PLLA blends revealed better thermal and mechanical properties than pure PHB. It is suggested that the PLLA presence promoted these results. In the degradation study we could observe that PLLA is more susceptible to biological environment than PHB and blends, because it presents a faster degradation in a comparison for films and pins. The results also showed that the PHB got to maintain its mechanical properties for more time than PLLA, despite of PHB has mechanical properties inferior than PLLA. During the degradation the samples disclosed tendency to crystallize, probably increasing the crystal lamellar thickness. The biocompatibility study showed density adsorption protein values, HSA and HIgG, onto biomaterials surfaces very similar to those reported in the literature. It is suggested that the PHB/PLLA blends have potentiality to be used as bioreabsorbables polymers in the medical area.

Key words: biomaterials, bioreabsorbables polymers, degradation, poly( $\beta$ -hydroxybutyrate), poly(L-lactic acid), protein adsorption, FT-IR (ATR), capillary electrophoresis.

Assunto	Página
Resumo	xiii
Abstract	XV
Índice de Figuras	xxi
Índice de Tabelas	xxix
Nomenclatura	xxxiv
CAPÍTULO I	
INTRODUÇÃO	01
CAPÍTULO II	
OBJETIVOS	03
CAPÍTULO 3	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
3.1. Biomateriais: definição e aplicações	04
3.1.1. Polímeros como Biomateriais: Funcionalidade e Biocompatibilidad	<b>e</b> 05
3.1.2. Polímeros Bioabsorvíveis e Funcionalidade	06
3.1.3. A Degradação dos Polímeros Biorreabsorvíveis	07
3.1.4. Poliácido láctico – PLA	09
3.1.5. Polihidroxibutirato – PHB	10
3.1.6. Blenda PLA/PHB	11
3.1.7. Biocompatibilidade	12
3.2. O Sangue e suas Proteínas	13
3.2.1. Proteínas Plasmáticas	13
3.2.2 A Coagulação Sangüínea	15
3.3. Um enfoque do estudo da biocompatibilidade: adsorção de proteínas do san	gue na
superfície de materiais	18

3.3.1. Infravermelho por Transformada de Fourier no modo ATR - FT-IR(ATR)193.3.2. Infravermelho Por Transformada de Fourier Acoplada a ReflectânciaTotal Atenuada - FTIR (ATR)243.3.2.1. Quantificação da proteína adsorvida sobre um material -equação da densidade de adsorção em ATR (Chittur, 1998)283.3.2.2. Índice de absortividade molar de proteína em FTIR / ATR293.3.2.3. FT-IR (ATR) e a célula de fluxo contínuo303.3.3. Eletroforese Capilar32

# **CAPÍTULO IV**

MATERIAIS E MÉTODOS	36	
4.1. Materiais	36	
4.2. Métodos	37	
4.2.1. Obtenção das Blendas PHB/PLLA na forma de filmes	37	
4.2.2. Obtenção das blendas na forma de pinos, preparadas por blenda f	isica no	
estado fundido	40	
4.3. Medidas de Espessura do Filme Obtido Através da Técnica Spin Coating	42	
4.4. Ensaio de Degradação "In Vitro" das Blendas PHB/PLLA	43	
4.5. Caracterização das Blendas PHB/PLLA Confeccionadas na Forma de Film	ies pela	
Técnica de Evaporação do Solvente ("Casting") e Pinos	44	
4.5.1. Análise térmica: MDSC para as amostras de filmes e pinos antes	e após	
degradação	45	
4.5.2. Análise mecânica: DMA para as amostras de filmes e pinos antes	e após	
degradação 45		
4.5.3. Análise morfológica: SEM para filmes e pinos antes da degradação	46	
4.5.4. Análise térmica: TGA para filmes e pinos antes e após degradação	46	
4.5.5. Análise estrutural: WAXS e SAXS para filmes e pinos antes	e após	
degradação	47	
4.5.6. Ensaio mecânico de flexão para pinos antes da degradação	48	
4.5.7. Cromatografia de Permeação em Gel – GPC	48	
4.6. Ensaio para Obtenção do Índice de Absortividade Molar das Proteínas	49	
4.7. Ensaio de Adsorção das Proteínas Sobre os Biomateriais	50	

XVIII

4.7.1. Ensaio e análise da adsorção de proteínas nos biomateriais PHB e PLLA	
utilizando a técnica de FT-IR ATR	50
4.7.1.1. Tratamento espectral	53
4.8. Ensaio e Análise da Adsorção de Proteína Empregando a Técnica	Eletroforese
Capilar	54
4.8.1.Curva de calibração da HSA	54
4.8.2. Ensaios de adsorção de HSA em PLLA e PHB, analisada em Eletroforese	
Capilar	55

# CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1. Caracterização das Blendas PHB/PLLA na forma de pinos e filmes	58
5.1.1. Calorimetria Diferencial de Varredura – MDSC	58
5.1.2. Análise termogravimétrica – TGA	66
5.1.3. Análise Dinâmico Mecânica - DMA	69
5.1.4. Análise morfológica – SEM	72
5.1.5. Análise de difração de raios-X (WAXS)	76
5.1.6. Análise de espalhamento de raios-X à baixos ângulos (SAXS)	79
5.1.7. Ensaio mecânico de flexão - pinos	83
5.2. Caracterização das Blendas PHB/PLLA na forma de pinos e filmes após	o ensaio
de degradação "in vitro"	86
5.2.1. Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura Modulada – Mi	<b>DSC</b> 86
5.2.2. Análise de Cromatografia de Permeação em Gel – CPC	110
5.2.3. Análise Termogravimétrica – TGA	111
5.2.4. Análise Dinâmico Mecânica – DMA	120
5.2.5. Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura – SEM	128
5.2.6. Análise de Difração de Raio-X - WAXS	134
5.2.7. Análise de espalhamento de Raio-X à baixos ângulos - SAXS	140
5.3. Análise e Cálculo da Espessura do Filme de PLLA Spin-Coating	145
5.3.1. Microscopia Interferométrica.	145
5.3.2. FT-IR – Reflectância	145
5.3.3. Perfilômetro	146

5.4. Resultados para Obtenção do Índice de Absortividade Molar (ε) das Proteínas 147
5.5. Resultados dos Ensaios de Adsorção de Proteína Empregando a Técnica FT-IR /
ATR em Sitema de Fluxo Contínuo 150
5.5.1. Cinética de adsorção de HSA em PLLA e PHB utilizando ZnSe (seleneto
de zinco) como cristal ATR 150
5.5.2. Cinética de Adsorção de HIgG em PLLA, PHB e PHB/PLLA 50/50,
utilizando Ge (germânio) como cristal ATR 153
5.5.3. Equilíbrio de adsorção de HIgG em PLLA, PHB e PHB/PLLA 50/50,
utilizando Ge (germânio) como cristal ATR 158
5.5.4. Cinética de Adsorção de HSA em PLLA e PHB utilizando Ge (germânio)
como cristal ATR 160
5.5.5. Equilíbrio de adsorção de HSA em PLLA e PHB utilizando Ge
(germânio) como cristal ATR 162
5.5.6. Cinética de adsorção de HFg em PLLA e PHB utilizando Ge (germânio)
como cristal ATR 163
<b>5.6. Resultados dos Ensaios de adsorção Analisados por Eletroforese Capilar</b> 166
<b>5.6.1. Curva de Calibração de HSA em EC</b> 166
5.6.2 Resultados dos ensaios de adsorção de HSA em PLLA e PHB analisados
<b>por EC</b> 167
5.6.3. Equilíbrio da adsorção de HSA em PLLA e PHB analisados por EC 169
5.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) das proteínas adsorvidas em

# CAPÍTULO VI

6.1. CONCLUSÕES	172
6.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	174

# CAPÍTULO VII

175

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

XX

Figura 1: Estrutura molecular das duas formas opticamente ativas do Poliácido
láctico. 09
Figura 2: Estrutura molecular do Polihidroxibutirato.10
Figura 3: Diagrama geral sobre a biocompatibilidade (TANZAWA, 1993). 12
Figura 4: Formato, dimensões relativa e massas molares em Dalton das moléculas
de proteína do sangue: albumina, y - Globulina e fibrinogênio. (HARPER, 1971).
Figura 5: Mecanismos da Coagulação Sangüínea — São indicados os mecanismo
intrínseco e extrínseco. 16
Figura 6: Espectro Eletromagnético21
Figura 7: Diagrama esquemático do caminho da radiação infravermelha no
ATR 21
Figura 8: Variação da distância de penetração com o indice de refração do IRE 23
Figura 9: Variação da distância de penetração com o ângulo de incidência 23
Figura 10: Variação da distância de penetração com o número de reflexões
internas. 24
Figura 11: Representação esquemática de um cristal (ATR) trapezoidal (Chittur,
1998) 25
Figura 12: Representação esquemática da célula de fluxo contínuo
(GENDREAU, 1986). 31
Figura 13: Representação esquemática da eletroforese capilar. 34
Figura 14: Eletroferograma típico de solução padrão de HSA (20µg/mL) 35
Figura 15: Esquema do molde com o filme secando dentro da cuba fechada. 38
Figura 16: Representação esquemática da confecção de filmes no equipamento
Spin Coating, em etapas: A (gotas da solução polimérica), B espalhamento da solução
polimérica, C e D evaporação do solvente e formação do filme fino. 40
Figura 17: Representação esquemática da confecção das blendas PHB/PLLA no
equipamento Mini Max Molder. 41
Figura 18: Representação esquemática do protocolo para análise da espessura, em

xxi

43

um perfilômetro, do filme confeccionado por spin coater.

Figura 19: Representação esquemática da linha de SAS para análises de SAXS e WAXS.

Figura 20: Esquema do dispositivo de três pontos do teste de flexão. 48

Figura 21: Vista da parte inferior da célula de fluxo, utilizada no sistema de fluxocontinuo da Figura 22. Dimensões da célula: 1 mm de profundidade, 8 mm de largura e 60mm de comprimento.50

Figura 22: Representação esquemática do sistema de fluxo contínuo empregadonos ensaios de adsorção das proteínas sobre as blendas PHB/PLLA.51

Figura 23: Representação esquemática do tratamento espectral. 54

Figura 24: Termogramas do Fluxo de Calor Total do primeiro aquecimento, dablenda de PHB/PLLA em diferentes composições, para (a) pinos e (b) filmes.59

Figura 25: Termogramas de Fluxo de Calor (a) reversível e (b) irreversível, dosegundo aquecimento, para os pinos de PHB/PLLA, em diferentes composições.60

Figura 26: Termogramas de Fluxo de Calor (a) reversível e (b) irreversível, dosegundo aquecimento, para os filmes de PHB/PLLA, em diferentes composições.61

Figura 27: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análisetermogravimétrica (TGA) das blendas na forma de pinos.68

Figura 28: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análisetermogravimétrica (TGA) das blendas na forma de filmes.68

Figura 29: Gráficos dos módulos de armazenamento e de perda da análise deDMA das blendas PHB/PLLA na forma de pinos.71

 Figura 30: Gráficos dos módulos de armazenamento e de perda da análise de

 DMA das blendas PHB/PLLA na forma de filmes.
 71

Figura 31: Micrografias das superficies fraturadas das blendas PHB/PLLA 0/100,30/70, 50/50, 70/30 e 100/0, na forma de pinos, da análise de SEM.74

Figura 32: Micrografias das superficies das blendas PHB/PLLA 0/100, 30/70,50/50, 70/30 e 100/0, na forma de filmes, da análise de SEM.75

Figura 33: Representação gráfica genérica de uma análise de WAXS (RYAN, 1997).

xxii

Figura 34: Resultados da análise de WAXS para as blendas PHB/PLLA 0/100,
50/50 e 100/0, na forma de pinos. 77
Figura 35: Resultados da análise de WAXS para as blendas PHB/PLLA 0/100,
50/50 e 100/0, na forma de filmes. 77
Figura 36: Modelo da estrutura polimérica ideal (FEIGIN, 1987). 80
Figura 37: Curva de SAXS genérica (RYAN, 1997). 81
Figura 38: Resultados da análise de SAXS para as blendas PHB/PLLA 0/100,
50/50 e 100/0na forma de pinos 81
Figura 39: Resultados da análise de SAXS para as blendas PHB/PLLA 0/100,
50/50 e 100/0, na forma de filmes. 82
Figura 40: Curvas de tensão máxima ( $\sigma$ max.) em função do alongamento
máximo ( $\varsigma$ max.) do ensaio mecânico de flexão para as blendas PHB/PLLA 0/100, 30/70,
50/50, 70/30 e 100/0. 84
Figura 41: Curvas de MDSC obtidas para os pinos de PHB/PLLA 0/100, em
diferentes tempos de degradação: (a) $1^{\circ}$ aquecimento e (b) $2^{\circ}$ aquecimento. 87
Figura 42: Curvas de MDSC obtidas para os pinos de PHB/PLLA 30/70, em
diferentes tempos de degradação: (a) 1º aquecimento e (b) 2º aquecimento. 88
Figura 43: Curvas de MDSC obtidas para os pinos de PHB/PLLA 50/50, em
diferentes tempos de degradação: (a) 1º aquecimento e (b) 2º aquecimento. 89
Figura 44: Curvas de MDSC obtidas para os pinos de PHB/PLLA 70/30, em
diferentes tempos de degradação: (a) 1º aquecimento e (b) 2º aquecimento. 90
Figura 45: Curvas de MDSC obtidas para os pinos de PHB/PLLA 100/0, em
diferentes tempos de degradação: (a) 1° aquecimento e (b) 2° aquecimento. 91
Figura 46: Curvas de MDSC obtidas para os filmes de PHB/PLLA 0/100 em
diferentes tempos de degradação: (a) $1^{\circ}$ aquecimento e (b) $2^{\circ}$ aquecimento. 92
Einer 47. Current de MDSC abtides nors en filmen de DIID/DLLA 20/70 em
diferentes tempos de degradação: (a) 1º equecimente o (b) 2º equecimento
unerentes tempos de degradação. (a) 1 aquéennento e (b) 2 aquéennento. 95
Figura 48: Curvas de MDSC obtidas para os filmes de PHB/PLLA 50/50, em
diferentes tempos de degradação: (a) 1° aquecimento e (b) 2° aquecimento. 94
xxiii

Figura 49: Curvas de MDSC obtidas para os filmes de PHB/PLLA 70/30, emdiferentes tempos de degradação: (a) 1º aquecimento e (b) 2º aquecimento.95

Figura 50: Curvas de MDSC obtidas para os filmes de PHB/PLLA 100/0, emdiferentes tempos de degradação: (a) 1º aquecimento e (b) 2º aquecimento.96

Figura 51: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das blendas de PHB/PLLA 0/100, na forma de pinos em diferentes tempos de degradação.

Figura 52: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das blendas de PHB/PLLA 30/70, na forma de pinos em diferentes tempos de degradação.

Figura 53: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das blendas de PHB/PLLA 50/50, na forma de pinos em diferentes tempos de degradação.

Figura 54: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das blendas de PHB/PLLA 70/30, na forma de pinos em diferentes tempos de degradação.

Figura 55: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das blendas de PHB/PLLA 100/0, na forma de pinos em diferentes tempos de degradação. 115

Figura 56: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das blendas de PHB/PLLA 0/100, na forma de filmes em diferentes tempos de degradação.

Figura 57: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das blendas de PHB/PLLA 30/70, na forma de filmes em diferentes tempos de degradação.

Figura 58: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das blendas de PHB/PLLA 50/50, na forma de filmes, em diferentes tempos de degradação.

 $\mathbf{x}\mathbf{x}\mathbf{i}\mathbf{v}$ 

Figura 59: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das blendas de PHB/PLLA 70/30, na forma de filmes em diferentes tempos de degradação.

Figura 60: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das blendas de PHB/PLLA 100/0, na forma de filmes em diferentes tempos de degradação.

Figura 61: Curvas do Módulo de Armazenamento (E') e Módulo de Perda (E''),obtidas do DMA, para as blendas PHB/PLLA 0/100 na forma de pinos.121

Figura 62: Curvas do Módulo de Armazenamento (E') e Módulo de Perda (E''),obtidas pelo DMA, para as blendas PHB/PLLA 30/70 na forma de pinos.121

Figura 63: Curvas do Módulo de Armazenamento (E') e Módulo de Perda (E''),obtidas pelo DMA, para as blendas PHB/PLLA 50/50 na forma de pinos.122

Figura 64: Curvas do Módulo de Armazenamento (E') e Módulo de Perda (E''),obtidas pelo DMA, para as blendas PHB/PLLA 70/30 na forma de pinos.122

Figura 65: Curvas do Módulo de Armazenamento (E') e Módulo de Perda (E"),obtidas pelo DMA, para as blendas PHB/PLLA 100/0 na forma de pinos.123

Figura 66: Curvas do Módulo de Armazenamento (E') e Módulo de Perda (E"),obtidas pelo DMA, para as blendas PHB/PLLA 0/100 na forma de filmes.123

Figura 67: Curvas do Módulo de Armazenamento (E') e Módulo de Perda (E"),obtidas pelo DMA, para as blendas PHB/PLLA 30/70 na forma de filmes.124

Figura 68: Curvas do Módulo de Armazenamento (E') e Módulo de Perda (E"),obtidas pelo DMA, para as blendas PHB/PLLA 50/50 na forma de filmes.124

Figura 69: Curvas do Módulo de Armazenamento (E') e Módulo de Perda (E''),obtidas pelo DMA, para as blendas PHB/PLLA 70/30 na forma de filmes.125

Figuras 70: Curvas do Módulo de Armazenamento (E') e Módulo de Perda (E"),obtidas pelo DMA, para a blenda PHB/PLLA 100/0 na forma de filmes.125

Figura 71: Micrografias das superficies das fraturadas das blendas de PHB/PLLA na forma de pinos: (a) 0/100 com 0 meses, (b) 0/100 com 6 meses, (c)50/50 0 meses, (d) 50/50 com 12 meses, (e) 100/0 com 0 meses e (e) 100/0 com 12 meses; ampliação 1000X. 130

Figura 72: Micrografias da análise de SEM de amostras de PLLA puro na forma de filmes (a) superfície da fratura para zero mês de degradação (1500x), (b) superfície da fratura para 10 meses de degradação (1500x) e (c) superfície para 10 meses de degradação (200x).

**Figura 73:** Micrografias da análise de SEM de amostras de PHB/PLLA na forma de filmes (a, b, c) superficie da fratura da blenda 30/70 com 0 e 12 meses de degradação (1500x e 5000x); (d, e, f, g) superficie da fratura da blenda 50/50 com 4, 6 e 10 meses de degradação (1500x e 5000x).

**Figura 74:** Micrografias da análise de SEM de amostras de PHB/PLLA na forma de filmes (a, b, e) superficie da fratura da blenda 70/30 com 0, 10 e 12 meses de degradação (1500x e 5000x); (c, d, f) superficie da fratura da blenda 100/0 com 4, 10 e 12 meses de degradação (1500x e 5000x).

Figura 75: Fotografia comum, com máquina fotográfica digital da amostra PLLApuro na forma de filme após 10 meses de degradação "in vitro".134

Figura 76: Difractogramas para amostras de PLLA na forma de pinos, emdiferentes períodos de degradação, e do PLLA amorfo sem degradar.134

Figura 77: Difractogramas para amostras de PHB/PLLA 50/50 na forma de pinos em diferentes períodos de degradação. 135

Figura 78: Difractogramas para amostras de PHB na forma de pinos emdiferentes períodos de degradação, e do PHB amorfo sem degradar.135

Figura 79: Difractogramas para amostras de PLLA na forma de filmes em diferentes períodos de degradação. 136

Figura 80: Difractogramas para amostras de PHB/PLLA 50/50 na forma de filmes em diferentes períodos de degradação. 136

Figura 81: Difractogramas para amostras de PHB na forma de filmes em diferentes períodos de degradação. 137

Figura 82: Curvas de SAXS para amostras de PLLA na forma de pinos, em diferentes períodos de degradação. 140

Figura 83: Curvas de SAXS para amostras de PHB/PLLA 50/50 na forma de pinos, em diferentes períodos de degradação. 141

Figura 84: Curvas de SAXS para amostras de PHB na forma de pinos, em diferentes períodos de degradação. 141

Figura 85: Curvas de SAXS para amostras de PLLA na forma de filmes, em diferentes períodos de degradação. 142

Figura 86: Curvas de SAXS para amostras de PHB/PLLA 50/50 na forma defilmes, em diferentes períodos de degradação.142

Figura 87: Curvas de SAXS para amostras de PHB na forma de filmes, em diferentes períodos de degradação. 143

Figura 88: Gráfico de Transmitância x comprimento de onda obtido da análise deFT-IR por Reflectância para obter a espessura do filme de PLLA spin-coater.146

Figura 89: Gráfico da análise da medida de espessura do filme de PLLA emlâmina de vidro, medida em um perfilômetro.147

Figura 90: Gráfico obtido do ensaio para cálculo do índice de absortividade molar da HIgG. 148

Figura 91: Gráfico obtido do ensaio para cálculo do índice de absortividade molar da HSA 149

Figura 92: Gráfico obtido do ensaio para cálculo do índice de absortividade molar da HFg. 149

Figura 93: Cinética de adsorção de HSA em PLLA usando o ZnSe comoelemento de reflexão interna.152

Figura 94: Cinética de adsorção de HSA em PHB usando o ZnSe como elemento de reflexão interna. 152

Figura 95: Cinética de adsorção de HSA em PC usando o ZnSe como elemento de reflexão interna. 153

Figura 96: Resultados das análises de adsorção de HIgG em PHB usando a técnica de FT-IR/ATR. 155

Figura 97: Resultados das análises de adsorção de HIgG em PLLA usando a técnica de FT-IR/ATR. 155

Figura 98: Resultados das análises de adsorção de HIgG na blenda PHB/PLLA50/50 usando a técnica de FT-IR/ATR.156

**Figura 99:** Isotermas de adsorção à 37°C de HIgG para os sistemas: PHB/HIgG, PLLA/HIgG e PHB/PLLA 50/50/HIgG. 159

Figura 100: Resultados da análise de adsorção de HSA em PHB usando a técnica de FT-IR (ATR).

Figura 101: Resultados da análise de adsorção de HSA em PLLA usando a técnica de FT-IR (ATR).

Figura 102: Isotermas de adsorção à 37°C de HSA para os sistemas: PHB/HSA e PLLA/HSA.

Figura 103: Resultados da análise de adsorção de HFg em PHB usando a técnica de FT-IR (ATR) 165

Figura 104: Resultados da análise de adsorção de HFg em PLLA usando a técnica de FT-IR (ATR) 166

Figura 105: Curva de calibração da HSA feita através de análises em Eletroforese Capilar.

Figura 106: Eletroferograma da análise da proteína adsorvida nos sistemasPHB/HSA e PLLA/HSA 15 mg/mL de solução protéica.167

Figura 107: Isotermas de adsorção à 37°C de HSA para os sistemas: PHB/HSA e PLLA/HSA. 169

**Figura 108:** Micrografias das análises de SEM, de amostras de PHB na forma de pinos: (a) PHB antes da adsorção, (b) PHB após a adsorção de HSA, (c) PHB após a adsorção de HIgG, e (d) PHB após a adsorção de HFg, (ampliação de 1000X). 171

**Tabela 1**: Requisitos necessários ao biomaterial (DIMITRIU, 1994)06

**Tabela 2:** Polímeros empregados na área médica (DIMITRIU, 1994)06

Tabela 3: Propriedades térmicas e mecânicas do PLA e PHB (DIMITRIU,1994)

Tabela 4: As principais vantagens de utilização do FTIR-ATR sobre outrastécnicas de análise (FINK, 1986)18

**Tabela 5:** Informações gerais sobre espectros de proteínas (GENDRAU, 1986)19

**Tabela 6:** Representação dos períodos de degradação para as amostras.44

Tabela 7: Parâmetros empregados para a análise de DMA das amostras na formade: filmes (obtidas pelo método de solvente - casting) e pinos.46

Tabela 8: Valores de temperatura de transição vítrea (Tg), temperatura de cristalização (Tc), temperatura de fusão(Tf), entalpias de fusão ( $\Delta$ Hf) e cristalização ( $\Delta$ Hc), e grau de cristalinidade (%χc); obtidos do primeiro e segundo aquecimento da análise de MTDSC, para as blendas PHB/PLLA 0/100, 30/70, 50/50, 70/30 e 100/0, na forma de pinos.

**Tabela 9:** Valores de temperatura de transição vítrea (Tg), temperatura de cristalização (Tc), temperatura de fusão (Tf), entalpias de fusão ( $\Delta$ Hf) e cristalização ( $\Delta$ Hc), e grau de cristalinidade (% $\chi$ c); obtidos do primeiro e segundo aquecimento da análise de MTDSC, para as blendas PHB/PLLA 0/100, 30/70, 50/50, 70/30 e 100/0, na forma de filmes.

Tabela 10: Dados da temperatura inicial de perda de massa (T on set), temperaturade máxima perda de massa (T peak) e porcentagem de perada de massa (%), obtidos daanálise de TGA para as blendas PHB/PLLA, na forma de pinos e filmes.67

**Tabela 11:** Dados de temperatura de transição vítrea (Tg) obtidos à partir dascurvas do módulo de perda da análise (E") e da tangente  $\delta$ , da análise de DMA das blendasPHB/PLLA na forma de pinos e filmes.72

Tabela 12: Resultados do grau de cristalinidade calculados pela equação 25, apartir dos resultados das análises de WAXS para as blendas PHB/PLLA 0/100, 50/50 e100/0, na forma de pinos e filmes.78

xxix

Tabela 13: Valores da Largura à meia altura (FWHM) obtidos da análise deWAXS para as amostras de PHB/PLLA em várias concentrações na forma de pinos efilmes.78

Tabela 14: Resultados do período longo calculados pela equação 13, a partir dosresultados das análises de SAXS para as blendas PHB/PLLA 0/100, 50/50 e 100/0.82

Tabela 15: Dados de: tensão máxima ( $\sigma$  max.), módulo de Young (E) ealongamento máximo ( $\varsigma$  max.) à partir do ensaio mecânico de flexão para as blendasPHB/PLLA 0/100, 30/70, 50/50, 70/30 e 100/0.85

**Tabela 16:** Valores de tensão máxima ( $\sigma$  max.): experimentais e da literatura. 85

Tabela 17: Dados de Temperatura de Transição Vítrea (Tg), de Cristalização (Tc),de Fusão (Tf), Entalpias de Cristalização ( $\Delta$ Hc), de Fusão ( $\Delta$ Hf) e Grau de Cristalização( $\chi$ c), obtidos da análise de MDSC, para pinos de PHB/PLLA 0/100.97

Tabela 18: Dados de Temperatura de Transição Vítrea (Tg), de Cristalização (Tc),de Fusão (Tf), Entalpias de Cristalização ( $\Delta$ Hc), de Fusão ( $\Delta$ Hf) e Grau de Cristalização( $\chi$ c), obtidos da análise de MDSC, para pinos de PHB/PLLA 30/70.98

**Tabela 19:** Dados de Temperatura de Transição Vítrea (Tg), de Cristalização (Tc), de Fusão (Tf), Entalpias de Cristalização ( $\Delta$ Hc), de Fusão ( $\Delta$ Hf) e Grau de Cristalização ( $\chi$ c), obtidos da análise de MDSC, para pinos de PHB/PLLA 50/50. 99

**Tabela 20:** Dados de Temperatura de Transição Vítrea (Tg), de Cristalização (Tc),de Fusão (Tf), Entalpias de Cristalização ( $\Delta$ Hc), de Fusão ( $\Delta$ Hf) e Grau de Cristalização( $\chi$ c), obtidos da análise de MDSC, para pinos de PHB/PLLA 70/30.100

**Tabela 21:** Dados de Temperatura de Transição Vitrea (Tg), de Cristalização (Tc), de Fusão (Tf), Entalpias de Cristalização ( $\Delta$ Hc), de Fusão ( $\Delta$ Hf) e Grau de Cristalização ( $\chi$ c), obtidos da análise de MDSC, para pinos de PHB/PLLA 100/0.

Tabela 22: Dados de Temperatura de Transição Vítrea (Tg), de Cristalização (Tc),de Fusão (Tf), Entalpias de Cristalização ( $\Delta$ Hc), de Fusão ( $\Delta$ Hf) e Grau de Cristalização( $\chi$ c), obtidos da análise de MDSC, para filmes de PHB/PLLA 0/100.102

Tabela 23: Dados de Temperatura de Transição Vítrea (Tg), de Cristalização (Tc),de Fusão (Tf), Entalpias de Cristalização ( $\Delta$ Hc), de Fusão ( $\Delta$ Hf) e Grau de Cristalização( $\chi$ c), obtidos da análise de MDSC, para filmes de PHB/PLLA 30/70.103

**Tabela 24:** Dados de Temperatura de Transição Vítrea (Tg), de Cristalização (Tc), de Fusão (Tf), Entalpias de Cristalização ( $\Delta$ Hc), de Fusão ( $\Delta$ Hf) e Grau de Cristalização ( $\chi$ c), obtidos da análise de MDSC, para filmes de PHB/PLLA 50/50. 104

Tabela 25: Dados de Temperatura de Transição Vítrea (Tg), de Cristalização (Tc),de Fusão (Tf), Entalpias de Cristalização ( $\Delta$ Hc), de Fusão ( $\Delta$ Hf) e Grau de Cristalização( $\chi$ c), obtidos da análise de MDSC, para filmes de PHB/PLLA 70/30.105

**Tabela 26:** Dados de Temperatura de Transição Vítrea (Tg), de Cristalização (Tc),de Fusão (Tf), Entalpias de Cristalização ( $\Delta$ Hc), de Fusão ( $\Delta$ Hf) e Grau de Cristalização( $\chi$ c), obtidos da análise de MDSC, para filmes de PHB/PLLA 100/0.106

Tabela 27: Resultados de massa molar (Mw), número molar (Mn), viscosidademolar (Mz) e índice de polidispersividade (Mw/Mn) obtidos da análise de GPC paraamostras na forma de pinos111

Tabela 28: Valores das temperaturas de início (T on set) e máxima (T peak) deperda de massa e % de perda de massa para as blendas PHB./PLLA na forma de pinos, emdiferentes tempos de degradação "*in vitro*".118

**Tabela 29:** Valores das temperaturas de início (T on set) e máxima (T peak) deperda de massa e % de perda de massa para as blendas PHB./PLLA na forma de filmes, emdiferentes tempos de degradação "*in vitro*".119

**Tabela 30:** Temperaturas de Transição Vítrea (Tg) obtidas por DMA, nas curvas de Módulo de Perda (E") e *damping* (tan  $\delta$ ), para as blendas PHB/PLLA na forma de pinos. 126

**Tabela 31:** Temperaturas de Transição Vítrea (Tg) obtidas por DMA, nas curvas de Módulo de Perda (E") e *damping* (tan  $\delta$ ), para as blendas PHB/PLLA na forma de filmes. 127

Tabela 32: Resultados do grau de cristalinidade calculado pela equação 14, apartir dos resultados da análise de WAXS para as blendas PHB/PLLA na forma de pinos,em diferentes períodos de degradação hidrolítica.137

Tabela 33: Resultados do grau de cristalinidade calculado pela equação 14, apartir dos resultados da análise de WAXS para as blendas PHB/PLLA na forma de filmes,em diferentes períodos de degradação hidrolítica.138

xxxi

Tabela 34: Valores de Largura à meia altura (FWHF) de alguns picoscaracterísticos da cristalização do PHB e do PLLA para amostras na forma de pinos.138

Tabela 35: Valores de Largura à meia altura (FWHF) de alguns picoscaracterísticos da cristalização do PHB e do PLLA para amostras na forma de filmes.139

Tabela 36: Resultados do período longo (L), obtidos a partir dos resultados daanálise de SAXS para as blendas PHB/PLLA na forma de pinos, em diferentes períodos dedegradação hidrolítica.143

Tabela 37: Resultados do período longo (L), obtidos a partir dos resultados daanálise de SAXS para as blendas PHB/PLLA na forma de filmes, em diferentes períodos dedegradação hidrolítica.144

Tabela 38: Resultados dos índices de absortividade molar das proteínas; obtidosexperimentalmente e da literatura (SINGH, 1999).148

Tabela 39: Resultados da área e densidade de adsorção dos experimentos deadsorção de HIgG em PHB.156

Tabela 40: Resultados da área e densidade de adsorção dos experimentos deadsorção de HIgG em PLLA.157

Tabela 41: Resultados da área e densidade de adsorção dos experimentos deadsorção de HIgG na blenda PHB/PLLA 50/50.157

Tabela 42:Valores dos parâmetros:  $\Gamma_{max}$  (densidade máxima de proteínaadsorvida por unidade de área) e  $K_d$  (a constante de dissociação referente a adsorção daproteína nos materiais) obtidos a partir da linerização do modelo de Langmuir.159

Tabela 43: Resultados da área e densidade de adsorção dos experimentos deadsorção de HSA em PHB.160

Tabela 44: Resultados da área e densidade de adsorção dos experimentos deadsorção de HSA em PLLA.161

Tabela 45: Valores dos parâmetros:  $\Gamma_{max}$  (densidade máxima de proteínaadsorvida por unidade de área) e  $K_d$  (a constante de dissociação referente a adsorção daproteína nos materiais) obtidos a partir da linerização do modelo de Langmuir.163

xxxii

Tabela 46: Resultados da área e densidade de adsorção dos experimentos deadsorção de HFg em PHB.165

Tabela 47: Resultados da área e densidade de adsorção dos experimentos deadsorção de HFg em PLLA.165

Tabela 48: Resultados obtidos do ensaio de adsorção de HSA em PLLAanalisados por eletroforese capilar.167

Tabela 49: Resultados obtidos do ensaio de adsorção de HSA em PHB analisadospor eletroforese capilar.168

**Tabela 50:** Valores dos parâmetros:  $\Gamma_{max}$  (densidade máxima de proteína adsorvida por unidade de área) e  $K_d$  (a constante de dissociação referente a adsorção da proteína nos materiais) obtidos a partir da linerização do modelo de Langmuir. 170

**Tabela 51:** Valores de  $\Gamma$  (densidade de proteína adsorvida),  $\Gamma_{max}$  (densidade máxima de proteína adsorvida) e K<sub>d</sub> (constante de dissociação referente a adsorção da proteína nos materiais), para os sistemas analisados por FT-IR (ATR) e E C. 170

Letras Latinas

A – absorbância integrada	
Aa – área do halo amorfo	
Ac – área dos picos cristalino	
$C^*$ - concentração de equilíbrio de proteína em solução	[mg/mL]
Cb - concentração da solução protéica	[mg/mL; mol/L]
D – diâmetro	[mm]
de – caminho óptico efetivo	[mm]
dp – profundidade de penetração da radiação infravermelho	[nm; mm]
E – módulo de Young	[MPa]
E'- módulo de armazenamento	[MPa]
E"- módulo de perda	[MPa]
F – força	[N]
I – intensidade de espalhamento	[adimensional]
K <sub>d</sub> – constante de dissociação	[adimensional]
L – período longo	[nm]
L <sub>0</sub> - distância entre as extremidades de apoio	[mm]
la – lamela amorfa	[nm]
lc – lamela cristalina	[nm]
$n_1$ – índice de refração do cristal	[adimensional]
n <sub>2</sub> – indice de refração da amostra	[adimensional]
q – magnitude do vetor espalhamento	[adimensional]
T – temperatura	[°C]
T on set - temperatura de início de perda de massa	[°C]
T peak – temperatura de máxima perda de massa	[°C]
Tc – temperatura de cristalização	[°C]
Tf – temperatura de fusão	[°C]
Tg - temperatura de transição vítrea	[°C]
w – porcentagem em peso	[%]
Y – deformação	[mm]

### Letras Gregas

ς - alongamento	[mm]
θ - ângulo	[°]
$\lambda$ - comprimento de onda	[cm; nm]
Γ - densidade de adsorção	[µg/cm <sup>2</sup> ]
$\Gamma_{max}$ – densidade máxima de adsorção	[µg/cm <sup>2</sup> ]
ε - absortividade molar	[L/mol.cm <sup>2</sup> ]
σ - tensão	[MPa]
$\chi_{\rm C}$ – grau de cristalinidade	[%]
$\Delta$ Hc – variação de entalpia de cristalização	[J/g]
$\Delta$ Hf – variação de entalpia de fusão	[J/g]
$\tan \delta$ - <i>damping</i> (fator de perda)	[adimensional]

#### Abreviações

- ATR- reflectância total atenuada
- DMA análise dinâmico mecânica
- EC eletroforese capilar
- FT-IR infravermelho por transformada de Fourier
- Ge germânio
- GPC cromatografia de permeação em gel
- HFIP hexafluorisopropanol
- HFg fibrinogênio humano
- HIgG -- imunoglobulina G humana
- HSA albumina humana
- IRE elemento de reflexão interna
- MDSC calorimetria diferencial de varredura modulada
- PBS solução tampão fosfato salino
- PC policarbonato
- PHB poli( $\beta$ -hidroxibutirato)
- PLLA poli(L-ácido láctico)
- SAXS espalhamento de raio-X à baixos ângulos

XXXV

SEM – microscopia eletrônica de varredura

TGA – análise termogravimétrica

WAXS – difração de raio-X

ZnSe - seleneto de zinco

FWHM – largura à meia altura

# **CAPÍTULO I**

#### INTRODUÇÃO

O uso de polímeros na área médica coincide com o avanço das pesquisas dos mesmos. Praticamente todo polímero sintético recém descoberto encontrou sua função em estudos de experimentação cirúrgica logo após sua descoberta, e muitos perduraram tornando-se rotina em prática clínica. Suturas de Nylon foram reportadas no princípio da década de 40 e artigos de revisão para uso de polímeros como o nylon, poli(metilmetacrilato) (PMMA), *Dracon polyester* e policloreto de vinila em cirurgia, começaram a aparecer em conceituados jornais médicos na metade da década de 40 (GRIFFITH, 2000).

Esses polímeros tornaram-se importantes na medicina como componentes essenciais de dispositivos de próteses permanentes incluindo implantes de quadris, lentes artificiais, enxertos vasculares, cateteres, etc. As pesquisas continuam otimizando a estabilidade e desempenho dos polímeros para utilização na área médica (GRIFFITH, 2000).

Devido a esse crescente avanço nas pesquisas em busca por materiais para uso médico percebeu-se a necessidade de se definir um termo para tais, que passaram a ser conhecidos como biomateriais (material sintético utilizado para substituir partes de um sistema vivo ou estar em contato íntimo com um tecido biológico vivo).

Estima-se que o mercado mundial associado aos biomaterias envolve atualmente aproximadamente 35 bilhões de dólares anuais, com perspectiva de crescimento de 11% ao ano demonstrando, assim, o interesse e a necessidade por este tipo de produto (ORÉFICE, 1995).

No caso nacional grande parcela dos biomateriais usados são importados, agravando mais ainda a questão da saúde pública; assim, faz-se necessário o

1

desenvolvimento científico e tecnológico brasileiro na área de biomateriais, a fim de melhorar o atendimento à saúde pública e diminuir seus gastos (ORÉFICE, 1995).

Ao longo das últimas décadas implantes biorreabsorvíveis têm sido experimentados e utilizados em muitos procedimentos cirúrgicos, como por exemplo, fixação de fraturas, substituição óssea, reparo de cartilagem, entre outros. Dependendo dos componentes do polímero, esses materiais são modelados a fim de apresentar propriedades funcionais adequadas para cada utilização, sendo que as propriedades do polímero resultam da associação de fatores mecânicos, térmicos e viscoelásticos (YUEHUEI, 2000).

Porém, a utilização de biomateriais em alguns casos apresenta interações adversas entre a superficie do material e os componentes do sangue levando em geral à formação de coágulos, os quais podem obstruir a circulação sangüínea ocasionando sérias lesões e até mesmo a morte. O processo de formação de coágulos sangüíneos é precedido pela adesão e ativação de plaquetas, que por sua vez é precedida pela adsorção de proteínas do sangue na superficie do biomaterial. As interações entre biomateriais e proteínas ocorrem devido à grande diversidade de características superficiais apresentadas pelas proteínas (ROSA, 1998).

Assim, além do grande interesse em pesquisas por novos biomateriais verifica-se, também, aumento das pesquisas para se estudar a adsorção de proteínas do sangue humano na superfície destes materiais com o intuito de prever possíveis interações adversas na interface do sistema material/fluido biológico.

Neste trabalho descreve-se a preparação e caracterização de blendas biorreabsorvíveis de poli( $\beta$ -hidroxibutirato) (PHB) / poli(L-ácido láctico) (PLLA), bem como os estudos de degradação hidrolítica e de adsorção de proteínas do sangue humano na superfície destas blendas. Optou-se pela blenda PHB/PLLA com o intuito de melhorar as propriedades mecânicas do PLLA durante a degradação, já que este material perde rapidamente suas propriedades mecânicas quando degrada. Assim, optou-se por misturar PLLA com PHB que apresenta propriedades mecânicas inferiores, mas consegue mantê-las durante o processo de degradação. A relevância deste estudo reside no fato de que o desenvolvimento de novos biomateriais representa possibilidade de aplicação na área médica, contribuindo para o avanço da tecnologia de implantes temporários e melhorando a qualidade de vida de futuros pacientes.

# **CAPÍTULO ΙΙ**

### **OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho foi preparar, caracterizar, estudar a degradação "in vitro" e a adsorção de proteínas sobre as blendas biorreabsorvíveis, Poli(β-hidroxibutirato) (PHB) / Poli (L-ácido láctico) (PLLA), visando contribuir com o avanço da tecnologia de implantes temporários.

O assunto foi abordado pelo estudo dos aspectos apresentados no diagrama abaixo:



## **CAPÍTULO III**

# **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### 3.1. Biomateriais: definição e aplicações

A NIH *Consensus Development Conference* de 1982 define: "biomaterial é toda e qualquer substância ou combinação de substâncias, que não fármacos, de natureza sintética ou natural que pode ser utilizada por qualquer período de tempo, como um todo ou parte do sistema, para aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo" (WILLIAMS, 1987).

A definição adotada na *Consensus Conference of the European Society for Biomaterials*, mais simplificada, define biomaterial como: "todo material não vivo, usado em dispositivo médico ou biomédico, objetivando interação com o sistema biológico" (WILLIAMS, 1987).

Outra definição de biomaterial dada pela junta Consultiva de Biomateriais da Universidade de Clemson – Estados Unidos, define: "biomaterial como uma substância sistematica e farmacologicamente inerte desenhada para ser implantada, dentro ou incorporada a um sistema vivo" (PARK, 1992).

O conceito de biocompatibilidade se resume na habilidade de um material para induzir no hospedeiro uma resposta adequada a uma aplicação específica (WILLIAMS, 1987). A biocompatibilidade inclui fenômenos biológicos, tais como a resposta imunológica, carcinogenicidade e trombogenicidade (VERT, 1992).

Os biomateriais podem ser: (a) naturais: colágeno, fibras de proteínas (seda, lã e pêlo), polissacarídeos (algodão e celulose); ou (b) sintéticos: metais, cerâmica e polímeros, sendo que os sintéticos são denominados de materiais biomédicos. A primeira aplicação de um material biomédico foi em 1550, utilização de fio de ouro como sutura (LYMAN, 1989).

Porém, a utilização dos biomateriais só se tornou efetiva após o conhecimento de técnicas cirúrgicas assépticas, desenvolvidas por Lister nos anos 1860 (PARK, 1992). Em procedimentos cirúrgicos mais adiantados, os biomateriais geralmente eram mal sucedidos em conseqüência de infecções. A infecção tende a ser agravada na presença dos biomateriais, desde que o implante possa fornecer uma região inacessível às células competentes do sistema imunológico do corpo.

Estudos básicos sobre biomateriais foram iniciados recentemente. Um dos primeiros estudos foi proposto e patrocinado pelo Instituto Nacional do Coração e Pulmão (EUA) na década de 60, com o intuito de obter um material polimérico compatível com o sangue para ser empregado em coração artificial. A partir daí muitas propostas foram feitas a fim de conseguir materiais para serem utilizados em cirurgia cardiovascular e membranas de hemodiálise entre outras aplicações (TANZAWA, 1993).

#### 3.1.1. Polímeros como Biomateriais: Funcionalidade e Biocompatibilidade

A pesquisa de polímeros naturais e sintéticos tem despertado grande interesse visando aplicações nas áreas médica e odontológica. Devido às suas inúmeras propriedades, esses materiais abrangem um grande número de aplicações, tais como: materiais para implantes, liberação controlada de fármacos, bem como artigos para uso cirúrgico, fazendo parte da classe dos biomateriais.

A Tabela 1 mostra requisitos necessários ao biomaterial, para satisfazer a NIH, e os padrões citados acima. Apesar da grande quantidade de materiais que já vem sendo empregada na área médica (Tabela 2) os padrões de biocompatibilidade e propriedades mecânicas requeridos para os biomateriais, têm restringido bastante a aplicação destes (DIMITRIU, 1994).

Praticabilidade funcional	A função do tecido ou órgão deve ser garantida mesmo por tempo prolongado.
Bioestabilidade	O meio biológico não deve prejudicar a funcionalidade do biomaterial
Biocompatibilidade	O biomaterial não deve provocar distúrbios ao sistema biológico.
Esterilizável	O processo de esterilização não deve prejudicar a funcionalidade do biomaterial.

Tabela 1: Requisitos necessários ao biomaterial (DIMITRIU, 1994)

Tabela 2: Polímeros empregados na área médica (DIMITRIU, 1994)

Polímeros	Área de uso
Polietileno de baixa densidade	Cirurgia reconstrutiva
Polietileno, de massa molecular ultra alta	Ortopédica
Borracha de silicone	Cirurgia plástica e ortopédica
Poliacetais	Ortopédica
Resina epóxi (compósitos)	Ortopédica
Poliésteres	Cardiovascular
Poliácido láctico	Suturas
Poliácido glicólico	Suturas
Hidrogéis	Oftálmica

Desta forma pode-se dividir tais requisitos em duas propriedades mais abrangentes: (i) funcionalidade e (ii) biocompatibilidade. A primeira pode ser alcançada por escolha ou confecção de um material adequado e a segunda através da modificação superficial do material.

Dentro da classe dos biomateriais destacam-se os poli( $\alpha$ -hidroxiácidos) que são polímeros biorreabsorvíveis cuja principal característica é a degradação por hidrólise, gerando produtos absorvíveis pelo organismo (ANGELOVA, 1999).

#### 3.1.2. Polímeros Biorreabsorvíveis e Funcionalidade

Como já foi dito no item anterior são polímeros que sofrem decomposição dentro de organismos, e seus produtos de decomposição podem ser metabolizados e excretados pelo organismo. Porém, materiais cujos produtos de degradação permanecem por um período muito longo no organismo vivo não podem ser utilizados.
### Capítulo III – Revisão Bibliográfica

A degradação destes materiais pode ocorrer por meio de várias reações: oxidação, redução, eliminação, isomerização e outras, por ação de enzimas ou não. A biorreabsorção de polímeros é dividida em dois estágios: decomposição e absorção. Somente polímeros constituídos por ligações metabólicas ou seus análogos com ligações hidrolizáveis são biorreabsorvíveis (KIMURA, 1993).

Atualmente os poli( $\alpha$ -hidroxiácidos) que são poliésteres alifáticos derivados de ácido glicólico, D,L- e L-ácido láctico,  $\beta$ -hidroxibutirato e  $\epsilon$ -caprolactana, são os polímeros que mais tem encontrado aplicações na área biomédica como polímeros biorreabsorvíveis para prótese e liberação controlada de fármacos (ZHANG, 1995), (IGNATIUS, 1996), (ELST, 1996). A melhoria em algumas propriedades destes materiais, como permeabilidade, taxa de biodegradação, propriedades de tensão, têm sido alcançadas por copolimerização de poliésteres e poli(éter-éster)s (ZHANG, 1995), (ELST, 1996).

Como já foi visto o biomaterial deve ser funcional, ou seja, possuir propriedades desejáveis para uma aplicação específica. Para que um material alcance tal característica este deverá apresentar propriedades mecânicas, químicas, físicas, térmicas, entre outras, que satisfaçam as necessidades da aplicação.

De modo geral são conhecidos como materiais de alto desempenho que podem ser conseguidos através da mistura física de, pelo menos, dois polímeros conhecidos, pretendendo-se com isso combinar as melhores propriedades destes materiais para se alcançar propriedades desejadas. Esta técnica é, financeiramente, mais viável e rápida do que a pesquisa e o desenvolvimento de um novo polímero (ULTRACKI, 1989).

O estudo de misturas poliméricas a partir de polímeros biorreabsorvíveis ou hidroliticamente instáveis tem atraído muita atenção como sendo uma possibilidade de obter novos materiais para uso biomédico, devido à facilidade que eles apresentam de modificação em suas propriedades e características de degradação (NIJENHUIS, 1996).

### 3.1.3. A Degradação dos Polímeros Biorreabsorvíveis

A hidrólise química de cadeias hidroliticamente instáveis é o principal mecanismo na degradação polimérica (MIDDLETON, 2000). O primeiro evento mensurável na degradação dos poli( $\alpha$ -hidroxi ésteres) é a perda de resistência mecânica devido ao decréscimo da massa molar. As cadeias poliméricas são solúveis no fluido extracelular quando a massa molar está abaixo de 7000 Daltons. Neste caso o material possui resistência mecânica muito baixa e o polímero começa a fragmentar-se devido à tensão mecânica local (WAKE, 1998).

Para polímeros semicristalinos a degradação ocorre em duas fases. Na primeira fase, a água penetra a superficie do dispositivo, atacando preferencialmente as cadeias químicas da fase amorfa e convertendo longas cadeias poliméricas em cadeias menores, e finalmente em fragmentos solúveis. Devido a isso, ocorre inicialmente uma redução na massa molar da fase amorfa sem a perda das propriedades físicas. Em seguida inicia-se a perda das propriedades físicas e a água começa a fragmentar o dispositivo. Na segunda fase, ocorre o ataque enzimático aos fragmentos. A metabolização dos fragmentos resulta em uma rápida perda de massa polimérica (MIDDLETON, 2000).

A degradação de polímeros "in vivo" difere da degradação "in vitro", principalmente porque "in vivo" o implante está submetido a esforços mecânicos. Alguns fatores que contribuem para a degradação, resultando em gás carbônico e água, representam importante papel tanto na degradação "in vitro" como na "in vivo". A taxa de degradação do polímero "in vitro" e "in vivo" depende não somente da composição química, mas também do tamanho, forma, e da superfície do implante. Estes são fatores que podem ser sistematicamente variados e avaliados nas situações de teste "in vitro". As propriedades específicas, tais como, massa molar inicial, distribuição de massa molar, grau de cristalinidade e taticidade podem ser controladas e avaliadas antes da implantação ou do teste de degradação em solução tampão (ELST, 1996).

Os fatores que influenciam na degradação que não podem ser controlados e os quais certamente causam diferenças entre a degradação "in vitro" e "in vivo", são as respostas do hospedeiro ao material implantado. Num implante ósseo, por exemplo, as habilidades de cicatrização de um implante individual e a capacidade de tamponamento do hospedeiro são dois dos muitos fatores que influenciam os resultados da osteosíntese usando implantes biodegradáveis. Além disso, a biocompatibilidade do fixador da fratura implantado está relacionada ao tamanho do implante e ao sistema imunológico do hospedeiro. Estes mecanismos de defesa diferem em cada espécie e ainda em cada indivíduo de uma mesma espécie (ELST, 1996).

8

#### 3.1.4. Poliácido láctico - PLA

O ácido láctico (lactatos) é uma substância natural muito empregada em alimentos como agente conservante e flavorizante e, também, é o principal bloco de construção na síntese química dos polímeros da família dos polilactídeos. O ácido láctico pode ser sintetizado quimicamente, mas geralmente é produzido por fermentação microbiológica de açúcares como a glicose e hexose sendo que este suprimento de açúcar pode ser: derivado de casca de batatas, cereais e resíduos lácticos. O monômero produzido por fermentação é utilizado para a preparação dos polímeros polilactídeos (GAJRIA, 1996).

A Figura 1 apresenta a estrutura molecular do poliácido láctico.



Figura 1: Estrutura molecular das duas formas opticamente ativas do Poliácido láctico.

O ácido láctico existe em duas formas estereoisoméricas, as quais proporcionam a formação de quatro polímeros morfologicamente distintos; os poli(ácido láctico)s (PLA)s D-PLA e L-PLA que são as duas formas estereoregulares, o D,L-PLA que é um polímero racêmico obtido da mistura de D- e L-ácido láctico, e meso-PLA que pode ser obtido do D,L-lactídeo (GAJRIA, 1996), (KIMURA, 1993). A cristalinidade dos polímeros, fator importante na biodegradação, varia com a estereoregularidade do polímero (DIMITRIU, 1994). Os polímeros obtidos dos monômeros D e L opticamente ativos são semicristalinos, mas o D,L-PLA opticamente inativo é amorfo (GAJRIA, 1996).

Os fatores que podem afetar a degradação dos lactatos incluem estrutura química e configuracional, distribuição e massa molar, condições de fabricação, local de implantação,

fatores físicos e condições de degradação. A degradação de polímeros semicristalinos se processa por hidrólise primeiro na região amorfa e, depois, na cristalina (DIMITRIU, 1994).

O ácido láctico possui um grupo hidroxílico e um grupo carboxílico podendo ser facilmente convertido em poliéster. Algumas das vantagens destes polímeros são: alta resistência mecânica, comportamento termoplástico, biocompatibilidade, sensibilidade à água, visto que se degradam lentamente comparados com os polímeros solúveis que incham na água (GAJRIA, 1996). Como exemplo de aplicação pode-se citar o poli(L-lactídeo) (PLLA) semicristalino que tem sido utilizado em tecidos para fixação temporária com boa resistência mecânica (ZHANG, 1993).

#### 3.1.5. Polihidroxibutirato - PHB

O poli(hidroxibutirato) (PHB) é um polímero termoplástico biorreabsorvível produzido pela bactéria "Alcaligenes eutrophus". Este polímero possui temperatura de fusão (Tm) em torno de 180°C, é altamente cristalino e frágil. O PHB tem atraído a atenção industrial, por ser um plástico degradável no meio ambiente, para várias aplicações na agricultura, marinha e aplicações médicas (KOYAMA, 1995) e possui uma velocidade de hidrólise não enzimática bastante pequena (KOYAMA, 1997). A Figura 2 mostra a estrutura molecular do PHB.



Figura 2: Estrutura molecular do Polihidroxibutirato.

Na Tabela 3 pode-se verificar as propriedades térmicas e mecânicas do PLA e do PHB, obtidas da literatura (DIMITRIU, 1994).

Polímero	Mw	Tg (°C)	Tm (°C)	Resistên cia à tração na ruuptura (MPa)	Módulo (MPa)	% Alongamento "Yield"	% Alongamento (Quebra)
L-PLA	50.000	54	170	28	1200	3,7	6,0
L-PLA	100.000	58	159	50	2700	2,6	3,3
L-PLA	300.00	59	178	48	3000	1,8	2,0
DL-PLA	107,000	51		29	1900	4,0	5,0
PHB	370.000	1	171	36	2500	2,2	2,5

Tabela 3: Propriedades térmicas e mecânicas do PLA e PHB (DIMITRIU, 1994)

## 3.1.6. Mistura PLA/PHB

Koyama e Doi estudaram a miscibilidade, morfologia e biodegradabilidade da mistura PLA(amorfo)/PHB preparada em solução com clorofórmio, em várias concentrações. Os resultados obtidos foram: uma única Tg (temperatura de transição vítrea) para todas as composições estudadas, para a cinética de cristalização observou-se um decréscimo na taxa de crescimento dos esferulitos de PHB com o aumento da concentração de PLA e, os esferulitos de PHB preenchiam todo o volume do filme indicando a inclusão do PLA amorfo dentro dos esferulitos. Os autores indicam que estes resultados sugerem que a mistura é miscível nos estados cristalino e amorfo. Quanto à hidrólise enzimática os resultados mostram que a taxa de erosão enzimática da superfície decresce com o aumento da concentração de PLA no filme. Na hidrólise simples sem enzima observaram que a cisão hidrolítica da cadeia de PHB foi acelerada na presença de PLA, indicando efeito catalítico neste processo por parte do PLA (KOYAMA E DOI, 1995).

Este mesmo grupo tem um outro estudo da miscibilidade desta mistura preparada também em solução; porém, tal miscibilidade é verificada usando PHB (Mw = 650.000) e PLA de várias massas molares (Mw variando de 9.900 a 530.000). Como resultado estes pesquisadores encontraram que a miscibilidade depende fortemente da massa molar do PLA. Eles obtiveram através da análise de DSC uma única Tg para mistura com PLA de Mw abaixo de 18.000, sendo que a Tg aumenta com o aumento de Mw do PLA e para valores de Mw acima de 20.000 obtiveram duas Tg's, sugerindo uma separação bifásica no estado fundido (KOYAMA E DOI, 1997).

Este mesmo resultado também foi verificado por Blüm & Owen que estudaram a estrutura esferulítica e o comportamento de fusão da mistura PLA/PHB, empregando um

PHB de Mn = 222.000. Eles encontraram miscibilidade para a mistura com Mn de PLA abaixo de 1.759 e um sistema bifásico para Mn acima de 159.400 (BLÜM, 1995).

## 3.1.7. Biocompatibilidade

Como já foi visto biocompatibilidade pode ser definida como a habilidade de um material ter um desempenho satisfatório quando em contato com o organismo vivo, com resposta apropriada do tecido hospedeiro, para uma aplicação específica (WILLIAMS, 1987).

Portanto, a biocompatibilidade é uma característica essencial do biomaterial para a segurança do artigo médico. Na Figura 3 tem-se uma visão geral a respeito da biocompatibilidade (TANZAWA, 1993).



Figura 3: Diagrama geral sobre a biocompatibilidade (TANZAWA, 1993).

A resposta natural de um sistema biológico na presença de um corpo estranho é a rejeição. O sistema alcança este objetivo pelo desencadeamento de uma série de reações celulares. A natureza destas reações varia dependendo das propriedades macroscópicas e

microscópicas do implante, por exemplo; tamanho, forma, natureza da superficie do implante e local do implante (DIMITRIU, 1994).

Assim, os biomateriais devem ser biocompatíveis para realizarem suas funções sem provocar reações adversas ao sistema biológico (KULIK, 1996). Para haver tal biocompatibilidade o material deve possuir uma série de características (PINTO, 1993):

- não destruir ou sensibilizar elementos celulares do sangue,
- não alterar as proteínas plasmáticas,
- não causar respostas imunes diversas,
- não induzir à carcinogenicidade ou mutagenicidade,
- não produzir reações tóxicas ou alérgicas,
- não dizimar eletrólitos,
- não ser adversamente afetado pela esterilização,
- apresentar estabilidade no ambiente fisiológico.

É essencial, portanto, que os materiais empregados sejam biocompatíveis com o sistema biológico no qual são inseridos, já que uma vez em contato com o sangue e fluidos corporais, o material não poderá liberar substâncias, tais como plastificantes, que possam ser tóxicas, carcinogênicas, ativadoras da coagulação sangüínea e, promotoras de respostas inflamatórias.

### 3.2. O Sangue e suas Proteínas

O sangue é definido como um tecido que circula num sistema virtualmente fechado de vasos e é formado por elementos sólidos (glóbulos vermelhos, brancos e plaquetas) em suspensão num meio líquido, o plasma (HARPER, 1971).

## 3.2.1. Proteínas Plasmáticas

O teor de proteínas no plasma é de, aproximadamente, 7 a 7,5 g/100 mL; correspondendo a maior parte dos sólidos do plasma. Estas proteínas compreendem proteínas simples e conjugadas como glicoproteínas e vários tipos de lipoproteínas. As

proteínas plasmáticas são separadas em três grupos principais: fibrinogênio, albumina e globulina (HARPER, 1971).

<u>Fibrinogênio</u>: participa da cascata de coagulação sangüínea sendo o precursor da fibrina, a substância do coágulo sangüíneo, é uma molécula assimétrica muito alongada, com uma relação axial de cerca de 20:1 (Figura 4). Sua massa molar varia entre 350000 e 450000 Daltons, constituindo de 4 a 6% das proteínas totais do plasma com concentração em torno de 0,2 a 0,6 g/dL, sendo sintetizada no figado e apresentando ponto isoelétrico (pI) na faixa de 5,1 a 6,3 (HARPER, 1971; MURRAY, 1993).

<u>Albumina</u>: é a proteína mais abundante do soro, sendo sintetizada no figado, com massa molar de aproximadamente 69000 Daltons (Figura 4), sendo responsável pelo controle da pressão osmótica e pelo transporte de ácidos graxos livres no sangue. A estrutura primária da albumina consiste de 610 aminoácidos ordenados em uma cadeia peptídica simples. A estrutura secundária parece apresentar as cadeias dobradas sobre si para formar camadas que podem ser desenroladas por redução de pH e re-enroladas por elevação de pH (HARPER, 1971). A albumina se apresenta no soro sanguíneo em concentração na faixa de 3,5 a 5,5 g/dL, seu pI é de 4,8 (MURRAY,1993).

 $\gamma$  - Globulina: é uma fração das globulinas que se originam dos plasmócitos e do tecido linfóide, que é sede principal dos anticorpos circulantes, as chamadas imunoglobulinas, que constituem uma família de proteínas intimamente relacionadas possuindo toda a atividade conhecida dos anticorpos do soro. As imunoglobulinas (Ig) são divididas em três grupos (HARPER, 1971):

- a) IgG (γ<sub>2</sub> globulina, γG) é a principal fração que contem anticorpos, compreendendo ~
  80% das gamaglobulinas 700 1450 mg/100mL de soro, com massa molar variando entre 150000 e 160000 Daltons (Figura 4); seu pI é em torno de 6,3 e 7,3.
- b) IgA (γA, β<sub>2</sub>A) diferente da anterior pelo teor mais elevado de carboidrato e corresponde de 140 260 mg/100mL de soro.
- c) IgM (γM, β<sub>2</sub>M) é a fração de massa molar mais elevada ~750000 Daltons, correspondendo de 70 130 mg/100mL de soro.



**Figura 4:** Formato, dimensões relativas e massas molares de três moléculas de proteína do sangue: albumina, γ - Globulina e fibrinogênio. (HARPER, 1971).

# 3.2.2 A Coagulação Sangüínea

A coagulação sangüínea ocorre por uma seqüência de reações bioquímicas catalisadas enzimaticamente que envolve as células do sangue e as proteínas do plasma, sendo conhecida como cascata de coagulação.

O sistema de coagulação sangüínea pode ser ativado pelo mecanismo extrínseco, que se inicia com trauma aos tecidos fora dos vasos sangüíneos ou através do mecanismo intrínseco, que começa no próprio sangue. Estes dois mecanismos convergem em um mecanismo final comum que envolve a ativação da protrombina em trombina e a conversão de fibrinogênio, catalisada pela trombina, em filamentos de fibrina. Os mecanismos: intrínseco, extrínseco e comum, são complexos e envolvem muitas proteínas diferentes, podendo ser visualizado na Figura 5 (HARFENIST, 1993).



Polímero reticulado de fibrina

Figura 5: Mecanismos da Coagulação Sangüínea — São indicados os mecanismos intrínseco e extrínseco.

Observação: Os eventos descritos abaixo do fator A são designados como o mecanismo comum final, o qual é finalizado com a formação de fibrina reticulada. A linha pontilhada indica a descoberta de que os complexos de fator de tecido e fator VIIa ativam não somente

a fator X no mecanismo extrínseco clássico, mas também o fator IX no mecanismo intrínseco. Além disso, a trombina e o fator Xa retornam e ativam os dois sítios indicados (linhas tracejadas). PK é a precalicreína, HK é quininogênio e PL são fosfolipídeos.

A protrombina é uma alfa<sub>2</sub> globulina instável que pode facilmente se fragmentar em pequenos compostos, um dos quais é a trombina. A trombina é uma enzima com capacidade proteolítica, que age sobre o fibrinogênio removendo dois peptídios de baixa massa molar de cada molécula de fibrinogênio, formando uma molécula de monômero de fibrina, que tem a capacidade automática de se polimerizar com outras moléculas monômeras de fibrina. Estes monômeros de fibrina polimerizam-se, em poucos segundos, em longos filamentos de fibrina formando o retículo do coágulo. Nos primeiros estágios desta polimerização, os monômeros de fibrina ligam-se por fracas pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Nestes estágios, as cadeias poliméricas estão fracamente ligadas podendo ser facilmente desfeitas. Porém, logo em seguida, outra globulina, o fator estabilizador da fibrina age como uma enzima determinando a formação de ligações covalentes entre os monômeros de fibrina, e também entre as cadeias dos polímeros adjacentes, fazendo com que a rede tridimensional de filamentos de fibrina se fortaleça tornando-se resistente. O coágulo é formado por esta rede de filamentos de fibrina, dispostos em todas as direções, retendo células sangüíneas, plaquetas e plasma (GUYTON, 1977).

A coagulação sangüínea pode ser impedida pela ação de substâncias que interferem na conversão da protrombina em trombina. O inibidor mais conhecido é a heparina, que é um composto hidrossolúvel, termoestável e extremamente eficiente, 1 mg de heparina impede a coagulação de 100 mL de sangue. A heparina é abundante no figado e pulmão, e seu efeito anticoagulante é devido à combinação direta e imediata de sua molécula altamente sulfatada com vários fatores do sistema de coagulação (HARPER, 1971).

17

# 3.3. Um enfoque do estudo da biocompatibilidade: adsorção de proteínas do sangue na superfície de materiais

Vários grupos de pesquisadores vêm empregando a técnica de Infravermelho por Transformada de Fourier acoplada à técnica de Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR), a fim de estudar a adsorção quantitativa de proteínas na superfície de materiais poliméricos, bem como as mudanças conformacionais sofridas pelas moléculas de proteínas, com o intuito de obter informações a respeito do processo de adsorção de proteínas que é de grande interesse em sistemas biológicos (BRASH, 1969); (STRAATEN, 1991); (PITT, 1986); (FINK,1987); (FU,1993); (JEON, 1992); (CASTILLO, 1985, 1986); (DENG, 1986).

Apesar das vantagens mencionadas na Tabela 4 sobre a utilização desta técnica em relação à outras (como elipsometria por exemplo), a utilização da técnica FTIR-ATR requer um contato perfeito entre a amostra e o elemento de reflexão interna (IRE) devendo a superfície do filme ser lisa, homogênea e regular para a obtenção de resultados satisfatórios.

**Tabela 4:** As principais vantagens de utilização do FTIR-ATR sobre outras técnicas de análise (FINK, 1986).

Vantagens da utilização do FTIR-ATR em relação a outras técnicas de análise de proteínas.

Rápida aquisição de dados - até 10 espectros por segundo. Os dados podem ser obtidos quase que continuamente e possibilidade de apresentar resultados num tempo real.

Capacidade de obtenção de dados de sistemas fisiológicos intactos em ambientes aquosos através da subtração do "background".

Potencial para análise de multi-componentes de espectros complexos.

Observação da conformação macromolecular através da desconvolução de bandas espectrais.

Não requer preparação destrutiva da amostra.

Sensibilidade à superficie.

Simplicidade no procedimento de medida.

O estudo de adsorção de proteínas é feito através do grupo amida (CONH) das proteínas. Este grupo exibe bandas características em 1650 cm<sup>-1</sup> (amida I), em 1550 cm<sup>-1</sup> (amida II) e em 1300 cm<sup>-1</sup> (amida III). A natureza destas vibrações foi elucidada por Miyazawa (1960). No caso da vibração na região amida I, 80% da energia potencial é associada ao estiramento do grupo C=O, 10% ao estiramento C-N e 10% ao dobramento C-NH no plano. Para a vibração amida II, 40% da energia está associada ao estiramento C-N e 60% ao dobramento N-H, sendo esta a banda mais empregada nos estudo de adsorção de proteínas por ser relativamente insensível a mudanças conformacionais e sofrer menor interferência da banda de absorção de água a 1640 cm<sup>-1</sup> (FU, 1993). Na Tabela 5, estão relacionadas informações gerais sobre as bandas espectrais características de espectros de proteínas.

FREQÜÊNCIA (CM <sup>-1</sup> )	Fonte	INFORMAÇÃO		
1730 (1740-1710)	Carbonil e Lipídios	Lipídios associados a proteínas		
1650 (1670-1630)	Amida I	Identificação de proteínas,		
		mudanças conformacionais		
1550 (1570-1520)	Amida II	Quantificação de proteínas		
1450	Cadeias Laterais de CH <sub>2</sub> da	Identificação de proteínas		
	valina, leucina e isoleucina			
1400	Cadeias lateriais de carboxilatos	Quantificação de proteínas,		
		sensível ao pH		
1361	Componentes de baixa massa			
	molar do sangue			
1300 (1310-1240)	Complexo Amida III	Identificação de proteinas,		
		mudanças conformacionais, região		
		primária usada para diferenciação		
		de proteínas em misturas,		
		informação relativa a estrutura		
	·	secundária		
1080 (1080 - 1040)	Grupos funcionais carboidrato	Conteúdo de glicoproteínas nas		
		camadas adsorvidas		

Tabela 5: Informações gerais sobre espectros de proteínas (GENDRAU, 1986).

# 3.3.1. Infravermelho por Transformada de Fourier no modo ATR - FT-IR (ATR)

A espectroscopia estuda as interações da radiação eletromagnética com a matéria. A radiação eletromagnética pode ser dividida em diferentes regiões que correspondem a diferentes técnicas espectroscópicas (Figura 6). A região entre 4000 e 400 cm<sup>-1</sup> corresponde à região considerada infravermelho médio onde bandas vibracionais e rotacionais são observadas. E é nesta região onde se localizam as bandas de absorção das proteínas (COLEMAN, 1993).

A espectroscopia de infravermelho tem sido amplamente usada em química orgânica e analítica por muitos anos. A aplicação das técnicas de IR a sistemas biológicos

## Capitulo III – Revisão Bibliográfica

não era comum e somente com o desenvolvimento e a evolução do espectrofotômetro FTIR (infravermelho por Transformada de Fourier) a técnica de IR tornou-se uma ferramenta valiosa para estudos de sistemas biológicos. Um espectrofotômetro FTIR é formado por dois componentes básicos: uma bancada ótica e um computador. A bancada ótica mede a intensidade de uma radiação infravermelha especialmente codificado após este ter atravessado uma amostra. O sinal resultante, denominado "interferograma", contém informação sobre todas as freqüências presentes na radiação, sendo que um computador interpreta este interferograma e utiliza um tratamento matemático (Transformada de Fourier - FT) para decifrar as interações que ocorrem quando a luz infravermelha é absorvida por um sistema molecular, apresentando como resultado um espectro (GENREAU, 1986).

Uma das técnicas de infravermelho mais popular, a espectroscopia ATR (reflectância total atenuada), tornou-se mais amplamente utilizada após a introdução de sua versão FT. A técnica FTIR-ATR combina o poder da espectroscopia IR com a óptica da reflexão total atenuada. Foram os cálculos teóricos realizados por Simon (1951), seguido por Fahrenfort (1961), que desenvolveram a técnica ATR para a obtenção de espectros de IR de materiais; os quais não podiam ser obtidos facilmente por medidas convencionais. A partir daí, a ATR vem sendo aplicada em diversos estudos sobre adsorção a partir de soluções (HLADY, 1996).

Na espectroscopia de reflexão interna a amostra é colocada em contato com um cristal especial denominado elemento de reflexão interna (IRE). O IRE é composto de um material de alto índice de refração, como por exemplo: o seleneto de zinco (ZnSe), iodeto de tálio-brometo de tálio (KRS-5) ou germânio (Ge). Nesta técnica a radiação infravermelha é focalizada por uma série de espelhos, em uma das extremidades inclinadas do IRE, sendo refletida através do cristal, geralmente inúmeras vezes, finalmente é direcionada ao detector por outra série de espelhos (COLEMAN, 1993). A Figura 7 apresenta um diagrama esquemático da técnica ATR.

20



Figura 6: Espectro eletromagnético



Figura 7: Diagrama esquemático do caminho da radiação infravermelha no ATR.

Como descrito anteriormente, na técnica de refletância total atenuada a luz infravermelha é focalizada sobre uma das extremidades do IRE, onde se o ângulo  $\theta$  no qual a radiação atinge a interface do IRE e o ar for maior que o ângulo crítico, a luz IR será totalmente refletida internamente no cristal (IRE). O ângulo crítico pode ser calculado através da seguinte equação:

$$\theta_{critico} = \operatorname{sen}^{-1} \frac{n_2}{n_1} \tag{1}$$

onde:  $n_1$  = índice de refração do IRE e  $n_2$  = índice de refração da amostra

A cada reflexão, um campo elétrico evanescente é criado na interface entre o IRE e a amostra, este campo decresce exponencialmente com a distância de penetração da radiação na amostra (CHITTUR, 1998). A distância de penetração é definida como a distância a partir da interface IRE-amostra onde a intensidade da onda evanescente decresce 1/e do seu valor original. Esta distância de penetração pode ser calculada usando a equação:

$$dp = \frac{\lambda}{2n_{\rm l}\pi[{\rm sen}^2\,\theta - (n_{\rm 2}/n_{\rm l})^2\,]^{1/2}}$$
(2)

onde:  $\theta$  = ângulo de incidência ,  $\lambda$  = comprimento de onda da radiação, n<sub>1</sub> = índice de refração do cristal, n<sub>2</sub> = índice de refração da amostra

Nas regiões do infravermelho, onde a amostra absorve energia, há interação entre a onda evanescente e a amostra obtendo-se o espectro (STRAATEN, 1991). A distância de penetração varia de acordo com: o material que compõe o elemento de reflexão interna (Figura 8), o ângulo de incidência da radiação (Figura 9), e com o número de reflexões internas (Figura 10) (WASACZ, 1998).



Figura 8: Variação da distância de penetração com o índice de refração do IRE



Figura 9: Variação da distância de penetração com o ângulo de incidência



Figura 10: Variação da distância de penetração com o número de reflexões internas

À medida que o índice de refração do IRE aumenta, o ângulo de incidência também aumenta, enquanto o número de reflexões internas e a distância de penetração diminuem, diminuindo, a intensidade das bandas.

# 3.3.2. Infravermelho por Transformada de Fourier acoplada a Reflectância Total Atenuada – FTIR (ATR)

A técnica de FTIR/ATR é um método poderoso na obtenção de informações relevantes para o entendimento da adsorção de proteína em superficies. Os espectrofotômetros disponíveis podem dar espectros IR bem reprodutíveis de proteínas em soluções aquosas e em superficies. A velocidade e sensibilidade de sistemas FTIR com óptica ATR e "software" para coleta de dados comercialmente disponíveis permitem o estudo da cinética de adsorção de proteínas em altas concentrações e diferentes gradientes de cisalhamento.

Existem diferentes tipos de porta amostras que podem ser usados que dão informações diferentes sobre proteínas. Para se estudar proteínas adsorvidas em superficies

e meio aquoso a técnica de reflexão interna total atenuada (usando Germânio como elemento de reflexão interna) é a mais adequada.

Segundo Chittur (1998) considerando um cristal ATR trapezoidal (também chamado de elemento de reflexão interna, ou IRE) como mostrado na Figura 11, com uma luz infravermelha e óptica apropriada incidindo em uma das faces de entrada do cristal. Se o ângulo  $\theta$  formado quando a luz infravermelha atinge a interface entre o cristal ATR (meio denso) e o meio raro (água, ar ou solução tampão), é maior que o ângulo crítico, então a luz refletirá totalmente internamente no cristal. O ângulo crítico é calculado como de acordo com a equação (1) apresentada anteriormente.

onde  $n_1$  é o índice de refração do meio denso (cristal) e  $n_2$  é o índice de refração do meio raro (meio aquoso, ar ou solução tampão com ou sem proteína).

O número de reflexões internas, N, pode ser calculado por:

$$N = \frac{L}{c}\cot\theta \tag{3}$$

onde L é o comprimento do cristal, c é a espessura do cristal e  $\theta$  é o ângulo de incidência da luz IV no cristal.



Figura 11: Representação esquemática de um cristal (ATR) trapezoidal (Chittur, 1998)

Em cada reflexão um campo elétrico evanescente (E) é criado no meio raro cuja intensidade decai exponencialmente com a distância (z) no meio raro,  $E = E_0 e^{-z/dp}$ , onde dp é a profundidade de penetração e é a distância em que a onda evanescente cai para 1/e vezes a intensidade na superficie. O decréscimo exponencial do campo elétrico está presente para ambos os componentes: elétrico e magnético da luz. A profundidade de penetração do campo evanescente para ambas polarizações pode ser calculada usando a equação (2).

onde:  $\lambda$  é o comprimento de onda da luz (a profundidade de penetração é uma função do comprimento de onda),  $n_1$  é o índice de refração do cristal ATR (para germânio  $n_1$  é 4 e independe do comprimento de onda),  $n_2$  é o índice de refração do meio raro (este valor é uma função do comprimento de onda),  $\theta$  é o ângulo de incidência e  $n_{21}$  é  $n_2/n_1$ . Para um valor de índice de refração de proteína de 1,5 em 1550 cm<sup>-1</sup>, a dp em 1550 cm<sup>-1</sup> é de 0,428 µm para IRE de Ge.

Partindo do conhecimento da intensidade do campo elétrico na superficie do IRE, um caminho óptico efetivo pode ser definido que é equivalente ao caminho óptico de um material no modo de transmissão convencional e produz a mesma absorbância (este valor é diferente para as duas polarizações).

O plano de incidência (plano xz) é perpendicular ao plano formado pela superficie do meio denso e meio raro. Três amplitudes de campo elétrico podem ser definidas na superficie do meio raro. Existem duas polarizações, uma paralela ao plano de incidência que é chamada de magnética transversal TM (ou paralela, onda P) e outra é perpendicular ao plano de incidência chamada de elétrica transversal (TE) (ou perpendicular, onda S).

Considerando um sistema de coordenadas no cristal ATR com x ao longo do comprimento do cristal ATR, y perpendicular a x (na superficie do cristal) e z perpendicular ao plano formado pelos eixos x-y. A onda TE terá um componente somente ao longo da direção y enquanto a onda TM terá uma componente ao longo de ambas as direções x e z.

Luz polarizada perpendicularmente se propagando através do cristal ATR resultará em um campo elétrico na superficie do ATR com uma única componente na superficie do cristal,  $E_0 = E_y$ . Quando a luz polarizada é paralela ao plano de incidência então  $E_0^2 = E_x^2 + E_z^2$ . Combinando as informações espectrais usando luz polarizada, pode-se obter informações sobre a orientação da proteína na superfície.

A intensidade da luz refletida em cada ponto de reflexão será reduzida pela presença do material que absorve a luz IR no meio raro. A sensibilidade das superfícies de ATR é devido à adição do número de pequenas absorbâncias em cada reflexão.

Harrick definiu caminho óptico, (de) como a espessura do material que dá a mesma absorbância no espectro de transmissão em incidência normal como para o ATR:

$$d_e = \frac{n_{21} E_0^2 d_p}{2\cos\theta} \tag{4}$$

Usando a expressão para calcular a componente do campo elétrico ao longo das direções x, y e z, os caminhos ópticos para as polarizações perpendicular e paralela podem ser escritos como:

$$d_{e\perp} = \frac{2n_{21}d_{p}\cos\theta}{1 - n_{21}^{2}}$$
(5)

$$d_{e \amalg} = \frac{2n_{21}d_{p}\cos\theta(2\sin^{2}\theta - n_{21}^{2})}{(1 - n_{21}^{2})((1 + n_{21}^{2})\sin^{2}\theta - n_{21}^{2})}$$
(6)

A razão de polarização (PR) de um instrumento pode ser definida como a razão da intensidade da componente paralela pela perpendicular do feixe. Esta razão pode variar com o comprimento de onda. Mas para muitos sistemas de FTIR o valor de PR é bem próximo da unidade. Assim, o caminho óptico efetivo total é:

$$d_{e} \approx \left(\frac{d_{e\perp} PR + d_{e\Pi}}{1 + PR}\right) \tag{7}$$

A densidade de proteína adsorvida em uma superficie pode ser calculada em termos de quantidades experimentalmente observáveis tais como a absorbância integrada

por reflexão, a absortividade molar da proteína, profundidade de penetração do IR e o caminho óptico efetivo.

# 3.3.2.1. Quantificação da proteína adsorvida sobre um material – equação da densidade de adsorção em ATR (Chittur, 1998).

Consideremos um filme, fino, de proteína adsorvida adjacente ao cristal ATR em contato com uma solução protéica. A equação de Tompkins descreve a absorbância por reflexão como:

$$\frac{A}{N} = \frac{n_{21}E_0^2\varepsilon}{\cos\theta} \int_0^\infty C(z) \exp\left(\frac{-2z}{dp}\right) dz, \qquad (8)$$

onde: A é a absorbância integrada devido às reflexões internas, N é o número de reflexões internas,  $n_{21}$  é a relação entre os índices de refração dos meios e o do IRE, E é a intensidade campo elétrico evanescente,  $\varepsilon$  é o índice absortividade molar integrada [(L/mol.cm<sup>2</sup>)], dp é a profundidade de penetração da radiação, z é a distância a partir da superfície do IRE (cm), C(z) é a concentração em função da distância à partir do IRE (mol/L) e a espessura da camada de proteína adsorvida é t.

Para a distância de 0 a t, C(z) = Ci, onde Ci é a concentração de proteína adsorvida, e para z de t a  $\infty$  pode-se escrever C(z) = Cb, onde Cb é a concentração da solução protéica. Considerando uma situação de estado estacionário pode-se escrever:

C(z) = Ci + Co, 0 < z < t

$$C(z) = Cb, t < z < \infty$$

Usando um cristal ATR de Germânio com 45° que possui um dos maiores índices de refração (entre os cristais normalmente usados como IRE), pode-se maximizar o sinal a partir da superficie enquanto se minimiza o sinal da solução aquosa.

A espessura da monocamada adsorvida (50 – 100 Å) é usualmente muito menor que a profundidade de penetração (dp) podendo-se, assim, aproximar o cálculo da integral da equação 1, desmembrado-a em dois termos: Capítulo III - Revisão Bibliográfica

$$\frac{A}{N} = \frac{{}_{n21}E_0^2\varepsilon}{\cos\theta} \int_0^t C(z) \exp\left(\frac{-2z}{dp}\right) dz + \frac{{}_{n21}E_0^2\varepsilon}{\cos\theta} \int_t^\infty C(z) \exp\left(\frac{-2z}{dp}\right) dz$$
(9)

Na primeira integral pode-se considerar C(z) fora da integral como uma constante igual a Ci. Como t é muito menor que dp, então  $\exp(-2t/dp) \approx 1 - 2t/dp$ , portanto, a primeira integral pode ser simplificada para  $\epsilon$  (2de/dp) (Cit), onde de é o caminho óptico efetivo da radiação IR (este termo é chamado de Aa/N, que é a absorbância por reflexões das moléculas de proteínas na interface). A segunda integral é igual a  $\epsilon$ Cbde (chamada de Ab/N, que é a absorbância por reflexão de proteínas em solução). A equação simplificada para a absorbância por reflexão pode ser escrita como a soma destas duas absorbâncias:

$$\frac{A}{N} = \varepsilon \left(\frac{2de}{dp}\right) (Cit) + \varepsilon Cbde \tag{10}$$

Considerando Cit igual a  $\Gamma$  que é a densidade de adsorção, temos:

$$\Gamma = \frac{A/N - \varepsilon Cbde}{\varepsilon (2de/dp)}$$
(11)

# 3.3.2.2. Índice de absortividade molar de proteína em FTIR / ATR

O índice de absortividade molar  $\varepsilon$  de proteínas pode ser calculado a partir de experimentos de transmissão, assumindo a validade da lei de Beer-Lambert,

$$A = \mathcal{B}C_{b} \tag{12}$$

onde b é a espessura da amostra (cm),  $C_b$  é a concentração da amostra (mol/L) e A é medido experimentalmente para valores conhecidos de  $C_b$ .

NOTA: Para experimentos em ATR utiliza-se como espessura da amostra (b) o caminho óptico efetivo (EPL) que é uma comparação aproximada entre a absorbância esperada de um espectro no ATR e um espectro de transmissão. O caminho óptico efetivo (EPL) pode ser calculado empregando as equações 5, 6 e 7 já apresentadas, sendo que para ATR horizontal N deve ser dividido por 2.

Como já foi dito quando se trabalha com sistemas aquosos existe o problema com a banda de absorção da água que coincide com a banda Amida I da proteína, havendo a necessidade de se retirar a interferência da banda da água. Para isso uma técnica simples e prática é a subtração direta: espectro total (proteína + solução aquosa) – espectro da solução aquosa, cuidando para que a região entre 1900 – 1740 cm<sup>-1</sup> seja uma reta após a subtração.

## 3.3.2.3. FT-IR (ATR) e a célula de fluxo contínuo

Usando um cristal com alto índice de refração, como o de germânio (Ge), como sendo uma parede da célula de fluxo contínuo, a adsorção de proteína pode ser monitorada diretamente da solução aquosa. Os primeiros trabalhos demonstraram viabilidade da técnica de fluxo contínuo, mas sofreram dificuldades na análise de misturas complexas. Recentemente, tentativas foram feitas para estudar sistemas mais bem definidos, olhando aspectos da adsorção tais como: cinética, mudanças conformacionais induzidas pelo solvente, mudanças espectrais em "fibronectin" adsorvidos (LENK, 1989).

A Figura 12 mostra uma célula de fluxo contínuo para experimentos em (ATR) e meio aquoso usada no "National Center for Biomedical Infrared Spectroscopy". O "design" desta célula representa o compromisso entre uma performance espectral ótima e condições hidrodinâmicas razoáveis para o fluxo dentro da célula. Esta célula foi construída para estudos com: macromoléculas, interações enzimáticas com substrato ou inibidores e deposição de proteínas em superfícies. Estudos de biocompatibilidade em que componentes do sangue interagem com superfícies poliméricas que estão cobrindo o cristal têm sido uma das primeiras aplicações. Esta célula possui várias características atrativas, ela é uma janela estreita, com altura total de 0,8 mm, permitindo uma taxa de cisalhamento da ordem de 500 a 700 s<sup>-1</sup>, para fluxos volumétricos de aproximadamente 75mL/min. A célula é relativamente longa com um aspecto estreito, o que proporciona o desenvolvimento rápido de um fluxo do tipo laminar dentro da célula, e somente de 10 a 20% da região de entrada mostra condições de fluxo turbulento. Polímeros de interesse podem ser depositados na superficie ativa do cristal, ou o cristal pode ser pré coberto com outro material para estudar interações na superficie. Um fluxo com substratos ou produtos é bombeado através da célula para reagir ou adsorver com a superficie do cristal ATR coberto ou não. Os cristais (ATR) de Ge possuem ângulo de 45° para a incidência da luz, são confeccionados para aproximadamente 50 reflexões e permitir uma energia na faixa de 10 a 15% por todo caminho óptico (GENDREAU, 1986).



Figura 12: Representação esquemática da célula de fluxo contínuo (GENDREAU,1986).

Como já foi dito, para estudos próximos à superficie, o ATR é uma excelente ferramenta, e representa uma das primeiras vantagens do FT-IR. Quando se utiliza do ATR para experimentos, a superficie do ATR pode ser continuamente monitorada, e mudanças quantitativas para a proteína adsorvida podem ser detectadas bem como mudanças conformacionais das espécies adsorvidas, permitindo estudos das mudanças na composição ou organização da camada adsorvida. Devido à velocidade com que o FT-IR pode coletar espectros, intensidades de várias bandas podem ser medidas continuamente em períodos de tempo muito próximos (GENDREAU, 1986).

Existe uma grande quantidade de trabalhos mostra estudos sobre a adsorção de proteínas em materiais; aqui serão citados alguns trabalhos onde os autores utilizam a técnica de FT-IR (ATR) juntamente com um sistema de fluxo contínuo, no qual o cristal ATR, usualmente Ge, é recoberto com o material de interesse empregando a técnica de cobertura "Spin Coating".

- Estudo da adsorção de albumina em poliuretanas (PITT, 1988).
- Estudos da adsorção de proteínas em biomateriais (CHITTUR, 1986).
- Mudanças espectrais da BSA em superficies (LENK, 1989).
- Mudanças conformacionais de proteínas do plasma humano em superficies heparinizadas (BARBUCCI, 1994).

### **3.3.3. Eletroforese Capilar**

Diversas são as técnicas utilizadas para o estudo da adsorção de proteínas em biomateriais, dentre elas podemos citar a utilização de compostos radioativos (RICHARDSON JR, 1993; PEREZ-LUNA, 1994; SHEPPARD, 1994; TANG, 1998), FT-IR (BRASH, 1969; CHITTUR, 1998), elipsometria (TENGVALL, 1998; ELWING, 1998), e ELISA (HALL, 1992).

Uma alternativa para o estudo qualitativo da adsorção de proteínas na interface sólido-líquido é a eluição da proteína adsorvida com soluções sulfactantes (geralmente dodecil sulfato de sódio, SDS) com posterior análise por eletroforese em gel (SDS-PAGE). Este método foi utilizado por vários autores (STANISLAWSKI, 1995; SÖDERLING, 1996; SANTIN, 1997; BABÉENSE, 1997; LÜCK, 1998). Porém, este método não permite a determinação quantitativa das proteínas adsorvidas devido a grande dispersão das moléculas de proteína no interior do gel e pela ligação não estequiométrica do corante com as proteínas presentes no gel.

A eletroforese capilar é uma técnica recente e análoga à eletroforese em gel, com as vantagens de possibilitar uma boa remoção de calor do sistema (devido à pequena espessura do capilar), possibilitar a utilização de tensões maiores durante as análises (o que resulta em menores tempos de análise) e poder detectar a absorbância da solução após uma certa distância do ponto de injeção da amostra o que permite a quantificação das proteínas (BARKER, 1995).

A eletroforese tem sido o método básico para separações bioquímicas desde os anos 30 sendo descrita pela primeira vez por Tiselius. Esta técnica baseia-se na migração de partículas carregadas sob a influência de um campo elétrico. A mobilidade da partícula, depende de seu tamanho e sua carga, logo a mobilidade da partícula está relacionada com a razão carga/massa.

$$\mu E = (q/6\pi) \eta r \tag{13}$$

onde  $\mu E$  = mobilidade eletroforética, q = número de carga,  $\eta$  = viscosidade do meio e r = raio da partícula.

A velocidade eletroforética de um partícula relaciona-se com sua mobilidade e com a magnitude do campo elétrico aplicado.

$$v = \mu E E \tag{14}$$

onde v = velocidade da partícula e E = intensidade do campo elétrico (volts/cm).

Já a eletroforese capilar foi desenvolvida no final dos anos 80, sendo um método semelhante ao desenvolvido por Tiselius, tendo como vantagem simplicidade, velocidade, versatilidade e baixo custo. Na eletroforese capilar a amostra é injetada sob pressão em uma das extremidades do capilar. Após a injeção da amostra estabelece-se uma diferença de potencial entre os eletrodos fazendo com que as partículas movam-se na direção do eletrodo apropriado, passando por um detector (Figura 13). O tempo que uma partícula leva para percorrer o comprimento do início do capilar até o detector é chamado tempo de migração ( $t_m$ ).

A aplicação de um campo elétrico num capilar contendo um eletrólito causa o fluxo da solução através do capilar, chamado de fluxo eletroosmótico, que bombeia as partículas ao longo do capilar na direção do detector.

O fluxo eletroosmótico é definido por:

$$V_{eo} = (\epsilon \zeta / 4\pi \eta) E \tag{15}$$

onde  $\in$  = constante dielétrica,  $\eta$  = viscosidade do tampão,  $\zeta$  = potencial zeta medido no plano de cisalhamento próximo à interface sólido/líquido.

Na eletroforese capilar utilizam-se capilares de diâmetro na faixa de 20 a 200  $\mu$ m, sendo possível separar moléculas grandes e pequenas. Tal separação é facilitada empregando-se alta voltagem (~ 500 V/cm) que permitirá gerar o fluxo eletrofosmótico da solução e o fluxo eletroforético das partículas (espécies iônicas).



Figura 13: Representação esquemática da eletroforese capilar.

A eletroforese capilar apresenta seu resultado na forma de eletroferogramas, os quais representam a variação da absorbância com o tempo de migração das moléculas. A Figura 14 apresenta um eletroferograma típico de solução padrão de HSA (20µg/mL), obtido por eletroforese capilar em zona livre. O pico com tempo de migração de 7 minutos, representa materiais não carregados eletricamente que migram no interior das micelas formadas pelos tensoativos, enquanto o pico com tempo de migração de 10 minutos representa a HSA.



Figura 14: Eletroferograma típico de solução padrão de HSA (20µg/mL).

# CAPÍTULO IV

# **MATERIAIS E MÉTODOS**

O desenvolvimento experimental do trabalho foi dividido em duas partes:

- A 1<sup>a</sup> parte envolveu a preparação de blendas de PHB/PLLA em duas formas: pinos e filmes. Os pinos foram obtidos por mistura fisica no estado fundido em uma mini injetora, e os filmes por solubilização seguida de evaporação do solvente. As amostras das blendas de PHB/PLLA na forma de pinos e filmes foram caracterizadas e também passaram por um estudo de degradação "in vitro" seguido de caracterização.
- A 2<sup>a</sup> parte contou com o estudo de adsorção de proteínas do sangue na superficie de filmes de PHB, PLLA e PHB/PLLA 50/50, utilizando as técnicas de infravermelho por transformada de Fourier acoplada a técnica de reflectância total atenuada (FTIR-ATR) e eletroforese capilar.

## 4.1. Materiais

## Polímeros Biodegradáveis:

Os polímeros utilizados no decorrer do trabalho foram o poli(L-ácido láctico) (PLLA) obtido da Purac e o poli( $\beta$ -hibroxibutirato) (PHB) da Aldrich, ambos de grau analítico.

## Solvente:

O solvente empregado na preparação das blendas de PHB/PLLA na forma de filmes foi o hexafluorisopropanol (HFIP) obtido da Aldrich, grau analítico.

## Proteinas Humanas:

As proteínas do sangue humano utilizados nos ensaios de adsorção na superfície dos polímeros foram a albumina (HSA), imunoglobulina G (HIgG) e fibrinogênio (HFg) obtidas da Sigma com grau de pureza em torno de 95 a 98%.

### Agentes Tamponantes:

As soluções tampão empregadas nos ensaios de adsorção foram o tampão fosfato salino (NaCl) com pH 7,4; tampão fosfato com 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) com pH 2,5 e tampão fosfato com 0,1% de SDS com pH 3,5. Todos os reagentes empregados na preparação destas soluções apresentavam de grau analítico e foram obtidos da Merk. A água utilizada também possuía grau analítico, água milli – Q de condutividade 18,2 meghom-cm (M $\Omega$ .cm).

#### 4.2. Métodos

## 4.2.1. Obtenção das blendas PHB/PLLA na forma de filmes

As blendas PHB/PLLA preparadas na forma de filmes por solvente ("casting") foram caracterizadas e utilizadas no estudo de degradação "in vitro" e os filmes obtidos empregando o equipamento de "Spin Coating" foram usados no estudo de adsorção de proteínas.

## a) Preparação das blendas por evaporação do solvente ("casting")

Através desta técnica foram obtidas blendas PHB/PLLA na forma de filmes nas composições 100/0, 70/30, 50/50, 30/70 e 0/100 (% em massa), segundo o protocolo abaixo.

## Protocolo:

- as blendas foram preparadas solubilizando ambos os polímeros em hexafluorisopropanol (HFIP) (7% m/v), mantendo o frasco sob agitação, em agitador magnético por 2 horas.
- após total solubilização dos polímeros vertia-se a solução em uma placa de vidro conforme Figura 15, deixando a placa dentro de uma cuba de vidro totalmente fechada para evaporação lenta do solvente durante 48 horas. Este procedimento foi adotado para evitar que o filme ficasse retorcido pela rápida evaporação do solvente.
- depois de prontos os filmes eram secos em estufa à vácuo por 8 horas à 60°C,
- os filmes foram armazenados em embalagem plástica em dessecador sob vácuo, por 3 semanas para posterior caracterização evitando, com este procedimento, a possibilidade de degradação durante o armazenamento.



Figura 15: Esquema do molde com o filme secando dentro da cuba fechada.

## b) Preparação das blendas empregando o equipamento "Spin Coating"

Nesta etapa foram confeccionadas as blendas PHB/PLLA 0/100, 50/50 e 100/0 (% em massa), na forma de filme sobre uma lâmina de vidro (para verificar a espessura do filme formado) e diretamente sobre o cristal de ZnSe e Ge (após a escolha dos parâmetros para obtenção do filme) utilizando-se um equipamento do tipo "Spin Coating", representado na Figura 16, segundo o protocolo abaixo.

# Protocolo:

- as blendas mencionadas acima foram preparadas através da solubilização dos polímeros em HFIP 0,1 e 0,2% m/v (sobre a lâmina de vidro) e 2% m/v sobre os cristais ZnSe e Ge.
- após a solubilização gotejava-se 200 µL da solução sobre o substrato (lâmina de vidro ou cristal) já acoplado ao equipamento "Spin Coating".
- o "Spin Coating" era acionado para que a solução se espalhasse e formasse um filme extremamente fino, empregando 4000 rpm de rotação durante 30 segundos, sendo que após os primeiros 10 segundos ligava-se o exaustor da capela e, após o término dos 30 segundos de rotação do "Spin Coating", mantinha-se o exaustor ligado por mais 30 segundos com a finalidade de acelerar o processo de evaporação do solvente.
- o procedimento anterior era repetido 4 vezes tendo, desta forma, um filme com quatro camadas sobre o cristal.
- o filme pronto permanecia na capela com o exaustor ligado por, aproximadamente, 5 minutos para garantir total evaporação do solvente.

**Observação:** O emprego de um filme com várias camadas foi escolhido de acordo com a literatura estudada, pois com uso de uma única camada obtém-se um filme muito frágil, que pode se soltar do cristal ou se quebrar, durante o ensaio de adsorção (CHITTUR, 1986).



Figura 16: Representação esquemática da confecção de filmes no equipamento "Spin Coating", em etapas: A (gotas da solução polimérica), B espalhamento da solução polimérica, C e D evaporação do solvente e formação do filme fino.

# 4.2.2. Obtenção das blendas na forma de pinos, preparadas por mistura física no estado fundido.

Nesta etapa foram preparadas blendas de PHB/PLLA nas composições 100/0, 70/30, 50/50, 30/70 e 0/100 (% em massa), utilizando moldes na forma de pino com dimensões de 2,00 mm de diâmetro e 70,00 mm de comprimento para caracterização e estudo de degradação "in vitro" e 4,00 mm de diâmetro e 90,00 mm de comprimento para ensaios de adsorção de proteína e análise por Eletroforese Capilar. O equipamento utilizado foi um misturador Mini Max Molder que pode ser visualizado pela representação esquemática da Figura 17 e segundo o protocolo apresentado abaixo.

#### **Protocolo:**

- colocava-se os polímeros dentro do recipiente da mini injetora que estava aquecida a 200°C, e o molde envolto por uma camisa de aquecimento a 130°C.
- iniciava-se o processamento do material com fusão seguida de blenda durante 4,5 minutos. Ao término deste tempo o material era injetado em um molde.
- após o término do processamento bem como injeção da massa no molde, este era retirado rapidamente do equipamento e imerso em banho com água à temperatura

ambiente, permanecendo em resfriamento por 5 minutos obtendo-se, assim, blendas PHB/PLLA no estado amorfo.

 abria-se o molde retirava-se a amostra, que era armazenada em embalagem plástica dentro de dessecador sob vácuo por 3 semanas para equilíbrio do processo de cristalização.



Figura 17: Representação esquemática da confecção das blendas PHB/PLLA no equipamento Mini Max Molder.

### 4.3. Medidas de Espessura do Filme Obtido Através da Técnica "Spin Coating"

As medidas de espessura foram feitas devido à necessidade de se obter um filme fino o suficiente para que a radiação no infravermelho (IR) pudesse ultrapassá-lo, pois o objetivo era que o IR detectasse e analisasse as proteínas adsorvidas sobre este filme durante o ensaio de adsorção de proteínas. A literatura consultada mostra que a profundidade de penetração da radiação infravermelho é de 400 nm; portanto, a espessura do filme "spin-coater" sobre o cristal deveria ser inferior a 400 nm (profundidade de penetração da radiação IR). Desta forma, mediu-se a espessura do filme de PLLA depositado sobre o cristal de Ge e lâminas de vidro segundo o protocolo do item 3.3.1 b), empregando três técnicas de medida de espessura de filme fino: a) microscopia interferométrica, b) análise de FT-IR por reflectância, para filme sobre o cristal e c) perfilômetro, para filme sobre lâmina de vidro.

a) Microscopia Interferométrica: empregou-se um microscópio de interferência da marca Carl Zeiss, com uma lâmpada branca de  $\lambda = 0,606\mu m$ . Neste microscópio verifica-se o número de franjas de interferência que a espessura do filme causa na luz incidente. Aplicando a equação (16) obtém-se a espessura média do filme.

$$e = \lambda \cdot f \tag{16}$$

onde e = espessura,  $\lambda$  = comprimento de onda da luz utilizada e f = n<sup>o</sup> de franjas de interferência.

b) FT-IR por reflectância: empregou-se um equipamento de FT-IR da Perkin Elmer modelo Lambda 9, usando uma faixa de comprimento de onda de 1200 a 1500 nm. A literatura mostra que após a obtenção do gráfico de Transmitância x Comprimento de onda ( $\lambda$  em nm) aplicando-se a equação (17), pode-se obter a espessura do filme analisado.

$$4nd\frac{1}{\lambda} = N \tag{17}$$

onde: n = índice de refração, d = espessura,  $\lambda$  = comprimento de onda e N = número de ordem.
c) Perfilômetro: empregou-se um perfilômetro da marca Veeco modelo Dektak<sup>3</sup>. Para análise da espessura no perfilômetro, os filmes foram preparados conforme o item 4.2.1 b) sobre lâminas de vidro, pois temia-se a danificação do cristal durante a medida da espessura. Tal análise foi feita segundo o protocolo abaixo.

### **Protocolo:**

- Fazia-se uma marca com uma caneta (do tipo pincel atômico) sobre o filme depositado numa lâmina de vidro.
- Fazia-se um risco com um estilete e com o auxílio de uma régua sobre a marca, feita anteriormente, de maneira que tal risco ou corte estivesse no sentido transversal ao filme depositado na lâmina.
- A lâmina era colocada no perfilômetro e com o auxílio da marca à caneta feita sobre o filme posicionava-se o corte ou risco sob a "agulha" que varria a superficie do filme e detectava a diferença ou degrau (proporcionado pelo corte) existente, caracterizando a espessura do filme. (vide Figura 18)



**Figura 18:** Representação esquemática do protocolo para análise da espessura, em perfilômetro, do filme confeccionado por "Spin Coating".

## 4.4. Ensaio de Degradação "In Vitro" das Blendas PHB/PLLA

Este ensaio foi feito com o intuito de estudar o processo de degradação das blendas PHB/PLLA simulando um meio fisiológico, segundo o protocolo abaixo.

#### **Protocolo:**

- foram colocados dois pinos ou um filme de cada composição da blenda em tubos de ensaio, aos quais foi adicionado 20 mL de solução tampão fosfato salino (pH 7,4).
- os tubos foram numerados, fechados e colocados num banho à 37°C, por diferentes períodos de tempo. A Tabela 6 apresenta as blendas na forma de filmes e pinos, empregadas neste estudo, bem como os períodos de tempo que cada amostra ficou no banho para posterior caracterização.
- após cada período especificado o material era retirado do banho, lavado com água deionizada e álcool etílico (PA).
- após a lavagem o material era seco em estufa à vácuo por 8 horas à 60°C, e armazenado em saquinho plástico e dessecador sob vácuo.

**Tabela 6:** Representação dos períodos de tempo de degradação passados pelas amostras para posterior caracterização.

Composição	Amo	ostra	Pino/	Tem	po (m	eses)	Amo	ostra Fi	lme/Te	mpo (m	leses)
PHB/PLLA	2	4	6	8	10	12	2	4	6	10	12
0/100	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
30/70	X	X	X				Х	X	X		X
50/50	X	X	X	X	X	X	Х	X	X	X	X
70/30	X	X	X		]		Х	X	X		X
100/0	Х	X	X	X	X	X	Х	X	X	X	X

# 4.5. Caracterização das Blendas PHB/PLLA Confeccionadas na Forma de Filmes pela Técnica de Evaporação do Solvente ("Casting") e Pinos

As blendas foram caracterizadas. antes e após ensaio de degradação "in vitro", para estudar suas propriedades térmicas, mecânicas, morfológicas e estruturais. Para tanto foram empregadas as análises: Calorimetria Diferencial de Varredura Modulada (MDSC), Análise Dinâmico Mecânica (DMA), Ensaio Mecânico de Flexão, Análise Termogravimétrica, Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM), Difração de Raios-X (WAXS), Espalhamento de Raios-X à baixos ângulos (SAXS) e Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).

# 4.5.1. Análise térmica: MDSC para as amostras de filmes e pinos antes e após degradação.

Esta análise foi empregada com o intuito de obter dados a respeito das características térmicas das amostras, como por exemplo, temperatura de transição vítrea (Tg), temperatura de cristalização (Tc) e temperatura de fusão (Tm) e também relacioná-las antes e após o ensaio de degradação.

Utilizou-se um equipamento TA Instruments, modelo MDSC 2910. Os parâmetros empregados durante as análises foram:

- 1ª varredura partindo de 25°C até 210°C com rampa de aquecimento de 10°C/min., modulação de +/- 0,5°C a cada 60 segundos e isoterma de 5 minutos em 210°C.
- 2ª varredura (resfriamento) até -30°C com rampa de resfriamento de 25°C/min., sem modulação e isoterma de 5 minutos em -30°C.
- 3<sup>a</sup> varredura aquecimento de -30°C até 210°C com rampa de aquecimento de 1°C/min., modulação de +/- 0,5°C a cada 60 segundos, isoterma de 5 minutos em 210°C.

# 4.5.2. Análise mecânica: DMA para as amostras de filmes e pinos antes e após degradação.

Esta análise fornece dados sobre os fenômenos de transição térmica, Tg e Tm, bem como sobre propriedades mecânicas, resistência mecânica.

Foi empregado um equipamento NETZSCH Thermische Analyse, modelo DMA 242 cell. Os parâmentros utilizados para a análise são apresentados na Tabela 7.

Parâmetros de Análise	Tipo de Amostra: FILME	Tipo de Amostra: PINO
Porta amostra	Tração	Dual Cantilever - Flexão
Rampa de aquecimento (°C/minuto)	3	5
Temperatura inicial (°C)	- 25	- 25
Temperatura final (°C)	220	220
Freqüência (Hz)	1,00	1,00
Amplitude (µm)	30	15
Modo de força	Dinâmico	Estático
Tensão máxima (N)	1,0	1,0

**Tabela 7:** Parâmetros empregados para a análise de DMA das amostras na formade: filmes (obtidas pelo método de solvente – "casting") e pinos.

## 4.5.3- Análise morfológica: SEM para filmes e pinos antes da degradação

A análise morfológica fornece informações a respeito da estrutura do material como, por exemplo: miscibilidade e porosidade, entre outras.

Esta análise foi feita utilizando um microscópio eletrônico de varredura da marca Leica modelo LEO440i. Para a análise microscópica da fratura as amostras foram fraturadas criogenicamente em nitrogênio líquido, e para análise microscópica superficial as amostras foram cortadas. Todas as amostras foram metalizadas com ouro-paládio em um equipamento Sputter Coater da marca BAL-TEC, modelo SCD 050, antes de serem analisadas.

## 4.5.4. Análise térmica: TGA para filmes e pinos antes e após degradação

Empregou-se um equipamento da marca TA Instruments, modelo DSC 2920 modulated. Os parâmetros empregados na análise foram: rampa de aquecimento de 10°C/min., temperatura inicial 20°C e temperatura final 400°C, em ambiente inerte. O objetivo desta análise é caracterizar o material quanto à sua degradação e estabilidade térmica.

46

## 4.5.5. Análise estrutural: WAXS e SAXS para filmes e pinos antes e após degradação

As análises de SAXS e WAXS foram realizadas simultaneamente no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas/SP. O intuito das análises é saber mais a respeito da estrutura molecular e cristalina do material.

A Figura 19 traz uma representação esquemática da linha de SAS utilizada para ambas as análises. Os parâmetros empregados para tais análises foram:

- fonte: imã defletor D11A(4°),  $\sigma$  y= 0,14 mm
- monocromador: cristal de Si cortado assimetricamente e com curvatura elástica (111), ângulo assimétrico: 11°, modo condensador; faixa de energia 6 12 keV (1 2 Å)
- resolução em energia: (E/ΔE):5x10<sup>3</sup> @ 7,7 keV
- elementos focalizantes: monocromador com cristal Si curvado elasticamente (focalizador horizontal).



Figura 19: Representação esquemática da linha de SAS para análises de SAXS e WAXS.

#### 4.5.6. Ensaio mecânico de flexão para pinos antes da degradação

O ensaio mecânico de flexão é adequado para materiais rígidos e frágeis, fornecendo a deformação do material sob a influência de uma carga (força) durante um período de tempo, sendo que a deformação aumenta com o tempo. O dispositivo mais comumente utilizado no ensaio de flexão é o de três pontos (Figura 20) (HUNT, 1993).

Os dados experimentais precisam ser transformados para se conseguir a curva tensão x deformação donde se obtém: o módulo de Young, a tensão e a deformação máxima na ruptura. Para tanto emprega-se as equações 18, 19 e 20 (NIELSEN, 1974):

Tensão:  $\sigma = \text{força} / \text{área transversal}$  (18)

Deformação: 
$$\varsigma = \Delta L / L_0$$
 (19)

Módulo de Young: 
$$E = d\sigma / d\varsigma$$
 (20)



Figura 20: Esquema do dispositivo de três pontos do teste de flexão.

Para esta análise foi empregado um equipamento da marca MTS, modelo Test Star II. Utilizando-se 5 amostras de cada tipo de blenda na forma de pino. Os parâmetros empregados foram: célula de carga de no máximo 100Kgf, com 10Kgf de fundo de escala, usando uma velocidade de 1,3 mm/min, distância entre os suportes da amostra de 20 mm e amostras com diâmetro de 1,85 mm.

## 4.5.7. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Empregou-se um equipamento da marca Polymer Laboratories Ltd, modelo PL-GPC210, com os seguintes parâmetros para análise: fase móvel THF; duas colunas MIXED-B  $10\mu m$  + pré-coluna  $10\mu m$ ; detector de índice de refração; padrões para calibração: EasyCal A e B 0,10 % em THF – tolueno marcador; amostras a 2% (m/v) de polímero em clorofórmio; duas injeções por amostras; tempo de corrida de 25 minutos; vazão do sistema =1,00 mL/min e temperatura  $30^{\circ}C$ .

## 4.6. Ensaio para Obtenção do Índice de Absortividade Molar das Proteínas

Nesta etapa foram feitos ensaios para obter os coeficientes de absortividade molar das proteínas usados na equação de quantificação da proteína adsorvida. Para conseguir realizar tal experimento utilizou-se a célula de fluxo como se esta fosse uma célula para líquido e empregou-se, como elemento de reflexão interna, o cristal de Ge.

#### Protocolo:

- foram preparadas soluções de HSA, HIgG e HFg em tampão fosfato salino pH 7,4 nas concentrações: 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75; 2; 2,5 e 3 mg/mL.
- montava-se a célula com o cristal de Ge e enchia-se esta com a solução.
- coletava-se três espectros de 64 varreduras cada.

Tratamento espectral:

- colocava-se todos os espectros na mesma escala, corrigia-se a linha base automaticamente e convertia-se os espectros em dados, empregando o "software" OMINIC que faz a interface com o equipamento de FT-IR ATR.
- com os resultados na forma de dados numéricos subtraía-se o espectro do tampão, obtendo, assim, somente espectros referentes à proteína detectada pelo IR.
- selecionava-se a região de 1400 a 1750 cm<sup>-1</sup>, desta região selecionava-se o intervalo entre 1480 e 1700 cm<sup>-1</sup>, construía-se uma linha base que é levada para a coordenada y=0, então, calculava-se a área integrada sob a banda em 1550 cm<sup>-1</sup> (1480 1580 cm<sup>-1</sup>).
- construía-se um gráfico de concentração (mg/mL) x área integrada sob a banda amida II (1550 cm<sup>-1</sup>) segundo a Lei de Beer-Lambert obtendo, desta forma, uma equação no formato y = Ax e um índice de correlação, onde A = ε . l. c (l é o

caminho óptico da célula utilizada no experimento e que foi calculado como mostrado no item 2.3.2. pelas equações 5, 6 e 7).

 desta forma obteve-se o ε (coeficiente de absortividade molar) para as proteínas estudadas.

## 4.7. Ensaio de adsorção das proteínas sobre os biomateriais

Os ensaios de adsorção de proteínas sobre os biomateriais foram conduzidos em tempo real no equipamento de FTIR –ATR como mostrado no item 4.7.1.

# 4.7.1. Ensaio e análise da adsorção de proteínas nos biomateriais PHB, PLLA e na blenda PHB/PLLA 50/50, utilizando a técnica de FT-IR ATR

A célula de fluxo contínuo e o sistema de fluxo contínuo foram montados no laboratório e podem ser visualizados nas Figuras 21 e 22.



**Figura 21:** Vista da parte inferior da célula de fluxo, utilizada no sistema de fluxo contínuo da Figura 22. Dimensões da célula: 1 mm de profundidade, 8 mm de largura e 60 mm de comprimento.



**Figura 22:** Representação esquemática do sistema de fluxo contínuo empregado nos ensaios de adsorção das proteínas sobre as blendas PHB/PLLA.

O protocolo do ensaio e análise simultânea da adsorção da proteína sobre o filme polimérico pode ser seguido abaixo.

## Protocolo:

- Após a obtenção do filme polimérico, na concentração desejada, diretamente sobre o substrato (cristal de Ge), como foi descrito no item 3.3.1 b), montava-se o sistema de fluxo de acordo com a Figura 22.
- Preparava-se a solução protéica com tampão fosfato salino pH 7,4 na concentração desejada.
- iii. Colocava-se as soluções de tampão fosfato salino pH 7,4 e de proteína nos respectivos tanques.
- iv. Coletava-se um espectro do (cristal + filme) (32 "scans" e resolução de 4 cm<sup>-1</sup>).

- v. Passava-se um fluxo de água por 5 min., coletava-se 3 espectros (32 "scans" e resolução 4 cm<sup>-1</sup>). Esse procedimento tinha como finalidade lavar o filme e analisar a banda de absorção da água em 1640 cm<sup>-1</sup>.
- vi. Passava-se um fluxo da solução PBS por 30 minutos, para equilíbrio da força iônica, e coletava-se 3 espectros (cristal + filme + PBS) a 5, 15 e 30 minutos (32 "scans" e resolução de 4 cm<sup>-1</sup>).
- vii. Trocava-se a solução PBS pela solução de proteína e coletava-se espectros (cristal + filme + sol. salina + proteína) a cada 40 segundos nos 5 primeiros minutos (16 "scans" e resolução de 4 cm<sup>-1</sup>).
- viii. Continuava-se coletando espectros (36 "scans" e 4 cm<sup>-1</sup>) em 7, 10 e 15 minutos de ensaio.
- ix. Depois passava-se a coletar espectros (64 "scans" e 4 cm<sup>-1</sup>) a cada 7 minutos até atingir 2 horas de ensaio.
- x. Trocava-se a solução protéica pela solução PBS iniciando-se o processo de lavagem do filme com o intuito de retirar as proteínas fracamente adsorvidas e eliminar a contribuição das proteínas da solução protéica aos espectros.
- xi. A solução PBS era passada e descartada por 2 horas. Neste período coletava-se espectros da etapa de lavagem (64 "scans" e 4 cm<sup>-1</sup>) a cada 7 minutos.
- xii. Trocava-se novamente a solução salina pela solução protéica para conseguir quantificar a contribuição da proteína da solução protéica. Esta etapa durava 30 minutos e eram coletados espectros a cada 5 min (36 "scans" e 4 cm<sup>-1</sup>).
- xiii. Terminado o ensaio a célula era desmontada, o cristal com o filme + proteína era lavado com água e deixava-se secando em ambiente de laboratório. Quando este estivesse seco coletava-se um espectro (36 "scans" e 4 cm<sup>-1</sup>). Tal procedimento foi adotado com a finalidade de se certificar que o filme polimérico ainda permanecia sobre o cristal.

**Observação:** A vazão das soluções no sistema de fluxo contínuo quando se empregava as proteínas HSA e HIgG era de aproximadamente 33 mL/min., o que proporcionava um gradiente de cisalhamento ( $\Delta \tau$ ) de 417 s<sup>-1</sup>, comparável ao sanguíneo que é de  $\Delta \tau = 420$  s<sup>-1</sup>. Tal vazão resultava em um número de Reynolds igual a 70; logo o fluxo era laminar. Para a

proteína HFg a vazão usada proporcionava um  $\Delta \tau$  de aproximadamente 120 s<sup>-1</sup>. A deformação precisou ser diminuída neste caso pois para deformações superiores ocorria a desnaturação desta proteína após 30 minutos de experimento.

#### 4.7.1.1. Tratamento espectral

O tratamento dos espectros foi feito de acordo com Fink (1987). Antes de iniciar tal tratamento, todos os espectros obtidos durante o ensaio eram colocados na mesma escala, a seguir fazia-se uma correção automática da linha base e então transformava- os em dados numéricos.

Fazia-se uma subtração 1:1 dos dados dos espectros (E):

E (proteína + salina + filme + cristal) - E (salina + filme + cristal) = E proteína

Após a subtração do espectro (salina + filme + cristal) multiplicava-se o espectro por um fator de normalização (N) com a finalidade de padronizar todos os espectros para comparações e cálculos.

Foi calculado um fator de normalização (N) para cada experimento, pois a intensidade da banda de absorção da água em 1640 cm<sup>-1</sup> variou de experimento para experimento, provavelmente devido à montagem e desmontagem da célula de fluxo contínuo em cada experimento de acordo com a equação 21:

$$N = \frac{I_{H_2O(1640)}}{(I_{T(1640)} - I_{S(1640)})}$$
(21)

onde:  $I_{H2O}$  é a intensidade de absorção da banda da água em 1640 cm<sup>-1</sup>,  $I_T$  é a intensidade de absorção em 1640 cm<sup>-1</sup> do espectro total (cristal + polímero + tampão + proteína adsorvida) e  $I_S$  é a intensidade de absorção em 1640 cm<sup>-1</sup> do espectro da proteína após a subtração (cristal + polímero + tampão).

Depois que os espectros passavam pelo tratamento descrito acima (subtração e normalização) a região entre 1000 e 2000 cm<sup>-1</sup> era selecionada e uma linha base era traçada entre 1480 e 1700 cm<sup>-1</sup> como mostrado na Figura 23. Então, tal linha base era subtraída e a área da região entre 1480 e 1580 cm<sup>-1</sup>era calculada por integração. Desta forma obtinha-se a área da região de interesse para cada espectro em cada experimento. Com as áreas integradas calculava-se a densidade de adsorção pela Equação 11 do item 2.3.2.1. Construía-se uma curva da cinética de adsorção de tempo x densidade de adsorção de proteína. O resultado obtido durante a lavagem é referente à proteína adsorvida no material sem a contribuição da proteína presente na solução protéica; a média destes valores obtidos durante a etapa de lavagem foi utilizada para a quantificação da proteína adsorvida segundo a equação 11, já citada.



Figura 23: Representação esquemática do tratamento espectral.

# 4.8. Ensaio e Análise da Adsorção de Proteína Empregando a Técnica Eletroforese Capilar

Nesta etapa os ensaios de adsorção de proteínas sobre os biomateriais PHB e PLLA foram conduzidos no modo estático.

## 4.8.1. Curva de calibração da HSA

A curva de calibração para a proteína HSA foi feita conforme o protocolo abaixo:

#### Protocolo:

- Preparava-se aproximadamente 2 mL de soluções de proteína em várias concentrações em tampão fosfato pH 2,5 com 1% de SDS (dodecil sulfato de sódio). Estas soluções eram colocadas em frascos que eram tampados e deixados sob agitação branda por 2 horas.
- Depois os frascos eram colocados em banho ultra-sônico por 10 minutos, seguindo-se 10 minutos em banho à 100°C e novamente banho ultra-sônico por mais 10 minutos.
- O tampão de corrida da análise era um tampão fosfato pH 3,5 com 0,1% de SDS. Tal tampão era utilizado durante a análise no equipamento de eletroforese capilar.

As análises das soluções protéicas por Eletroforese Capilar foram feitas empregando um capilar de sílica fundida de 27 cm de comprimento e 50  $\mu$ m de diâmetro interno. A amostra foi injetada sob pressão de 0,5 psi por 10 segundos, o campo elétrico utilizado foi de 400V/cm, a voltagem do processo de separação foi de 12 V, a temperatura de análise foi de 20°C e a absorbância monitorada foi de 200 nm.

Os parâmetros, as soluções tampão e as concentrações das soluções protéicas utilizadas, baseiam-se no trabalho de pós-doutorado desenvolvido por Paulo Rosa (1998) neste laboratório.

Após as análises foram construídas curvas de absorbância x tempo (min), e calculada a área integrada sob a banda de absorção da proteína que ocorria em torno de 2,8 min. Com tais resultados construía-se um gráfico de área integrada x concentração ( $\mu$ g/mL), fazia-se um ajuste linear da curva passado pelo ponto (0,0) e obtinha-se uma equação do tipo y = ax, onde: a é uma constante, y é a área integrada e x a concentração.

#### 4.8.2. Ensaios de adsorção de HSA em PLLA e PHB, via Eletroforese Capilar

Para o ensaio de adsorção de HSA nos biomateriais foram usados pinos de PLLA e PHB, de 4,00 mm de diâmetro e 90,00 mm de comprimento proporcionando, assim, uma área superficial total de aproximadamente 10 cm<sup>2</sup>. Tais ensaios foram conduzidos segundo o protocolo abaixo.

# Protocolo:

# a) Preparação da superfície:

- O material era sonicado com solução detergente por 5min,
- Lavado com água milli-Q,
- Sonicado com água milli-Q por 5 min.,
- Seco em estufa 45 °C,
- Equilibrio da superficie com tampão PBS: 3 ciclos de contato da superficie com 2,5 mL de tampão por 5 min.

# b) Adsorção e lavagem

- O material era incubado em 3,5mL de solução protéica por 1 h, à 37°C sob agitação branda.
- Terminado o ensaio de adsorção o material era lavado, realizando-se 8 ciclos de lavagem com 2,5mL de tampão PBS por 20 segundos cada ciclo.
- O material lavado era removido e colocado em tubo limpo.

# c) Eluição da proteína adsorvida na superfície do material

- Incubar o material com 3,5mL de tampão fosfato, 50mM + 1%SDS, pH 2,5, por 2h à temperatura ambiente sob agitação branda.
- Sonicar o sistema em banho ultrassônico por 10 min.
- Ferver o sistema por 10 min.
- Sonicar o sistema em banho ultrassônico por 10 min.

# d) Análise da solução com a proteína eluída do material, via Eletroforese Capilar

- Capilar de sílica fundida 27 cm x 50 µm
- Voltagem: 12 kV

- Absorbância @ 200nm
- Temperatura 20°C
- Tampões: amostra tampão fosfato (PB) 50mM + 1% SDS, pH 2,5; corrida PB 150 mM+0,1%SDS, pH 3,5.

## e) Tratamento dos dados

- Construir curva absorbância x tempo
- Calcular a área integrada sob o pico da proteína
- Usando a equação da curva de calibração calcular a concentração correspondente à área calculada.
- Cálculo da densidade superficial de proteína (HSA) adsorvida no biomaterial segundo equação 22.

$$\Gamma = \frac{C_{ad}V_{el}}{A} \tag{22}$$

onde:  $\Gamma$  é a densidade superficial de proteína adsorvida ( $\mu g/cm^2$ ),  $C_{ad}$  é a concentração de proteína adsorvida (calculada através da curva de calibração),  $V_{el}$  é o volume da solução de eluição (no caso 3,5 mL) e A é a área superficial de biomaterial utilizada (no caso 10 cm<sup>2</sup>).

## **CAPÍTULO** V

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 5.1. Caracterização das Blendas PHB/PLLA na forma de pinos e filmes

Blendas PHB/PLLA nas concentrações 0/100, 30/70, 50/50, 70/30 e 100/0 foram obtidas segundo o protocolo mencionado no item 4.2.1 a) e 4.2.2, e caracterizadas através das técnicas de MDSC, DMA, SEM, TGA, WAXS e SAXS, ensaio mecânico de flexão e GPC, empregando os parâmetros apresentados nos itens: 4.5.1, 4.5.2, 4.5.3, 4.5.4, 4.5.5 e 4.5.6, 4.5.7, respectivamente.

#### 5.1.1. Calorimetria Diferencial de Varredura - MDSC

O DSC com temperatura modulada tem alguns beneficios com relação ao estudo de transições térmicas de materiais, quando comparado ao DSC convencional. Alguns destes beneficios são: separar fenômenos sobrepostos tais como fusão e recristalização, em materiais semicristalinos; mostrar relaxações entálpicas na temperatura de transição vítrea e mostrar transições de diferentes componentes de blendas (VERDONCK, 1999; SAUER, 2000; PAK, 2000).

As Figuras 24 (a,b), 25 (a,b) e 26 (a,b) mostram os termogramas de fluxo de calor total do primeiro aquecimento e fluxos de calor reversível e irreversível do segundo aquecimento da análise de MDSC para as amostras na forma de pinos e filmes. Valores de temperatura de transição vítrea (Tg), temperatura de cristalização (Tc), temperatura de fusão (Tf), entalpias de fusão ( $\Delta$ Hf) e cristalização ( $\Delta$ Hc) e grau de cristalinidade (% $\chi$ c) das amostras na forma de pinos e filmes são dados nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.



(a)



**(b)** 

Figura 24: Termogramas do Fluxo de Calor Total do primeiro aquecimento, da blenda de PHB/PLLA em diferentes composições, para (a) pinos e (b) filmes.



**(a)** 



Figura 25: Termogramas de Fluxo de Calor (a) reversível e (b) irreversível, do segundo aquecimento, para os pinos de PHB/PLLA, em diferentes composições.



(a)



**(b)** 

Figura 26: Termogramas de Fluxo de Calor (a) reversível e (b) irreversível, do segundo aquecimento, para os filmes de PHB/PLLA, em diferentes composições.

**Tabela 8:** Valores de temperatura de transição vitrea (Tg), temperatura de cristalização (Tc), temperatura de fusão (Tf), entalpias de fusão ( $\Delta$ Hf) e cristalização ( $\Delta$ Hc) e grau de cristalinidade (% $\chi$ c); obtidos do primeiro e segundo aquecimento da análise de MDSC, para as blendas PHB/PLLA 0/100, 30/70, 50/50, 70/30 e 100/0, na forma de pinos.

Pl	inos	Tg	(°C)	Tc	(°C)	ΔHc	(J/g)	Tf (°C)	ΔHf (J/g)	<b>X</b> c (%)	ZC (%)
PHB/PLLA	Aquecimento	PHB	PLLA	РНВ	PLLA	PHB	PLLA	PHB PLLA	TOTAL	PLLA	PHB
0/100	1.		63		102		20	181	44	26	
	2°		58		87		27	178	45		
30/70	15		59		85		7	178	56	34	12
	2°	-4	51	30	76	2,0	17	178	39		
50/50	1.0		61		90		2	179	70	35	24
	2°	1	52	32	75	6,0	16	170 178	63		
70/30	10		59		100		6	178	69	16	33
	2°	-1	52	30	77	3,0	10	170 178	73		
100/0	18							175	82	•	56
	2°	-4		29		4,0		168	89		

**Tabela 9:** Valores de temperatura de transição vítrea (Tg), temperatura de cristalização (Tc), temperatura de fusão (Tf), entalpias de fusão ( $\Delta$ Hf) e cristalização ( $\Delta$ Hc) e grau de cristalinidade (% $\chi$ c); obtidos do primeiro e segundo aquecimento da análise de MDSC, para as blendas PHB/PLLA 0/100, 30/70, 50/50, 70/30 e 100/0, na forma de filmes.

ពា	mes	Tg	(°C)	Tc	(°C)	ΔHa	e (J/g)	Tf (°C)	ΔHf (J/g)	χς (%)	χε (%)
PHB/PLLA	Aquecimento	PHB	PLLA	PHB	PLLA	PHB	PLLA	PHB PLLA	TOTAL	PLLA	РНВ
0/100	10							176	40	43	•
	2°		56		88		25	177	44		
30/70	I.a							176	45	34	9
	2°	-3	46	30	71	4	16	166 177	50		
50/50	10							177	57	30	20
	2°	-1	51	33	71	10	13	165 177	58		
70/30	lo							174	62	20	30
	2°	-3	44	32	69	18	11	160 175	68		
100/0	1°							175	89	+	61
	20	-1		31		13		168	97		

Analisando as Figuras 24 (a) e (b) observa-se que no 1° aquecimento só foi possível identificar a Tg relativa ao PLLA puro e nas blendas na forma de pinos, em torno de 60°C. Em relação à Tg do PLLA puro na forma de filmes no 1° aquecimento, pode-se dizer que o modo de preparação da amostra; blenda e evaporação lenta do solvente, contribuiu para proporcionar maior cristalinidade ao PLLA atingindo um grau de cristalinidade de 44%, enquanto para os pinos esse valor é de 26% (Tabelas 8 e 9). Portanto, as cadeias amorfas do PLLA puro na forma de filmes, não tiveram mobilidade para caracterizar sua Tg no 1° aquecimento. O mesmo pode ser dito com relação à Tg do PLLA nas blendas na forma de filmes, sendo que neste caso as blendas ainda contam com a presença do PHB que é altamente cristalino e também proporciona aumento na cristalinidade das amostras.

A Tg relativa ao PHB puro e nas blendas na forma de pinos e filmes não pôde ser visualizada porque a análise teve início na temperatura ambiente, e a Tg relativa ao PHB ocorre em torno de  $0^{\circ}$  C.

Desse modo, as Tg's puderam ser melhor caracterizadas através das curvas do fluxo de calor reversível no 2° aquecimento, Figuras 25 (a) e 26 (a), que mostram uma única Tg para os homopolímeros em –1 e 60°C (pinos) e –1 e 56°C (filmes) para o PHB e PLLA, respectivamente; e mostram duas Tg's para as blendas PHB/PLLA, em torno de –1 e 55°C (pinos) e –2 e 47°C (filmes) referentes ao PHB e PLLA, respectivamente, sugerindo imiscibilidade entre os polímeros para todas as concentrações estudadas. Estudos com blendas de PHB/P(S)LA mostraram resultados similares com a presença de duas Tg's (KOYAMA e DOI, 1997; OHKOSHI, 2000); e estudos com a blenda PHB/PDLA também apresentaram imiscibilidade entre os polímeros com a presença de duas Tg's distintas (ZHANG, 1996).

O pico de cristalização no 1° aquecimento (Figura 24) só pôde ser visualizado para o PLLA na forma de pino, pois como já foi dito as outras amostras, apresentavam-se muito cristalinas, não ocorrendo esse fenômeno durante o 1° aquecimento.

As Figuras 25 (b) e 26 (b) que apresentam resultados do 2° aquecimento mostram um pico de cristalização para os homopolímeros PHB e PLLA, e dois picos de cristalização para as blendas, relativos ao PHB e PLLA. A Tc do PLLA puro é maior que a Tc do PLLA nas blendas, para pinos e filmes, enquanto a Tc relativa ao PHB permanece constante, indicando que o componente PHB afeta a cristalização do PLLA na blenda. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que quando o PLLA cristaliza já existem cristais de PHB presentes na blenda, os quais podem interferir resultando na cristalização do PLLA em temperaturas mais baixas, fornecendo um decréscimo na Tc deste polímero, porém, a quantidade de PHB na blenda não influencia a Tc do PLLA. Resultados similares foram observados por Koyama e Doi para a blenda PHB/P(S)LA (KOYAMA e DOI, 1997).

No 1° aquecimento observou-se uma única temperatura de fusão tanto para homopolímeros como para as blendas na forma de pinos e filmes, mostrando que os polímeros PHB e PLLA fundem juntos, o que sugere imiscibilidade entre PHB e PLLA para todas as blendas estudadas.

No 2° aquecimento (Figuras 25 b e 26 b) uma única temperatura de fusão foi observada para os homopolímeros em torno de 168 e 178°C (pinos) e 168 e 177°C (filmes) para o PHB e PLLA, respectivamente. Um pico de recristalização imediatamente antes da fusão do PLLA foi verificado, tanto para os pinos como para os filmes. As blendas PHB/PLLA 30/70 e 50/50 na forma de pino (Figura 25 b) apresentaram um sinal de recristalização antes da fusão e também uma ligeira proeminência antes da Tf do PLLA, indicando a fusão do PHB, enquanto a blenda 70/30 mostrou duas Tf distintas relativas ao PHB e PLLA, porém nenhum fenômeno de recristalização pôde ser observado. Para as amostras na forma de filmes (Figura 26 b) todas as blendas 30/70, 50/50 e 70/30 apresentaram duas Tf bem definidas e distintas, podendo-se ainda verificar indício de recristalização antes da fusão para as blendas 30/70 e 50/50. Resultados similares foram observados por Sauer usando a análise de MDSC para estudar o PEN (polietileno dicarboxilato de naftaleno) (SAUER, 2000).

O fenômeno de recristalização à partir da nucleação molecular, ocorre quando cadeias ou segmentos de cadeias se fundem próximos à cristais íntegros que possuem temperatura de fusão superiores. Quando durante a existência de tal situação ocorre um resfriamento insignificante as cadeias ou segmentos fundidos se cristalizam sobre os cristais ainda existentes ocorrendo, assim, a cristalização por nucleação (SAUER, 2000).

As temperaturas de fusão do PHB e do PLLA, no 2º aquecimento, para os dois tipos de amostras, pinos e filmes, permaneceram constantes confirmando a imiscibilidade entre o PHB e o PLLA.

65

A partir dos dados de  $\Delta$ Hf e  $\Delta$ Hc e  $\Delta$ Hf<sup>0</sup> calculados considerando o polímero 100% cristalino, pode-se calcular o grau de cristalinidade relativo ao PLLA e/ou PHB ( $\chi_c$ %) nas blendas através da equação (23):

$$X_C = \frac{w_1 \Delta H f - \Delta H c_1}{\Delta H^0 f_1}.100$$
(23)

onde:  $w_1$  é a porcentagem em massa de PHB ou PLLA,  $\Delta$ Hf é a entalpia de fusão aparente obtida da análise,  $\Delta$ Hc<sub>1</sub> é a entalpia de cristalização do PHB ou PLLA obtido da análise e  $\Delta$ H<sup>0</sup>f<sub>1</sub> é a entalpia teórica de fusão para o polímero 100% cristalino. Os valores obtidos da literatura de  $\Delta$ H<sup>0</sup>f são: 93,7 J/g para o PLLA (TSUJI e IKADA, 2000) e 146 J/g para o PHB (AVELLA, 1997).

Os resultados a partir do primeiro aquecimento (Tabelas 8 e 9) mostraram que o grau de cristalinidade do PLLA e do PHB diminui com o aumento da concentração do outro componente na blenda, para pinos e para filmes. Observa-se, ainda, que o grau de cristalinidade do PHB puro é maior que do PLLA puro, e que o grau de cristalinidade total, soma dos graus de cristalinidade referentes ao PHB e PLLA nas blendas, aumenta em função do aumento da concentração de PHB nas blendas, sugerindo que provavelmente devido à sua alta cristalinidade o PHB influenciou de alguma forma na cristalização da blenda. Resultados similares foram observados para a blenda PHBV/PLLA, onde o pesquisador verificou aumento do grau de cristalinidade da blenda com o aumento da concentração de PHBV.

#### 5.1.2. Análise Termogravimétrica - TGA

A análise termogravimétrica para filmes e pinos foi feita para se estudar a estabilidade térmica dos homopolímeros e das blendas PHB/PLLA. Para os pinos tal análise também possibilitou a averiguação de possível ocorrência de processo de degradação durante a blenda (processamento) das amostras, que foi feita a 200°C. Esta temperatura é considerada alta, pois está acima da temperatura de fusão dos polímeros PHB e PLLA.

A Tabela 10 e as Figuras 27 e 28 mostram os resultados obtidos a partir da análise de TGA para as amostras na forma de pinos e filmes, respectivamente.

Pode-se verificar (Tabela 10) que a temperatura inicial de perda de massa (T on set), associada ao início do processo de degradação, para os homopolímeros e para as blendas na forma de pinos, é superior à temperatura de processamento utilizada para a obtenção dos mesmos. Portanto, conclui-se que nenhum processo de degradação ocorreu durante a obtenção destas amostras.

**Tabela 10:** Dados da temperatura inicial de perda de massa (T on set), temperatura de máxima perda de massa (T peak) e porcentagem de perda de massa (%), obtidos da análise de TGA para as blendas PHB/PLLA, na forma de pinos e filmes.

Pinos	T onset (°C)		T pes	k (°C)	Perda de 1	Perda de massa (%)		
PHB/PLLA	PHB	PLLA	PHB	PLLA	PHB	PLLA		
0/100		322		340	*****	99		
30/70	276	347	290	365	34	66		
50/50	271	330	280	348	52	44		
70/30	269	325	276	345	67	31		
100/0	235		249		98	****		
Filmes	T ons	et (°C)	T pea	k (°C)	Perda de i	nassa (%)		
PHB/PLLA	PHB	PLLA	РНВ	PLLA	PHB	PLLA		
0/100		346		365		86		
30/70	266	337	280	363	28	62		
50/50	268	332	280	352	49	47		
70/30	268	324	276	344	63	29		
100/0	264		277	<b></b>	97			



Figura 27: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das blendas na forma de pinos.



Figura 28: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das blendas na forma de filmes.

Pode-se verificar ainda pelas Figuras 27 e 28, que pinos e filmes apresentam um único estágio de perda de massa para os homopolímeros (PHB e PLLA) e dois estágios para as blendas PHB/PLLA, referentes ao PHB e PLLA, respectivamente. Pelos dados obtidos (Tabela 10) observa-se para pinos e filmes que o PLLA possui maior estabilidade térmica que o PHB, pois o PLLA inicia sua degradação térmica em torno de 320° C (T on set) e alcança o máximo da perda de massa em torno de 340° C (T peak); enquanto o PHB inicia sua degradação térmica em torno de 235° C e sua máxima perda de massa se dá por volta de 250° C. Resultado similar foi obtido para a blenda PLLA/PHBV (FERREIRA, 2002).

Nas blendas observa-se que a estabilidade térmica do PHB aumenta com o aumento da concentração de PLLA nestas, pois as temperaturas "T on set" e "T peak" crescem em função da concentração de PLLA nas blendas. Assim, sugere-se que o PLLA melhora a estabilidade térmica das blendas PHB/PLLA estudadas, tanto para filmes como para pinos.

#### 5.1.3. Análise Dinâmico Mecânica - DMA

Os módulos de perda (E") e de armazenamento (E') das blendas na forma de pinos e filmes são plotados em função da temperatura nas Figuras 29 e 30, respectivamente; e os valores de temperatura de transição vítrea (Tg) obtidos a partir das curvas do módulo de perda da análise (E") são apresentados na Tabela 11.

Analisando o módulo de perda E" das Figuras 29 e 30 observa-se uma única Tg para os homopolímeros em torno de 86 e 47° C para PLLA e PHB, nos pinos, e 47 e 6° C para PLLA e PHB nos filmes. As blendas de PHB/PLLA apresentam, duas Tg's relativas ao PHB e PLLA tanto para pinos como para filmes, sugerindo imiscibilidade entre os polímeros concordando assim com os resultados de MDSC.

Para as blendas na forma de pinos observa-se que a Tg relativa ao PLLA permanece constante, em torno de 86° C, enquanto a Tg relativa ao PHB sofre um decréscimo com o aumento da concentração de PLLA na blenda (Tabela 11).

Analisando a Tabela 11 observa-se que para as blendas na forma de filmes à Tg relativa ao PLLA aumenta em função da concentração de PHB, assim como a Tg relativa ao PHB sofre um acréscimo com o aumento da concentração de PLLA na blenda, isso indica que ambos os polímeros são influenciados pela presença do outro, diminuindo a mobilidade das cadeias amorfas.

Analisando ainda o E" (Figuras 29 e 30) para as amostras na forma de pinos verifica-se que o homopolímero PHB e a blenda PHB/PLLA 70/30 apresentam também processos em altas temperaturas, em torno de 90 e 120°C, respectivamente. Estes processos em altas temperaturas envolvem rearranjo da fase cristalina, assim como observado por Lotti para o PHB puro no estudo da blenda PHB/PMMA (LOTTI, 1993). O módulo de perda (E") também apresentou transições secundárias à baixas temperaturas devido à mobilidade de cadeias laterais para todas as composições da blenda PHB/PLLA na forma de pinos. Esse fato não foi observado para os filmes porque estes tiveram tempo suficiente para acomodar as cadeias durante a evaporação do solvente.

Para as blendas na forma de pinos o E' do PLLA tem um decréscimo rápido em torno de 85° C enquanto que o E' do PHB decresce lentamente, até alcançar a temperatura de 156°C, quando ocorre um decréscimo drástico. Para as blendas o E' comporta-se muito semelhante ao do PHB, exceto pelo decréscimo um pouco mais enfático em torno de 85°C, devido à presença do componente PLLA nas blendas.

Analisando o E' das amostras na forma de filmes observa-se o mesmo comportamento tanto para homopolímeros quanto para blendas, o módulo decresce lentamente até atingir uma temperatura em torno de 160°C, sendo que se observa um decréscimo um pouco mais enfático em torno de 80°C nas blendas devido à presença do PLLA.

70



Figura 29: Gráficos dos módulos de armazenamento e de perda da análise de DMA das blendas PHB/PLLA na forma de pinos.



**Figura 30:** Gráficos dos módulos de armazenamento e de perda da análise de DMA das blendas PHB/PLLA na forma de filmes.

**Tabela 11:** Dados de temperatura de transição vítrea (Tg) obtidos a partir das curvas do módulo de perda (E"), da análise de DMA das blendas PHB/PLLA na forma de pinos e filmes.

Pinos	Tg (°C	) - E"
PHB/PLLA	PHB	PLLA
0/100		86
30/70	30	88
50/50	38	88
70/30	48	85
100/0	47	
Filmes	PHB	PLLA
0/100		47
30/70	24	61
50/50	6	68
70/30	9	66
100/0	6	

#### 5.1.4. Análise morfológica – SEM

As Figuras 31 e 32 mostram as micrografias da análise de microscopia eletrônica de varredura (SEM) da superficie da seção transversal das blendas PHB/PLLA na forma de pinos e filmes, respectivamente.

Analisando a Figura 31 (pinos) observa-se que todas as amostras são densas, sendo que, a morfologia das blendas é diferente da morfologia dos homopolímeros. Apesar disso, com aumentos de até 1500x, não se observou separação de fase nas blendas.

Analisando a Figura 32 (filmes) verifica-se que a morfologia dos homopolímeros é densa, sendo que o PHB apresenta morfologia esférica (Figura 32 f), enquanto que as blendas apresentam morfologia bem diferente dos homopolímeros, podendo-se observar poros. Comparando as blendas verifica-se que os poros da blenda 50/50 são maiores do que nas blendas de PHB/PLLA 30/70 e 70/30. Pode-se sugerir que nas blendas na forma de

filmes existe separação de fases, sendo que, na blenda PHB/PLLA 30/70 tem-se uma matriz de PLLA e os poros seria a fase dispersa de PHB que foi retirada no momento da fratura da amostra, o mesmo pode-se dizer da blenda de PHB/PLLA 70/30, porém nesta amostra a matriz é o PHB e a fase dispersa o PLLA. Na blenda PHB/PLLA 50/50 tem-se concentração igual dos dois polímeros, logo a concentração da fase dispersa na matriz é maior do que para as outras blendas, como conseqüência tem-se poros de maior tamanho. Zhang e colaboradores estudaram a blenda PHB/PLA usando extração da fase de PLA com solvente tolueno; a morfologia apresentada por estes autores é muito próxima da discutida no presente trabalho. No estudo com PHB/PLA os autores mostram a presença de duas fases, onde os poros decorrentes da fase de PLA aumentaram de tamanho em função do aumento da concentração de PLA na blenda.(ZHANG, 1995; ZHANG, 1996). Outros autores também observaram separação de fases para blendas de PHBV/PLLA (IANNACE, 1994; FERREIRA, 2002).

A diferença de morfologia entre pinos e filmes é decorrente do tipo de preparação das amostras, podendo-se salientar que na preparação dos filmes o processo de evaporação do solvente possivelmente favoreceu a separação de fases.



**Figura 31:** Micrografias das superfícies das fraturadas das misturas PHB/PLLA na forma de pinos: (a) 0/100, (b) 100/0, (c) 30/70, (d) 50/50 e (e) 70/30.



**Figura 32:** Micrografias das superficies das fraturadas das misturas PHB/PLLA na forma de filmes: (a) 0/100, (b) 100/0, (c) 30/70, (d) 50/50, (e) 70/30 e (f) 100/0 (detalhe da superficie).

#### 5.1.5. Análise de difração de raios-X (WAXS)

A Figura 33 mostra uma representação gráfica de um resultado de análise de WAXS, onde I é a intensidade de espalhamento e 2θ é o ângulo de espalhamento. Através deste gráfico pode-se calcular o grau de cristalinidade para um material semi-cristalino. O método mais empregado usa as intensidades integradas do modelo associado às partes amorfas e cristalinas do material semi-cristalino. O grau de cristalinidade, X<sub>c</sub>, é dado como a fração em massa do componente cristalino pela equação (24) (RYAN, 1997):

$$X_{\rm C} = \frac{A_{\rm C}}{\left(A_{\rm C} + A_{\rm a}\right)} \tag{24}$$

onde:  $A_a$  é a área sob o halo amorfo e  $A_c$  é a área restante sob os picos cristalinos como mostrado na Figura 33.



Figura 33: Representação gráfica genérica de uma análise de WAXS (RYAN, 1997).

As Figuras 34 e 35 apresentam os resultados da análise de WAXS para as blendas PHB/PLLA na forma de pinos e filmes, respectivamente, e as Tabela 12 e 13 apresentam o resultado do grau de cristalinidade, calculado pela equação 24 apresentada acima e a largura à meia altura dos principais picos, respectivamente.

Analisando as Figuras 34 e 35 (pinos e filmes) verifica-se a existência de 4 picos característicos do PHB para 20 em torno de: 14, 17, 26 e 28. Verifica-se também o aparecimento de um pico muito intenso em  $2\theta = 17$  para o PLLA, o qual coincide com um pico característico do PHB, e outros picos de pouca intensidade em torno de 15, 20 e 23.

Para a blenda PHB/PLLA 50/50 nota-se a presença de todos os picos característicos do PHB e do PLLA simultaneamente. Resultados similares tem sido observado para o PLLA (FUJIWARA, 2001; JIN KON KIM, 2001).



Figura 34: Difractogramas para as blendas PHB/PLLA 0/100, 50/50 e 100/0, na forma de pinos.



Figura 35: Difractogramas para as blendas PHB/PLLA 0/100, 50/50 e 100/0, na forma de filmes.

Tabela 12: Grau de cristalinidade calculados (equação 24), a partir dos resultados das análises de WAXS para as blendas PHB/PLLA 0/100, 50/50 e 100/0, na forma de pinos e filmes.

Pinos	Grau de cristalinidade - Xc (%)
PHB/PLLA 0/100	17
PHB/PLLA 50/50	50
PHB/PLLA 100/0	58
Filmes	Grau de cristalinidade - Xc (%)
PHB/PLLA 0/100	52
PHB/PLLA 50/50	56

 Tabela 13: Largura à meia altura (FWHM) obtidos da análise de WAXS para as amostras de PHB/PLLA em várias concentrações na forma de pinos e filmes.

Pico amostra	Largura à meia altura (FWHM)								
Pinos	14	15,5	19,7	23	26	28			
PLLA		0,5	0,447	0,57					
50/50	0,257	0,295	0,46						
PHB	0,340				0,908	0,5			
Filmes	14	15,5	19,7	23	26	28			
PLLA		0,36	0,5						
50/50	0,22	0,28	0,44	T					
PHB	0,25	0,37			0,91	0,36			

Analisando a Tabela 12 observa-se aumento da cristalinidade da blenda PHB/PLLA na forma de pino devido à presença do PHB, podendo-se sugerir e confirmar o que já foi verificado na análise de MDSC sobre a influência do PHB na cristalinidade da blenda PHB/PLLA, provavelmente devido ao seu alto grau de cristalinidade.

As amostras na forma de filmes não apresentaram variações significativas no grau de cristalinidade em função da composição (Tabela 12), mas este fato também pôde ser verificado pela análise de MDSC, que apesar do grau de cristalinidade da blenda aumentar
em função da concentração de PHB a diferença numérica não é grande (Tabela 9). Além disso, já foi discutido anteriormente que o PLLA na forma de filme possui grau de cristalinidade elevado devido ao método de preparação da amostra que, provavelmente, favoreceu sua cristalização.

A Tabela 13 traz os valores da largura à meia altura de alguns picos obtidos do gráfico da análise de WAXS. A largura à meia altura é inversamente relacionada ao tamanho dos cristalitos. Desse modo, analisando a Tabela 13 observa-se que a largura dos picos relativos ao PHB diminui quando comparamos os valores do PHB puro aos da blenda 50/50, para pinos e filmes. Isso também acontece para o PLLA, exceto para o pico na posição 17 onde se verifica o inverso, um aumento na largura do pico do PLLA puro em relação à blenda.

Assim, pode-se dizer que os cristalitos são maiores na blenda do que nos polímeros puros, considerando ainda que o decréscimo na largura dos picos relativos ao PHB na blenda é mais acentuado do que para os picos relativos ao PLLA, sugere-se que o PHB possui maior influencia na cristalização da blenda, assim como já foi discutido na análise de MDSC.

#### 5.1.6. Análise de espalhamento de raios-X à baixos ângulos (SAXS)

O estudo da estrutura de polímeros pelo método de espalhamento de raio-X à baixos ângulos é um campo de aplicação muito importante. Tais estudos podem ser conduzidos tanto em soluções à várias concentrações como no estado sólido (amorfo, cristalino). Estes estudos dão informações sobre a estrutura dos polímeros, que não são conseguidas por outros métodos (FEIGIN, 1987).

Como regra tem-se que macromoléculas em solução apresentam conformação totalmente livre (estatisticamente enrolada); cristais de polímeros consistem de um agregado de camadas lamelares orientadas aleatoriamente. As amostras de polímeros são geralmente polidispersas contendo moléculas com diferentes massas molares (FEIGIN, 1987).

Polímeros semi-cristalinos são ideais para estudos por SAXS, pois apresentam variação de densidade eletrônica cuja correlação de comprimento usualmente está dentro da

79

faixa detectada por esta técnica (1 - 100 nm). Além disso, suas estruturas podem, em muitos casos, ser adequadamente descritas assumindo que a variação de densidade eletrônica ocorre na direção de uma única coordenada. Isto permite cálculos de modelos de difração, mesmo quando existe uma grande diferença do modelo de estrutura periódica ideal (VONK, 1982).

O modelo ideal de estrutura polimérica utilizado consiste de: lamelas cristalinas e amorfas, paralelas, empilhadas, como mostrado na Figura 36. As lamelas se organizam em esferulitos, nos quais a direção lamelar normal varia gradualmente. Este modelo é uma boa aproximação principalmente para polímeros de alta cristalinidade.



Figura 36: Modelo da estrutura polimérica ideal (FEIGIN, 1987).

Um gráfico típico de SAXS é apresentado na Figura 37, onde I é a intensidade de espalhamento e q é a magnitude do vetor espalhamento (ou a distância do espalhamento no espaço recíproco). Através deste gráfico tem-se um valor de q\* (pico de interferência) em  $Iq^2$  máximo, e pela equação de Bragg (equação 25) obtém-se o período longo (d<sub>1</sub>) que caracteriza l<sub>c</sub> (lamela cristalina) + l<sub>a</sub> (lamela amorfa) (RYAN, 1997).

$$d_1 = \frac{2\pi}{q^*}$$
(25)



Figura 37: Curva de SAXS genérica (RYAN, 1997).

As Figuras 38 e 39 apresentam as curvas da análise de SAXS para as amostras de PHB/PLLA na forma de pinos e filmes respectivamente, e a Tabela 14 apresenta os valores do período longo obtidos da análise.



Figura 38: Curvas de SAXS para as blendas PHB/PLLA 0/100, 50/50 e 100/0, na forma de pinos.



Figura 39: Curvas de SAXS para as blendas PHB/PLLA 0/100, 50/50 e 100/0, na forma de filmes.

**Tabela 14:** Resultados do período longo calculados pela equação 25, a partir dos resultados das análises de SAXS para as blendas PHB/PLLA 0/100, 50/50 e 100/0.

Pinos	Período lor	igo (Å)					
PHB/PLLA	РНВ	PLLA					
0/100		249					
50/50	59	240					
100/0	58						
Filmes	Período longo (Â)						
PHB/PLLA	PHB	PLLA					
0/100		205					
50/50	69	137					
100/0	71	5					

Analisando as Figuras 38 e 39 para pinos e filmes, respectivamente verifica-se a existência de picos de primeira ordem sendo que, para os homopolímeros, observa-se somente um pico e para a blenda 50/50 nota-se a presença de dois picos, um proveniente do PLLA e outro do PHB. Além disso, verifica-se que os picos da blenda deslocam-se ligeiramente, em relação a estes nos homopolímeros, sendo que nos pinos observa-se o deslocamento do pico referente ao PHB para a esquerda, menores valores de q e do PLLA para a direita, maiores valores de q. Nos filmes nota-se o deslocamento dos picos relativos ao PHB e ao PLLA para a direita, maiores valores de q.

Observando a Tabela 14 verifica-se que o comprimento do período longo para o PLLA de 249 Å está próximo ao da literatura que reporta 190 Å (FUJIWARA, 2001). Para o PHB o valor do período longo é bem menor que para o PLLA, porém não se encontrou nada na literatura a respeito de SAXS em PHB. Verifica-se ainda, que os valores do período longo relativo ao PHB na blenda PHB/PLLA 50/50 são semelhantes ao do polímero puro, PHB, enquanto que o valor do período longo relativo ao PLLA na blenda decresce principalmente para a amostra na forma de filme, comprovando mais uma vez que o PHB influencia a estrutura do PLLA como já observado nas análises de MDSC e WAXS.

#### 5.1.7. Ensaio mecânico de flexão - pinos

A tensão ( $\sigma$ ) e o alongamento ( $\varsigma$ ) foram calculados segundo a norma ASTM D 790-71 e, considerando os pinos como sistemas cilíndricos (NIELSEN, 1974).

$$\sigma = \frac{8FL_0}{\pi D^3} \tag{26}$$

$$\varsigma = \left(\frac{6DY}{L_0^2}\right).100\tag{27}$$

$$\mathbf{E} = \mathbf{d}\boldsymbol{\sigma} / \mathbf{d}\boldsymbol{\varsigma} \tag{28}$$

onde: F é a força (N); L<sub>0</sub> é a distância entre as pontas (mm);  $\varsigma$  é o alongamento (%);  $\sigma$  é a tensão (MPa); Y é a deformação (mm); D é o diâmetro da amostra (mm) e E é o módulo de Young.

Na Figura 40 o gráfico é construído com a tensão (σ) em função do alongamento (ς) para todas as composições da blenda PHB/PLLA. A Tabela 15 mostra a tensão máxima

até a ruptura ( $\sigma$  max.), o módulo de Young (E) e o alongamento máximo ( $\varsigma$  max.). A tensão máxima sofrida pelas blendas até a ruptura varia em função da concentração das blendas PHB/PLLA, assim como o alongamento.



Figura 40: Curvas de tensão máxima ( $\sigma$  max.) em função do alongamento máximo ( $\varsigma$  max.) do ensaio mecânico de flexão para as blendas PHB/PLLA 0/100, 30/70, 50/50, 70/30 e 100/0.

Os resultados apresentados na Tabela 15 mostram que a tensão máxima ( $\sigma$  max.), o módulo de Young (E) e o alongamento máximo ( $\varsigma$  max.) aumentam com o aumento da concentração de PLLA nas blendas, sugerindo que o PLLA melhora as propriedades mecânicas da blenda PHB/PLLA. Quando as blendas são comparadas observa-se que o PLLA tem o maior valor de tensão máxima e a blenda PHB/PLLA 30/70 tem o maior valor de alongamento máximo. Portanto, pode-se dizer que a blenda PHB/PLLA 30/70 apresenta as melhores propriedades mecânicas, pois esta possui o maior valor para alongamento máximo e o maior módulo, e a tensão máxima é similar à do PLLA. Resultados similares tem sido observado para a blenda PHBV/PLLA (IANNACE, 1994).

A Tabela 16 traz os resultados experimentais de tensão máxima obtidos e valores encontrados na literatura (YUEHUEI, 2000; SUDESH, 2000). Comparando os valores da Tabela 16 observa-se boa coerência entre os valores experimentais e os da literatura, sugerindo que a blenda obtida apresenta boas propriedades mecânicas.

**Tabela 15:** Tensão máxima ( $\sigma$  max.), módulo de Young (E) e alongamento máximo ( $\varsigma$  max.) à partir do ensaio mecânico de flexão para as blendas PHB/PLLA 0/100, 30/70, 50/50, 70/30 e 100/0.

PHB/PLLA	σ max. (MPa)	E (MPa)	ς max. (%)
0/100	$136 \pm 13$	8477 ± 932	3,36 ± 0,008
30/70	$115 \pm 9$	$9100\pm888$	$5,\!66\pm0,\!024$
50/50	92 ± 7	8613 ± 442	$2,36\pm0,012$
70/30	$77 \pm 11$	$8795\pm628$	$1,\!40\pm0,\!077$
100/0	57 ± 4	8692 ± 502	$1,22 \pm 0,003$

**Tabela 16:** Tensão máxima ( $\sigma$  max.): valores experimentais e da literatura.

Material Polimerico	o max. (MPa)
PHB/PLLA 0/100 *	136
PHB/PLLA 30/70 *	115
PHB/PLLA 50/50 *	92
PHB/PLLA 70/30 *	77
PHB/PLLA 100/0 *	57
PHB ***	40
Polipropileno ***	38
Polietileno de baixa densidade ***	10
PLLA **	45 - 144
Poli(ácido glicólico) (PGA) **	57
Poli óxido de etileno (PEO) **	65 - 66

\* experimentais

\*\* YUEHUEI, 2000

\*\*\* SUDESH, 2000

5.2. Caracterização das Blendas PHB/PLLA na forma de pinos e filmes após o ensaio de degradação "in vitro"

## 5.2.1. Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura Modulada - MDSC

As Figuras de 41 a 45 e de 46 a 50, apresentam as curvas de MDSC que acompanham o comportamento das blendas PHB/PLLA em várias composições durante a degradação hidrolítica, para pinos e filmes, respectivamente.

Os polímeros puros e as blendas foram caracterizados pela temperatura de transição vítrea (Tg), temperaturas de cristalização (Tc) e de fusão (Tf), calores de cristalização ( $\Delta$ Hc) e de fusão ( $\Delta$ Hf), e grau de cristalinidade ( $\chi_c$ %). Tais valores obtidos dos termogramas durante os 12 meses de degradação "in vitro" encontram-se nas Tabelas de 17 a 21 e de 22 a 26, para pinos e filmes, respectivamente.

No estudo de degradação, assim como na caracterização das blendas antes do ensaio de degradação hidrolítica, não foi possível observar a Tg relativa ao PHB puro e nas blendas para as amostras na forma de pinos e filmes, porque a análise teve início na temperatura ambiente e a Tg no PHB ocorre em torno de 0°C. A Tg relativa ao PLLA puro ou nas blendas na forma de pinos é visível, já para as amostras na forma de filmes verifica-se uma mudança na linha base, mas não é possível identificar a Tg através do tratamento feito com as curvas. Desse modo, os valores das Tg's para tais amostras foram obtidos das curvas de fluxo de calor reversível no 2° aquecimento.





Figura 41: Curvas de MDSC obtidas para os pinos de PHB/PLLA 0/100, em diferentes tempos de degradação: (a) 1° aquecimento e (b) 2° aquecimento.





Figura 42: Curvas de MDSC obtidas para os pinos de PHB/PLLA 30/70, em diferentes tempos de degradação: (a) 1° aquecimento e (b) 2° aquecimento.





Figura 43: Curvas de MDSC obtidas para os pinos de PHB/PLLA 50/50, em diferentes tempos de degradação: (a)  $1^{\circ}$  aquecimento e (b)  $2^{\circ}$  aquecimento.





**Figura 44:** Curvas de MDSC obtidas para os pinos de PHB/PLLA 70/30, em diferentes tempos de degradação: (a) 1° aquecimento e (b) 2° aquecimento.





Figura 45: Curvas de MDSC obtidas para os pinos de PHB/PLLA 100/0, em diferentes tempos de degradação: (a) 1° aquecimento e (b) 2° aquecimento.





Figura 46: Curvas de MDSC obtidas para os filmes de PHB/PLLA 0/100, em diferentes tempos de degradação: (a) 1° aquecimento e (b) 2° aquecimento.



Figura 47: Curvas de MDSC obtidas para os filmes de PHB/PLLA 30/70, em diferentes tempos de degradação: (a) 1° aquecimento e (b) 2° aquecimento.





Figura 48: Curvas de MDSC obtidas para os filmes de PHB/PLLA 50/50, em diferentes tempos de degradação: (a)  $1^{\circ}$  aquecimento e (b)  $2^{\circ}$  aquecimento.



Figura 49: Curvas de MDSC obtidas para os filmes de PHB/PLLA 70/30, em diferentes tempos de degradação: (a)  $1^{\circ}$  aquecimento e (b)  $2^{\circ}$  aquecimento.





Figura 50: Curvas de MDSC obtidas para os filmes de PHB/PLLA 100/0, em diferentes tempos de degradação: (a)  $1^{\circ}$  aquecimento e (b)  $2^{\circ}$  aquecimento.

**Tabela 17:** Dados de Temperatura de Transição Vítrea (Tg), de Cristalização (Tc), de Fusão (Tf), Entalpias de Cristalização (ΔHc), de Fusão (ΔHf) e Grau de Cristalização (χc), obtidos da análise de MDSC, para pinos de PHB/PLLA 0/100.

p	inos	Tg (°C)	Γe (°C) ΔΙ	lc (J/g)	Tf(°C)	ΔHf(J/g)	χc (%)
PHB/PLLA	Aquecimento	PHB PLLA PH	B PLLA PHI	3 PLLA P	HB PLLA	TOTAL	PLLA
0/100	18	63	<b>102</b>	20	181	44	26
0 meses	2°	58	87	27	178	45	
0/100	<b>1</b> °	67			180	47	<b>5</b> 0
6 méses	<b>2°</b>	57	88	29	179	51	
0/100	19	66	95	13	180	47	36
10 meses	<b>2°</b>	58	88	28	178	51	
0/100	<b>1°</b>	66	98	24	180	47	25
12 meses	<b>2°</b>	50	88	29	179	49	

**Tabela 18:** Dados de Temperatura de Transição Vítrea (Tg), de Cristalização (Tc), de Fusão (Tf), Entalpias de Cristalização (ΔHc), de Fusão (ΔHf) e Grau de Cristalização (χc), obtidos da análise de MDSC, para pinos de PHB/PLLA 30/70.

р	inos	Tg	(°C)	Те	(°C)	Анс	(J/g)	Tf	(°C)	ΔHf (J/g)	χς (%)
PHB/PLLA	Aquecimento	PHB	PLLA	PHB	PLLA	PHB	PLLA	PHB	PLLA	TOTAL	PLLA
30/70	lo		59		85		7	1	78	56	34
0 meses	2°	-4	51	30	76	1,5	17	1	78	39	
30/70	lo.		67					1	78	63	47
6 meses	2°	0.6	53	33	74	4	14	172	178	51	
30/70	1°		66					1	78	75	56
8 meses	2°	-0,3	55	31	74	2	18	172	178	55	

**Tabela 19:** Dados de Temperatura de Transição Vítrea (Tg), de Cristalização (Tc), de Fusão (Tf), Entalpias de Cristalização (ΔHc), de Fusão (ΔHf) e Grau de Cristalização (χc), obtidos da análise de MDSC, para pinos de PHB/PLLA 50/50.

р	inos	Tg	(°C)	Te	(°C)	ΔHe	·(J/g)	Tf (°C)	ΔHf (J/g)	χς (%)
PHB/PLLA	Aquecimento	рнв	PLLA	рнв	PLLA	РНВ	PLLA	PHB PLLA	TOTAL	PLLA
50/50	10		61		90		2	179	70	35
0 meses	2°	1,0	52	32	75	6	16	170 178	63	
50/50	10		67					178	71	38
6 meses	2°	0.8	56	34	74	9	13	171 179	68	
50/50	19		64		87		3	177	73	36
8 meses	2°	1,0	51	33	73	8	13	171 178	71	
50/50	10		67					176	66	35
10 meses	2°	1,5	51	33	72	7	11	171 178	63	
50/50	10		62		85		3	176	67	33
12 meses	2°		50		69		12	170 178	61	

**Tabela 20:** Dados de Temperatura de Transição Vítrea (Tg), de Cristalização (Tc), de Fusão (Tf), Entalpias de Cristalização (ΔHc), de Fusão (ΔHf) e Grau de Cristalização (χc), obtidos da análise de MDSC, para pinos de PHB/PLLA 70/30.

pi	inos	Tg	(°C)	Te	(°C)	ΔH	: (J/g)	Tf	(°C)	ΔHf (J/g)	χε (%)
PHB/PLLA	Aquecimento	PHB	PLLA	PHB	PLLA	PHB	PLLA	PHB	PLLA	TOTAL	PLLA
70/30	1°		59		100		6	1	78	69	16
0 meses	2°	-1	52	30	77	2,5	10	170	178	73	
70/30	10		62	-		-		1	77	79	25
6 meses	2°	2	50	32	73	7	8	171	178	82	
70/30	10		57		92		7	1	78	73	16
8 meses	2°	1,5	53	34	76	15	9	172	178	75	

**Tabela 21:** Dados de Temperatura de Transição Vítrea (Tg), de Cristalização (Tc), de Fusão (Tf), Entalpias de Cristalização (ΔHc), de Fusão (ΔHf) e Grau de Cristalização (χc), obtidos da análise de MDSC, para pinos de PHB/PLLA 100/0.

pi	pinos		Tg (°C)		Tc (°C)		(J/g)	Tf (°C)		ΔHf (J/g)	χε (%)	
PHB/PLLA	Aquecimento	PHB	PLLA	PHB	PLLA	PHB	PLLA	PHB	PLLA	TOTAL	PHB	
100/0	1°							175		82	56	
0 meses	2°	-4		29		4		168		89		
100/0	lo							177		89	61	
6 meses	2°	0		31		11		170		96		
100/0	10							176		96	66	
8 meses	2°	0		31		14		170		100		
100/0	1°							175		87	60	
10 meses	2°	0		32		12		170		95		
100/0	1º							177		93	64	
12 meses	2°	0		30		10		171		96		

**Tabela 22:** Dados de Temperatura de Transição Vítrea (Tg), de Cristalização (Tc), de Fusão (Tf), Entalpias de Cristalização ( $\Delta$ Hc), de Fusão ( $\Delta$ Hf) e Grau de Cristalização ( $\chi$ c), obtidos da análise de MDSC, para filmes de PHB/PLLA 0/100.

ពា	mes	Tg (°C)		T¢	T¢ (°C)		AHe (J/g)		(°C)	ΔHf (J/g)	<b>xc (%)</b>
PHB/PLLA	Aquecimento	РНВ	PLLA	PHB	PLLA	PHB	PLLA	PHB	PLLA	TOTAL	PLLA
0/100	10								176	40	43
0 meses	2°		56		88		25		177	44	
0/100	1º								78	52	56
4 meses	2°		57		86		30		177	53	
0/100	lo							1	76	59	63
6 meses	2°		57		82		33		176	62	
0/100	10								71	66	70
8 meses	2°		55		77		34		170	57	
0/100	lo								170	71	76
10 meses	2°		52		76		32		168	63	
00/100	1º								69	84	90
12 meses	2°		51		81		38		161	54	

**Tabela 23:** Dados de Temperatura de Transição Vítrea (Tg), de Cristalização (Tc), de Fusão (Tf), Entalpias de Cristalização ( $\Delta$ Hc), de Fusão ( $\Delta$ Hf) e Grau de Cristalização ( $\chi$ c), obtidos da análise de MDSC, para filmes de PHB/PLLA 30/70.

ពា	mes	Tg (°	C)	Te (°C	) <u>A</u> H	c (J/g)	Tf (°(	C) /	.Hf (J/g)	χε (%)
PHB/PLLA	Aquecimento	o PHB F	PLLA F	PHB PL	LA PHB	PLLA	PHB P	LLA '	FOTAL	PLLA
30/70	lo						176		45	34
0 meses	2°	-3	46	30 7	1 4	16	166	177	50	
30/70	1,0						178		54	40
4 meses	2°	0	49	33 7	3 2	18	170	177	57	
30/70	l <sub>o</sub>						177		57	43
TU meses	2°	3	51	35 7	2 2	18	172	177	59	
30/70	10						177		58	43
12 meses	2°	4	51	34 7	0 2	18	173	177	60	

Tabela 24: Dados de Temperatura de Transição Vítrea (Tg), de Cristalização (Tc), de Fusão (Tf), Entalpias de Cristalização ( $\Delta$ Hc), de Fusão ( $\Delta$ Hf) e Grau de Cristalização ( $\chi$ c), obtidos da análise de MDSC, para filmes de PHB/PLLA 50/50.

fil	mes	Tg	(°C)	Tc	(°C)	ΔH	s (J/g)	Tf (°C)	ΔHf (J/g)	χε (%)
PHB/PLLA	Aquecimento	PHB	PLLA	PHB	PLLA	PHB	PLLA	PHB PLLA	TOTAL	PLLA
50/50	10							177	57	30
0 meses	2°	-1	51	33	71	10	13	165 177	58	
50/50								175	71	38
4 meses		2	52	34	75	6	14	172 178	76	
50/50	10							176	78	42
6 meses	2°	2	57	34	79	10	15	176	82	
50/50	1°							176	67	36
8 meses	2°	2	52	35	77	13	14	173 178	68	
50/50	1°							175	84	45
10 meses	2°	1	51	35	75	5	14	171 178	78	
50/50	1°							175	76	41
12 meses	2°		53		71		13	172 177	71	

**Tabela 25:** Dados de Temperatura de Transição Vítrea (Tg), de Cristalização (Tc), de Fusão (Tf), Entalpias de Cristalização ( $\Delta$ Hc), de Fusão ( $\Delta$ Hf) e Grau de Cristalização ( $\chi$ c), obtidos da análise de MDSC, para filmes de PHB/PLLA 70/30.

ពា	mes	Tg	(°C)	T¢	(°C)	АНс	• (J/g)	Tľ	(°C)	ΔHf(J/g)	χε (%)
PHB/PLLA	Aquecimento	PHB	PLLA	рнв	PLLA	рнв	PLLA	PHB	PLLA	TOTAL	PLLA
70/30	1º								74	62	20
0 meses	2°	-3	44	32	69	18	11	160	175	68	
70/30	1°								76	71	23
4 meses	2°	2	52	34	74	4	7	170	178	75	
70/30	10								75	82	26
10 meses	2°	2	54	33	76	2	7	172	178	82	
70/30	lo.								75	82	26
12 meses	2°	6	55		75		6	172	178	80	

**Tabela 26:** Dados de Temperatura de Transição Vítrea (Tg), de Cristalização (Tc), de Fusão (Tf), Entalpias de Cristalização ( $\Delta$ Hc), de Fusão ( $\Delta$ Hf) e Grau de Cristalização ( $\chi$ c), obtidos da análise de MDSC, para filmes de PHB/PLLA 100/0.

ពីរ	nies	Tg	(°C)	Te	(°C)	ΔHe	: (J/g)	Tf	(°C)	ΔHf (J/g)	χε (%)
PHB/PLLA	Aquecimento	РНВ	PLLA	PHB	PLLA	PHB	PLLA	PHB	PLLA	TOTAL	РНВ
100/0	1.0							1	75	89	61
0 meses	2°	-1		31		13		168		97	
100/0	lo							1	77	89	61
4 meses	2°	-3		31		2		168		89	
100/0	1°							1	74	83	57
6 meses	2°	-1		32		6		174		85	
100/0	1°							ļ	75	90	61
8 meses	2°	1		31		8		175		92	
100/0	l°							1	75	98	67
10 meses	2°	1		33		13		172		99	
100/0	1°							1	75	99	68
12 meses	2°	1		34		15		171		100	

Analisando as Figuras de 46 a 49 e as Tabelas de 22 a 25 para o PLLA puro e para as blendas, na forma de filmes, no 1° aquecimento verifica-se a presença da Tg relativa ao PLLA; porém, esta não é nítida e não se observa pico de cristalização (Tc). A dificuldade em visualizar a Tg e a inexistência da Tc é devido ao fato de que o método de preparação das amostras na forma de filmes permitiu a máxima cristalização das amostras dificultando a mobilidade das cadeias amorfas que caracterizam a Tg e, estando as amostras totalmente cristalizadas, não existe a possibilidade de cristalização durante o aquecimento o que caracterizaria a Tc. Além disso, no caso das blendas o PHB que é altamente cristalino contribuiu, dificultando a mobilidade das cadeias. Já no 2° aquecimento pode-se observar tanto Tg como Tc, para o PLLA puro e para as blendas porque o resfriamento foi rápido o suficiente para impedir completa cristalização das amostras. Este fato também foi observado por outros autores que estudaram a degradação hidrolítica do PLLA (DUEK, 1999), e da blenda PLLA/PHBV (FERREIRA, 2001).

No 2° aquecimento a Tg relativa ao PLLA puro na forma pino e filme (Tabelas 17 e 22), a Tg relativa ao PHB puro na forma de pino (Tabela 21) e as Tg's relativas ao PHB e ao PLLA nas blendas (Tabelas 18-20 e 23-25), na forma de pinos ou filmes, permanecem constantes em função do tempo de degradação.

Para o PHB puro na forma de filmes (Figura 50 e Tabela 26) e pinos (Figura 45 e Tabela 21) não se observa Tg no 1° aquecimento porque à temperatura inicial da análise está acima da Tg do PHB, e no 2° aquecimento para a amostra na forma de filme a Tg aumenta em função do aumento do tempo de degradação, podendo-se salientar que esse fato sugere que o PHB cristaliza durante o processo de degradação hidrolítica.

Para o PLLA puro na forma de filmes (Tabela 22) no 2° aquecimento a Tc diminui de 88 para 81°C com o aumento do tempo de degradação, enquanto que o  $\Delta$ Hc sofreu um aumento de 25 para 38 J/g, para o mesmo período de degradação hidrolítica. O decréscimo na Tc ocorreu porque com a degradação houve perda de massa molar, ou seja, as cadeias são quebradas em cadeias menores que precisam de menor energia para cristalizar diminuindo, assim, a Tc. Esse fato também foi observado por outros autores que estudaram a degradação hidrolítica do PLLA (DUEK, 1999; SUMING LI, 1990). O aumento do  $\Delta$ Hc verificado aqui foi observado e discutido por outros autores (MAINIL-VARLET, 1997; DUEK, 1999; FERREIRA, 2001), sendo que alguns consideram que esse fato é

### Capitulo V - Resultados e Discussão

conseqüência do rearranjo de pequenas cadeias gerado pelo processo de degradação, formando novos cristais, outros, consideram que a degradação de partes das regiões amorfas resulta em aumento das regiões cristalinas remanescentes. Neste estudo acredita-se que houve um rearranjo dos cristais aumentando a cristalinidade e formando cristais diferentes, pois na fusão pode-se observar o aparecimento de um 2° pico de fusão em função da degradação (Figura 46 b), caracterizando a existência de dois tipos de cristais que precisam de energias diferentes para se fundir. Para o PLLA na forma de pino a Tc no 1° aquecimento tende a diminuir durante a degradação, como já foi visto anteriormente; e no 2° aquecimento a Tc permanece constante em torno de 88°C. O valor de  $\Delta$ Hc tanto no 1° como no 2° aquecimento permanece constante.

Para as blendas na forma de filmes no 2° aquecimento (Figuras 47-49 e Tabelas 23-25) observa-se picos de cristalização para o PHB e PLLA, sendo que as Tc's do PHB nas blendas permanecem constantes em torno de 32°C durante a degradação e as Tc's do PLLA permanecem constantes para a blenda 30/70 e sofrem acréscimos em torno de 7°C para as concentrações 50/50 e 70/30, devido ao aumento da concentração de PHB nestas blendas. O pico de cristalização relativo ao PHB desaparece aos 12 meses de degradação máxima. Para as blendas na forma de pinos (Figuras 42-44 e Tabelas 18-20) no 1° aquecimento só se verifica a Tc relativa ao PLLA que apresenta uma tendência a diminuir em função da degradação. No 2° aquecimento observa-se duas Tc's relativas ao PHB e ao PLLA que permanecem constantes. O  $\Delta$ Hc do PHB e do PLLA permanece praticamente constante para as blendas durante a degradação, exceto na blenda 70/30 onde se verifica um aumento de 2,5 para 15 J/g de 0 para 8 meses de degradação no  $\Delta$ Hc relativo ao PHB, podendo-se sugerir mais uma vez que o PHB está cristalizando durante a degradação, como já discutido anteriormente.

Para o PHB puro na forma de filmes (Tabela 26) e pinos (Tabela 21) não se observa Tc no 1° aquecimento, enquanto que no 2° aquecimento a Tc e o  $\Delta$ Hc permanecem constantes para as amostras na forma de filmes, ao passo que, para as amostras na forma de pinos verifica-se uma Tc constante em torno de 30°C e o  $\Delta$ Hc aumenta de 4 para 14 J/g de 0 para 8 meses de degradação permanecendo constante após este período.

Observa-se que para o PLLA puro na forma de filmes (Tabela 22) a Tf diminui com o aumento do tempo de degradação tanto no 1º (de 180 para 165°C) como no 2º aquecimento (de 177 para 161°C), isso ocorre porque o processo de degradação do PLLA promove a formação de novos cristais, os quais podem ser fundidos com menores energias e temperatura; este resultado também foi observado por Ferreira (2002) no estudo de degradação hidrolítica da blenda PLLA/PHBV. No 1º aquecimento observa-se um aumento no AHf de 40 para 84 J/g com o aumento do tempo de 0 para 12 meses de degradação; conferindo aumento do grau de cristalinidade do PLLA de 43% para 90% com a degradação. No  $2^{\circ}$  aquecimento o  $\Delta$ Hf permanece constante em torno de 50 J/g. Observa-se que, a partir de 8 meses de degradação, começa a aparecer um segundo pico de fusão no segundo aquecimento (Figura 46 b), podendo-se verificar, também, que o pico de recristalização imediatamente anterior à fusão desaparece. O aparecimento de dois picos de fusão para o PLLA é consequência da formação de cristais de tamanhos diferentes com espessura de lamelas diferentes, esse fato também foi observado em um estudo de degradação hidrolítica do PLLA (LI, 1990). Para o PLLA puro na forma de pinos (Tabela 17) observa-se somente uma Tf constante em ambos os aquecimentos. O  $\Delta$ Hf no 1° aquecimento e no 2º aquecimento permanece constante. O grau de cristalinidade do PLLA no 1º aquecimento oscila aumentando e diminuindo durante a degradação. O fato do grau de cristalinidade oscilar pode ser explicado porque provavelmente a degradação do PLLA ocorre através da quebra de cadeias que se cristalizam e também da degradação dos cristais, implicando ora no decréscimo ora no acréscimo do grau de cristalinidade.

Para as blendas na forma de filmes (Tabelas 23-25) e pinos (Tabela 18-20) verifica-se somente um pico de fusão no 1° aquecimento com Tf constante para todas as concentrações estudadas (PHB/PLLA 30/70, 50/50 e 70/30). O  $\Delta$ Hf tende a aumentar em função da degradação conferindo aumento no grau de cristalinidade ( $\chi$ c) relativo ao PLLA durante a degradação hidrolítica. No 2° aquecimento observa-se a presença de dois picos de fusão relativos à fusão do PHB e PLLA respectivamente, sendo que as Tf's relativas PHB nas amostras na forma de filmes sofrem acréscimos, enquanto que para amostras na forma de pinos permanecem constantes. As Tf's relativas ao PLLA permanecem constante para todas as blendas estudadas durante a degradação, tanto pinos como filmes. O  $\Delta$ Hf relativo ao PLLA aumenta com o aumento do tempo de degradação para todas as blendas, filmes ou pinos.

Para o PHB puro na forma de filmes (Tabela 26) e pinos (Tabela 21), tanto no  $1^{\circ}$  como no  $2^{\circ}$  aquecimento a Tf permanece constante e o  $\Delta$ Hf sofre um ligeiro acréscimo para os períodos de 10 e 12 meses de degradação, o mesmo ocorre com o grau de cristalinidade.

Pode-se observar tanto para pinos como para filmes que o grau de cristalinidade relativo ao PLLA diminui com o aumento da concentração de PHB na blenda, e que o grau de cristalinidade do PHB puro é bem maior do que do PLLA puro, confirmando a alta cristalinidade do PHB e sugerindo sua influencia na cristalização do PLLA.

Pode-se concluir dos dados de MDSC que o PLLA degrada mais facilmente que o PHB, pois os termogramas relativos ao PLLA apresentam maior variação com a degradação do que os do PHB, sendo que, só é possível observar diferença significativa nos termogramas relativos ao PHB após o período de 8 meses nas blendas e 10 meses para o PHB puro. Esse fato leva a conclusão de que o PLLA tende a acelerar a degradação do PHB. Outra observação interessante é que as amostra na forma de filmes tiveram um processo de degradação mais acentuado e mais rápido do que as amostras na forma de pinos, possivelmente devido ao maior contato existente entre filmes e solução fisiológica, o que aumentou a interação entre os sais da solução e as cadeias poliméricas, esse fato também foi observado por Ferreira (2002) no estudo de degradação hidrolítica da blenda PLLA/PHBV na forma de pinos e filmes.

# 5.2.2. Análise de Cromatografia de Permeação em Gel - GPC

Foram feitas análises de GPC para algumas amostras na forma de pinos nos tempos zero e 12 meses de ensaio de degradação "in vitro", a fim de identificar processo de degradação através de resultados de perda de massa molar, que são apresentados na Tabela 27.

Analisando os resultados de massa molar média ponderal (Mw) não se verifica diferença entre os valores para PHB puro em zero e em 12 meses de ensaio "in vitro", sugerindo que não houve degradação deste polímero neste período. O PLLA puro (pino) apresentou decréscimos de Mw dando evidências de degradação em 12 meses, o mesmo foi verificado para a blenda 50/50 (pino), podendo-se sugerir que o componente da blenda PHB/PLLA que degradou foi o PLLA. Os resultados de GPC confirmaram o que foi verificado nas análises de MDSC e TGA.

**Tabela 27:** Resultados de massa molar (Mw), número molar (Mn), viscosidade molar (Mz) e índice de polidispersividade (Mw/Mn) obtidos análise de GPC para amostras na forma de pinos.

Amostra	Mn	Mw	Mz	Mv	Mw/Mn
PLLA 0 meses	12345	76757	230100	62793	6,218
PLLA 12 meses	27885	64305	141948	57012	2,472
50/50 0 meses	15375	68895	197459	57183	4,481
50/50 12 meses	16148	50753	108994	44398	3,143
PHB 0 meses	24387	57649	119884	51222	2,364
PHB 12 meses	14081	57122	175004	47187	4,065

Mn = massa molar média numérica

Mw = massa molar média ponderal

Mz = massa molar média Z

My = massa molar viscosimétrica

D = MW/Mn = distribuição de massa molar

UNICAMP BIBLIOTECA CENTRAL SEÇÃO CIRCULANTE

## 5.2.3. Análise Termogravimétrica – TGA

As Figuras de 51 a 55 (pinos) e 56 a 60 (filmes) e as Tabelas 28 e 29 apresentam os resultados obtidos das análises de TGA para pinos e filmes, respectivamente.

Analisando as Figuras para pinos e filmes, observa-se um único estágio de perda de massa para os homopolímeros e dois para as blendas, relativos a perda de massa do PHB do PLLA, respectivamente, que também variam de acordo com a % em massa de cada componente na blenda.

Observando os resultados obtidos para pinos nas Figuras de 51 a 55 e Tabela 28 observa-se que as temperaturas T on set e T peak aumentam com o aumento do tempo de degradação de 0 para 6 meses, permanecendo constante após este período. Considerando que neste período as análises de MDSC, SEM e DMA não mostraram degradação para as amostras na forma de pinos, nada se pode afirmar com relação a este resultado observado através do TGA no período de 0 a 6 meses de degradação. Pode-se sugerir ainda que a

técnica de análise de TGA não foi sensível o suficiente para detectar degradação hidrolítica nas amostras na forma de pinos no período de 0 a 12 meses.

Analisando os resultados dos filmes, Figuras de 56 a 60 e Tabela 29, verifica-se que o PLLA puro se degrada no período de 12 meses de ensaio apresentando decréscimos de 51 e 36°C para T on set e T peak, respectivamente, sendo que, o decréscimo nas temperaturas foi mais significativo após 10 meses de degradação, esse fato também foi observado nas análises de MDSC, DMA e SEM. Ainda para o PLLA puro verifica-se um acréscimo na % de perda de massa em torno de 11% durante a degradação. Para as blendas não se verifica variação significativa nos valores das temperaturas analisadas, T on set e T peak que permanecem constantes durante o período de degradação. O mesmo pode ser observado para o PHB puro.

Assim, pode-se dizer que o processo de degradação depende do modo de preparação da amostra, bem como do tipo de amostra, já que os filmes, muito mais finos que os pinos, se mostraram mais susceptível a ação do meio, como observado nas análises de MDSC, SEM e DMA. Além disso, sugere-se que o PLLA diminui o tempo do processo de degradação das blendas e o PHB confere maior estabilidade térmica às blendas durante o processo de degradação.



Figura 51: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das blendas de PHB/PLLA 0/100, na forma de pinos em diferentes tempos de degradação.



Figura 52: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das blendas de PHB/PLLA 30/70, na forma de pinos em diferentes tempos de degradação.



Figura 53: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das blendas de PHB/PLLA 50/50, na forma de pinos em diferentes tempos de degradação.



Figura 54: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das blendas de PHB/PLLA 70/30, na forma de pinos em diferentes tempos de degradação.


Figura 55: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das blendas de PHB/PLLA 100/0, na forma de pinos em diferentes tempos de degradação.



Figura 56: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das blendas de PHB/PLLA 0/100, na forma de filmes em diferentes tempos de degradação.



Figura 57: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das blendas de PHB/PLLA 30/70, na forma de filmes em diferentes tempos de degradação.



Figura 58: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das blendas de PHB/PLLA 50/50, na forma de filmes, em diferentes tempos de degradação.



Figura 59: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das blendas de PHB/PLLA 70/30, na forma de filmes em diferentes tempos de degradação.



Figura 60: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das blendas de PHB/PLLA 100/0, na forma de filmes em diferentes tempos de degradação.

**Tabela 28:** Valores das temperaturas de início (T on set) e máxima (T peak) de perda de massa e % de perda de massa para as blendas PHB./PLLA na forma de pinos, em diferentes tempos de degradação "*in vitro*".

pinos	T onset (°C) T peak (°C)		T peak (°C)		Perda de massa (%	
0/100	PHB	PLLA	РНВ	PLLA	РНВ	PLLA
0 meses		322		340		99
6		322		361		98
8		346		364		97
10		340		360		98
12		345		362		94
30/70	рнв	PLLA	PHB	PLLA	РНВ	PLLA
0 meses	276	347	290	365	34	66
6	267	330	293	367	32	65
8	273	342	286	362	34	65
50/50	PHB	PLLA	PHB	PLLA	PHB	PLLA
0 meses	271	330	280	348	52	44
6	264	332	289	360	46	49
8	270	336	283	355	51	46
10	267	335	284	358	52	48
12	271	337	287	358	50	46
70/30	PHB	PLLA	PHB	PLLA	PHB	PLLA
0 meses	269	325	276	345	67	31
6	261	320	287	352	68	27
8	269	333	283	354	53	39
100/0	PHB	PLLA	PHB	PLLA	PHB	PLLA
0 meses	235		249		98	
6	260		283		99	
8	266		278		94	
10	263		274		96	
12	267		280		99	

T on set = temperatura de início de perda da massa

T peak = temperatura onde ocorre a máximo de perda de massa

**Tabela 29:** Valores das temperaturas de início (T on set) e máxima (T peak) de perda de massa e % de perda de massa para as blendas PHB./PLLA na forma de filmes, em diferentes tempos de degradação "*in vitro*".

filmes	T ons	T onset (°C)		T peak (°C)		T peak (°C)		Perda de massa (%)	
0/100	РНВ	PLLA	PHB	PLLA	РНВ	PLLA			
0 meses		346		365		86			
4		344		364		89			
6		344		365		85			
10		346		365		94			
12		295		329		97			
30/70	рнв	PLLA	PHB	PLLA	PHB	PLLA			
0 meses	266	337	281	363	28	62			
4	266	338	280	360	30	64			
10	268	338	284	360	29	67			
12	270	338	282	360	32	62			
50/50	РНВ	PLLA	PHB	PLLA	PHB	PLLA			
0 meses	368	332	280	352	49	47			
4	265	333	278	352	51	50			
10	270	334	281	258	52	46			
12	270	333	280	357	52	45			
70/30	PHB	PLLA	PHB	PLLA	PHB	PLLA			
0 meses	268	324	276	344	63	29			
4	264	324	278	344	69	30			
10	266	326	280	347	70	27			
12	267	325	277	345	69	27			
100/0	рнв	PLLA	PHB	PLLA	PHB	PLLA			
0 meses	264		277		97				
4	267		281		98				
6	266		277		90				
10	266		276		99				
12	265		278		100				

T on set = temperatura de início de perda da massa

T peak = temperatura onde ocorre a máximo de perda de massa

#### 5.2.4. Análise Dinâmico Mecânica – DMA

As Figuras 61 a 65 e 66 a 70 apresentam curvas dos Módulos de Perda (E") e de Armazenamento (E') do estudo de degradação "*in vitro*" das blendas PHB/PLLA na forma de pinos e filmes, respectivamente. As Tabelas 30 e 31 apresentam os valores da Tg dos componentes da blenda, obtidos das curvas do módulo de perda, para os pinos e filmes, respectivamente.

Como apresentado no Capítulo IV (Materiais e Métodos), as análises de DMA foram feitas nos modos de flexão e tração para os pinos e filmes, respectivamente.

O PLLA puro apresentou perda de propriedade mecânica mais rápida na forma de filme do que na forma de pino. As amostras de PLLA puro na forma de filmes só puderam ser analisadas até 6 meses de degradação hidrolítica, após este período as amostras se tornaram muito quebradiças. Porém, com as amostras na forma de pinos de PLLA puro, pôde-se fazer análises até 12 meses de degradação. O mesmo aconteceu com as blendas na forma de filmes que puderam ser analisadas até no máximo 10 meses de degradação. Já as blendas na forma de pinos foram analisadas até 12 meses. Pode-se sugerir que a forma de preparação da amostra influencia na degradação como já foi observado nos resultados de TGA e MDSC. Os filmes têm maior área de contato com o fluido de degradação. Além disso, eram bastante finos, apresentavam espessura em torno de 0,8 mm; portanto houve maior interação entre sais do fluido e cadeias poliméricas.

O PHB, na forma de filmes e pinos, pôde ser analisado até 12 meses, mostrando que, apesar deste polímero apresentar propriedades mecânicas inferiores às do PLLA, ele consegue manter suas propriedades por mais tempo que o PLLA.

Este resultado é coerente com o que foi verificado na literatura, por exemplo, Duek e colaboradores (DUEK, 1999) e Li e colaboradores (LI, 1990) mostraram que após duas semanas de degradação o PLLA perde 50% de suas propriedades mecânicas e essa perda se acentua com o aumento do grau de cristalinidade. Holland e colaboradores (HOLLAND, 1990), e Ferreira e colaboradores (FERREIRA, 2001), mostraram que o PHBV puro apesar de possuir tensão máxima no escoamento inferior ao PLLA mantém suas propriedades mecânicas por um longo período de tempo durante a degradação hidrolítica.



Figura 61: Curvas do Módulo de Armazenamento (E') e Módulo de Perda (E'') obtidas do DMA, para as blendas PHB/PLLA 0/100 na forma de pinos.



Figura 62: Curvas do Módulo de Armazenamento (E') e Módulo de Perda (E'') obtidas pelo DMA, para as blendas PHB/PLLA 30/70 na forma de pinos.



**Figura 63:** Curvas do Módulo de Armazenamento (E') e Módulo de Perda (E") obtidas pelo DMA, para as blendas PHB/PLLA 50/50 na forma de pinos.



Figura 64: Curvas do Módulo de Armazenamento (E') e Módulo de Perda (E") obtidas pelo DMA, para as blendas PHB/PLLA 70/30 na forma de pinos.



Figura 65: Curvas do Módulo de Armazenamento (E') e Módulo de Perda (E'') obtidas pelo DMA, para as blendas PHB/PLLA 100/0 na forma de pinos.



Figura 66: Curvas do Módulo de Armazenamento (E') e Módulo de Perda (E'') obtidas pelo DMA, para as blendas PHB/PLLA 0/100 na forma de filmes.



**Figura 67:** Curvas do Módulo de Armazenamento (E') e Módulo de Perda (E'') obtidas pelo DMA, para as blendas PHB/PLLA 30/70 na forma de filmes.



**Figura 68:** Curvas do Módulo de Armazenamento (E') e Módulo de Perda (E'') obtidas pelo DMA, para as blendas PHB/PLLA 50/50 na forma de filmes.



Figura 69: Curvas do Módulo de Armazenamento (E') e Módulo de Perda (E'') obtidas pelo DMA, para as blendas PHB/PLLA 70/30 na forma de filmes.



**Figuras 70:** Curvas do Módulo de Armazenamento (E') e Módulo de Perda (E") obtidas pelo DMA, para a blenda PHB/PLLA 100/0 na forma de filmes.

**Tabela 30:** Temperaturas de Transição Vítrea (Tg) obtidas por DMA, nas curvas de Módulo de Perda (E"), para as blendas PHB/PLLA na forma de pinos.

Pinos PHB/PLLA	Tg (°C) - E"			
0/100	PHB	PLLA		
0 meses		86		
2 meses		79		
4 meses	-	81		
6 meses		81		
12 meses	-	82		
30/70	рнв	PLLA		
0 meses	30	88		
2 meses	48	90		
4 meses	52	86		
6 meses	-	82		
50/50	PHB	PLLA		
0 meses	38	88		
2 meses	44	86		
4 meses		83		
6 meses	=34	83		
12 meses	-			
70/30	PHB	PLLA		
0 meses	48	85		
2 meses	65	86		
4 meses	47	80		
6 meses	-	76		
100/0	PHB	PLLA		
0 meses	47	_		
2 meses	54	_		
4 meses	6 <u>0</u>			
6 meses	-	-		
12 meses	_	_		

**Tabela 31:** Temperaturas de Transição Vítrea (Tg) obtidas por DMA, nas curvas de Módulo de Perda (E"), para as blendas PHB/PLLA na forma de filmes.

Filmes	Tg (°C) - E"				
0/100	РНВ	PLLA			
0 meses	-	47			
4 meses		45			
6 meses	-	49			
30/70	РНВ	PLLA			
0 meses	24	61			
4 meses	20	66			
10 meses		70			
50/50	PHB	PLLA			
0 meses	6	68			
4 meses	20	77			
6 meses	12	66			
70/30	РНВ	PLLA			
0 meses	9	66			
4 meses	20	72			
10 meses	18	70			
100/0	PHB	PLLA			
0 meses	6	Ner			
4 meses	15	•			
6 meses	13				
10 meses	17	<b>~</b>			
12 meses	17	-			

Através das Figuras e Tabelas verifica-se que os homopolímeros em zero meses apresentam somente um pico de transição enquanto as blendas apresentam dois picos de transição relativos às Tg's do PHB e PLLA, sugerindo imiscibilidade entre os polímeros em todas as composições estudadas tanto para pinos como para filmes concordando, assim, com os resultados de MDSC.

Os picos relativos à Tg do PHB nas blendas tornam-se mais difíceis de serem visualizados com o aumento do tempo de degradação para as amostras na forma de pinos e

filmes, confundindo-se com o ruído da curva ou com as transições secundárias, talvez pelo decréscimo de porção amorfa e aumento da cristalinidade em conseqüência da degradação, fato observado também na análise de MDSC.

Para as amostras na forma de pinos (Tabela 30) observa-se decréscimo na Tg do PLLA no polímero puro Tg do PLLA nas blendas em função do tempo de degradação, enquanto que a Tg do PHB no polímero puro e nas blendas aumenta ligeiramente. Esse fato sugere aproximação entre as Tg's do PHB e do PLLA nas blendas.

Para as amostras na forma de filmes verifica-se uma tendência de acréscimos nas Tg's do PHB e do PLLA nos polímeros puros e nas blendas, sugerindo aumento no grau de cristalinidade das amostras como já discutido também na análise de MDSC.

#### 5.2.5. Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura – SEM

As Figuras 71, 72, 73 e 74 apresentam as micrografias das análises de SEM das amostras de pinos e filmes, antes e após a degradação.

As amostras na forma de filmes e pinos apresentaram-se esbranquiçadas após um período de dois meses de ensaio de degradação hidrolítica. Analisando as amostras macroscopicamente observou-se que os filmes se degradaram mais rapidamente, pois as amostras começaram a se quebrar, perdendo propriedades mecânicas como já discutido na análise de DMA, sobretudo o PLLA puro e as blendas 30/70 e 50/50, como pode ser visto na Figura 75, onde PLLA puro que se apresentava na forma de um filme, se transformou em pequenos pedaços após dez meses de degradação. Ferreira (2002) também observou na blenda PLLA/PHBV que o PLLA apresentou-se quebradiço com a degradação hidrolítica. Com relação às amostras na forma de pinos, para o PLLA puro e para as blendas 30/70 e 50/50, verificou-se maior facilidade em fraturá-las caracterizando, também, perda de propriedades mecânicas. As amostras de PHB puro e a blenda 70/30 ficaram mais maleáveis e "fofas".

Apesar das mudanças verificadas macroscopicamente e da perda de propriedade mecânica apresentada pelas amostras na forma de pinos, não foi possível observar, através de microscopia (Figura 71) mudanças morfológicas evidentes que caracterizassem degradação.

Analisando a Figura 72 (b, c), observa-se que a amostra de PLLA puro na forma de filme apresenta trincas na superficie e na fratura em torno de 10 meses de degradação "in vitro". Antes deste período, não se verificou nenhuma evidencia morfológica de degradação, mesmo com aumento de 5000 x.

Com relação às blendas (Figura 73 e 74 a, b, e) verifica-se que a blenda que apresentou maior evidência de degradação foi a 50/50, pois no tempo zero como já foi discutido anteriormente observa-se nítida separação de fases, e com a degradação é possível verificar que uma das fases vai degradando, com seis meses tem-se a amostra totalmente porosa e com 12 meses só se observa uma fase, como se a outra tivesse sido retirada, no caso degradada. Sugere-se que a fase que degradou foi do PLLA, já que através das micrografias e das análises de MDSC e DMA, o PLLA apresenta maior variação em suas propriedades térmicas e mecânicas, caracterizando sua degradação. As micrografias das blendas 30/70 e 70/30 apresentam-se mais porosas quando se compara o tempo zero e 12 meses de degradação.

O PHB puro na forma de filmes (Figura 74 c, d, f) não apresenta nenhuma evidência morfológica de degradação, pois comparando os tempos 4 e 10 meses as micrografias são muito parecidas.

Como conclusão da análise de SEM pode-se dizer mais uma vez, como já verificado por MDSC e DMA, que o modo de preparação das amostras influencia no processo de degradação, sendo que, as amostras na forma de filmes degradam-se mais rápido do que as amostras na forma de pinos, pois segundo Koyama (1995) a degradação hidrolítica não enzimática ocorre através do filme, já que a solução é capaz de permear através da amostra, o que não acontece para a amostra na forma de pino. Além disso, pode-se dizer que o PLLA degradou mais rápido que o PHB, assim, sugere-se que o PLLA pode acelerar o processo de degradação hidrolítica das blendas PHB/PLLA, como pode ser visto na blenda 50/50.

Resultados similares foram observados por Koyama (1995) que estudou a degradação hidrolítica da blenda P(R)-3-HB/P(R, S)LA. O autor concluiu que o P(R, S)LA acelera o processo de cisão das cadeias de P(R)-3-HB, devido ao efeito catalítico dos oligômeros de P(R, S)LA na matriz de P(R)-3-HB.

129



**Figura 71:** Micrografias das superfícies das fraturadas das misturas de PHB/PLLA na forma de pinos: (a) 0/100 com 0 meses, (b) 0/100 com 6 meses, (c)50/50 0 meses, (d) 50/50 com 12 meses, (e) 100/0 com 0 meses e (e) 100/0 com 12 meses; ampliação 1000X.



**Figura 72:** Micrografias da análise de SEM de amostras de PLLA puro na forma de filmes (a) superfície da fratura para zero mês de degradação (1500x), (b) superfície da fratura para 10 meses de degradação (1500x) e (c) superfície para 10 meses de degradação (200x).



**Figura 73:** Micrografias da análise de SEM de amostras de PHB/PLLA na forma de filmes (a, b, c) superfície da fratura da mistura 30/70 com 0 e 12 meses de degradação (1500x e 5000x); (d, e, f, g) superfície da fratura da mistura 50/50 com 4, 6 e 10 meses de degradação (1500x e 5000x).



**Figura 74:** Micrografias da análise de SEM de amostras de PHB/PLLA na forma de filmes (a, b, e) superfície da fratura da mistura 70/30 com 0, 10 e 12 meses de degradação (1500x e 5000x); (c, d, f) superfície da fratura da mistura 100/0 com 4, 10 e 12 meses de degradação (1500x e 5000x).



**Figura 75:** Fotografia comum, com máquina fotográfica digital da amostra PLLA puro na forma de filme após 10 meses de degradação "in vitro".

# 5.2.6. Análise de Difração de Raios-X - WAXS

As Figuras de 76 a 78 e de 79 a 81 e as Tabelas de 32 a 35, apresentam os resultados das análises de WAXS para pinos e filmes.



Figura 76: Difractogramas para amostras de PLLA na forma de pinos, em diferentes períodos de degradação, e do PLLA amorfo sem degradar.



Figura 77: Difractogramas para amostras de PHB/PLLA 50/50 na forma de pinos em diferentes períodos de degradação.



**Figura 78:** Difractogramas para amostras de PHB na forma de pinos em diferentes períodos de degradação, e do PHB amorfo sem degradar.



Figura 79: Difractogramas para amostras de PLLA na forma de filmes em diferentes períodos de degradação.



**Figura 80:** Difractogramas para amostras de PHB/PLLA 50/50 na forma de filmes em diferentes períodos de degradação.



Figura 81: Difractogramas para amostras de PHB na forma de filmes em diferentes períodos de degradação.

**Tabela 32:** Resultados do grau de cristalinidade calculado pela equação 24, a partir dos resultados da análise de WAXS para as blendas PHB/PLLA na forma de pinos, em diferentes períodos de degradação hidrolítica.

Pinos	Grau de cristalinidade
PHB/PLLA 0/100	Xc (%)
0 meses	17
6 meses	42
12 meses	8
PHB/PLLA 50/50	<u>χ</u> c (%)
0 meses	50
6 meses	46
12 meses	36
PHB/PLLA 100/0	<b>χ</b> € (%)
0 meses	58
6 meses	61
12 meses	62

**Tabela 33:** Resultados do grau de cristalinidade calculado pela equação 24, a partir dos resultados da análise de WAXS para as blendas PHB/PLLA na forma de filmes, em diferentes períodos de degradação hidrolítica.

Filmes	Grau de cristalinidade
PHB/PLLA 0/100	<b>χ</b> ε (%)
0 meses	52
4 meses	60
PHB/PLLA 50/50	χ <sub>C</sub> (%)
0 meses	56
4 meses	70
PHB/PLLA 100/0	χ <sub>C</sub> (%)
0 meses	62
4 meses	66

 Tabela 34:
 Valores
 de Largura à meia altura (FWHF)
 de alguns picos

 característicos da cristalização do PHB e do PLLA para amostras na forma de pinos.

Pico	Largura à meia altura				(FWHF) - pinos		
amostra	14	15.5	17	19.7	23	26	28
PHB0 m	0.340		0.408			0.908	0.5
PHB 6 m	0.345		0.351			0.888	0.53
PHB 12 m	0.31		0.377			0.86	0.431
PLLA 0 m		0.5	0.36	0.447	0.57		
PLLA 6 m		0.737	0.273	0.391			
PLLA 12 m			0.304	0.389			
50/50 0 m	0.257	0.295		0.46			
50/50 6 m	0.311	0.298		0.44			
50/50 12 m	0.326			0.57			

Pico		La	rgura à me	ia altura 🛛	(FWHF) -	filmes	
amostra	14	15.5	17	19.7	23	26	28
PHB 0 m	0.25	0.37				0.91	0.36
PHB 4 m	0.23	0.33				0.78	0.31
PLLA 0 m		0.36	0.325	0.5			
PLLA 4 m		0.29	0.27	0.37			
50/50 0 m	0.22		0.52	0.44			
50/50 4 m	0.21		0.34				

 Tabela 35: Valores de Largura à meia altura (FWHF) de alguns picos

 característicos da cristalização do PHB e do PLLA para amostras na forma de filmes.

Analisando os gráficos observa-se que durante a degradação hidrolítica tanto para pinos como para filmes, os picos de cristalização característicos dos polimeros puros PHB e PLLA mantêm a mesma posição para a blenda PHB/PLLA 50/50, (pino e filme).

Comparando as amostras durante a degradação observa-se que, para o PHB puro pino e filme (Tabelas 34 e 35) os picos diminuem de largura com a degradação, o mesmo acontece com o PLLA exceto para o pico em 15,5 (pino) onde se observa um aumento na largura do pico.

Para a blenda 50/50 na forma de pino (Tabela 34) verifica-se um aumento na largura de todos os picos com o aumento da degradação; enquanto que para a blenda na forma de filme (Tabela 35) observa-se o inverso a largura diminui com a degradação.

Sabendo-se que a largura do pico está inversamente relacionada ao tamanho dos cristalitos pode-se dizer que, com exceção da blenda 50/50 na forma de pino, todas as outras amostras apresentam acréscimos no tamanho dos cristalitos em função da degradação. Analisando as Tabelas 32 e 33 que apresentam o grau de cristalinidade das amostras, observa-se a tendência ao aumento no grau de cristalinidade em função da degradação exceto para a amostra 50/50 pino e para o PLLA pino; resultado similar já foi observado e discutido na análise de MDSC.

Através dos resultados observados pode-se sugerir uma inter-relação entre o aumento do grau de cristalinidade e o aumento no tamanho dos cristalitos, em função da degradação.

# 5.2.7. Análise de espalhamento de Raios-X à baixos ângulos - SAXS

As Figuras 82 a 84 e 85 a 87, e as Tabelas 36 e 37 apresentam os resultados das análises de SAXS.

Analisando os gráficos apresentados nas Figuras 82, 84 e 85, 87 para os polímeros PHB e PLLA puros na forma de pinos e filmes, observa-se que as curvas das amostras no estado amorfo não apresentam picos de correlação como era esperado, e as curvas referentes às amostras que estão em estado semi-cristalino, apresentam um único período longo.

Analisando as Figuras 83 e 86 para a blenda PHB/PLLA 50/50 (pino e filmes) observa-se a presença de dois períodos longos, relativos ao PHB e ao PLLA.

Os picos de correlação deslocam-se para menores valores de q, sendo que, para a amostra de PLLA (pino) 12 meses de degradação, os valores de q são muito pequenos, inferiores ao  $q_{min}$  (0,015 Å<sup>-1</sup>). Portanto, pode-se inferir que o período longo desta amostra será maior que aproximadamente 447 Å.



Figura 82: Curvas de SAXS para amostras de PLLA na forma de pinos, em diferentes períodos de degradação.



Figura 83: Curvas de SAXS para amostras de PHB/PLLA 50/50 na forma de pinos, em diferentes períodos de degradação.



Figura 84: Curvas de SAXS para amostras de PHB na forma de pinos, em diferentes períodos de degradação.



Figura 85: Curvas de SAXS para amostras de PLLA na forma de filmes, em diferentes períodos de degradação.



Figura 86: Curvas de SAXS para amostras de PHB/PLLA 50/50 na forma de filmes, em diferentes períodos de degradação.



Figura 87: Curvas de SAXS para amostras de PHB na forma de filmes, em diferentes períodos de degradação.

Tabela 36: Resultados do período longo (L), obtidos a partir dos resultados da análise de SAXS para as blendas PHB/PLLA na forma de pinos, em diferentes períodos de degradação hidrolítica.

Pinos PHB/PLLA	Período Longo (L) (Á)
0/100	PHB PLLA
0 meses	249
6 meses	292
12 meses	
50/50	PHB PLLA
0 meses	59 240
6 meses	61 305
12 meses	63
100/0	PHB PLLA
0 meses	58
6 meses	62
12 meses	65

Tabela 37: Resultados do período longo (L), obtidos a partir dos resultados da análise de SAXS para as blendas PHB/PLLA na forma de filmes, em diferentes períodos de degradação hidrolítica.

Filmes PHB/PL	LA	Período I	Longo	(L) (Ă)
	9222222 323		992 922999	
0/100		PHB	P	LLA
			ant constant	
0 meses				205
4 meses		400 and per and	an anair	
			998 - 30 <b>2</b> 2 2 2	
50/50		PHB	P	LLA
0 meses		69		137
	an a			
4 meses		69	····· ···· ····	
			ais mains	
100/0		PHB	P	LLA
0 meses		71		
0 meses		71		
0 meses		71 70		-

Analisando as Tabelas 36 e 37 observa-se que para o PLLA na forma de pino o período longo cresce em função da degradação e na forma de filme o pico de correlação não está mais visível provavelmente ele se encontra em valores de q inferior ao detectável. Para o PHB na forma de pinos (Tabela 36) o período longo apresenta um leve acréscimo em função da degradação, enquanto para os filmes (Tabela 37) o período longo permanece constante. Para a blenda 50/50 na forma de pino observa-se aumento no tamanho dos períodos longos relativos ao PHB e PLLA, já para a blenda na forma de filme o tamanho do período longo relativo ao PHB permanece constante, e aquele relativo ao PLLA deixa de ser visualizado em função da degradação.

Não se pode afirmar nada com relação a espessura dos componentes cristalino e amorfo, porém a tendência mostra um crescimento do período longo em função da degradação, que pode estar relacionado com o aumento da cristalinidade observado pelas análises de WAXS e MDSC, sugerindo um possível aumento na espessura da lamela cristalina.

# 5.3. Análise e Cálculo da Espessura do Filme de PLLA Spin-Coating

Como foi visto no item 4.3. a), b) e c) foram utilizadas três técnicas de análise para se obter a espessura do filme de PLLA "Spin-Coating".

#### 5.3.1. Microscopia Interferométrica.

Desta análise obteve-se como resposta f = 0,4 (franjas de interferência). Sabendo-se que  $\lambda=0,606\mu m$  e aplicando a equação (16) apresentada no item 4.3. a), tem-se que:

 $e = 0,2424 \ \mu m \text{ ou } 242 \ nm.$ 

Este resultado mostrou que a espessura do filme obtido através da técnica "Spin-Coating" é bastante inferior à profundidade de penetração da radiação infravermelho (400-600 nm), assegurando que a técnica de análise FT-IR (ATR) é sensível o suficiente para analisar as proteínas adsorvidas sobre o biomaterial.

# 5.3.2. FT-IR - Reflectância

Para esta análise, empregou-se os parâmetros apresentados no item 4.3. b), e obteve-se o gráfico da Figura 88. Sabendo que o índice de refração (n) do PLLA é de aproximadamente 1,2 e supondo número de ordem N = 1, empregou-se a equação (17), apresentada no item 4.3. b), e obteve-se o valor da espessura. Assim o resultado da espessura do filme apresentou o valor de 288 nm, aproximadamente.



Figura 88: Transmitância x comprimento de onda obtido da análise de FT-IR por Reflectância para obter a espessura do filme de PLLA spin-coater.

# 5.3.3. Perfilômetro

Apesar dos resultados obtidos com as técnicas de análises anteriores sugerirem que os filmes tinham espessura inferior à profundidade de penetração do IR (+/- 400nm), desejava-se, ainda, diminuir tal espessura buscando o aumento da sensibilidade da análise de proteína adsorvida sobre estes filmes.

Foram realizados alguns testes com filmes preparados sobre laminas de vidro com quatro camadas empregando soluções poliméricas de 0,1 e 0,2% (m/v). Tais filmes foram analisados em um perfilômetro da marca Veeco, modelo Dektak<sup>3</sup>.

O procedimento empregado para confecção do filme é apresentado no item 4.2.1. b), e o protocolo da análise da espessura no item 4.3. c).

Os resultados obtidos mostraram que o filme preparado com 0,1% apresentava espessura de 30 nm  $\pm$  5 nm; e o filme preparado com solução de 0,2% apresentava espessura de 40 nm  $\pm$  5 nm. Tais resultados confirmam que o filme preparado tem espessura bastante inferior a profundidade de penetração do raio IR, dando segurança para o prosseguimento dos experimentos.

Os resultados podem ser visualizados na Figura 89 que traz o resultado da análise da espessura do filme no perfilômetro. Verifica-se a ocorrência de um vale no eixo y variando de -400 a 0 Å, caracterizando o degrau ou espessura do filme.

Desta forma optou-se por confeccionar os filmes diretamente sobre o cristal utilizando solução polimérica de 0,2% e com quatro camadas.



**Figura 89:** Gráfico da análise da medida de espessura do filme de PLLA em lâmina de vidro, medida em um perfilômetro.

## 5.4. Resultados da obtenção do índice de Absortividade Molar (ɛ) das proteínas

Os experimentos para a obtenção do índice de absortividade molar da HSA, HIgG e HFg foram feitos segundo o protocolo experimental apresentado no item 4.6, no qual também se encontra o tratamento espectral utilizado para se chegar ao resultado final. A partir da literatura estudada e apresentada no item 3.3.2.2., Capítulo 3 de Revisão Bibliográfica, dos resultados obtidos foram plotadas curvas de área da banda de absorção das proteínas em função da concentração da solução protéica, obtendo-se segundo a Lei de Beer-Lambert equações do tipo y = Ax.

Segundo a Lei de Beer : 
$$Abs = \varepsilon c l$$
, portanto  $\varepsilon = Abs/cl$ 

onde: Abs é a área de absorção integrada (cm<sup>-1</sup>), c é a concentração (mol/L) e l é o caminho óptico (cm). No caso de ATR o caminho óptico foi calculado segundo as equações 5, 6 e 7 do item 3.3.2.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 38 e nas Figuras de 90 a 92. Pode-se dizer que os resultados são confiáveis já que o ɛ da HIgG está de acordo com a literatura consultada (SINGH, 1999).

Tabela 38: Resultados dos índices de absortividade molar das proteínas; obtidos experimentalmente e da literatura (SINGH, 1999).

Proteína	ε (L/(mol cm <sup>2</sup> )) experimental	ε (L/(mol cm <sup>2</sup> )) literatura
HSA	$2,86 \ge 10^6$	*
HFg	$7,32 \ge 10^7$	*
HIgG	<b>8,33</b> x 10 <sup>6</sup>	$5,4 \ge 10^6$

\* valores não encontrados na literatura



Figura 90: Gráfico obtido do ensaio para cálculo do índice de absortividade molar da HIgG.



Figura 91: Gráfico obtido do ensaio para cálculo do índice de absortividade molar da HSA.



Figura 92: Gráfico obtido do ensaio para cálculo do índice de absortividade molar da HFg.

# 5.5. Resultados dos Ensaios de Adsorção de Proteína Empregando a Técnica FT-IR / ATR em Sistema de Fluxo Contínuo

Os ensaios foram feitos segundo o protocolo experimental apresentado no item 4.7.1. e o tratamento espectral dos resultados foi feito como descrito no item 4.7.1.1.

# 5.5.1. Cinética de adsorção de HSA em PLLA e PHB utilizando ZnSe (seleneto de zinco) como cristal ATR

Os primeiros ensaios foram realizados utilizando-se o ZnSe como elemento de reflexão interna. Os resultados obtidos através destes experimentos deixavam dúvidas quanto à coerência da análise, já que o pico interferométrico durante os experimentos era muito pequeno. Sendo necessário diminuir muito a velocidade de coleta de espectros, portanto, diminuía a freqüência de coleta de espectros no início dos experimentos interferindo no estudo da cinética. Após os experimentos concluídos, foi feito o tratamento espectral.

Devido à dúvida quanto à veracidade dos resultados, foram feitas também análises com a adsorção de HSA em policarbonato (PC). Estes experimentos foram feitos na tentativa de comparar os resultados obtidos para este sistema com resultados obtidos por Rosa (1998), que estudou a adsorção de proteínas do sangue humano (HSA, HIgG e HFg) na superfície de PC usando Eletroforese Capilar como técnica de análise.

As Figuras 93, 94 e 95 apresentam os gráficos da cinética de adsorção de HSA em PLLA, PHB e PC, respectivamente.

Analisando a Figura 93 que apresenta a cinética de adsorção de HSA em PLLA, verifica-se certa coerência nos resultados para 5 e 7,5 mg/mL de solução protéica, que mostram um aumento proporcional da densidade de adsorção em função do aumento da concentração da solução protéica. Porém quando se avalia a curva para concentração de solução protéica 10 mg/mL, verifica-se um acentuado decréscimo na densidade de adsorção na etapa de lavagem, caracterizando densidade de adsorção inferior às obtidas nos experimentos com solução protéica de menor concentração, contrariando as expectativas.

Foi feito também experimento empregando 1 mg/mL de solução protéica (resultado não apresentado), verificando-se que a adsorção não atingiu o equilíbrio, pois os
resultados dos cálculos de densidade de adsorção da etapa de lavagem foram superiores àqueles da etapa de adsorção. Pode-se dizer que para tal concentração, a difusão das moléculas de proteína é muito lenta havendo necessidade de um tempo maior para que a cinética de adsorção atinja o equilíbrio. Sugere-se, também, que no período de 2 horas de adsorção, as moléculas de proteína não conseguiram se ligar fortemente ao material, podendo ter ocorrido dessorção destas proteínas na etapa de lavagem.

A Figura 94 apresenta as curvas da cinética de adsorção de HSA em PHB para concentrações de solução protéica de 1 e 5 mg/mL. As curvas destes experimentos para 1 e 5 mg/mL de solução protéica apresentam coerência com a densidade de adsorção aumentando com o aumento da concentração da solução protéica.

Foram feitos também experimentos com solução protéica nas concentrações de 7,5 e 10 mg/mL (resultados não apresentado) e verificou-se que a densidade de adsorção apresentou valores negativos.

Analisando os resultados dos experimentos de adsorção de HSA em PC verificouse que exceto os resultados do experimento com solução protéica de 1mg/mL (Figura 95), para as outras concentrações de 5, 10 e 15 mg/mL estudadas (resultados não apresentados) os valores de densidade de adsorção eram negativos. Assim não foi possível comparar tais resultados com aqueles obtidos por Rosa (1998).

Portanto, com base nos resultados obtidos para os sistemas estudados resolveu-se abandonar as análises usando o ZnSe como IRE. Para tentar explicar tais resultados negativos pode-se dizer que o segundo termo da equação 9 do item 3.3.2.1, que se refere à índice de absortividade molar e caminho óptico é maior que o primeiro termo que se refere à área da absorbância por reflexão, talvez este termo tenha sido muito pequeno devido à falta de sensibilidade e resolução, como já foi dito, pois o pico interferométrico era muito baixo.

151



Figura 93: Cinética de adsorção de HSA em PLLA usando ZnSe como elemento de reflexão interna.



Figura 94: Cinética de adsorção de HSA em PHB usando ZnSe como elemento de reflexão interna.



Figura 95: Cinética de adsorção de HSA em PC usando ZnSe como elemento de reflexão interna.

## 5.5.2. Cinética de adsorção de HIgG em PLLA, PHB e blenda PHB/PLLA 50/50 utilizando Ge (germânio) como cristal ATR

Devido aos resultados inesperados obtidos da adsorção HSA em PHB, PLLA e PC, usando ZnSe como IRE, resolveu-se trabalhar com o cristal de Ge.

Trabalhando com o cristal de Ge obtivemos um pico interferométrico com qualidade superior em termos de sensibilidade àquele obtido nos experimentos quando se trabalhava com o cristal de ZnSe. Dessa forma, pôde-se trabalhar com uma velocidade de coleta de espectros aproximadamente 2 vezes maior, obtendo mais espectros no mesmo intervalo de tempo.

As Figuras 96, 97 e 98 apresentam os resultados obtidos dos experimentos com os sistemas PHB/HIgG, PLLA/HIgG e blenda/HIgG, respectivamente. Nestes gráficos foram construídas curvas que apresentam as duas etapas do experimento para cada concentração.

Os valores da quantidade final de proteína adsorvida em cada sistema, usando para cálculo a equação 11 apresentada no item 3.3.2.1., são apresentados nas Tabelas 39, 40 e 41, sendo que tal resultado é obtido da etapa de lavagem, que tem por finalidade retirar as

proteínas fracamente adsorvidas e, também, eliminar a contribuição das proteínas que estão na solução protéica.

Analisando a Figura 96 e a Tabela 39 que mostram os resultados obtidos para os sistemas PHB/HIgG, verifica-se que todos os resultados obtidos são positivos, bem como existe coerência, já que, a densidade de adsorção apresenta tendência a aumentar em função do aumento da concentração da solução protéica, na faixa de concentrações estudadas. Apesar de verificar que a densidade de adsorção aumenta nota-se, também, que para os sistemas PHB/HIgG 2,5 mg/mL, 3,5 mg/mL e 5 mg/mL de solução protéica, as densidades de adsorção durante a etapa de lavagem é praticamente constante, verificando-se um aumento mais significativo na concentração 8,5 mg/mL. Verificou-se, ainda, que para as concentrações 6 mg/mL e 7,5 mg/mL, as densidades de adsorção diminuíram contrariando as expectativas, porém, dentre estes dois últimos sistemas, o mais crítico é o de 7,5 mg/mL. Sugere-se que para tais experimentos, de 6 mg/mL e 7,5 mg/mL, pode ter ocorrido algum erro experimental.

Analisando a Figura 97 e a Tabela 40 que mostram os resultados obtidos dos experimentos da adsorção de HIgG em PLLA verifica-se que a densidade de adsorção aumenta com o aumento da concentração da solução protéica de 2,5 mg/mL para 3,5 mg/mL, permanecendo praticamente constante para os experimentos que utilizam soluções protéicas de concentração variando de 3,5 mg/mL a 7,5 mg/mL. Sugere-se que a densidade de adsorção atinge o equilíbrio e permanece estável a partir de 5 mg/mL, e mesmo aumentando a concentração da solução protéica não se verifica aumento da densidade de adsorção.

154



Figura 96: Resultados das análises de adsorção de HIgG em PHB usando a técnica de FT-IR/ATR.



Figura 97: Resultados das análises de adsorção de HIgG em PLLA usando a técnica de FT-IR/ATR.



Figura 98: Resultados das análises de adsorção de HIgG na blenda PHB/PLLA 50/50 usando a técnica de FT-IR/ATR.

 Tabela 39: Resultados da área e densidade de adsorção dos experimentos de adsorção de HIgG em PHB.

Sistema PHB/HIgG solução protéica (mg/mL)	Área integrada sob a banda de absorção da proteína adsorvida (1480 – 1580 cm <sup>-1</sup> )	Γ (μg/cm <sup>2</sup> ) da proteína adsorvida
2,5	2,79	1,23
3,5	3,01	1,32
5,0	3,07	1,31
6,0	2,47	1,00
7,5	1,98	0,47
8,5	3,53	1,45

Sistema PLLA/HIgG solução protéica (mg/mL)	Área integrada sob a banda de absorção da proteína adsorvida (1480 – 1580 cm <sup>-1</sup> )	Γ (μg/cm <sup>2</sup> ) da proteína adsorvida
2,5	1,09	0,56
3,5	2,17	1,14
5,0	2,51	1,3
6,0	2,36	1,2
7,5	2,5	1,24

Tabela 40: Resultados da área e densidade de adsorção dos experimentos de adsorção de HIgG em PLLA.

**Tabela 41:** Resultados da área e densidade de adsorção dos experimentos de adsorção de HIgG na blenda PHB/PLLA 50/50.

Sistema blenda 50/50 /HIgG solução protéica (mg/mL)	Área integrada sob a banda de absorção da proteína adsorvida (1480 – 1580 cm <sup>-1</sup> )	Γ (µg/cm <sup>2</sup> ) da proteína adsorvida
3,5	2,52	1,09
5,0	2,22	0,91
7,5	2,47	0,98

Para o sistema PHB/PLLA 50/50 / HIgG (Figura 98 e Tabela 41) observa-se que houve uma incoerência na densidade de adsorção, pois esta decresceu com o aumento da concentração da solução protéica. Porém, pode-se observar na curva da cinética de adsorção (Figura 98) para a concentração de 3,5 mg/mL que a densidade de adsorção na etapa da lavagem é praticamente igual à do final da etapa de adsorção, esse fato nos leva a sugerir que para a concentrações maiores, 5 e 7,5 mg/mL, observa-se um aumento da densidade de adsorção em função do aumento da concentração da solução protéica. Para estas concentrações também se verifica que a adsorção das proteínas conseguiu atingir o equilíbrio, já que na etapa da lavagem tem-se um decréscimo da densidade de proteínas adsorvida.

É interessante perceber que a densidade de adsorção não varia muito com o aumento da concentração da solução protéica para os sistemas estudados (PHB/HIgG, PLLA/HIgG e blenda/HIgG), indicando que provavelmente se trabalhássemos em concentração sanguinea de HIgG (12mg/mL), a densidade de adsorção para tais sistemas seria muito próxima à verificada.

Os valores obtidos para as densidades de adsorção de HIgG em PHB e em PLLA se situam em torno de 1,3  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>, e para a blenda PHB/PLLA 50/50 em torno de 1,0  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>, os quais são comparáveis à valores de adsorção de HIgG encontrados na literatura. Lassen e Malmsten (1997) reportam valores em torno de 0,5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> para a adsorção de HIgG na superficie de PP-AA, utilizando como técnica de análise espectroscopia de fluorescência (TIRF). Brash e Lyman (1969) empregando a técnica de FT-IR/ATR mostraram que valores de adsorção de HIgG em três materiais poliestireno (PS), polietileno (PE) e *Silastic* são, respectivamente, 0,7  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>, 1,0  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> e 1,8  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>.

## 5.5.3. Equilíbrio de adsorção de HIgG em PLLA, PHB e blenda PHB/PLLA 50/50 utilizando Ge (germânio) como cristal ATR

As isotermas de adsorção da HIgG nos materiais estudados são apresentadas na Figura 99, e a Tabela 42 traz os parâmetros: densidade máxima de adsorção por unidade de área do material e constante de dissociação referentes a adsorção da proteína nos materiais. Tais parâmetros foram obtidos pela linearização (equação 30) do modelo de Langmuir (equação 29) que é normalmente empregado para ajustar isotermas de adsorção, como apresentado nas equações 29 e 30.

$$\Gamma = \frac{\Gamma_{max}C^{*}}{(K_{d} + C^{*})}$$
(29)

$$\frac{1}{\Gamma} = \frac{K_d}{\Gamma_{max}} \frac{1}{C^*} + \frac{1}{\Gamma_{max}}$$
(30)

onde:  $\Gamma$  é a densidade de proteína adsorvida por unidade de área,  $\Gamma_{max}$  é a densidade máxima de proteína adsorvida por unidade de área,  $K_d$  é a constante de dissociação referente a adsorção da proteína nos materiais e  $C^*$  é a concentração de equilíbrio de proteína em solução.

Apesar da limitação de pontos experimentais, as isotermas de adsorção apresentadas na Figura 99 mostram uma tendência a saturação, para os sistemas estudados em torno de 6 mg/mL de solução protéica. Pode-se observar que a densidade de proteínas adsorvida é diferente para cada sistema, devido provavelmente à diferença de interações entre os materiais e a proteína. Assim, pôde-se obter os parâmetros de densidade máxima de adsorção e constante de dissociação apresentados na Tabela 42, os valores de densidade máxima de adsorção mostram que o PHB é o material que apresenta maior capacidade de adsorção de HIgG, seguido pela blenda PHB/PLLA e PLLA.

A maior capacidade de adsorção de HIgG na blenda PHB/PLLA em relação ao PLLA puro pode ser devido ao fato de que, como observado no estudo de caracterização da blenda PHB/PLLA, o PHB influencia na estrutura do PLLA quando são blendados.



**Figura 99:** Isotermas de adsorção à 37°C de HIgG para os sistemas: PHB/HIgG, PLLA/HIgG e PHB/PLLA 50/50/HIgG.

**Tabela 42:** Valores dos parâmetros:  $\Gamma_{max}$  (densidade máxima de proteína adsorvida por unidade de área) e  $K_d$  (a constante de dissociação referente a adsorção da proteína nos materiais) obtidos a partir da linearização do modelo de Langmuir.

Sistema	$\Gamma_{\text{máximo}} (\mu g/cm^2)$	Kd
РНВ	2,57	1,69
PLLA/HIgG	0,25	0,04
PHB/PLLA 50/50 / HIgG	0,85	0,73

# 5.5.4. Cinética da adsorção de HSA em PLLA e PHB utilizando Ge (germânio) como cristal ATR

As Tabelas 43 e 44 trazem os valores de área da banda de absorção e densidade de adsorção de HSA em PHB e PLLA, respectivamente, sendo que tais valores foram obtidos do equilíbrio, na etapa de lavagem. As Figuras 100 e 101 apresentam os resultados das análises de adsorção de HSA em PHB e PLLA, respectivamente.

Analisando a Figura 100 observa-se que aumentando a concentração da solução protéica a densidade de adsorção também aumenta. Pode-se notar, ainda, que os valores de densidades de adsorção da proteína HSA em PHB (Tabela 43) são ligeiramente superiores aos de HIgG em PHB (Tabela 39).

Para o sistema HSA/PLLA observa-se também que o aumento na concentração da solução protéica provoca aumento na densidade de adsorção (Figura 101). Porém, verificase que para a concentração de solução de HSA de 8,5 mg/mL resulta em densidade de adsorção inferior à concentração de 7,5 mg/mL, contrariando as expectativas.

Comparando os valores da densidade de adsorção de HSA em PLLA (Tabela 44) e de HIgG em PLLA (Tabela 40), verifica-se que a HSA adsorve mais que a HIgG na superficie do PLLA, assim como verificado para o PHB, podendo-se sugerir que devido ao tamanho da HIgG esta tenha maior dificuldade em adsorver. Entretanto a maior adsorção de HSA em relação à HIgG para ambos os sistemas com PLLA e PHB favorece à biocompatibilidade, já que a literatura sugere que a HSA passiva o processo de coagulação sanguínea.

Tabela 43: Resultados da área e densidade de adsorção dos experimentos de adsorção de HSA em PHB.

Sistema PHB/HSAÁrea integrada sob a banda de absorção da proteína adsorvida (1480 - 1580 cm <sup>-1</sup> )		Γ (μg/cm <sup>2</sup> ) da proteína adsorvida
3,0	1,658	0,967
7,5	2,47	1,358
8,5	3,045	1,983

 Tabela 44: Resultados da área e densidade de adsorção dos experimentos de adsorção de HSA em PLLA.

Sistema PLLA/HSA solução protéica (mg/mL)	Área integrada sob a banda de absorção da proteína adsorvida (1480 – 1580 cm <sup>-1</sup> )	Γ (μg/cm <sup>2</sup> ) da proteína adsorvida
3,0	1,536	1,103
5,0	2,514	1,702
7,5	3,752	2,635
8,5	2,732	2,06



Figura 100: Resultados da análise de adsorção de HSA em PHB usando a técnica de FT-IR (ATR).



Figura 101: Resultados da análise de adsorção de HSA em PLLA usando a técnica de FT-IR (ATR)

# 5.5.5. Equilíbrio da adsorção de HSA em PLLA e PHB utilizando Ge (germânio) como cristal ATR

A Figura 102 apresenta as isotermas de adsorção de HSA em PLLA e PHB. Os valores dos parâmetros de densidade máxima de adsorção e constante de dissociação obtidos da linearização do modelo de Langmuir, já apresentado, estão na Tabela 45.

Analisando a Figura 102 observa-se tendência a saturação para os sistemas PHB/HSA e PLLA/HSA em torno 7 mg/mL, concentração um pouco superior àquela observada para os sistemas com HIgG, sugerindo que a HSA possui maior interação com os materiais comparada à HIgG. Os parâmetros de densidade máxima de adsorção, apresentados na Tabela 45 mostram maior capacidade de adsorção da HSA no PHB assim como verificado para HIgG.



Figura 102: Isotermas de adsorção à 37°C de HIgG para os sistemas: PHB/HSA e PLLA/HSA.

**Tabela 45:** Valores dos parâmetros:  $\Gamma_{max}$  (densidade máxima de proteína adsorvida por unidade de área) e  $K_d$  (a constante de dissociação referente a adsorção da proteína nos materiais) obtidos a partir da linearização do modelo de Langmuir.

Sistema	$\Gamma_{\text{máximo}}$ (µg/cm <sup>2</sup> )	Kd
PHB/HSA	0,67	0,36
PLLA/HSA	0,50	0,11

# 5.5.6. Cinética de adsorção de HFg em PLLA e PHB utilizando Ge (germânio) como cristal ATR

Os experimentos com os sistemas PHB/HFg e PLLA/HFg foram conduzidos com um fluxo de solução protéica em torno de 5,5mL/min proporcionando um gradiente de deformação de aproximadamente 65 s<sup>-1</sup>; bastante inferior ao utilizado até então, que era de 33,3 mL/min com 417 s<sup>-1</sup> de gradiente de cisalhamento. A diminuição na velocidade do fluxo da solução protéica foi feita porque a solução apresentou sinais de desnaturação da

#### Capitulo V – Kesullaaos e Discussao

proteína HFg durante experimentos conduzidos com fluxo de 33,3 mL/min. O sinal observado foi floculação e coloração esbranquiçada adquirida pela solução após um período em torno de 20 minutos, sendo que a situação se tornava mais evidente quando se aumentava a concentração da solução protéica. Considerando que as moléculas de HFg são maiores e apresentam forma bem mais alongada em relação às de HSA e HIgG pode-se sugerir que as moléculas de HFg desnaturavam em função do cisalhamento sofrido pela amostra. Assim, o fluxo da solução foi reduzido a um mínimo no qual não se observou mais desnaturação para soluções de baixas concentrações. Para altas concentrações de solução protéica a redução no fluxo não foi suficiente para evitar a desnaturação; porém, com o equipamento (bomba peristáltica) empregado não foi possível reduzir mais o fluxo da solução.

As Tabelas 46 e 47 trazem os valores de área e densidade de adsorção de HFg em PHB e PLLA, respectivamente, sendo que tais valores foram obtidos do equilíbrio, na etapa de lavagem. As Figuras 103 e 104 apresentam os resultados das análises de adsorção de HFg em PHB e PLLA, respectivamente.

Analisando a Figura 103 observa-se que para a concentração de 2 mg/mL de solução protéica o sistema não atingiu o equilíbrio, devido à baixa concentração da solução e ao grande tamanho das moléculas de HFg que pode provocar o decréscimo na velocidade de difusão das mesmas. Já para as concentrações de 3 e 4 mg/mL verificou-se resultados coerentes quanto ao equilíbrio da adsorção, porém a densidade de adsorção não sofreu variação significativa em função do aumento da concentração (Tabela 46).

Para o sistema PLLA/HFg (Figura 104 e Tabela 47), infelizmente os resultados obtidos das análises mostraram que para as concentrações estudadas a adsorção não atingiu o equilíbrio, obtendo-se valores de densidade de adsorção, da etapa de lavagem, maiores do que da etapa de adsorção, podendo-se sugerir que o tempo de experimento não foi suficiente para que o equilíbrio fosse atingido devido à menor taxa de difusão das moléculas de HFg, como já discutido anteriormente, ou ainda que as concentrações eram baixas.

164

Tabela 46: Resultados da área e densidade de adsorção dos experimentos de adsorção de HFg em PHB.

Sistema PHB/HFg solução protéica (mg/mL)	Área integrada sob a banda de absorção da proteína adsorvida (1480 – 1580 cm <sup>-1</sup> )	Γ (μg/cm <sup>2</sup> ) da proteína adsorvida
2,0	2,47	0,29
3,0	1,75	0,172
4,0	1,86	0,17

 Tabela 47: Resultados da área e densidade de adsorção dos experimentos de adsorção de HFg em PLLA.

Sistema PLLA/HFg solução protéica (mg/mL)	Área integrada sob a banda de absorção da proteína adsorvida (1480 – 1580 cm <sup>-1</sup> )	Γ (μg/cm <sup>2</sup> ) da proteína adsorvida
1,0	2.31	0,35
2,0	2,26	0,33
3,0	3,3	0,49



Figura 103: Resultados da análise de adsorção de HFg em PHB usando a técnica de FT-IR (ATR).



Figura 104: Resultados da análise de adsorção de HFg em PLLA usando a técnica de FT-IR (ATR)

### 5.6. Resultados dos Ensaios de adsorção Analisados por Eletroforese Capilar (EC)

#### 5.6.1. Curva de Calibração de HSA em EC

Os ensaios para a obtenção da curva de calibração da HSA foram seguidos de acordo com o protocolo apresentado no item 4.8.1. A Figura 105 apresenta a curva de calibração da HSA juntamente com o ajuste linear.



Figura 105: Curva de calibração da HSA feita através de análises em Eletroforese Capilar.

#### 5.6.2. Resultados dos ensaios de adsorção de HSA em PLLA e PHB analisados por EC

Os ensaios de adsorção de HSA em PLLA e PHB, e a análise da adsorção foram feitos segundo os protocolos apresentados no item 4.8.2.

A Figura 106 apresenta eletroferogramas de análises dos sistemas PHB/HSA e PLLA/HSA empregando 15 mg/mL de solução protéica. Os resultados obtidos das análises para todos os sistemas estudados são mostrados nas Tabelas 48 e 49.

Analisando a Figura 106 verifica-se que o tempo de migração da HSA varia de um sistema para o outro, o que era esperado. Pode-se observar, também, que o pico referente ao tampão permanece no mesmo tempo de migração.



Figura 106: Eletroferograma da análise da proteína adsorvida nos sistemas PHB/HSA e PLLA/HSA 15 mg/mL de solução protéica.

 Tabela 48: Resultados obtidos do ensaio de adsorção de HSA em PLLA analisados por eletroforese capilar.

$C_0 (mg/mL)$	Área sob o pico	Cad (µg/mL)	$\Gamma (\mu g/cm^2)$
3,5	7,86	0,63	0,22
5,0	9,3	0,74	0,26
7,5	10,34	0,83	0,29
12,5	42,7	3,42	1,2
15,0	53,4	4,27	1,5

$C_0 (mg/mL)$	Área sob o pico	Cad (µg/mL)	$\Gamma (\mu g/cm^2)$
1,0	4,68	0,375	0,13
5,0	79,68	6,382	2,23
7,5	104	8,33	2,92
10,0	112,6	9,02	3,16
15,0	75	6,00	2,1

**Tabela 49:** Resultados obtidos do ensaio de adsorção de HSA em PHB analisados por eletroforese capilar.

Analisando os resultados da Tabela 48 para os sistemas PLLA/HSA verifica-se que para as concentrações de 3,5 mg/mL a 7,5 mg/mL, a densidade de adsorção praticamente não varia, havendo um aumento significativo quando a concentração da solução protéica varia de 7,5 mg/mL para 12,5 mg/mL e voltando a permanecer constante para a maior concentração de 15 mg/mL.

Para o sistema PHB/HSA (Tabela 49) verifica-se que a densidade de adsorção aumenta com o aumento da concentração da solução protéica quando esta varia de 1 mg/mL para 10 mg/mL e depois para a maior concentração a densidade de adsorção decresce um pouco.

Os valores experimentais de adsorção de HSA em PLLA e PHB estão em torno de  $\Gamma$ = 1,5 µg/cm<sup>2</sup> e 2 µg/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Tais resultados estão de acordo com a literatura consultada que apresenta adsorção de HSA em outros materiais, como: Rosa (1998) mostra para o sistema HSA/PVC (policloreto de vinila) a densidade de adsorção é da ordem de 1,2 µg/cm<sup>2</sup> empregando como método de análise eletroforese capilar; Brash e Lyman (1969) apresentam a adsorção de HSA em polietileno (PE), poliestireno (PS) e em *Silastic*, analisadas por FT-IR/ATR com valores de densidade de adsorção de 0,8µg/cm<sup>2</sup>; 0,5µg/cm<sup>2</sup> e 1,6µg/cm<sup>2</sup> respectivamente. Para comparação com outros resultados observamos que, Jeon (1992) apresenta que densidade de adsorção de HSA em poliuretana (PU) empregando solução protéica de concentração de 30 mg/mL (concentração fisiológica), é de aproximadamente 3,9 µg/cm<sup>2</sup>.

#### 5.6.3. Equilíbrio da adsorção de HSA em PLLA e PHB analisados por EC

A Figura 107 apresenta as isotermas de adsorção, a Tabela 50 os parâmetros de densidade máxima de adsorção e constante de dissociação da proteína, obtidos a partir da linearização do modelo de Langmuir já citado, e a Tabela 51traz os valores de  $\Gamma$ ,  $\Gamma_{max}$  e K<sub>d</sub> para os sistemas analisados por FT-IR (ATR) e EC.

Através da Figura 107 observa-se tendência a saturação para ambos os sistemas em torno de 12mg/mL, enquanto a Tabela 50 mostra que o PHB tem maior capacidade de adsorção que o PLLA como já verificado através da análise de FT-IR (ATR). O fato da saturação da adsorção ocorrer em concentração superior àquela observada por FT-IR (ATR) se deve à diferença entre as amostras, para a análise em FT-IR as amostras eram filmes e para Eletroforese Capilar eram pinos. Os resultados sugerem mais uma vez que o método de preparação influencia nas propriedades dos materiais como observado através dos resultados de caracterização das amostras (MDSC, SEM, WAXS e SAXS).

Analisando a Tabela 51 nota-se que os valores de densidade de adsorção para os sistemas analisados por FT-IR (ATR) e Eletroforese Capilar apresentam boa coerência, apesar das amostras serem diferentes (filmes e pinos), sugerindo que estas duas técnicas podem proporcionar resultados confiáveis.



Figura 107: Isotermas de adsorção à 37°C de HSA para os sistemas: PHB/HSA e PLLA/HSA.

**Tabela 50:** Valores dos parâmetros:  $\Gamma_{max}$  (densidade máxima de proteína adsorvida por unidade de área) e  $K_d$  (a constante de dissociação referente a adsorção da proteína nos materiais).

Sistema	$\Gamma_{\text{máximo}}$ (µg/cm <sup>2</sup> )	$\mathbf{K}_{d}$
PHB/HSA	0,74	0,05
PLLA/HSA	0,14	0,34

**Tabela 51:** Valores de  $\Gamma$  (densidade de proteína adsorvida),  $\Gamma_{max}$  (densidade máxima de proteína adsorvida) e  $K_d$  (constante de dissociação referente a adsorção da proteína nos materiais), para os sistemas analisados por FT-IR (ATR) e EC.

Sistemas FT-IR (ATR)	Γ (µg/cm <sup>2</sup> )	$\Gamma_{\rm mix}$ (µg/cm <sup>2</sup> )	Kd
PHB/HIgG	1,3	2,57	1,69
PLLA/HIgG	1,2	0,25	0,04
50/50 / HIgG	1	0,85	0,73
PHB/HSA	1,5	0,67	0,36
PLLA/HSA	2	0,50	0,11
Sistemas E C	Г (µg/cm <sup>2</sup> )	Γ <sub>máx</sub> (µg/cm <sup>2</sup> )	Kd
PHB/HSA	2,5	0,74	0,05
PLLA/HSA	1,3	0,14	0,34

#### 5.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) das proteínas adsorvidas em PHB

A título de ilustração foi feita análise de microscopia eletrônica de varredura (SEM) de amostras de PHB na forma de pino, antes e após ensaios de adsorção, com a finalidade de identificar a proteína adsorvida na superfície da amostra.

A Figura 108 apresenta as micrografias das análises de SEM, através da qual é possível verificar a presença de pontos brancos infinitamente pequenos sobre a superfície dos pinos de PHB, muito parecido com pó, após os ensaio de adsorção das proteínas HSA, HIgG e HFg, sugerindo que tais proteínas estão realmente adsorvidas sobre o material.



**Figura 108:** Micrografias das análises de SEM, de amostras de PHB na forma de pinos: (a) PHB antes da adsorção, (b) PHB após a adsorção de HSA, (c) PHB após a adsorção de HIgG, e (d) PHB após a adsorção de HFg, (ampliação de 1000 x).

### **CAPÍTULO VI**

#### 6.1. CONCLUSÕES

O estudo das blendas PHB/PLLA permitiu concluir que os polímeros são imiscíveis, sendo que o PLLA confere estabilidade térmica e mecânica, e o PHB aumenta a cristalinidade das mesmas. As blendas na forma pinos apresentaram morfologia densa e na forma de filmes a morfologia observada foi porosa com separação de fases.

Durante o estudo de degradação pôde-se observar que o método de preparação influenciou o processo de degradação das amostras, sendo que, os filmes se mostraram mais susceptíveis ao meio apresentando maiores evidências de degradação. Além disso, verificou-se também que o PLLA degradou mais rapidamente que o PHB, e influenciou a degradação das blendas PHB/PLLA na forma de filmes, acelerando a degradação destas, enquanto o PHB contribuiu para aumentar a estabilidade térmica e mecânica.

Morfologicamente não se observou degradação para as amostras na forma de pinos, somente para os filmes, principalmente para o homopolímero PLLA. O processo de degradação ocorreu de modo que as amostras se tornaram mais cristalinas em função da degradação, sendo que o PLLA na forma de filme demonstrou probabilidade de formação de cristais de tamanhos diferentes possivelmente com espessura de lamelas cristalinas diferentes. Pôde-se concluir ainda que durante a degradação dos homopolímeros e blenda 50/50 (pinos e filmes) ocorreu aumento do tamanho dos cristalitos, bem como o aumento da espessura do período longo o que levou a pensar que a espessura da lamela cristalina aumentou.

Através dos resultados dos ensaios de adsorção de proteínas (HSA e HIgG) sobre os biomateriais (PHB, PLLA e PHB/PLLA 50/50), concluiu-se que a utilização de filmes finos sobre o cristal de germânio, "spin-coating", proporcionou maior sensibilidade à técnica de análise empregada, o FT-IR (ATR). Além disso, o emprego do sistema de fluxo contínuo simulando condições fisiológicas (fluxo sanguíneo, temperatura, pH, força iônica)

172

deu maior veracidade aos resultados obtidos, podendo-se inclusive acompanhar a cinética de adsorção das proteínas sobre os polímeros em tempo real.

As isotermas de adsorção mostraram que os sistemas tendem a saturar a adsorção em torno de 6 mg/mL a 7 mg/mL para análise em FT-IR (ATR), e em torno de 12mg/mL para análise em Eletroforese Capilar. Esses resultados conduzem a conclusão de que o método de preparação das amostras (filmes e pinos), também, influencia no processo de adsorção das proteínas na superfície dos materiais. Essa afirmação é reforçada pelos resultados de caracterização das blendas que mostrou influência do método de preparação das amostras nas propriedades térmicas, mecânicas, morfológicas e estruturais destas.

Os resultados dos ensaios de adsorção obtidos por FT-IR (ATR) e por Eletroforese Capilar mostrou que a densidade de proteínas adsorvidas nos biomateriais são próximos à valores obtidos da literatura para a adsorção destas proteínas em outros materiais. Os valores obtidos para HSA são maiores do que para HIgG, mostrando que ocorre uma maior interação da HSA com a superfície dos biomateriais estudados.

As blendas PHB/PLLA possuem potencialidade para utilização na área médica, podendo-se sugerir o emprego dos pinos PHB/PLLA 30/70 em ortopedia para pequenas fraturas e, dos filmes como barreira contra invasão de tecido; pois, as blendas apresentaram bons resultados de caracterização e ensaios de adsorção de proteínas. Além disso, a blenda PHB/PLLA apresenta um processo de degradação lento maior que 12 meses, podendo ser utilizada para dispositivos que requeiram tal característica.

#### 6.2. Sugestões para Trabalhos Futuros

- Estudo "in vivo" da blenda PHB/PLLA 30/70, visando aplicação dos pinos em ortopedia para pequenas fraturas, e dos filmes como barreira contra invasão de tecido.
- Utilizar a técnica de Eletroforese Capilar para estudar adsorção competitiva das proteínas HSA, HIgG e HFg em biomaterial.
- Estudar as mudanças conformacionais sofridas pelas proteínas durante e após a adsorção em um biomaterial empregando o sistema de fluxo contínuo em FT-IR (ATR) e dicroísmo circular (CD).
- Estudar as propriedades superficiais dos filmes preparados por "Spin Coating", visando melhor entendimento do processo de adsorção das proteínas na superficie destes materiais.

### **CAPÍTULO VII**

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ANGELOVA, N., HUNKELER, D. Rationalizing the Design of Polymeric Biomaterials. Trends in Biotechnology. v.17, P. 409-421, 1999.

ASTM D790 - Método Padrão de Teste para Propriedades de Flexão de Plásticos, 1971.

AVELLA, M., et. al. Poly(3-Hydroxybutyrate)/Poly(Methyleoxide) Blends: Thermal, Crystallization and Mechanical Behaviour. Polymer. v.38, p. 6135-6143, 1997.

BABENSEE, J. E., et. al. Immunoblot Analysis of Protein Associated with HEMA-MMA Microcapsules: Human Serum Proteins in vitro and Rat Proteins Following Implantation. Biomaterials. v.19, p.839-849, 1999.

BARBUCCI, R., MAGNANI, A. Conformation of Human Plasma Proteins at Polymers Surfaces: the Effectiveness of Surface Heparinization. Biomaterials. v. 15, p. 955-962, 1994.

BARKER, D. R. Capillary Electrophoresis, John Wiley & Sons, 1ª edição, New York, 1995.

BLÜMM, E., OWEN, A. J. Miscibility, Crystallization and Melting of Poly(3-Hydroxybutyrate)/Poly(L-Lactide) Blends. Polymer. v.36, p.4077, 1995.

BRASH, J.L., LYMAN, D.J. Adsorption of Plasma Proteins in Solution to Uncharged, Hydrophobic Polymer Surfaces. Journal of Biomedical Materials Research. v.3, p.175-189, 1969.

CASTILLO, E. J., et al. Protein Adsorption on Soft Contact Lenses II – Reversible and Irreversible Interactions between Lysozyme and Soft Contact Lens Surfaces. Biomaterials. v.6, p. 338-345, 1985.

CHITTUR, K. K. FTIR-ATR for Protein Adsorption to Biomaterials Surfaces. Biomaterials. v.19, p.357-369, 1998. CHITTUR, K. K., et al. Fourier-Transform Infrared-Spectroscopy Attenuated Total Reflection Studies of Protein Adsorption in Flowing Systems - Approaches for Bulk Correction and Compositional Analysis of Adsorbed and Bulk Proteins in Mixtures Journal of Colloid and Interface Science. v.111, p.419-433, 1986.

COLEMAN, P.B. Practical Sampling Techniques for Infrared Analysis. CRC Press, Boca Raton. p. 3 - 57, 1993.

DENG, X. M., CASTILLO, E. J., ANDERSON, J. M. Surface Modification of Soft Contact Lenses: Silanization, Wettability and Lisozyme Adsorption Studies. Biomaterials. v.7, p. 247–251,1986.

DIMITRIU, S. Polymeric Biomaterials. Marcel Dekker, Inc. New York, 1994.

DUEK, E.A.R., ZAVAGLIA, C.A.C., BELANGERO, W.D. In Vitro Study of Poly(Lactic Acid) Pin Degradation. Polymer. v. 40, p. 6465-6473, 1999.

ELST, M. V. et al. The Burst Phenomenon an Animal Model Simulating the Long-Term Tissue Response on PLLA Interlocking Nails. Journal of Biomedical Materials Research. v.30, p.139-143, 1996.

ELWING, H. Protein Adsorption and Ellipsometry in Biomaterial Research. Biomaterials, v.19, p.397-406, 1998.

FEIGIN, L. A., SVERGUN, D. I. Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron. Edited by George W. Taylor, Plenum Press, New York, cap. 6, 1987.

FERREIRA, B. M. P. Obtenção, Caracterização Estudo "In Vitro" e "In Vivo" de Blendas de Poli(L-ácido láctico)/ Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato), Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Mecânica / Universidade Estadual de Campinas, Abril/2002.

FERREIRA, B.M.P., ZAVAGLIA, C.A.C., DUEK, E.A.R. Films of Poliy(L-Lactic Acid)/Poly(Hydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate) Blends: In Vitro Degradation. Materials Research. v. 4, p. 34 - 42, 2001.

FINK D. J., et al. *Quantitative Surface Studies of Protein Adsorption by Infrared Spectroscopy*. Analytical Biochemistry. v. 165, p. 147 – 154, 1987.

FINK, D. J., CHITTUR, K. K. Monitoring Biological Processes by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Enzyme Microbiological Technology. v. 9, p.568 – 572, 1986. FU, F. N., FULLER, M. P., SINGH, B. R. Use of Fourier Transform Infrared/Attenuated Total Reflectance Spectroscopy for the Study of Surface Adsorption of Proteins. Applied Spectroscopy. v.47, p.98-102, 1993.

FUJIWARA, T., et al. Intriguing Morphology Transformation Due to the Macromolecular Rearrangement of Poly(L-Lactide)-Block-Poly(Oxyethylene): From Core-Shell Nanoparticles to Band Structures via Fragments of Unimolecular Size. Polymer. v. 42, p. 1515 – 1523, 2001.

GAJRIA, A. M. et al. *Miscibility and Biodegradability of Blends of Poly(lactic acid) and Poly(vinyl acetate)*. Polymer. v.37, p.437-444, 1996.

GENDREAU, R. M. Biomedical Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Applications to Proteins in Spectroscopy in the Biomedical Sciences. Gendreau, R. M. Editor, CRC Press, Florida, p.1-86, 1986.

GRIFFITH, L.G. Polymeric Biomaterials. Acta Materialia. v. 48, p. 263-277, 2000.

GUYTON, A. C. Hemostasia e Coagulação Sangüínea, in Fisiologia Básica. Ed. Interamericana, Rio de Janeiro, cap.7, 1989.

HALL, B., et. al. The Reference of European Communities, p.147, 1992.

HARFENIST, E. J., MURRAY, R. K. Plasma Proteins, Immunoglobulins, and Blood Coagulation, in Harper's Biochemistry. Editor Lange Medical Book, Nowalk, cap.59, 1993.

HARPER, H. A. Manual de Química Fisiológica. Atheneu Editora São Paulo S/A, São Paulo, cap.10, 1971.

HLADY, V. Spectroscopic and Other Techniques for Studyng Adsorption of Bioproducts at Interfaces. in Interfacial Phenomena and Products. Editor Marcel Dekker, New York, cap.9,1996.

HOOLAND, S. J., YASIN, M., TIGHE, B. J. Polymers for Biodegradable Medical Devices. VII. Hydroxybutyrate-Hydroxyvalerate Copolymers: Degradation Of Copolymers and Their Blends with Polysaccharides Under In Vitro Physiological Conditions. Biomaterials, v. 11, p. 208-215, 1990.

HUNT, B. J., JAMES, M. I. *Polymer Characterization*. Editor Blackie Acdemic & Professional, London, caps.6, 7, 9 e 10, 1993.

IANNACE, S., et. al. Poly(3-Hydroxybutyrate)-Co-(3-Hydroxyvalerate)/Poly-L-Lactide Blends: Thermal and Mechanical Properties. Journal Applied Polymer Science, v. 54, p.1525-1536, 1994.

IGNATIUS, A.A., CLAES, L.E. In Vitro Biocompatibility of Bioresorbable Polymers: Poly(L,DL-lactide) and Poly(L-lactide-co-glycolide). Biomaterials. v.17, p.831-839, 1996.

JEON, J. S., SPERLINE, R. P., RAGHAVAN S. *Quantitative Analysis of Adsorbed Serum Albumin on Segmented Polyurethane Using FTIR/ATR Spectroscopy*. Applied Spectroscopy. v.46, p.1644 – 1648, 1992.

KIM, J. K., et. al. Synthesis and Crystallization Behavior of Poly(L-Lactide)-Block-Poly(&-Caprolactone) Copolymer. Polymer. v. 42, p. 7429-7441, 2001.

KIMURA, Y. Biodegradable Polymers. in: Biomedical Applications of Polymeric Materials. Editor CRC Press, EUA, p.163-189, 1993.

KOYAMA, N., DOI, Y. Miscibility of a Binary Blends of Poly((R)-3-Hydroxybutiric Acid) and Poly((S)-Lactic Acid). Polymer. v.38, p.1589, 1997.

KOYAMA, N., DOI, Y. Morphology and Biodegradability of a Binary Blend of Poly((R)-3-Hydroxybutiric Acid) and Poly((R,S)-Lactic Acid). Canadian Journal Microbilology. v.41, p. 316-322, 1995.

KULIK, E., IKADA, Y, In Vitro Platelet Adhesion to Nonionic and Ionic Hydrogels with Different Water Contents. Journal of Biomedical Materials Research, v. 30, p.295-304, 1996.

LASSEN, B., MALMSTEN, M. Competitive Protein Adsorption at Plasma Polymer Surfaces. Journal of Colloid and Interface Science, v. 186, p. 9 – 16, 1997.

LENK, T. J., et. al. *IR Spectral Changes of Bovine Serum Albumin upon Surface Adsorption*. Journal of Biomedical Materials Research. v. 23, p. 549-569, 1989.

LI, S., GARREAU, H., VERT, M. Structure-Property Ralationships in the Case of the Degradation of Massive Poly(α-Hydroxy Acids) in Aqueous Media. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 1, p. 198-206, 1990.

LOTTI, N., et. al. Binary Blends of Microbial Poly(3-Hydroxybutyrate) with Polymethacrylates. Polymer. v. 34, p. 4935-4940, 1993.

LÜCK, M., et. al. Analysis of Plasma Protein Adsorption on Polymeric Nanoparticles with Different Surface Characteristics. Journal of Biomedical Materials Research, v.39, p.478-485, 1998.

LYMAN, D.J., ROWLAND, S. M., *Biomaterials* in Polymers: Biomaterials and Medical Applications, Wiley-Interscience, p.52, 1989.

MAINIL-VARLET, P., RAH, B., GOGOLEWSKI, S. Long-Term In Vivo Degradation and Bone Reaction to Various Polylactides. Biomaterials. v. 18, p. 257-266, 1997.

MIDDLETON, J.C., TRIPTON, A.J. Synthetic Biodegradable Polymers as Orthopedic Devices. Biomaterials. v. 21, p.2335-2346, 2000.

MIYAZAWA, T. Perturbation Treatment of the Characteristics Vibrations of the Polypeptide Chains in Various Configurations. Journal of Chemical Physics. v. 32, p. 1647, 1960.

MURRAY, R. K., GRAMMER, D. K., MAYES, P. A., RODWELL, V. W. Harper's Biochemistry. 23<sup>a</sup> Edition. Editor Appleton & Lange, EUA, p. 803, 1993.

NIELSEN, L. E. Mechanical Properties of Polymers and Composites. Marcel Dekker, Inc., New York, caps. 1, 2 e 4, v.1, 1974.

OHKOSHI, I., ABE, H., DOI, Y. Miscibility and Solid-State Structures for Blends of Poly[(S)-Lactide] with Poly[(R,S)-3-Hydroxybutyrate]. Polymer. v. 41, p. 5985-5992, 2000.

ORÉFICE, R. L., et. al. Processing and Characterization of Bioactive Composite, in Bioceramics. v. 8, p. 409-414, 1995.

PAK, J., et. al. Thermal Analysis of Paraffins Calorimetry. Thermochimica Acta. v. 357-358, p. 259-266, 2000.

PARK, J. B., LAKES, R. S. *Biomaterials an Introduction*. Second Edition. New York, cap. 10, p. 220-237, 1992.

PEREZ-LUNA, V. H., HORBETT, T. A., RATNER, B. D. Developing Correlations Between Fibrinogen Adsorption and Surface Properties Using Multivariate Statistics Journal of Biomedical Materials Research. v.28, p.1111-1126, 1994.

PINTO, T.J.A., SAITO, T., GLEREAN, A. Biocompatibilidade de Materiais Empregados na Confecção de Próteses Cardiovasculares: Comparação entre Pericárdio Bovino e Dracon<sup>®</sup>. Revista Saúde Pública. v.27, p.185-189, 1993.

PITT, W. G., COOPER, S. L. Albumin Adsorption on Alkyl Chain Derivatized Polyurethanes: I. The Effect of C-18 Alkylation. Journal of Biomedical Materials Research, v. 22, p. 359-382, 1988.

PITT, W. G., PARK, K., COOPER, S. L. Sequential Protein Adsorption and Thrombus deposition on Polymeric Biomaterials. Journal of Colloid and Interface Science. v.111, 1986.

RICHARDSON J. R., R. R., MILLER, J. A., REICHERT, W. M. Biomaterials. v.14, p.627, 1993.

ROSA, P. T. V., ARRUDA, A. C. F., SANTANA, C. C. Adsorção de Proteínas do Sangue na Superfície de Biomateriais. Anais do 2º Encontro Brasileiro sobre Adsorção. Florianópolis, 1998.

RYAN, A. J., et al. Low-Molar-Mass Cyclic Poly(Oxyethylene)S Studied by Raman Spectroscopy, X-Ray Scattering and Differential Scanning Calorimetry. Polymer. v. 38, p. 35-42, 1997.

SANTIN, M., et. al. Adsorption of  $\alpha$ -1-Microglobulin from Biological Fluids onto Polymer Surfaces. Biomaterials. v.18, p.823-827, 1997.

SAUER, B. B., et. al. Temperature Modulated DSC Studies of Melting and Recrystallization in Polymers Exhibiting Multiple Endotherms, Polymer. v. 41, p. 1099-1108, 2000.

SHEPPARD, J. I., MCCLUNG, W. G. FEUERSTEIN, I. A. Adherent Platelet Morphology on Adsorbed Fibrinogen: Effects of Protein Incubation Time and Albumin Addition. Journal of Biomedical Materials Research. v.28, p.1175-1186, 1994.

SINGH, B. R., comunicação pessoal, 1999.

SÖDERLING, E., HERBST, K., YLI-URPO, A. Journal of Biomedical Materials Research. v.31, p.525, 1996.

STANISLAWSKI, L., DE NECHAUD, B., CHRISTEL, P. Plasma Protein Adsorption to Artificial Ligament Fibers. Journal of Biomedical Materials Research. v.29, p. 315-323, 1995.

STRAATEN, V. J., PEPPAS, N. A. ATR-FTIR Analysis of Protein Adsorption on Polymeric Surfaces. Journal of Biomaterials Science – Polymer Edition. v.2, p.113–121, 1991.

SUDESH, K., ABE, H., DOI, Y. Syntesis, Structure and Properties of Polyhydroxyalkanoates: Biological Polyesters. Progress in Polymer Science. v. 25, p. 1503-1555, 2000.

TANG, L. Mechanisms of Fibrinogen Domains: Biomaterial Interactions. Journal Biomaterials Science: Polymer Edition. v.9, p.1257-1266, 1998.

TANZAWA, H. Biomedical Polymers: Current Status and Overview. in: Biomedical Applications of Polymeric Materials. Editor CRC Press, EUA, p.1-15, 1993.

TENGVALL, P., LUNDSTRÖM, I., LIEDBERG, B. Protein Adsorption Studies on Model Organic Surfaces: an Ellipsometric and Infrared Spectroscopic Approach. Biomaterials. v.19, p.407-422, 1998.

TSUJI, H., IKADA, Y. Properties and Morphology of Poly(L-Lactide) 4. Effects of Structural Parameters on Long-Tem Hydrolysis of Poly(L-Lactide) in Phosphate-Buffered Solution. Polymer Degradation and Stability. v. 67, p. 179-189, 2000.

UTRACKI, L.A. Polymer Alloys and Blends Thermodynamics and Rheology. Hanser Publishers, New York, 1989.

VERDONCK, E., SCHAAP, K., THOMAS, L. C. A Discussion of Principles and Applications of Modulated Temperature DSC (MTDSC). International Journal of Pharmaceutics. v. 192, p. 3-20, 1999.

VERT, M., LI, S. M., SPENLEHAUER, G., GUERIN, P. Bioresorbability an Biocompatibility of Aliphatic Polyesters. Journal Material Science Material in Medicine. v. 3, p. 432-446, 1992.

VONK, C. G. Synthetic Polymers in the Solid State. In: Small Angle X-ray Scattering. Editor Glatter, O. e Kratky, O., Academic Press, London, p. 433 – 466, 1982.

WAKE, M.C. et al. Effects of Biodegradable Polymer Particles on Rat Marrow-Derived Stromal Osteoblasts In Vitro. Biomaterials. v. 19, p. 1255-1268, 1998.

WASACZ, F. M. 2º Encontro Brasileiro de Usuários da Nicolet. São Paulo, 1998.

WILLIAMS, D. F. Definitions in Biomaterials (Progress in Biomaterials). Elsevier Press, v.4, 1987.

YUEHUEI, H., et. al. Pre-Clinical In Vivo Evaluation of Orthopaedic Bioabsorbable Devices. Biomaterials. v. 21, p. 2635-2652, 2000.

ZHANG, L., XIONG, C., DENG, X. Biodegradable Polyesters Blends for Biomedical Application. Journal of Applied Polymer Science. v.56, p.103-112, 1995.

ZHANG, X. et al. Biodegradable Polymers for Orthoped Applications: Synthesis and Processability of poly(L-lactide) and poly(lactide-co-*ɛ*-caprolactone). J.M.S. - Pure Applied Chemistry. v.A30, p.933-947, 1993.