

Universidade Estadual de Campinas
UNICAMP

Instituto de Química
Departamento de Físico-Química

**HIDROGÉIS DE IPNs BASEADAS EM
GELATINA E POLI(VINILPIRROLIDONA).
ESTUDO DA MISCIBILIDADE E AVALIAÇÃO
DA POTENCIALIDADE COMO BIOMATERIAL**

Dissertação de Mestrado

Cristina Moniz Araujo Lopes

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Isabel Felisberti

Dezembro de 1997

DATA: BC
 CHAMADA: Unicamp
881h
 Ex.
 WBO BC: 33181
 DC: 395/98
 C D
 ECO: R\$ 11,00
 TA: 26/03/98
 CPD

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
 UNICAMP**

1-00107253-4

L881h Lopes, Cristina Moniz Araujo
 Hidrogéis de IPNs baseadas em gelatina e poli(vinilpirrolidona) : estudo da miscibilidade e avaliação da potencialidade como biomaterial / Cristina Moniz Araujo Lopes. Campinas, [SP : s.c.], 1997.

Orientadora: Maria Isabel Felisberti.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.

1. Biocompatibilidade. 2*Hemocompatibilidade. 3. Comportamento mecânico. I. Felisberti, Maria Isabel. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

“Aqui fico
com palavras e povos e caminhos
que me esperam de novo, e que batem
com mãos consteladas em minha porta.”

Pablo Neruda

AGRADECIMENTOS

- À Bel pela orientação, confiança, paciência e liberdade de estilo.
 - À Eliana Resende (FEM) pela contribuição na elaboração do projeto desse trabalho e pela indicação de pessoas que auxiliaram na caracterização biológica.
 - À Lúcia Wada (IB) pela cessão do Laboratório de Cultura de Células e materiais usados nos testes de citotoxicidade, extrema boa vontade e simpatia, além de todos os ensinamentos; e a seus alunos, Chris e Arnaldo, pela paciência de esclarecer muitas dúvidas.
 - À Liana (FEM) e ao Álvaro (USP) pela boa vontade e atenção ao me deixarem acompanhar um experimento de adesão de plaquetas.
 - Ao pessoal do setor de Afereses do Hemocentro: Iara, Eduardo, Marques, por serem tão prestativos, bem humorados e simpáticos, e à Mariuce, que além de tudo isso, cuidava de mim enquanto eu passava mal durante a doação de plaquetas.
 - Ao Manoel Mendes do CPqD da Telebrás pela receptividade, cessão do equipamento de TMA e auxílio nos ensaios de compressão.
 - À Renata e à Cássia da Análise Térmica pelos ensinamentos e paciência.
 - À Lúcia da Microscopia Ótica e Eletrônica pela atenção e colaboração.
 - À Bel e ao André da Secretaria de Pós-Graduação por me ajudarem a sobreviver à burocracia.
 - Ao Toninho e ao Nelson da BIQ pela colaboração e pelo bom humor.
 - Ao pessoal do Setor de Desenho do IQ pela atenção e colaboração.
 - Ao Elias pela ajuda com o projetor multimídia.
-
-

-
-
- À Paula e à Iara do Setor de Reprografia do IQ pela atenção e colaboração.
 - À FAPESP pelo suporte financeiro.
 - Ao Antônio Micaroni da Leiner Davis Gelatin pelo fornecimento da gelatina usada no trabalho.
 - Ao pessoal do meu laboratório e laboratório vizinho: Lucila, Sandra, Silvana, Luís Eduardo, Sílvia, Cleide, Helena, Valéria, Diva, Valéria Yoshida, Maurício, Eduardo, Simone, Roseli, Luís, Ítalo, Fernando, Ricardo, Cristiane, Cristina, Carminha, Rita, Denise, Jair, Maurício, Cristiana, Uiram, Sheila, Cobaia por terem sido tão legais e divertidos e companheiros, tendo colaborado para tornar a execução desse trabalho tão agradável; e à Gislaine, por seu incentivo contínuo, intermitente e praticamente ininterrupto durante a elaboração dessa dissertação.
 - A Evelise, Lollo, Fabiana, Rita, Jorge, Carol, Delfim, Rose, Antônio simplesmente pelo tanto que significam pra mim.
 - A Cláudio, Milton, Wellison, Marcelo, Zé Formol, Carla, Lia, Walter (Κπ), Fernando (Pedrita), Sahori, Isaac, Jure pelos ótimos momentos juntos.
 - Aos companheiros de república: Silvana, Laura, Natália, Tico, Gisele, Andréia, Planck pela ótima convivência e paciência.
 - Aos amigos de Macedônia: Lucimara, Careca, Euzébio, Leila, por amizade tão duradoura.
 - À minha família pelo incentivo e compreensão.
 - E a todos que colaboraram com esse trabalho que, devido às tensões e correrias dessa época, eu tenha esquecido de mencionar ☺.
-
-

RESUMO

Polímeros para aplicações biomédicas devem possuir boas propriedades físico-químicas e mecânicas assim como biocompatibilidade adequada. Alguns polímeros sintéticos possuem as propriedades físicas requeridas mas não são suficientemente biocompatíveis. Por outro lado, polímeros naturais são biocompatíveis mas suas propriedades mecânicas são inadequadas. A mistura de polímeros sintético e natural na forma de blendas e IPNs reúne as propriedades de ambos num único material.

Hidrogéis de IPNs de poli(vinilpirrolidona) (PVP) e gelatina nas composições 30/70, 50/50 e 70/30 em porcentagem de massa foram obtidos a partir de solução aquosa usando-se como agentes reticulantes glutaraldeído (3%) para a gelatina e persulfato de potássio (100%) para o PVP.

A caracterização do material no estado desidratado foi feita para avaliar a estabilidade térmica e a miscibilidade das misturas. Através da técnica de Análise Térmica (TGA) constatou-se que as IPNs são termicamente estáveis até a temperatura de 250 °C. O estudo da miscibilidade por Calorimetria Diferencial de Varredura na versão modulada (MDSC) indicou miscibilidade em toda a faixa de composição estudada, enquanto que por Análise Dinâmico Mecânica (DMA) observou-se a existência de separação de fases na amostra contendo 70 % de gelatina, resultado atribuído a grande diferença de densidade de reticulação para o sistema nessa composição.

Ensaio de intumescimento mostraram que todas as IPNs são capazes de reter grandes quantidades de água, e que embora o PVP apresente grau de intumescimento muito maior que a gelatina, esse comportamento não se refletiu nas misturas, ou seja, a quantidade de água incorporada nas IPNs não é diretamente proporcional à quantidade de PVP na mistura.

A superfície do material no estado intumescido foi analisada por microscopia ótica com acessório de contraste de fase: a topografia é diferente para cada amostra embora todas apresentassem superfície irregular. Com o ensaio mecânico de compressão pode-se estudar o comportamento elástico dos hidrogéis diante da aplicação e retirada de uma força: a IPN 50/50 apresentou desempenho superior ao dos polímeros puros, enquanto que as IPNs nas outras composições deformaram mais que a gelatina, o componente mais frágil.

Pode-se verificar através de testes preliminares de citotoxicidade e adesão de plaquetas que o material pode ser biocompatível e hemocompatível.

De uma maneira geral, pode-se concluir que o material em questão tem propriedades interessantes para ser aplicado como biomaterial. A gelatina melhorou a compatibilidade com o sangue e adesão celular, enquanto que o PVP melhorou as propriedades mecânicas das IPNs.

ABSTRACT

Polymer materials for biomedical applications should possess good physico-chemical and mechanical properties as well as suitable biocompatibility. A number of synthetic polymers have the required physical properties but are not acceptable from the point of view of biocompatibility. On the other hand, biological polymers present inadequate mechanical properties although they are often biocompatible. The association of useful properties of natural and synthetic polymers could be achieved through blending.

IPN's hydrogels of poly(vinyl pyrrolidone) (PVP) and gelatin in compositions 30/70, 50/50 and 70/30 in mass percentage were prepared from aqueous solution using potassium persulfate (100%) and glutaraldehyde (3%) as their respective cross-linking agents.

Characterization of the materials in dehydrated state was made to evaluate blends thermal stability and miscibility. Thermogravimetric analysis (TGA) showed that IPNs are all stable thermally up to 250 °C. Miscibility studies, by means modulated differential scanning calorimetry (MDSC), indicated miscibility in all range of composition, while dynamic mechanical analysis (DMA) showed phase separation in IPN containing 70% gelatin. This result could be explained by a large difference between polymers cross-linking density in this composition.

Swelling studies showed that all IPN's are able to retain high water content and, although PVP presents very higher swelling degree than gelatin, this behavior is not reflected in IPN's. The content of water inside IPNs does not change in proportion to the amount of PVP in blend.

Swell state material surface was analyzed by phase contrast light microscope: topography is different to each IPN, although all had irregular surface. Elastic behavior was studied through compression mechanical experiments: 50/50 composition IPN had better performance than pure polymers.

Preliminary cytotoxicity and platelet adhesion tests showed hydrogel do not produce adverse effect on cells and blood, so it could be biocompatible.

In a general way, is possible to conclude that these hydrogels have attractive properties for biomedical application. Gelatin contributes for a better blood compatibility and cell adhesion, while PVP improves mechanical properties of IPN's.

Lista de Abreviações

PET	Poli(tereftalato de etileno)
PMMA	Poli(metacrilato de metila)
PHEMA	Poli(metacrilato de hidroxietila)
IPN	Redes Poliméricas Interpenetrantes
SIN	IPN simultâneo
PVP	Poli(vinilpirrolidona)
GPL	Gelatina tipo B linear
GPR	Gelatina tipo B reticulada
IPN1	IPN PVP/Gelatina 30/70 (% m)
IPN2	IPN PVP/Gelatina 50/50 (% m)
IPN3	IPN PVP/Gelatina 70/30 (% m)
PVPR	PVP reticulado
PVPL	PVP linear
TGA	Análise Termogravimétrica
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
MDSC	DSC Modulado
DMA	Análise Dinâmico Mecânica
TMA	Análise Termo Mecânica
Tg	Temperatura de transição vítrea
Cp	Capacidade calorífica
E'	Módulo de armazenamento de energia
E''	Módulo de perda de energia
EWC	Quantidade de água em equilíbrio
SFB	Soro fetal bovino

CONTEÚDO

Capítulo 1- Introdução

1.1– Biomateriais	1
1.2– Aplicações de polímeros em medicina	2
1.3– Hidrogéis	4
1.4– Redes poliméricas interpenetrantes (IPNs)	7
1.5– Poli(vinilpirrolidona) (PVP)	9
1.6– Gelatina	11

Capítulo 2- Objetivos 14

Capítulo 3- Preparação dos hidrogéis

3.1- Experimental	15
3.2- Mecanismos de reticulação	17
3.3- Considerações sobre a formação das redes	20

Capítulo 4- Caracterização na forma de xerogel

4.1- Análise termogravimétrica (TGA)	22
4.2- Avaliação da miscibilidade de misturas poliméricas	24
4.2.1- Calorimetria Diferencial de Varredura versão modulada (MDSC)	25
4.2.2- Análise Dinâmico Mecânica (DMA)	33
4.2.3- Relação entre os resultados obtidos por DSC e DMA-O efeito da água	39

1- INTRODUÇÃO

1.1-Biomateriais

Biomateriais são materiais não vivos que possuem algumas propriedades especiais que lhes permitam ser utilizados em dispositivos médicos buscando a interação com o sistema biológico¹. Eles podem ser usados tanto para reconstrução e substituição de partes do corpo humano, quanto para a fabricação de mecanismos para manutenção da vida (figura 1).

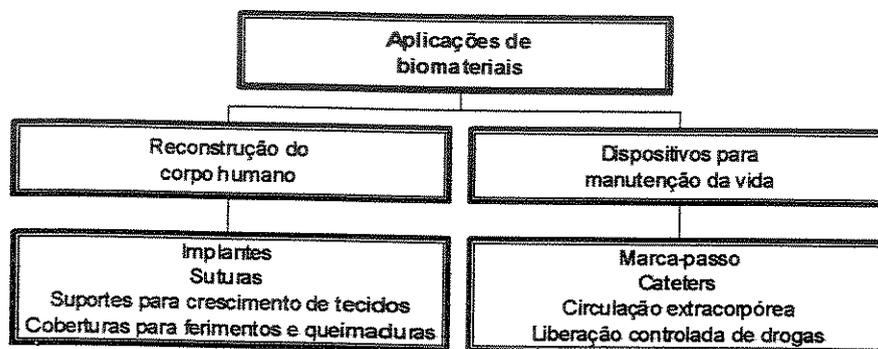


Figura 1: Exemplos de aplicações para biomateriais¹⁻⁴.

Duas características são cruciais para que um material seja utilizado nesse tipo de aplicação: biocompatibilidade e funcionalidade. Biocompatibilidade é definida como a habilidade de um material induzir no tecido hospedeiro uma resposta adequada a uma aplicação específica, ou seja, o material não perturba o sistema biológico nem este interfere na funcionalidade do material². A funcionalidade implica que o material mantenha seu desempenho por todo o tempo esperado para a aplicação, seja ela temporária ou definitiva. O cumprimento desses e outros requisitos

Capítulo 5- Caracterização na forma de hidrogel	
5.1- Ensaio de intumescimento	45
5.2- Ensaio mecânico	49
5.3- Análise de superfície	54
Capítulo 6- Avaliação da compatibilidade com tecidos e sangue	
6.1- Testes de citotoxicidade	57
6.2- Testes de adesão de plaquetas	69
Capítulo 7- Conclusões e sugestões para trabalhos futuros	76
Referências Bibliográficas	78
Anexo I	87
Anexo II	90
Anexo III	92

1- INTRODUÇÃO

1.1-Biomateriais

Biomateriais são materiais não vivos que possuem algumas propriedades especiais que lhes permitam ser utilizados em dispositivos médicos buscando a interação com o sistema biológico¹. Eles podem ser usados tanto para reconstrução e substituição de partes do corpo humano, quanto para a fabricação de mecanismos para manutenção da vida (figura 1).

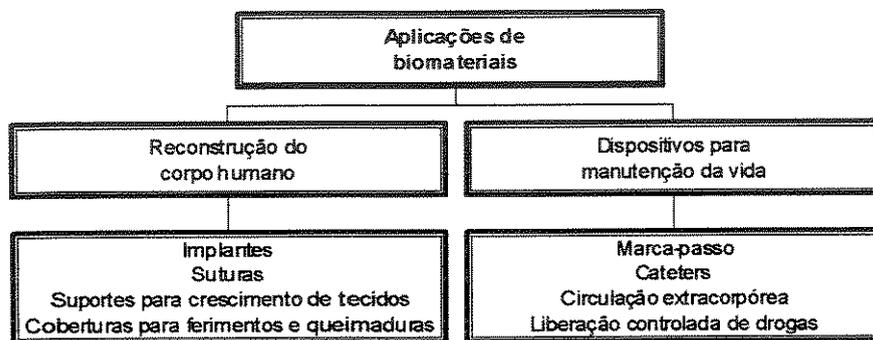


Figura 1: Exemplos de aplicações para biomateriais¹⁻⁴.

Duas características são cruciais para que um material seja utilizado nesse tipo de aplicação: biocompatibilidade e funcionalidade. Biocompatibilidade é definida como a habilidade de um material induzir no tecido hospedeiro uma resposta adequada a uma aplicação específica, ou seja, o material não perturba o sistema biológico nem este interfere na funcionalidade do material². A funcionalidade implica que o material mantenha seu desempenho por todo o tempo esperado para a aplicação, seja ela temporária ou definitiva. O cumprimento desses e outros requisitos

depende das propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas do material (composição, estrutura, estabilidade, físico-química da superfície, resistência a forças ou pressões às quais será submetido, resistência ao ataque de fluidos fisiológicos e enzimas, entre outras) ¹.

Muitos biomateriais já são utilizados rotineiramente e vários trabalhos de pesquisa têm procurado materiais com propriedades cada vez melhores para essa função. As categorias estudadas para esse fim incluem cerâmicas, metais, vidros, carbono, biomoléculas naturais modificadas, polímeros e compósitos. Apesar da grande variedade de biomateriais, ainda não existe, para muitas aplicações, um que satisfaça todos os requisitos necessários.

1.2- Aplicações de polímeros na medicina

As aplicações cirúrgicas dos polímeros naturais representa a maior utilização de polímeros até o século XX³. Pouco tempo depois do desenvolvimento dos polímeros sintéticos, seu uso em aplicações biomédicas atraiu a atenção de muitos pesquisadores devido a algumas importantes características: são leves, oferecem uma grande variedade de composições e propriedades, são facilmente fabricados e podem ser obtidos em formas variadas.

Atualmente muitos polímeros sintéticos são usados em aplicações biomédicas (tabela 1) sendo que a maioria está concentrada nas áreas de cardiologia, ortopedia, odontologia, oftalmologia, biotecnologia e implantes de tecidos moles^{2,4}.

Tabela 1: Algumas aplicações biomédicas de materiais poliméricos^{2,4}.

POLÍMERO	APLICAÇÕES
Poliuretanas	Isolante para fio de marca-passo, vasos sanguíneos e coração artificiais, cateters, bolsas de sangue, substituinte de ligamentos.
Polissiloxanos (Siliconas)	Juntas de dedos, membranas de oxigenação artificial, próteses de mama, válvulas de coração, cateters.
Poliamidas	Suturas, microencapsulação de curto prazo, células artificiais.
Poli(etileno)	Próteses de quadril, porta sangue para rins artificiais, pinos para ortopedia.
Poli(tereftalato de etileno) (PET)	Enxertos vasculares, reforço de implantes, suporte para regeneração de tecidos.
Poli(metacrilato de metila) (PMMA)	Próteses ortopédicas, lentes de contato rígidas, lentes intraoculares, cimento dentário e ósseo.
Poli(metacrilato de hidroxietila) (PHEMA)	Lentes de contato gelatinosas, prótese de mama, coberturas para ferimentos e queimaduras, liberação controlada de drogas.
Policarbonato	Implantes de crânio, oxigenadores de sangue, membranas de hemodiálise.

Polímeros naturais, ou biopolímeros, também são bastante utilizados na área de biomateriais. De origem vegetal (celulose, amido) ou animal (colágeno, albumina, dextrana, elastina, fibronectinas), eles possuem a vantagem de conter informações que facilitam a interação com as células. Esses materiais podem ser utilizados em sua forma natural ou quimicamente modificados, e as aplicações envolvem substituintes de ligamento, hemodiálise, dispositivos de liberação controlada de drogas, suturas e implantes biodegradáveis, cobertura para ferimentos e queimaduras⁵.

Muitos polímeros sintéticos que já estão disponíveis comercialmente apresentam propriedades mecânicas e físico-químicas comparáveis àquelas dos tecidos biológicos que vão ser substituídos, mas não são suficientemente biocompatíveis. Essa não biocompatibilidade se deve, principalmente, à presença de monômeros e de aditivos. Por outro lado, muitos polímeros naturais possuem boa biocompatibilidade, mas suas propriedades mecânicas são geralmente inadequadas. Melhorias nas características de um biomaterial sintético podem ser obtidas pela adição de macromoléculas biológicas. O material resultante deve combinar as propriedades mecânicas adequadas do componente sintético com a biocompatibilidade do componente biológico^{6,7}.

1.3- Hidrogéis

Hidrogéis são polímeros na forma de rede tridimensional, capazes de reter grandes quantidades de água. A quantidade de água presente nesses materiais é de pelo menos 20 % da massa total e se for maior que 95% o hidrogel é chamado de superabsorvente⁸. A propriedade de intumescer na presença de água, formando um gel elástico, e de encolher na ausência da

mesma apresentando, então, um comportamento vítreo é a principal característica de hidrogéis. A extensão do intumescimento é determinada principalmente pela natureza da cadeia polimérica e pela densidade de reticulação.

Para manter as estruturas tridimensionais, as cadeias poliméricas do hidrogel são normalmente reticuladas física ou quimicamente. Na reticulação química as cadeias estão unidas por ligações covalentes, enquanto que na reticulação física as cadeias estão conectadas por ligações tipo ponte de hidrogênio, interações de Van der Waals, iônicas e hidrofóbicas, ou pela presença de uma fase cristalina².

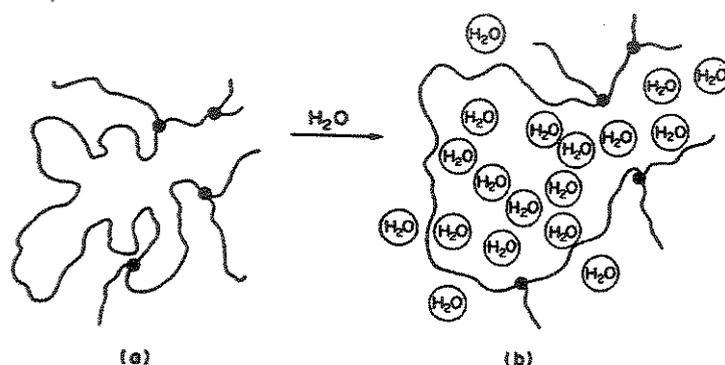


Figura 2: Representação esquemática de um hidrogel.

O interesse por hidrogéis na área de biomateriais é justificado por algumas vantagens que esses polímeros apresentam: a natureza elastomérica e macia dos hidrogéis minimiza a irritação mecânica e a causada por fricção aos tecidos; a baixa tensão interfacial com os fluidos e tecidos minimiza a adsorção de proteínas e adesão de células; a capacidade de intumescimento

facilita a retirada de resíduos de reagentes usados na preparação do material e permite a permeação e difusão de metabólitos de baixa massa molar .

Hidrogéis vêm sendo usados em várias aplicações biomédicas. Alguns exemplos são: liberação controlada de drogas, lentes de contato gelatinosa e intra-oculares, coberturas para ferimentos e queimaduras, recobrimento de superfícies para melhorar a biocompatibilidade, membranas de hemodiálise, prótese de ligamentos, desenvolvimento de músculos artificiais. Recentemente têm sido desenvolvidos novos hidrogéis, chamados de “espertos” ou “inteligentes”, cujo comportamento de intumescimento/encolhimento, degradação e curvatura responde a mudanças nos fatores externos, como pH, temperatura, campo elétrico, força iônica, solvente, tensão, luz e pressão. Com essa sensibilidade ao ambiente, novas aplicações para esses materiais têm sido consideradas⁸.

Hidrogéis podem ser obtidos em quatro formas principais:

- 1- Filmes. Evaporação de solvente com subsequente reticulação.
- 2- Redes reticuladas. Normalmente obtidas por polimerização em massa ou em solução.
- 3- Enxertia de superfícies. Enxerto de polímero hidrofílico em substratos poliméricos hidrofóbicos.
- 4- Redes poliméricas interpenetrantes (IPN).

Devido a alta quantidade de água incorporada em sua estrutura, os hidrogéis normalmente apresentam propriedades mecânicas ruins quando comparados a outros materiais poliméricos. Os dois últimos métodos permitem a obtenção de hidrogéis com propriedades mecânicas melhoradas.

1.4- Redes Poliméricas Interpenetrantes (IPNs)

A mistura de polímeros é uma técnica que vem sendo muito usada na ciência de polímeros para obtenção de materiais com novas propriedades de maneira rápida e econômica. Essas propriedades dependem da composição da mistura e, portanto, podem ser alteradas através de variação da mesma⁹. Dependendo da forma como é feita, a mistura pode resultar diferentes tipos de sistemas moleculares divididos em copolímeros, blendas e IPNs.

Na reação de copolimerização dois ou mais tipos de monômero são incorporados numa mesma cadeia polimérica. De acordo com a distribuição desses monômeros na cadeia o copolímero pode ser classificado como aleatório, alternado, bloco ou de enxertia.

As blendas são definidas como mistura física de dois ou mais polímeros com baixo ou nenhum grau de ligações químicas entre eles. Quando a mistura envolve dois polímeros em rede que tenham sido polymerizados e/ou reticulados um na presença do outro sem ligações covalentes entre eles, o material obtido é chamado de IPN (Interpenetrating Polymer Networks). Existem outras definições mais específicas para IPN relacionadas com o método de obtenção. Os tipos mais importantes são:

- 1- IPN sequencial. Monômero do polímero B e iniciador são intumescidos na rede do polímero A e polymerizados *in situ*.
- 2- IPN simultâneo (SIN). Monômeros ou pré-polímeros mais agentes reticulantes e iniciadores de ambas as redes são misturadas. As reações, não interferentes, ocorrem simultaneamente.
- 3- IPN látex. IPNs obtidas na forma de látex normalmente com estrutura tipo “core-shell”.

4- Semi-IPN. Um dos polímeros presente na mistura apresenta-se na forma linear.

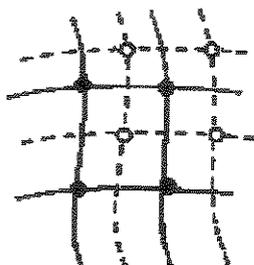


Figura 3: Representação esquemática de uma IPN. --- Polímero A reticulado, — Polímero B reticulado.

Os métodos mais usados para obtenção de blendas são mistura mecânica e mistura em solução. Na mistura em solução os componentes da blenda são solubilizados em um solvente comum que depois é evaporado para obtenção do sólido (casting); esse método é principalmente usado em escala de laboratório.

As propriedades de blendas dependem, primeiramente da miscibilidade dos componentes envolvidos. As propriedades das blendas de polímeros miscíveis podem ser ou aditivas ou sinérgicas, enquanto as de polímeros imiscíveis dependerão também da morfologia e da adesão entre as fases, além das propriedades individuais de cada componente⁹.

De uma maneira geral, para ser considerada miscível a blenda deve apresentar homogeneidade em nível molecular e energia livre de mistura negativa. O primeiro requisito é cumprido quando os componentes não formam microdomínios misturando-se com elevado grau de dispersão. O segundo pode ser alcançado quando há entre as moléculas, interações

específicas que resultem em calor de mistura exotérmico; isso porque, devido à alta massa molar dos polímeros, as misturas envolvem pouca mudança de entropia, então a energia livre e consequentemente a miscibilidade dependem essencialmente do fator entálpico. Estas mesmas regras aplicam-se a IPNs, com a diferença de que a extensão da segregação de fases e a morfologia podem ser controladas pela densidade de reticulação e pela rota sintética.

A mistura de polímeros sintéticos e naturais é uma maneira de combinar as propriedades mecânicas do componente sintético com as biológicas do natural. A reticulação dos componentes da mistura formando IPN é importante para melhorar as propriedades mecânicas e a estabilidade enzimática desses materiais. As propriedades mecânicas dos hidrogéis, geralmente ruins, podem ser melhoradas por obtenção na forma de IPN.

1.5- Poli (vinilpirrolidona)

A poli(vinilpirrolidona) (PVP) é um polímero biodegradável e solúvel em água; possui caráter anfifílico: os grupos amida e carboxila altamente polares conferem propriedades hidrofílicas (e de atração polar) e os grupos apolares metileno e metila conferem propriedades hidrofóbicas¹⁰.

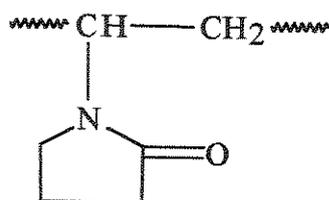


Figura 4: Representação da estrutura do PVP.

O PVP tem estrutura similar àquelas das proteínas; é considerado um modelo simples de proteína sendo fisiologicamente inativo. Possui boas propriedades formadoras de filme, é um polímero forte e flexível e exhibe excelentes propriedades complexantes e coloidais¹⁰.

O PVP em solução aquosa pode ser reticulado por reação com certos agentes químicos ou irradiados com luz ultravioleta ou raios gama formando um hidrogel¹¹. PVP linear vem sendo usado há muito tempo nos campos médico e farmacêutico e normalmente não tem apresentado toxicidade e nem potencial trombogênico¹⁰. Na forma de hidrogel tem sido usado em aplicações biomédicas e industriais: hidrogéis de copolímero de vinilpirrolidona e metacrilato de hidroxietila tem sido usado para a fabricação de lentes de contato moles; um material compósito preparado de um hidrogel de PVP e borracha de silicona tem sido estudado para possíveis aplicações como componentes de um coração artificial e interfaces compatíveis com sangue e tecidos¹². PVP também tem sido usado para recobrir superfície de poliuretanas para melhorar a hemocompatibilidade¹³.

Os géis de PVP podem ser formados a partir de solução aquosa por reação com álcalis fortes, persulfatos inorgânicos ou peróxidos. A gelação com álcalis fortes envolve a abertura do anel da pirrolidona para formar unidades de poli (vinil ácido aminobutírico)¹¹.

1.6- Gelatina

A gelatina é um polipeptídeo derivado da hidrólise parcial controlada do colágeno. Essa hidrólise pode ser ácida resultando na gelatina Tipo A, ou básica que dá a gelatina tipo B. Embora esse polímero não seja encontrado na natureza, a classificação como natural é mais adequada do que sintético.

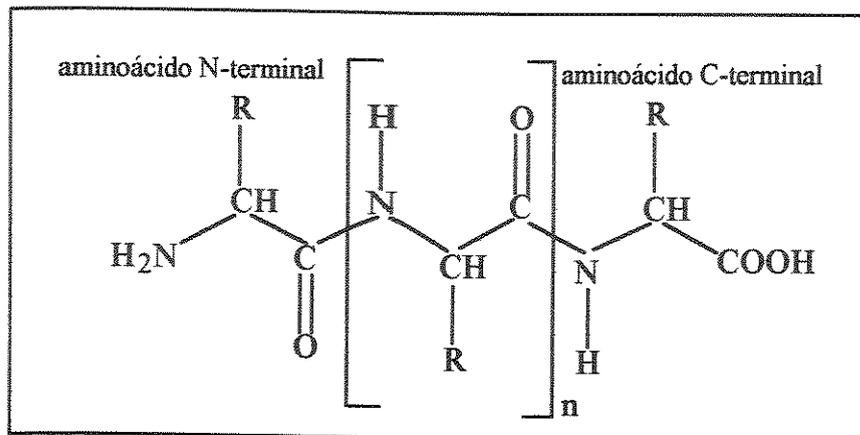


Figura 5: Representação da estrutura de um polipeptídeo.

O colágeno é uma proteína fibrosa da classe das escleroproteínas, insolúvel em água e na maioria dos solventes ordinários. É a mais abundante das proteínas do reino animal, constituinte de pele, tendões, cartilagens e outros tecidos conectivos, ossos e dentes. Difere das outras proteínas por conter grandes quantidades de prolina, hidroxiprolina (aminoácidos cíclicos), glicina e aminoácidos constituídos de enxofre, sendo a única proteína conhecida que possui quantidades significativas de hidroxiprolina¹⁴.

A unidade estrutural fundamental do colágeno é a molécula de tropocolágeno que consiste de três cadeias polipeptídicas em conformação helicoidal mantidas juntas por interações do tipo pontes de hidrogênio

intermolecular. A formação dessas ligações e da tripla hélice só é possível quando o terceiro resíduo na cadeia é a glicina.

Em soluções aquosas a temperaturas suficientemente altas as cadeias de gelatina assumem configurações aleatórias apresentando comportamento análogo ao de cadeias lineares de altos polímeros sintéticos. Essa semelhança permite examinar a estrutura e comportamento da gelatina do ponto de vista das teorias desenvolvidas para tratar os sistemas poliméricos sintéticos¹⁵.

Há diversas variedades de gelatina, a composição depende da fonte de colágeno e do tratamento hidrolítico usado. Em todos os tipos há um predomínio dos aminoácidos prolina, glicina, ácido glutâmico, hidroxiprolina, alanina, ácido aspártico e arginina.

A gelatina comercial possui massa molar de 65000 a 300000 g/mol. É um sólido vítreo cujos grânulos intumescem quando imersos em água fria. Com o aquecimento essas partículas intumescidas se dissolvem para formar uma solução. Se a solução for ácida as moléculas de gelatina são carregadas positivamente e se for básica são carregadas negativamente, ou seja, a gelatina possui caráter anfotérico¹⁶.

A formação de géis termicamente reversíveis em solução aquosa é influenciada por vários fatores. O processo inicia com um aumento da viscosidade resultando na formação do gel. A força dos géis formados depende da concentração e da força intrínseca da gelatina usada, que é uma função da estrutura e da massa molecular.

A formação do gel não é completamente entendida ainda, mas acredita-se que seja resultado de ligações do tipo ponte de hidrogênio (reticulação física). As moléculas de gelatina são arranjadas em micelas formando um gel semisólido que complexa a água. Uma teoria moderna propõe que a primeira etapa na gelação é a formação de regiões ordenadas causadas pelo retorno

parcial da gelatina a estruturas em hélices como as do colágeno. Depois, uma rede fibrilar tridimensional contínua de micelas se forma no sistema, provavelmente devido à formação de ligações não-específicas entre os segmentos mais ordenados das cadeias. Ligações hidrofóbicas, do tipo ponte de hidrogênio e eletrostáticas podem estar envolvidas na reticulação; e como essas ligações podem ser rompidas por aquecimento, o gel é termicamente reversível. A formação de reticulação é a parte mais lenta desse processo, então, sob condições ideais, a força do gel aumenta com o tempo a medida que mais pontos de reticulação são formados. O efeito total é o aumento da dependência da massa molecular média e da ordem com o tempo. A reorganização da estrutura das moléculas envolve a associação entre componentes (cadeia peptídica) que diferem em grau de reticulação, comprimento de cadeias e composição química¹⁵.

A estabilização dos biomateriais baseados em colágeno, seja por métodos químicos ou físicos, é necessária para diminuir a suscetibilidade à degradação enzimática. Somente materiais suficientemente estabilizados manterão as propriedades mecânicas requeridas durante o período de implantação desejado¹⁷. O glutaraldeído é o agente reticulante mais comum usado na estabilização de colágeno e gelatina, entretanto, é preciso que haja a eliminação completa do excesso de glutaraldeído, porque a toxidez desse reagente pode interferir nos resultados dos testes de biocompatibilidade¹⁸.

2- OBJETIVOS

A mistura de polímeros sintético e natural pode resultar em materiais que reúnem as propriedades de ambos tornando possível a sua utilização em aplicações biomédicas

O objetivo desse trabalho é fazer uma pré avaliação (triagem) da potencialidade de hidrogéis de IPNs baseadas no polímero sintético poli(vinilpirrolidona), e no polímero “natural”, gelatina, serem utilizadas como biomaterial.

A caracterização no estado desidratado visa estabelecer o comportamento de fases da mistura e a estabilidade térmica.

No estado intumescido são avaliadas propriedades importantes para aplicações biomédicas como superfície, comportamentos mecânico e de intumescimento, compatibilidade com sangue e tecidos.

3- PREPARAÇÃO DOS HIDROGÉIS

3.1- Experimental

As IPNs foram preparadas usando-se o método de mistura em solução. Uma solução aquosa 5% (m/V) de gelatina (Leiner), obtida de colágeno de couro de boi por processo de hidrólise básica (Tabela 2), e uma solução aquosa 5% de PVP (Aldrich), com massa molar de aproximadamente 360000 g/mol foram misturadas, em temperatura ambiente, em proporções adequadas para se obter as composições 30/70, 50/50 e 70/30 em porcentagem de massa dos polímeros. As misturas foram mantidas sob agitação por aproximadamente 20 horas e depois foram adicionados os agentes reticulantes de cada polímero.

Tabela 2: Especificações da gelatina tipo B usada. Dados fornecidos pelo fabricante.

n.º do lote	T118	pI	5,0
Bloom (g)	245	sulfato (ppm)	4005
viscosidade (mps)	39,1	cálcio (ppm)	1390
pH	5,71	cloreto (ppm)	290
cor	3	crômio (ppm)	0,9
claridade (NTU)	45	sódio (ppm)	1945
teor de cinza (%)	0,87	potássio (ppm)	53

Para a reticulação da gelatina foi adicionada uma solução aquosa de glutaraldeído (Sigma) de forma que a proporção de massa de reticulante por

massa de polímero fosse de 3 % e para a reticulação do PVP foi adicionado persulfato de potássio (Cinética Química) numa proporção de 100 %. Depois de feitas todas as adições a mistura foi novamente agitada para uma melhor dissolução dos reagentes e então colocadas em placas de Petri de Teflon e mantidas em forno convencional a uma temperatura de 70 ± 2 °C por 2 horas.

Depois da reticulação os filmes foram lavados com água destilada para remover os excessos de reticulantes.

A metodologia da reticulação de ambos os polímeros está bem estabelecida nas referências 11 e 18, onde foi avaliada a influência de vários fatores como temperatura, concentração, tempo e pH no grau de reticulação. As condições de preparação foram escolhidas de forma a otimizar a reação para os dois polímeros.

Também foram preparados filmes dos polímeros puros com e sem reticulação.

As amostras estudadas foram codificadas de acordo com a tabela 3.

Tabela 3: Amostras de PVP e gelatina estudadas.

CÓDIGO	AMOSTRA
GPL	Gelatina B Linear
GPR	Gelatina B Reticulada
IPN1	IPN PVP/gelatina 30/70 (% m/m)
IPN2	IPN PVP/gelatina 50/50 (% m/m)
IPN3	IPN PVP/gelatina 70/30 (% m/m)
PVPR	PVP Reticulado
PVPL	PVP Linear

3.2 -Mecanismos de reticulação

A reticulação da gelatina com glutaraldeído é um processo muito complicado, resultando na formação de uma grande variedade de possíveis entidades reticulantes (Figura 6). Envolve a reação dos grupos amina livres dos aminoácidos lisina e hidroxiprolina da cadeia do polipeptídeo com os grupos aldeído do glutaraldeído. A primeira reação que ocorre é a formação de uma base Schiff (III), imina resultante da reação de uma amina primária alifática e um grupo aldeído. Essa imina é um intermediário instável e em água pode ser hidrolisada regenerando os materiais de partida, porém nesse caso as bases Schiff são estabilizadas por reação com outras moléculas de glutaraldeído durante a formação das reticulações¹⁸.

Depois disso uma grande variedade de reações subsequentes podem estar envolvidas na reticulação do material. Basicamente pode se esperar que o intermediário III reagirá para dar IV ($n=0$). Entretanto, outras reações de III com o glutaraldeído são também possíveis; essas reações podem levar a amins secundárias ou terciárias ou a compostos piridínicos.

Em meio aquoso é possível a formação do amina cíclico XII. As reticulações podem ser formadas depois da reação de XII com glutaraldeído e água para dar XIII. O intermediário III também pode reagir com glutaraldeído de duas outras maneiras: em uma reação de condensação do tipo aldólica onde o composto V é o produto e também por reação de Mannich onde a amina VIII é formada.

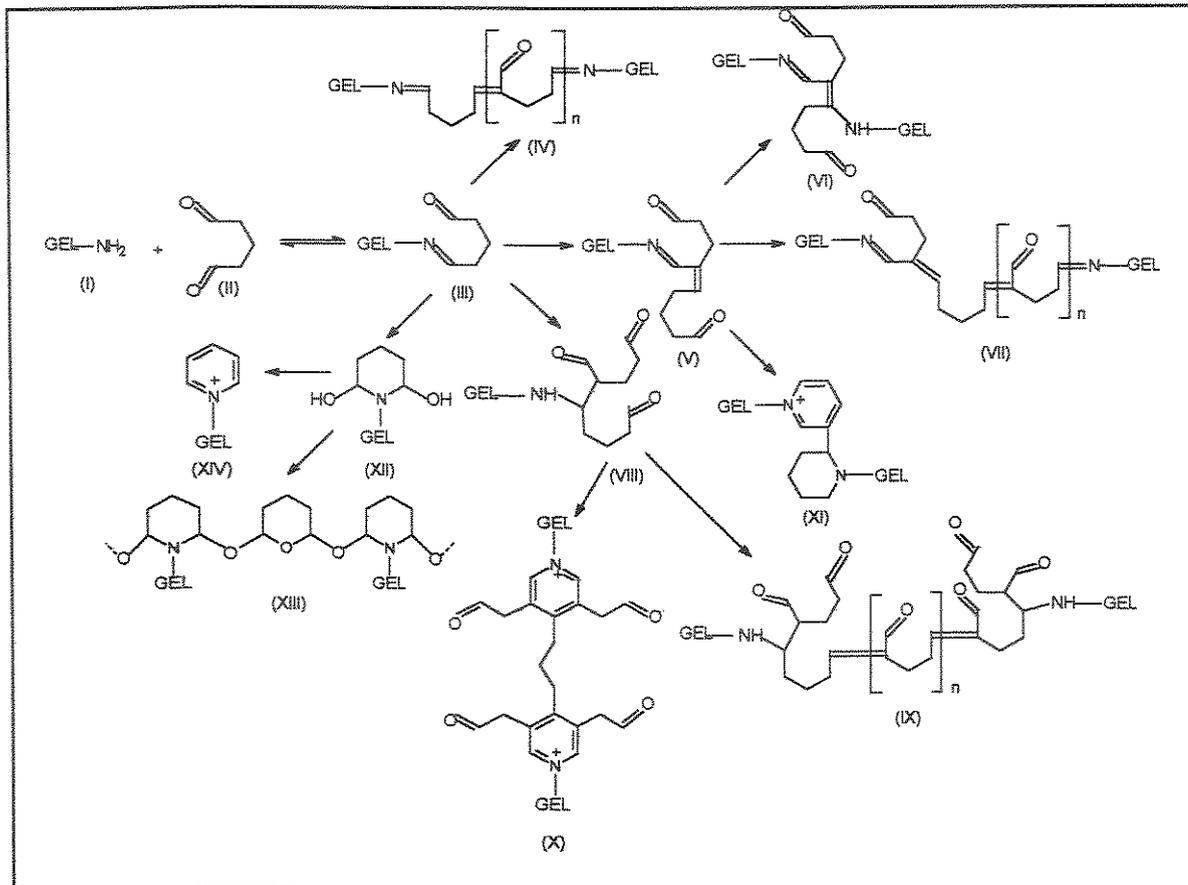


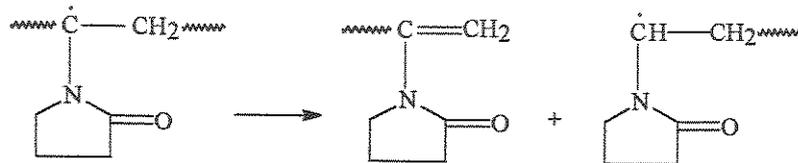
Figura 6: Esquema da reticulação da gelatina por glutaraldeído¹⁸.

O mecanismo exato de formação de ligações na reticulação do PVP com persulfato ainda não é conhecido. Presumivelmente ele envolve a abstração de um átomo de hidrogênio do anel ou grupo vinila com a subsequente formação de uma reticulação nesse sítio. A decomposição térmica do persulfato em solução aquosa primeiramente gera duas espécies, o íon radical sulfato ($\bullet\text{SO}_4^-$) e o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), que são capazes de abstrair um átomo de hidrogênio da molécula do polímero. Além da reticulação intermolecular, a cisão da cadeia e outras reações competitivas podem ocorrer¹¹.

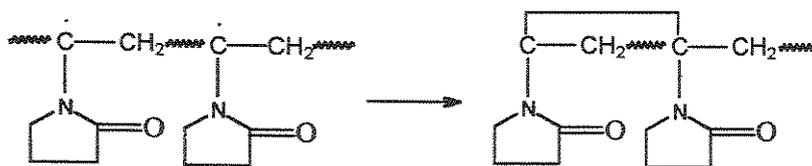
Duas importantes características dessa reticulação são as concentrações extremamente altas de persulfato (no mínimo 100 % da massa do polímero)

requeridas para formar géis de força considerável e a forte dependência do módulo de cisalhamento (G' max) com a temperatura da reação. Ambas sugerem que outras reações além da reticulação intermolecular estão competindo pelo persulfato.

Na reação de reticulação o macroradical formado se aproxima de outro macroradical por difusão molecular ou segmentar e forma uma ligação covalente estável. O macroradical também pode se rearranjar para um estado mais estável por cisão de cadeia, via desproporcionação, na vizinhança do elétron desemparelhado:

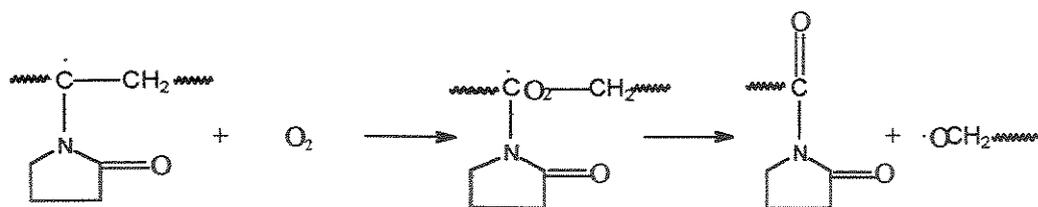


Reticulação intramolecular também pode ocorrer através de formação de anel:



Um microgel resulta quando o radical sofre reticulação intramolecular. Ambos, a cisão de cadeia e a reticulação intramolecular diminuem o volume hidrodinâmico da molécula do polímero.

Na presença de oxigênio, os macroradicaís podem decair por degradação oxidativa, que ocorre principalmente durante o estágio inicial da reação, quando algum oxigênio dissolvido pode estar presente na solução.



Outras reações competitivas de relativa importância incluem: polimerização de monômero residual, desativação de macrorradicais por reação com radical sulfato, desativação de dois radicais hidroxila por formação de água e oxigênio.

O pH não afeta a reticulação, embora em meios fortemente ácidos ou básicos possa ocorrer abertura do anel da pirrolidona formando unidades na forma de aminoácidos¹¹.

3.3- Considerações sobre a formação das redes

O método utilizado nesse trabalho para a obtenção de IPNs é pouco usado, envolvendo a mistura de polímeros e a reticulação dos mesmos em solução^{19,20}. Métodos convencionais de obtenção de IPNs partem de misturas onde pelo menos um dos componentes encontra-se na forma monomérica ou oligomérica

Em sistemas onde ocorre a formação de radicais livres há a possibilidade de reações entre os diferentes polímeros. Em IPNs estas reações são indesejadas, mas inevitáveis, podendo ser minimizadas pela escolha apropriada dos polímeros.

No caso das IPNs foi constatado experimentalmente que nas condições utilizadas na preparação do material (tempo, temperatura, porcentagem de

reticulante), o glutaraldeído, reticulante da gelatina, não reticula o PVP e o persulfato, reticulante do PVP, não reticula a gelatina. Ou seja, os reticulantes não contribuem para a formação de ligações cruzadas no outro polímero presente na mistura.

Tem sido relatado na literatura a enxertia de macromoléculas lineares sintéticas em superfícies de gelatina reticulada, usando-se persulfato como iniciador^{21,22}. Os polímeros enxertados são formados a partir de monômeros, mas no caso do sistema estudado nesse trabalho é possível que segmentos de PVP linear possam ter se ligado por enxertia à gelatina reticulada.

Um estudo cinético e uma análise aprofundada por espectroscopia poderiam elucidar se realmente houve formação de estrutura diferente da esperada; este porém não foi o objetivo deste trabalho.

4- CARACTERIZAÇÃO NA FORMA DE XEROGEL

A estabilidade térmica e o comportamento de fases das IPNs foram avaliados no estado desidratado (xerogel) através das técnicas de análise termogravimétrica (TGA), calorimetria diferencial de varredura (DSC) e análise dinâmico-mecânica (DMA).

4.1 –Análise termogravimétrica (TGA)

Análise termogravimétrica é uma técnica na qual a variação de massa de uma amostra é medida continuamente enquanto sua temperatura é aumentada dinamicamente a uma taxa constante; essa variação de massa também pode ser medida como uma função do tempo enquanto a amostra é mantida a uma mesma temperatura. O principal uso do TGA aplicado a polímeros tem sido em estudos de decomposição e estabilidade térmica²³.

Um analisador termogravimétrico é constituído por uma balança que monitora a variação de massa, enquanto a amostra é aquecida ou mantida a uma temperatura constante.

Em curvas termogravimétricas em que os fenômenos ocorrem muito próximos uns dos outros, pode-se assinalar mais facilmente as temperaturas apropriadas usando-se a curva diferencial dm/dT versus temperatura.

Experimental

Para todas as análises foi utilizado o programa de aquecimento a 10 °C/min numa faixa de temperatura de 25 a 1000 °C sob fluxo de argônio.

Resultados

A análise termogravimétrica foi realizada com o intuito de avaliar a estabilidade térmica da gelatina, do PVP e das IPNs em atmosfera inerte.

Foi feita uma pré-análise das curvas termogravimétricas apenas para verificar quais as temperaturas iniciais dos processos de decomposição e a possibilidade destes processos estarem interferindo nas técnicas utilizadas para estudo da miscibilidade (DSC e DMA). Na tabela 4 são apresentadas as faixas de temperatura onde ocorrem os principais processos de degradação, assim como o teor de massa perdida em cada um deles. As curvas termogravimétricas são apresentadas no anexo I.

Tabela 4: Dados da análise termogravimétrica. T_i : temperatura inicial e T_f : temperatura final do processo.

Amostra	Processos Degradativos	T_i (°C)	T_f (°C)	Perda de Massa (%)
PVPL	1°	415	459	92
PVPR	1°	209	271	10
	2°	405	451	40
	3°	806	858	21
GPL	1°	280	363	66
	2°	560	796	32
GPR	1°	279	378	65
	2°	570	572	3
IPN1	1°	265	470	63
	2°	774	887	18
IPN2	1°	355	459	61
	2°	780	863	20
IPN3	1°	372	456	56
	2°	801	847	23

Todas as amostras estudadas, com exceção da polivinilpirrolidona reticulada, PVPR, apresentam estabilidade térmica em atmosfera inerte até pelo menos 250 °C.

4.2 – Avaliação da miscibilidade de misturas poliméricas

A miscibilidade em misturas poliméricas é um fator decisivo em suas propriedades. Misturas miscíveis apresentam, normalmente, propriedades intermediárias às dos componentes puros. Em misturas imiscíveis, a morfologia do material é altamente dependente do modo de obtenção e da extensão da separação de fases, e determina as propriedades óticas, mecânicas, de permeação, etc.

A miscibilidade de misturas poliméricas pode ser detectada experimentalmente por diversas técnicas, entre as quais a espectroscopia nas regiões ultravioleta e infravermelho, a ressonância magnética nuclear, a microscopia eletrônica de transmissão ou varredura, técnicas que levam em conta propriedades óticas e análise térmica.

As técnicas de análise térmica mais utilizadas para a obtenção de informações sobre miscibilidade são Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Análise Dinâmico Mecânica (DMA) e Análise Termo Mecânica (TMA). Em todas elas a miscibilidade é estudada pelo comportamento da temperatura de transição vítrea (T_g), que é a temperatura na qual o material passa do estado vítreo para o elastomérico ou vice-versa. Misturas miscíveis apresentam uma única transição vítrea ocorrendo em temperatura intermediária às dos componentes puros, enquanto que misturas imiscíveis e parcialmente miscíveis apresentam duas ou mais transições.

4.2.1-Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Essa técnica se baseia na detecção de mudanças na entalpia ou calor específico da amostra com a temperatura. Os experimentos proporcionam informações qualitativas e quantitativas sobre as mudanças químicas e físicas que envolvem processos endotérmicos e exotérmicos ou mudanças na capacidade calorífica. No DSC que funciona sob o princípio de fluxo de calor (figura 7), a amostra e a referência inerte, normalmente uma panela vazia, são aquecidas segundo um programa predeterminado. O que é registrado é a diferença de temperatura entre a amostra e a referência. Essa diferença é convertida em calor através da calibração do equipamento com uma substância padrão, normalmente o índio²³.

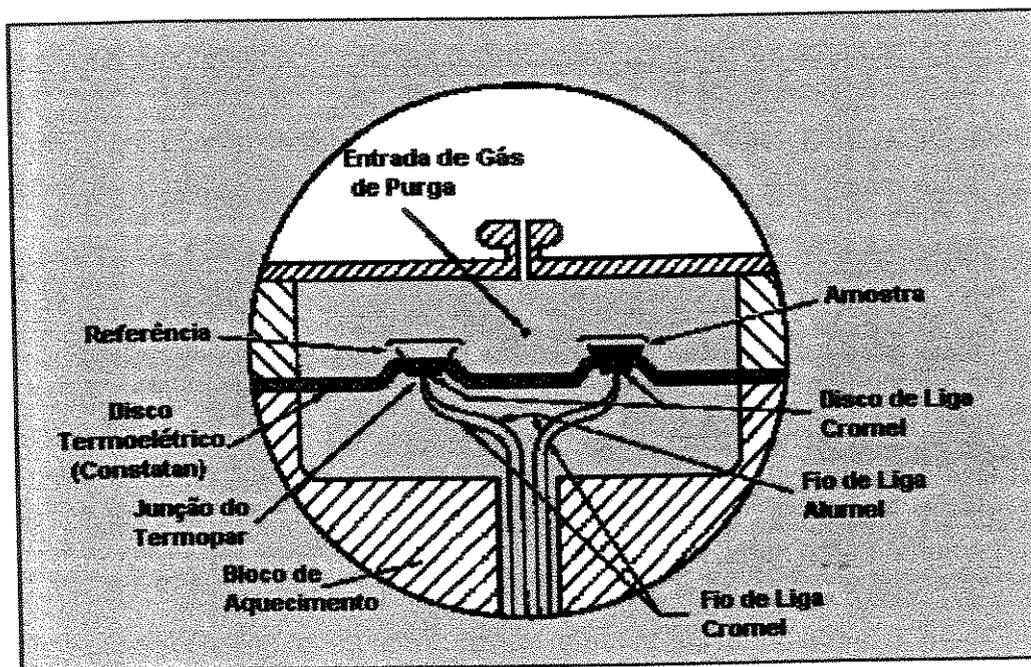


Figura 7 : Representação esquemática do DSC com princípio de fluxo de calor.

A técnica de DSC modulado (MDSC) permite a obtenção das mesmas informações dadas pelo sinal de fluxo total de calor (diferença entre uma amostra e uma referência inerte), mais sinais adicionais que possibilitam a melhor compreensão das transições observadas. Enquanto no DSC convencional a temperatura da amostra é variada segundo uma taxa linear, no MDSC a temperatura é variada de uma maneira linear e senoidal ao mesmo tempo (figura 8), usando-se uma taxa de aquecimento linear ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$), uma amplitude de oscilação de temperatura ($\pm ^{\circ}\text{C}$) e o período de oscilação de temperatura (s). No DSC convencional mede-se somente a soma de todas as transições térmicas na amostra, enquanto que no MDSC o fluxo de calor modulado, soma de todos os eventos térmicos, pode ser decomposto, usando-se a transformada de Fourier, em fluxo de calor reversível e fluxo de calor não reversível. Além disso é possível determinar a capacidade calorífica (C_p) em função da temperatura diretamente²⁴.

O fluxo reversível de calor é calculado da componente da capacidade calorífica do fluxo de calor modulado. As transições vistas nesse sinal são normalmente termodinamicamente reversíveis na temperatura na qual elas são detectadas, como a transição vítrea.

O fluxo total de calor é o mesmo do DSC tradicional e é definido como a média da corrida do sinal de fluxo de calor modulado.

O fluxo de calor não reversível é calculado subtraindo-se o fluxo de calor reversível do fluxo de calor total. Transições vistas nesse sinal são normalmente termodinamicamente não reversíveis na temperatura na qual elas aparecem, por exemplo: relaxação molecular, cristalização por resfriamento, evaporação, cura de termofixos, decomposição.

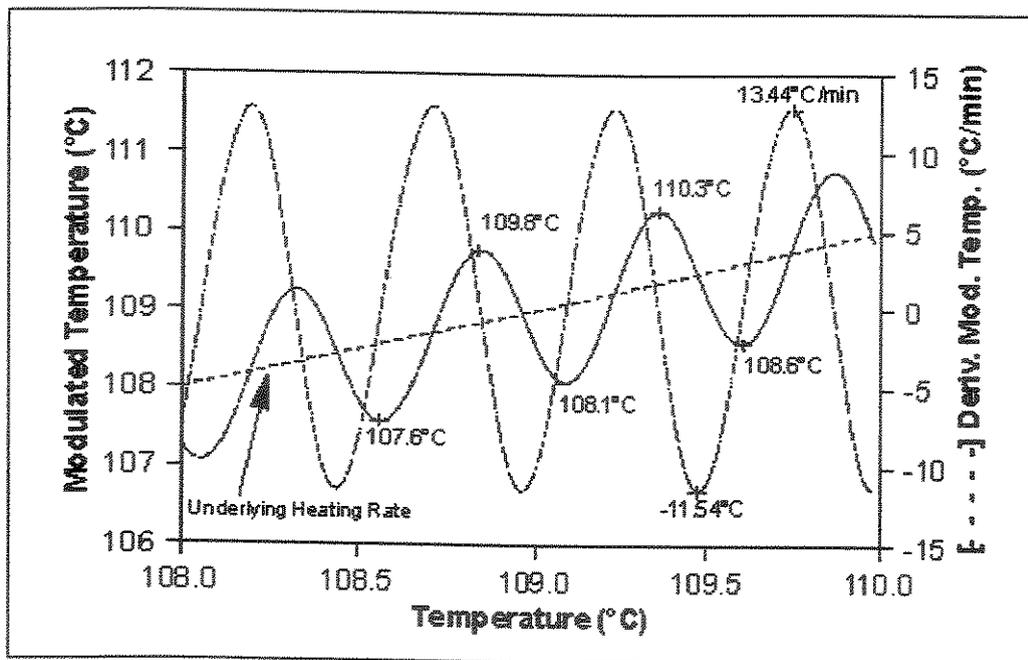


Figura 8: Perfil de aquecimento do MDSC.

As vantagens da técnica em relação ao DSC tradicional são²⁴:

- maior sensibilidade nos sinais de capacidade calorífica e fluxo de calor reversíveis porque a linha base do instrumento não afeta esses sinais, tornando possível a detecção de transições fracas.
- alta sensibilidade e alta resolução no mesmo experimento: alta sensibilidade obtida do largo sinal de fluxo de calor que é criado por uma alta taxa de aquecimento instantânea e alta resolução obtida de uma baixa taxa de aquecimento média. No DSC convencional transições com menos de 20 °C de diferença não podem ser resolvidas, com a modulação essas transições podem ser detectadas.
- auxilia a interpretação de transições complexas: o sinal do fluxo de calor total visto nos experimentos de DSC tradicional podem ser separados em seus componentes reversíveis (capacidade calorífica) e não reversíveis (cinética).

Experimental

Para se avaliar a miscibilidade das IPNs utilizou-se a técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura na versão modulada (MDSC).

Os experimentos foram conduzidos no DSC 2910, TA Instruments usando-se o seguinte programa de análise:

1. Temperatura inicial de $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$.
2. Modulação a uma frequência de oscilação de $\pm 1\text{ }(^{\circ}\text{C})$ num período de 60 segundos.
3. Isoterma por 10 minutos.
4. Rampa de aquecimento de $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por minuto até $250\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Resultados

Na figura 9 são apresentadas as curvas típicas de fluxo de calor total, fluxo de calor reversível e fluxo de calor irreversível para a gelatina reticulada. A curva de fluxo de calor total corresponde a curva de DSC que se obtém em experimentos convencionais. Observa-se nesta curva que a gelatina apresenta relaxações nas faixas de temperaturas de -20 a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, que se manifestam como processos endotérmicos, e uma acentuada variação da capacidade calorífica para temperaturas superiores a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, que é responsável pelo “declínio” pronunciado da curva de DSC.

Decompondo-se o fluxo de calor total, observamos que o evento endotérmico entre -20 e $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, bem como a queda acentuada da linha base a temperaturas acima de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ são relativas a processos irreversíveis; esses processos são provavelmente relacionados a relaxações das macromoléculas em presença de água (efeito da plastificação). Na curva de fluxo reversível observa-se com nitidez a transição vítrea para a gelatina

em aproximadamente 200 °C. Além disso há uma melhor definição da linha base.

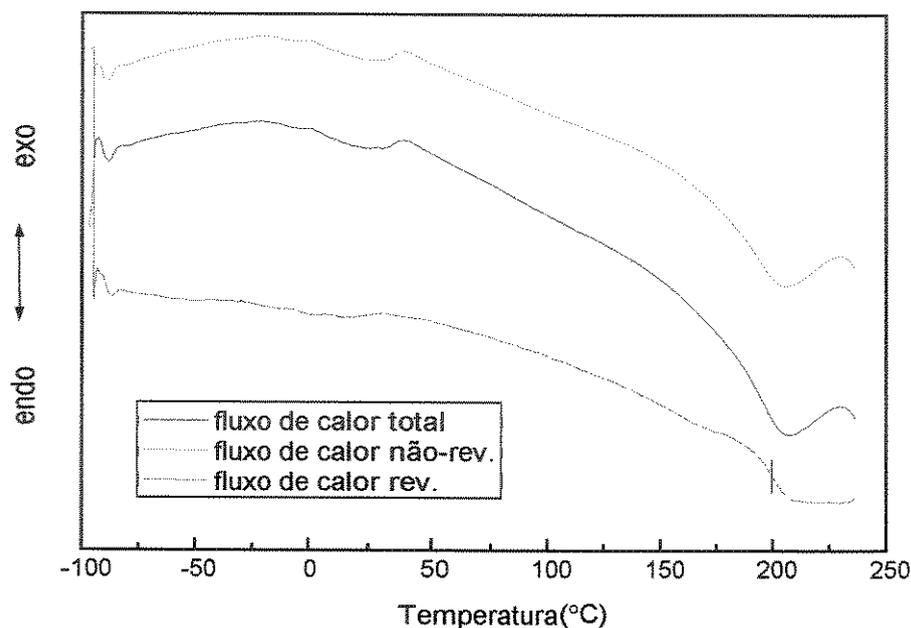


Figura 9 : Curvas de DSC da gelatina reticulada.

O endoterma que aparece junto com a transição vítrea e que é separado da mesma na curva de fluxo de calor irreversível (figura 9), pode ser associado à relaxação entálpica decorrente da história térmica do material ou, mais provavelmente, à desnaturação de domínios ainda ordenados da estrutura da gelatina. Embora a gelatina seja a forma amorfa ou semicristalina (baixo grau de cristalinidade) do colágeno, pode, por resfriamento, retomar a estrutura terciária do colágeno com as moléculas organizadas na forma de hélice²⁵⁻²⁷.

É importante ressaltar que as transições observadas nos ensaios de MDSC não estão relacionadas à degradação da gelatina (tabela 4).

Das curvas de DSC são tiradas informações sobre a temperatura de transição vítrea e sobre a largura da transição (tabela 5). A largura da transição é definida como a diferença entre a temperatura final e a temperatura inicial da transição, expressa em ° C. A temperatura de transição vítrea é assumida como sendo a temperatura correspondente à meia altura da transição.

Tabela 5: Temperaturas de transição vítrea observadas nas curvas de DSC. ΔW é a largura da transição.

AMOSTRA	TG* (° C)	ΔW (° C)
GPL	194	30
GPR	199	30
IPN1	165	30
IPN2	159	40
IPN3	154	65
PVPR	130	95
PVPL	177	10

*meia altura

Os valores de Tg para os polímeros de partida e para as IPNs foram obtidos das curvas de fluxo de calor reversível e portanto serão apresentadas apenas estas curvas (figura 10).

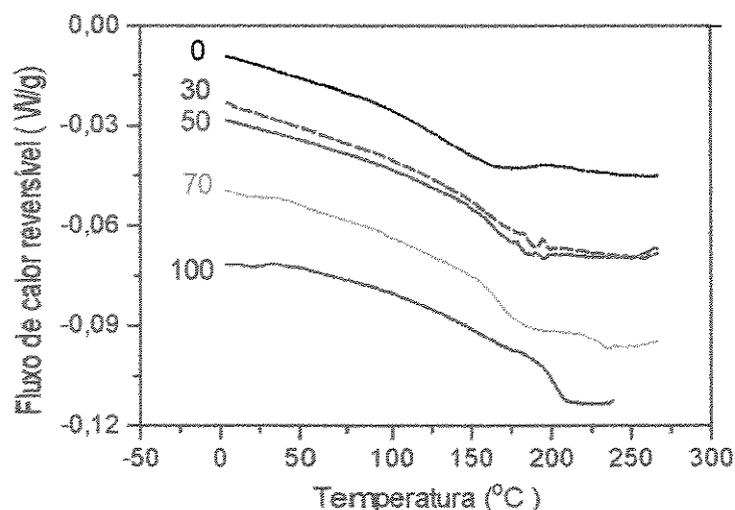


Figura 10: Curvas de fluxo de calor reversível obtidas com o MDSC em função da temperatura para as IPNs de PVP-gelatina. A porcentagem em massa de gelatina nas misturas está indicada nas curvas.

As curvas de todas as IPNs apresentam uma única transição vítrea, em temperatura intermediária às transições da gelatina reticulada e do PVP reticulado, indicando uma provável miscibilidade desse sistema, que é atribuída às fortes interações por pontes de hidrogênio entre os grupos amida e principalmente carbonila do PVP e as aminas da gelatina (figura 11). Também para as IPNs as transições observadas nas curvas de MDSC não estão relacionadas à degradação dos materiais (tabela 4).

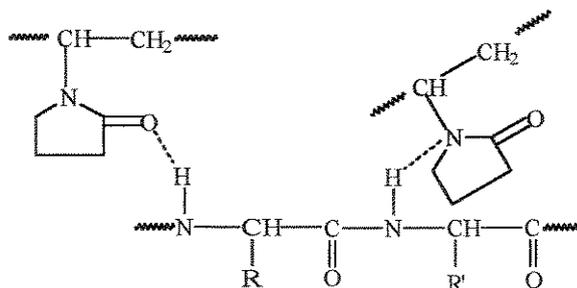


Figura 11: Interações entre PVP e gelatina.

Para todas as amostras pode se observar que a capacidade calorífica (C_p) varia muito durante a varredura de temperatura e só se estabiliza depois que as amostras sofrem transição vítrea.

Esta variação de capacidade calorífica está associada aos processos de relaxação que as macromoléculas podem sofrer. Para polímeros hidrofílicos, a forte dependência de C_p com a temperatura muitas vezes está relacionada com a presença de água, que plastifica o material, ou seja, diminui a energia de ativação para as relaxações, que se manifestam a temperaturas mais baixas.

A largura da transição, por sua vez, reflete o número de processos de relaxação responsáveis pela transição: quanto mais larga a transição, maior o número de processos de relaxação. Assim, homopolímeros amorfos costumam apresentar transições vítreas com largura até 10 °C, copolímeros aleatórios entre 10 e 30 °C e blendas e IPNs podem apresentar transições com largura de até 100 °C ou mais²⁸.

A analogia mais simples para se entender e explicar a largura e, portanto, o número de processos de relaxação é imaginar um material com um gradiente de concentração, cada qual apresentando relaxações próprias e que até se sobrepõem. Este tipo de situação tem sido denominada como micro heterogeneidade, que define a situação em que a heterogeneidade ocorre em segmentos de cadeia: um segmento de uma cadeia polimérica pode se encontrar em um ambiente mais rico em um componente e outro segmento da mesma cadeia pode estar em um ambiente químico diferente.

Na tabela 5 observamos que a gelatina reticulada apresenta Δw de 30 °C e o PVPR 95 °C. Isto indica que o PVPR apresenta um número maior de relaxações contribuindo para a transição vítrea, o que pode estar refletindo a complexidade da reação de reticulação do PVP com persulfato, que origina uma infinidade de estruturas químicas distintas. Também é preciso

considerar a alta higroscopicidade do PVPR que pode resultar na plastificação do polímero, abaixando a T_g e alargando a transição. Para as IPNs observa-se o aumento da largura da transição à medida que aumenta o teor de PVP na mistura.

4.2.2- Análise dinâmico mecânica

A análise dinâmico mecânica (DMA) é uma técnica poderosa para se estudar o comportamento viscoelástico de sistemas poliméricos e os processos que envolvem essa propriedade, como as relaxações, reações e a miscibilidade. As propriedades dinâmico-mecânicas de materiais são definidas submetendo-se o material a uma deformação ou a uma tensão oscilatória. Se o comportamento viscoelástico for linear, o material responderá à deformação com uma tensão também senoidal, porém defasada de um ângulo θ em relação à deformação aplicada devido à dissipação de energia^{23,29}.

Pelo DMA pode-se medir o módulo de armazenamento (E') e de perda de energia (E'') e o fator de perda, $\tan \delta$, que é a razão entre os módulos (E''/E'). O módulo de armazenamento é uma medida da energia mecânica que é armazenada pela amostra na forma de energia elástica. O módulo de perda quantifica a energia mecânica que é convertida em calor através de diferentes processos de relaxação que o material pode sofrer²³. Pode-se medir E' , E'' e $\tan \delta$ em função da temperatura, da frequência e do tempo.

Na figura 12 está esquematizada uma curva típica do módulo de armazenamento para um polímero, identificando as regiões com diferentes comportamentos. A região viscoelástica da curva corresponde à região de transição vítrea, a qual se manifesta nas curvas de módulo de perda e fator

de perda como um máximo e na curva de módulo de armazenamento como uma queda brusca (figura 13).

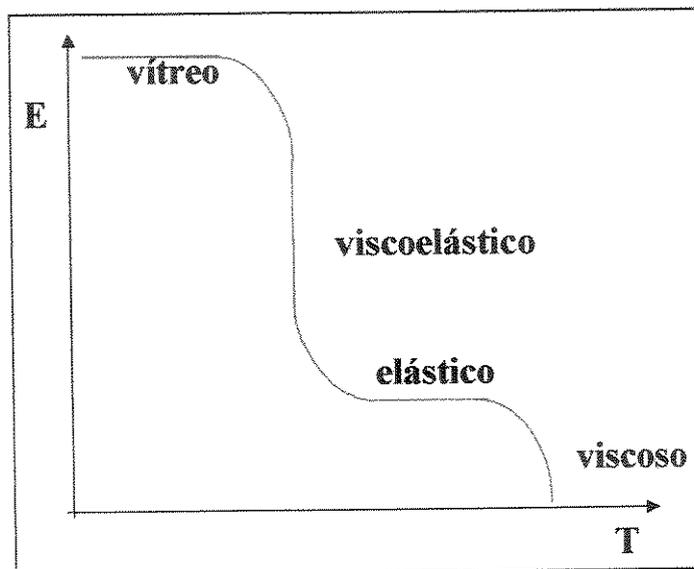


Figura 12: Dependência do módulo com a temperatura.

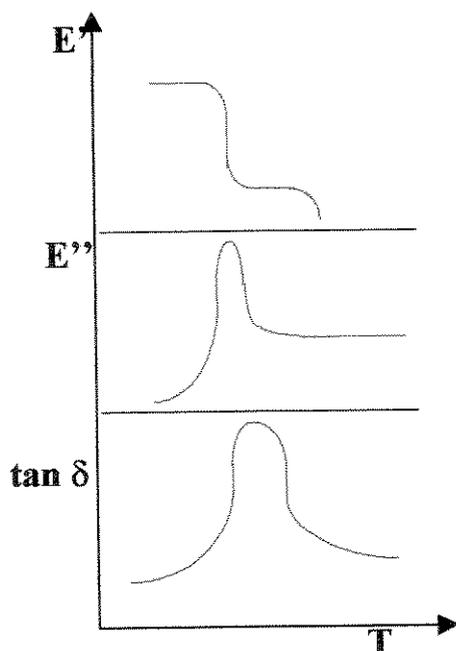


Figura 13: Perfil das curvas obtidas numa medida de DMA em função da temperatura.

Experimental

Para estudar o comportamento viscoelástico e as relaxações secundárias foram realizados experimentos de análise dinâmico mecânica utilizando o aparelho de DMA TA Instruments, modelo 983. Os experimentos foram conduzidos no modo de frequência fixa de 1Hz.

Para todas amostras foi usado um programa com os seguintes segmentos:

1. Temperatura inicial: 80 °C.
2. Isotherma (até que o valor do módulo ficasse constante (de 30 a 60 minutos)).
3. Incremento de 3 °C e equilíbrio da temperatura.
4. Medição na frequência de 1 Hz e amplitude de 0,2 mm.
5. Repetição do segmento 3 até 265 °C.

Resultados

A figura 14 mostra as curvas de módulo de armazenamento obtidas para os IPNs com diferentes composições na faixa de temperatura de 80 a 265° C. A queda do valor do módulo está associada com a transição vítrea. Observa-se que o aumento da concentração de gelatina causa o diminuição no módulo de armazenamento na região elástica ($T > T_g$). Isto implica que o PVP é o componente mais rígido da mistura. Na figura 15 são mostradas as curvas do módulo de perda para os IPNs com diferentes composições.

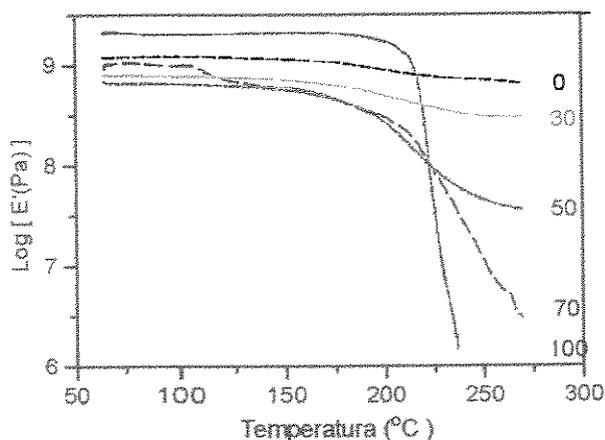


Figura 14: Módulo de armazenamento em função da temperatura para os IPNs de PVP-gelatina. Os números nas curvas indicam a porcentagem de gelatina na mistura.

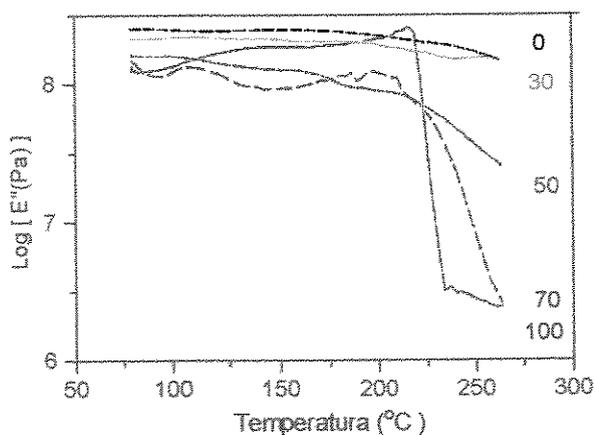


Figura 15: Módulo de perda em função da temperatura para os IPNs de PVP-gelatina. Os números nas curvas indicam a porcentagem de gelatina na mistura.

Em aproximadamente 226 °C observa-se uma relaxação muito intensa, evidenciada pela queda no módulo de armazenamento (figura 14) e pelo pico na curva do módulo de perda (figura 15) para a gelatina. Essa relaxação é atribuída à transição vítrea da gelatina reticulada e seca. Porém,

como já foi observado nos dados de DSC, na mesma faixa de temperatura da transição vítrea ocorre a desnaturação da proteína (perda da ordem estrutural); logo em seguida o material pode sofrer reticulação e começa a decompor. Todas essas mudanças afetam singularmente o módulo.

Para o PVP reticulado (PVPR), a dependência do módulo de armazenamento com a temperatura é bem menos acentuada do que para a gelatina reticulada, evidenciando uma maior densidade de reticulação para o primeiro caso.

Com relação às IPNs a queda do módulo de armazenamento na região de transição vítrea aumenta com o aumento do teor de gelatina, indicando uma diminuição da resistência mecânica do material seco a temperaturas maiores que a T_g , refletindo provavelmente na diminuição na densidade de reticulação global.

Nas curvas de módulo de perda, além da transição vítrea podem ser observadas relaxações secundárias do sistema (curvas em escala expandida são apresentadas no anexo II). A transição vítrea, também chamada de transição α , está relacionada com o movimento das cadeias em nível macroscópico. As relaxações secundárias chamadas de β , γ e δ ocorrem em temperaturas mais baixas que a T_g e estão relacionadas com movimentos localizados da cadeia principal ou de grupos laterais^{29,30}.

Em misturas homogêneas, o pico que ocorre a temperaturas mais altas está relacionado à transição vítrea, sendo que as relaxações que aparecem em temperaturas menores são as secundárias. Em misturas heterogêneas, o método utilizado para distinguir transições vítreas de relaxações secundárias é avaliando-se tanto as curvas de $E' \times T$ quanto as de $E'' \times T$: transições secundárias, por serem pontuais, não alteram significativamente o módulo de armazenamento, enquanto que a transição vítrea provoca uma queda acentuada no valor do módulo.

Assim, por exemplo, para a amostra IPN1 é possível observar dois picos com máximo aparecendo em aproximadamente 120 °C e 200 °C. Estes dois picos estão associados à transição vítrea, porque as curvas de módulo de armazenamento apresentam quedas nestas temperaturas. Na curva de módulo de armazenamento a transição a temperatura mais alta é larga, e a temperatura correspondente obtida a meia altura é de 237 °C. Esta transição está relacionada ao pico largo com máximo a 200 °C na curva de módulo de perda; esse pico aparece junto a um ombro (aproximadamente 230 °C) indicando a complexidade das relaxações nessa região. Aparentemente na IPN1 coexistem 3 fases, as quais estão associadas Tgs de 120 °C (fase rica em PVP), 200 °C (fase rica em gelatina) e 230 °C (gelatina e PVP).

Já para as as IPNs contendo 30 e 50 % de gelatina, os resultados mostram que são homogêneas, pois apresentam uma única transição vítrea.

Na tabela 6 são apresentados os valores de Tg, obtidos das curvas de módulo de armazenamento, assumindo como sendo igual à temperatura correspondente à meia altura da queda do módulo. O mais correto teria sido relacionar a temperatura correspondente ao máximo dos picos da curva de E'' x T com a Tg. No entanto as curvas de E' x T foram escolhidas para este propósito, porque a definição de alguns picos nas curvas de E'' x T é ruim, dificultando a determinação.

Em IPNs é comum que ao se formar a rede, um dos componentes seja expulso devido à força elástica da mesma. Assim, misturas miscíveis podem se apresentar homogêneas quando houver grande diferença entre a densidade de reticulação dos dois componentes. Isto poderia ser uma explicação para o comportamento da IPN1.

4.2.3 – Relação entre resultados obtidos por DSC e DMA - O efeito da água.

Os valores de Tg medidos em experimentos de DSC são acentuadamente mais baixos do que os medidas em experimentos de DMA (tabela 6). Embora as condições experimentais utilizadas para determinar as temperaturas de transição vítrea sejam diferentes para cada técnicas, este fato pode ser responsável apenas em parte pelas diferenças observadas nos valores de Tg. Uma outra, e mais provável explicação, é a presença de água nas amostras usadas para a realização de ensaios de DSC.

Tabela 6: Dependência da Tg na composição dos IPNs de PVP-gelatina.

AMOSTRA	TG (MDSC) * (°C)	TG (DMA) ** (°C)
GBR	199	226
IPN1	165	120, 237
IPN2	159	221
IPN3	154	209
PVPR	130	203

* meia altura, ** curvas de E' x T (meia altura)

Como a miscibilidade das IPNs está sendo avaliada justamente pelo comportamento da transição vítrea, cuidados experimentais devem ser tomados para a realização dos experimentos. Em princípio, os ensaios realizados por MDSC possibilitam que eventos irreversíveis, como a evaporação da água durante o experimento sejam separados de eventos reversíveis como a transição vítrea. Entretanto, a velocidade de evaporação

da água pode ser um fator limitante e a transição observada pode ser a de um material ainda hidratado.

Na literatura^{15,27} são encontrados diferentes valores para a temperatura de transição vítrea da gelatina. Valores de Tg obtidos pelas mesmas técnicas variam em até mais de 100 °C e sem dúvida a falta de concordância pode ser parcialmente atribuída às diferentes quantidades de água incorporada nas amostras.

A água tem um forte efeito plastificante na gelatina. Os filmes secos de gelatina se equilibram muito rapidamente com a água presente na atmosfera, e é bem conhecido que a quantidade de água absorvida pelo filme de gelatina depende da umidade relativa. Em experimentos onde a miscibilidade é avaliada através da Tg, a presença de água tem uma grande influência, já que na presença de diluentes plastificantes a transição vítrea do material é deslocada para temperaturas mais baixas^{7, 26, 31}.

Nos ensaios de DMA pode-se observar que as propriedades mecânicas do sistema em estudo são significativamente afetadas pela presença água. Na figura 16 são mostradas as curvas de módulo de armazenamento e perda, e fator de perda em função da temperatura para a IPN2, onde é possível observar o efeito da água. As curvas obtidas apresentam comportamento típico de um material que enrijece durante o aquecimento, como resinas que curam a altas temperaturas ou que perdem o solvente, plastificante, como é o caso.

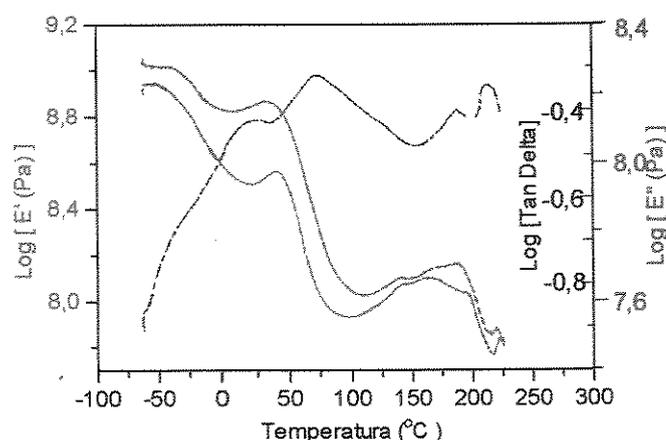


Figura 16: Curvas de DMA para a amostra IPN2 contendo água.

A curva de módulo de armazenamento mostra uma queda acentuada na faixa de temperatura de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a temperatura ambiente, seguida de um ligeiro aumento e uma nova queda até temperaturas em torno de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nas curvas DSC de fluxo de calor irreversível também é observada uma transição em $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, que foi atribuída a relaxações devido a presença de água, aqui o mesmo processo pode ser observado.

Acima de $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, o valor do módulo aumenta ligeiramente até chegar a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ onde o material sofre transição vítrea. O aumento do módulo implica que o material está perdendo a capacidade de dissipar energia mecânica, ou seja, as cadeias estão perdendo a flexibilidade. A perda de flexibilidade com o aumento da temperatura é o resultado da volatilização da água. As variações no módulo de perda e de $\tan \delta$ mostram as relaxações tanto de processos correspondentes ao aumento da flexibilidade das cadeias, como de processos correspondentes ao enrijecimento das mesmas, ambos decorrentes do aquecimento das amostras. Estes processos, enrijecimento e flexibilidade, ocorrem simultaneamente, de forma que as curvas de DMA refletem a combinação deles, sendo a sua interpretação complexa.

Na figura 17 é ilustrado o comportamento do módulo para o PVP durante a secagem isotérmica a 80 °C. Observa-se o aumento do módulo de armazenamento com o tempo devido à evaporação da água. Este resultado mostra claramente a influência da água no comportamento mecânico do material. As demais amostras apresentaram curvas com o mesmo perfil.

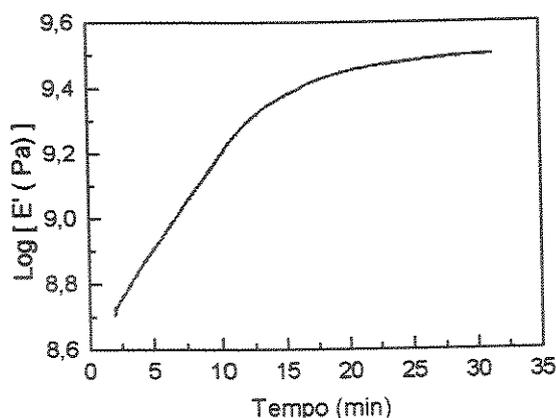


Figura 17: Comportamento de E' com o tempo a 80 °C para o PVP reticulado.

Além da alteração do comportamento dinâmico-mecânico, a presença de água dificulta muito a medição provocando a quebra das amostras em ensaios de DMA, quando essas começam a oscilar em baixas temperaturas. Provavelmente a expansão da água quando congelada cria pontos de tensão no polímero tornando-o frágil. A única forma de medir foi evitar o resfriamento da amostra e portanto o contato com umidade. Todas as amostras são altamente higroscópicas e o processo de sorção de água parece ser muito rápido.

É interessante observar que para a IPN1 foi observada somente uma transição vítrea por DSC, enquanto que por DMA constatou-se duas transições. A presença da água mascara a transição a temperaturas mais baixas, pois deve haver uma diminuição na T_g , como também um

alargamento da transição devido à plastificação, além de outras relaxações e à própria volatilização da água.

O comportamento da Tg com a variação da composição dos IPNs é bem diferente quando se compara os valores obtidos pelas duas técnicas. Na figura 18 é apresentado o comportamento da Tg em função da quantidade de gelatina na mistura. A linha teórica, calculada como sendo a média ponderada das Tgs dos polímeros constituintes da mistura (aditividade de volume), é a forma mais simples de modelar o comportamento térmico de misturas poliméricas miscíveis. Equações de Fox e Gordon-Taylor também são normalmente usadas como modelos, e a equação de Kwei é proposta para sistemas onde ligações tipo ponte de hidrogênio contribuem para aumentar a miscibilidade entre as macromoléculas³². Apenas para ilustrar o comportamento em relação ao modelo teórico, foi escolhida a transição vítrea ocorrendo a 237 °C no DMA, supostamente relativa à fase PVP/gelatina.

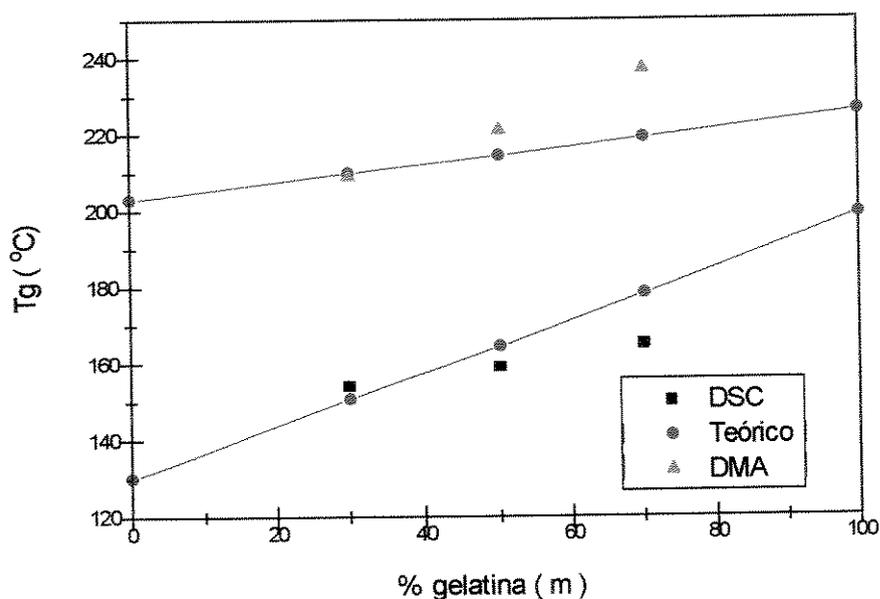


Figura 18: Comparação dos valores de Tg calculados (teóricos) e observados para IPNs de PVP-gelatina em diferentes composições.

Os dados de DSC diferem pouco do comportamento teórico, porém com tendência a apresentar um desvio negativo em relação à linearidade. Os dados de DMA apresentam um comportamento inverso: desvio positivo.

Uma possível explicação seria que nos experimentos de DMA os materiais estariam todos “não plastificados” sendo possível observar o efeito real das interações entre os dois polímeros que seriam fortes o suficiente para requerer maior energia para a relaxação das cadeias. No DSC a presença de água impede que essas interações sejam tão fortes resultando em um abaixamento da Tg.

O formato sigmoidal da curva de Tg x composição já foi relatado na literatura para outros sistemas contendo PVP onde há a formação de ligações específicas do tipo ponte de hidrogênio^{32, 33}. Também já foi observado para o sistema miscível PVP-Poli(vinilformal), a mesma tendência aqui mostrada: os desvios em relação à linearidade são menores quando a concentração de PVP na mistura é maior³².

5- CARACTERIZAÇÃO NA FORMA DE HIDROGEL

O estado hidratado (hidrogel) seria a forma em que as IPNs poderiam apresentar potencialidade como biomaterial. Aqui são apresentados alguns ensaios relacionados a propriedades físico-químicas (intumescimento, superfície) e mecânicas (compressão) importantes para esse tipo de aplicação.

5.1- Ensaio de intumescimento

Experimental

O grau de intumescimento no equilíbrio foi determinado usando a técnica de dessorção, conduzida no equipamento de TGA Hi-Res 2950-TA Instruments. Foram cortados pedaços dos hidrogéis intumescidos em água destilada, equilibrados a temperatura ambiente (21 ± 3 °C), por 48 horas. As massas iniciais eram de aproximadamente 25 mg.

Programa utilizado:

- Taxa de aquecimento: 20 °C/min até 100 °C.
- Isotherma a 100 °C até massa constante.

A característica mais importante de um hidrogel é a quantidade de água que ele é capaz de absorver, definida como o teor de água em equilíbrio (EWC - equilibrium water content) ou como grau de intumescimento^{34,35}.

$$EWC = [(W_i - W_s) / W_i] \times 100$$

$$\text{Grau de intumescimento} = (W_i - W_s) / W_s$$

onde: W_i é a massa do gel intumescido e W_s é a massa do gel seco.

Os valores de W_i e W_s são obtidos das curvas termogravimétricas, onde a diferença entre a massa inicial e a massa a 100 °C corresponde ao teor de água.

Vários fatores são responsáveis pela capacidade de intumescimento de um hidrogel. Quando o polímero desidratado é colocado na água, uma força osmótica causa a entrada da água na estrutura do hidrogel. Fortes interações entre grupos funcionais polares dos polímeros e a água aumentam a força diretora de intumescimento. Com a entrada de água, as cadeias do polímero são expandidas passando de uma configuração aleatória para uma configuração ordenada. Essa expansão não é entropicamente favorável, então uma força resistente se opõem. Quando a força osmótica é balanceada pela resistência à expansão, o hidrogel atinge o grau de intumescimento no equilíbrio².

Alta densidade de reticulação, baixa flexibilidade de cadeia e baixo volume livre são fatores desfavoráveis ao intumescimento por aumentar a resistência à expansão ou, no caso do volume livre, dificultar a penetração de água no interior do material².

Os valores obtidos para EWC e para o grau de intumescimento são mostrados na tabela 7. A porcentagem de água em equilíbrio é aproximadamente igual para as IPNs e o PVP sendo menor na gelatina; o mesmo acontece com o grau de intumescimento. Todas as amostras retêm quantidades de água muito superiores a sua massa seca, sendo que o PVP

intumescido chega a ficar com mais de 12 vezes a sua massa. Para as IPNs, por se tratar de amostras diferentes, não é possível fazer uma comparação com a densidade de reticulação. Já para a gelatina e o PVP, ambos reticulados, é possível tirar conclusões interessantes. O PVPR deve apresentar uma maior densidade de reticulação que a GPR, como constatado pelos valores de E' a temperaturas maiores que a T_g . Entretanto, a gelatina intumescce menos, o que implica em duas possibilidades:

1. a gelatina teria menor afinidade com a água do que o PVP
2. a gelatina apresentaria uma estrutura ordenada que contribuiria para estrutura de rede tridimensional diminuindo a capacidade de intumescimento a temperatura ambiente.

Das duas possibilidades a segunda parece mais razoável, uma vez que a natureza das interações água-gelatina e água-PVP é a mesma.

Tabela 7: Comportamento do intumescimento das amostras equilibradas em água destilada à temperatura ambiente após 24 horas.

	GRAU DE INTUMESCIMENTO	QUANTIDADE DE ÁGUA EM EQUILÍBRIO (%)
GPR	5,0	83,3
IPN1	9,0	90,0
IPN2	12,1	92,7
IPN3	9,1	90,0
PPR	12,6	92,7

A interface dos hidrogéis com a água é uma situação única e complexa. As moléculas de água nos hidrogéis podem estar como água livres ou ligadas ao polímero^{36,37}. A perda inicial de água é rápida e corresponde à saída da água livre, depois, mais lentamente começa a sair a água ligada. Além de requerer maior energia, a evaporação dessas moléculas ligadas é retardada, porque o hidrogel desenvolve uma película seca na superfície³⁸.

5.2 Ensaaios mecânicos

Experimental

Os ensaios mecânicos de compressão foram feitos em equipamento de Análise Termo Mecânica (TMA), TA Instruments, a temperatura ambiente (aproximadamente 26 °C) utilizando-se uma ponta para compressão com diâmetro de 6 mm.

Dois tipos de experimentos foram realizados: 1. a deformação foi registrada em função da força aplicada. 2. a variação de dimensão foi registrada em função do tempo, frente a uma carga fixa (ensaio de fluência).

As propriedades mecânicas de um biomaterial devem ser adequadas para a aplicação específica. No caso de hidrogéis, as possíveis aplicações envolvem situações em que uma grande elasticidade é requerida. Os hidrogéis, em geral, não possuem muita resistência ao rasgo, mas resistem bem a forças perpendiculares, como a compressão uniaxial.

O comportamento mecânico dos hidrogéis pode ser observado através de curvas de tensão (σ) *versus* razão de deformação ($\epsilon-1$) obtidas de experimentos de compressão. σ é a força aplicada por unidade de área do hidrogel e ϵ é a razão entre a espessura do material deformado e a espessura antes da deformação³⁹.

As curvas tensão-deformação apresentam o perfil mostrado na figura 19. No caso de compressão podem ser identificadas três diferentes regiões na curva. A região 1 mostra a eliminação de vazios na estrutura do material, a região 2 exibe um comportamento elástico linear e a região 3 é resultante da iniciação e crescimento de microfaturas que vão levar a ruptura do material.

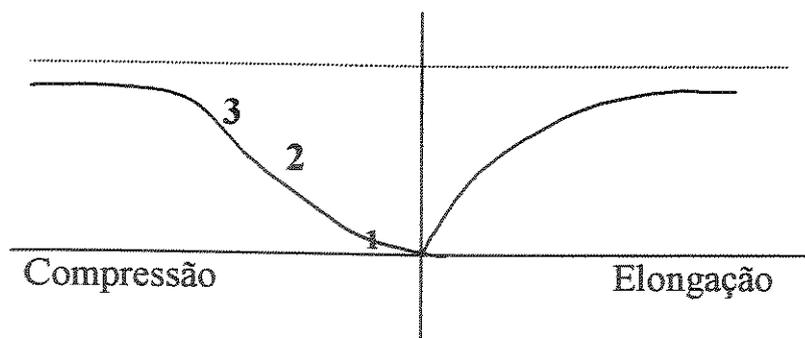


Figura 19: Perfil geral de curvas de tensão-deformação.

Na figura 20 são apresentadas curvas de tensão–deformação obtidas para os hidrogéis. Comparando o comportamento da gelatina e do PVP reticulados observamos:

1. Na primeira região das curvas, a gelatina apresenta maior resistência à compressão que o PVP, muito provavelmente devido à contribuição da estrutura organizada da gelatina para a rede tridimensional.
2. Acima de 100 Pa, a gelatina apresenta uma queda na resistência à compressão caracterizada pela maior deformação frente a mesma tensão. Isto implica que a força elástica, oriunda de ligações covalentes (reticulação), é mais forte no PVP; esse resultado é condizente com as observações de DMA.

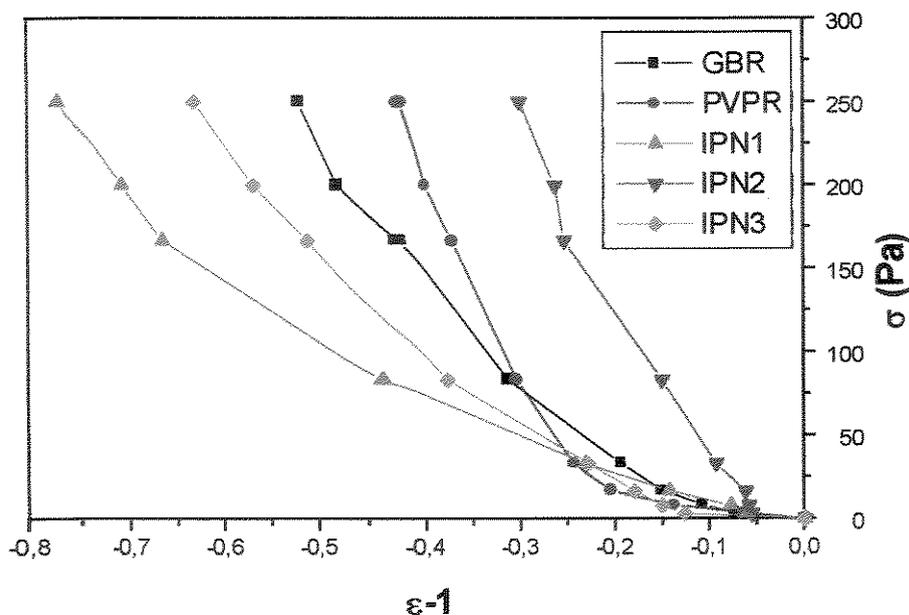


Figura 20: Curvas de tensão – deformação obtidas para os hidrogéis em experimentos de compressão.

Entre as IPNs, a que apresenta menor força elástica é a IPN1, justamente a que apresenta separação de fases. Este comportamento sugere que microgéis de PVPR, com alta densidade de reticulação, estejam dispersos em uma matriz também reticulada rica em gelatina. Já está bem estabelecido que a presença de um diluente no meio reacional de uma reticulação abaixa a eficiência desta, criando ciclos intracadeia. Como consequência há um abaixamento na densidade de reticulação, no caso da gelatina, devido a presença do PVP.

Este efeito de diluição é esperado para todas as IPNs, onde a presença de um componente interfere na reticulação do outro. É o caso da IPN3, contendo 30% em massa de gelatina, que apresenta uma resistência a

compressão menor que os componentes puros reticulados, porém superior à resistência da IPN1 que apresenta segregação de fases. Entretanto, para a IPN2 observa-se um sinergismo: é mecanicamente mais resistente que os polímeros de partida.

Este fato pode ser explicado por uma reticulação de ambos os componentes otimizados, formando redes com distribuição de densidade de reticulação homogênea, entretanto, esta hipótese é de difícil comprovação experimental.

Apesar das amostras IPN2 e PVPR apresentarem os maiores graus de intumescimento (tabela 7), foram também as que apresentaram melhor resistência à deformação. Isso implica que no caso desses hidrogéis o desempenho mecânico está mais relacionado com a distribuição e entrelaçamento das cadeias do que com a quantidade de água incorporada. Esse resultado é muito interessante já que normalmente quando as propriedades mecânicas de um hidrogel são melhoradas, o grau de intumescimento, sua principal característica, diminui sensivelmente.

A variação nas dimensões de um hidrogel quando este é submetido a uma força de compressão é uma combinação da deformação sofrida pela rede polimérica com a saída de água da estrutura do material^{40,41}.

Na figura 21 é apresentada a capacidade dos hidrogéis recuperarem sua forma após a retirada de uma tensão. Todas as amostras apresentam ótimo comportamento elástico e a recuperação é instantânea, da ordem de décimos de segundos. Esse comportamento é característico de materiais elastoméricos. Novamente observa-se que a IPN2 é a que apresenta maior força elástica, comparável ao PVPR, em relação às demais IPNs.

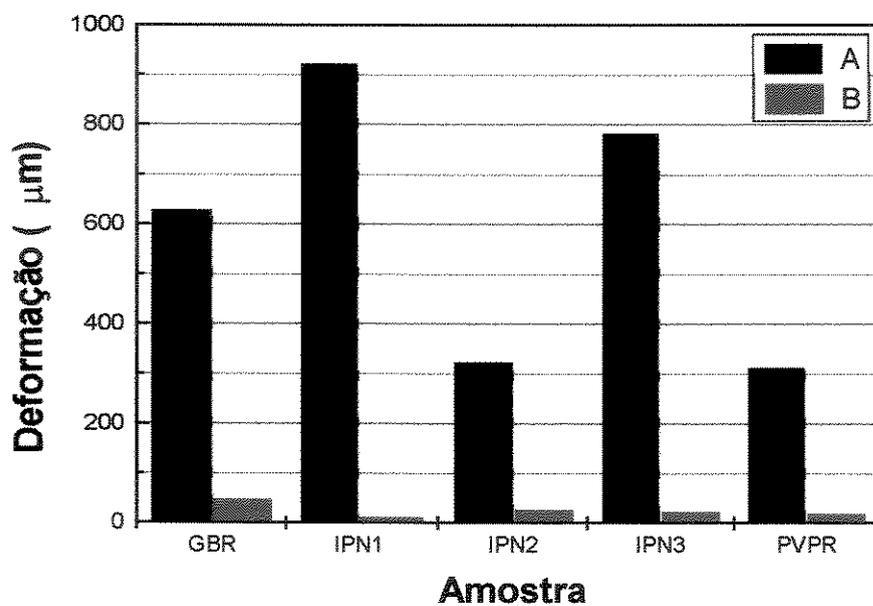


Figura 21: Variação de dimensão sofrida pelos hidrogéis com a aplicação de uma tensão de 166,7 Pa (A) e após retirada da mesma(B).

5.3 – Análise de superfície

Experimental

As amostras foram observadas e fotografadas (aumento de 100 x) no microscópio ótico Olympus CBA-K usando-se acessório para contraste de fase e filtro azul. A superfície estudada foi aquela onde houve evaporação de solvente durante o “casting” em placa de Petri.

A interação do tecido hospedeiro com o biomaterial depende muito da superfície do último já que é a interface que governa esse processo. A química, morfologia e topografia afetam a adesão de células e proteínas que por sua vez é responsável pela resposta do organismo à presença do material⁴²⁻⁴⁴.

As superfícies das IPNs intumescidas com água destilada foram observadas usando-se microscopia ótica. O único objetivo dessa análise foi avaliar a topografia da superfície desses materiais, como a rugosidade e a presença de poros apenas para auxiliar na interpretação dos resultados dos testes biológicos.

Todas as amostras (figuras 22–26) apresentaram superfície irregular, com presença de reentrâncias e saliências. Embora haja diferença entre as superfícies das amostras, é difícil estabelecer uma relação entre o aspecto da superfície e a composição da IPN.

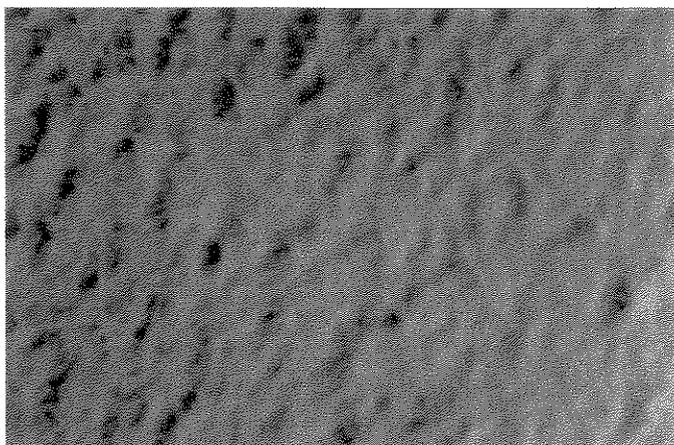


Figura 22: Micrografia da superfície da amostra GBR. Aumento de 100x.



Figura 23: Micrografia da superfície da amostra IPN1. Aumento de 100x.

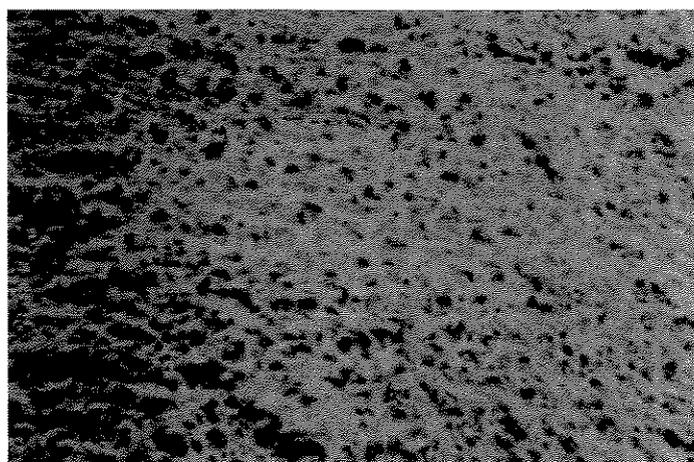


Figura 24: Micrografia da superfície da amostra IPN2. Aumento de 100x.

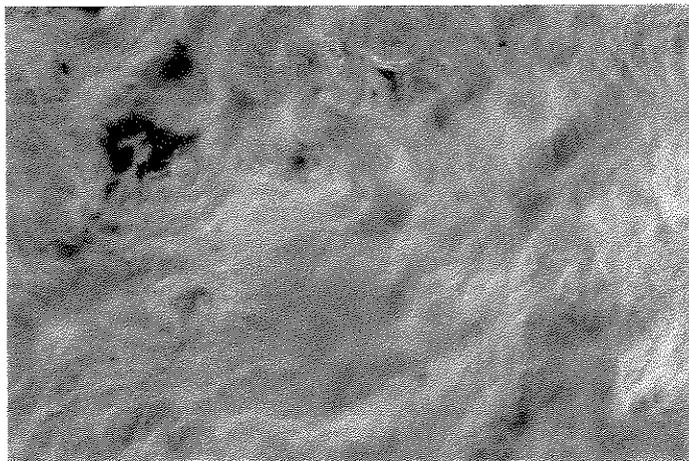


Figura 25: Micrografia da superfície da amostra IPN3. Aumento de 100x.

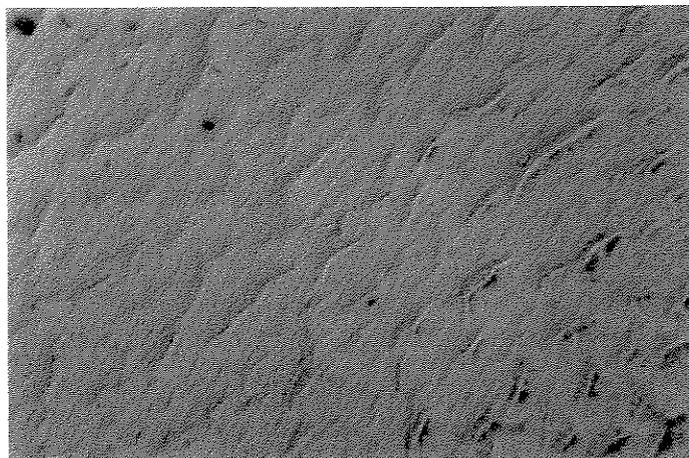


Figura 26: Micrografia da superfície da amostra PVP. Aumento de 100x.

6- AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE COM TECIDOS E SANGUE

Para ser usado como biomaterial, um material, deve, além de assumir e manter as funções necessárias para a aplicação específica, interagir com o ambiente biológico do organismo de forma que não altere seu funcionamento normal, ou seja, esses materiais têm que ser biocompatíveis.

6.1- Testes de citotoxicidade

Existem diferentes formas de se avaliar a biocompatibilidade de um material divididas em testes *in vivo* e *in vitro*. Nos testes *in vivo* o material é implantado em cobaias e o desempenho é avaliado estudando-se a morfologia do biomaterial e dos tecidos na região do implante depois de decorrido um tempo significativo. Os testes *in vitro*, feitos com células em cultura de linhagens estabelecidas (citotoxicidade), constituem a fase inicial da avaliação de biocompatibilidade: é possível detectar se o material em questão provoca morte das células ou efeitos negativos nas funções celulares⁴⁵.

Embora os resultados obtidos usando-se células em cultura não possam ser extrapolados diretamente para um organismo completo, é certo que se o material produz algum efeito deletério nas células, pode-se esperar que um efeito semelhante ocorra no organismo⁴⁶.

A avaliação da citotoxicidade é feita através da análise da viabilidade das células do sobrenadante do inóculo e de estudo de aspectos morfológicos das células sobre a superfície do polímero^{41,47-50}. O estudo da morfologia das células que cresceram sobre a placa onde estava o material também é

importante para averiguação da liberação de substâncias tóxicas para o meio de cultura.

As células Vero utilizadas nesse experimento são uma linhagem de fibroblastos estabelecida a partir de rim de macaca. Os fibroblastos são um grupo de células presente em todos os tecidos, especializado em estabelecer e manter a estrutura da matriz extracelular. As interações célula-célula e célula-substrato são extremamente importantes para esta função⁵¹.

Experimental

Estes testes, feitos de acordo com as normas técnicas ASTM F-813-83⁵² e ISO 10993-5⁵³, foram realizados no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Primeiramente as amostras foram esterilizadas em autoclave a 127 °C por 30 minutos. A amostra IPN1, que no estado intumescido é mecanicamente mais fraca que as outras, não suportou a pressão e a temperatura do tratamento. A esterilização dessa amostra foi feita mantendo-a por 48 horas em solução de etanol/água estéril 70%.

Em capela de fluxo laminar as amostras esterilizadas foram acondicionadas em placas descartáveis (Corning) de seis cavidades, de forma que a superfície por onde evaporou solvente entrasse em contato com o material biológico. Sobre as amostras foram colocadas arruelas de aço inox para manter os hidrogéis esticados e presos no fundo da placa. Foi adicionado o meio de cultura Ham-F10 (Nutricell) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Nutricell). Esse material foi mantido a 37 °C por 24 horas. Decorrido esse período, o meio de cultura foi retirado e, sobre as amostras, foi inoculada uma

suspensão de células da linhagem Vero em meio Ham-F10 com 10% de SFB (5×10^5 células/ml), e o material foi incubado a 37 °C até completar 48 horas de cultura.

A concentração da suspensão celular inoculada foi determinada fazendo-se a contagem das células em câmara de utilizando-se o corante vital Azul de Tripán. A concentração encontrada foi de $0,5 \times 10^4$ células/ml.

Depois de completado o tempo de cultura, foi feita a análise da viabilidade das células presentes no meio de cultura através do método de exclusão usando-se o corante Azul de Tripán. Amostras dos sobrenadantes foram coletadas, diluídas 1:1 em solução de Azul de Tripán em salina (1:9) e as células viáveis e não viáveis em suspensão foram contadas em câmara de Neubauer

Para o estudo da morfologia o meio de cultura foi retirado e as células fixadas com etanol/ácido acético 3:1, lavadas com etanol e água destilada. A seguir o material foi corado com Cresil Violeta 0,25% por 3 minutos, lavado com água destilada e fotografado em microscópio ótico com aumento de 10 vezes e 40 vezes.

Os experimentos foram feitos em triplicata. Como controle positivo foram usados filmes de silicona obtidos a partir do adesivo de silicona Rhodiastic 151 (Rhodia) e como controle negativo, a própria placa descartável de poliestireno.

Resultados

Uma primeira análise da citotoxicidade foi feita através de testes de viabilidade. Neste teste é possível distinguir células viáveis de inviáveis.

Células inviáveis são aquelas células que ou estão mortas ou já estão em processo de degeneração, tendo sofrido profundas modificações metabólicas e perdido a integridade da membrana. A célula pode estar ainda viva, mas sofreu alterações que afetaram suas funções normais. O Azul de Tripán, corante utilizado nesse teste, não é permeável para as células viáveis, assim, as células que são coradas permitiram a entrada do solvente porque a membrana celular não estava íntegra⁵⁴.

Analisando-se a figura 27 podemos constatar primeiramente a eficiência dos materiais escolhidos como controles⁴¹. Para a silicona (controle citotóxico) obteve-se 0% de viabilidade enquanto que na placa de poliestireno e lamínulas de vidro as células estavam 100% viáveis. É importante ressaltar que o vedante escolhido para fazer os filmes de silicona continha fungicida em sua composição, outros vedantes de silicona que não continham esse aditivo não se mostraram tão eficientes como controle citotóxico, portanto a citotoxicidade desse controle não se deve apenas a estrutura do material.

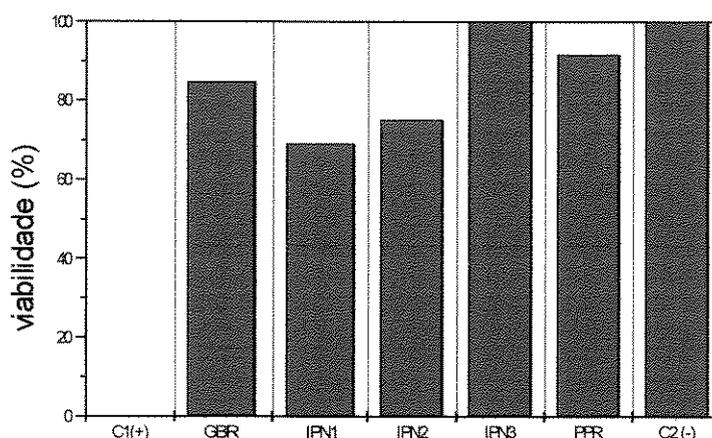


Figura 27: Resultados dos testes de viabilidade. C1(+) é o controle positivo (silicona) e C2(-) o controle negativo (poliestireno).

Essa eficiência é confirmada com o aspecto morfológico do material mostrado na figura 28. Praticamente não há células sobre a superfície do controle positivo, apenas alguns fragmentos de células. No caso do controle negativo, poliestireno, as células cresceram normalmente na superfície do material.

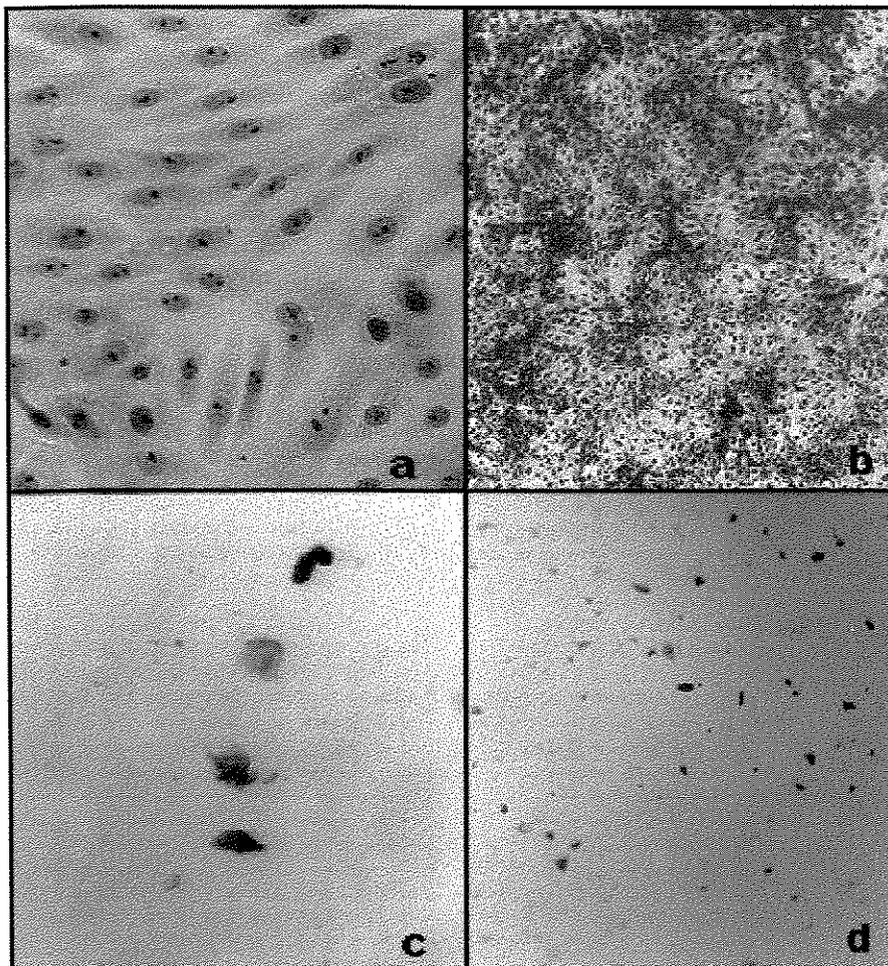


Figura 28: Morfologia de células Vero crescendo sobre controle negativo (a: aumento de 40x, b: aumento de 10 x) e sobre controle positivo (c: aumento de 40 x, d: aumento de 10 x).

A linhagem Vero é uma linhagem dependente de ancoragem. Isso significa que a célula precisa se ligar a um substrato, formando uma monocamada, para crescer e se dividir. A presença de células viáveis em suspensão no meio de cultura se deve ao fato de que durante os processos de divisão elas se tornam arredondadas e algumas podem descolar do substrato⁴¹.

Pode-se observar que para todos os hidrogéis (figuras 29-33) as células que cresceram sobre a placa e sobre a superfície dos mesmos não apresentam alterações morfológicas acentuadas quando comparadas aos controles. Conclui-se, portanto, que os hidrogéis não liberam substâncias tóxicas para o meio de cultura e que não apresentam toxicidade.

A diferença de coloração dos materiais se deve às diferentes capacidades de reter e liberar corante. O tempo que cada hidrogel foi mantido em contato com o corante foi o mesmo para todos, porém a lavagem de cada um foi feita até que o material apresentasse intensidade de coloração baixa o suficiente para permitir a visualização das células.

Os resultados de viabilidade para as amostras GBR, IPN1 e IPN2 não estão refletidos na análise de morfologia. A porcentagem de viabilidade diminui com o aumento da quantidade de gelatina embora nas micrografias não foram detectadas alterações morfológicas. Pode ser que moléculas de glutaraldeído, reagente tóxico para células, retidas na rede polimérica do material em pontos específicos tenha provocado alterações fisiológicas e o descolamento de algumas células. As moléculas de glutaraldeído podem se agrupar formando oligômeros e esses podem ter ficado entrelaçados em certas regiões da superfície. Como a quantidade de glutaraldeído é diretamente proporcional à de gelatina isso justificaria a relação de viabilidade com a quantidade de gelatina. Outras explicações podem estar relacionada com a

distribuição irregular de grupos atômicos na superfície do material e consequentemente com a presença de microdomínios hidrofílicos/hidrofóbicos

A quantidade de células aderidas sobre os hidrogéis diminui com o aumento do teor de PVP nas misturas. O PVP parece, então, limitar a adesão das células na superfície dos materiais.

A superfície dos polímeros no meio biológico é modificada pela deposição de proteínas segregadas pelas células ou presentes no meio de cultura. A camada de proteínas aderidas comanda os próximos processos de adesão e o que determina quais proteínas irão aderir são as propriedades da superfície do substrato, como energia livre de superfície, carga, balanço hidrofílico-hidrofóbico⁵⁵.

A presença de rugosidade na superfície dos polímeros, verificada por microscopia ótica, afeta as interações com o meio biológico de maneiras diferentes: há um aumento da área de contato do material com o tecido adjacente, o que intensifica as interações químicas e físico-químicas; mas, por outro lado, a presença de faces pontiagudas pode tornar o contato mais traumático⁵⁶. No caso de hidrogéis, devido a natureza mole do material, espera-se que apenas o primeiro efeito ocorra. Ou seja, a irregularidade da superfície é uma vantagem para esses materiais.

As amostras GBR e IPN2 apresentaram superfícies mais irregulares, no entanto não pode se estabelecer nenhuma relação direta entre a topografia das superfícies com a adesão celular ou citotoxicidade. Há apenas uma sugestão de uma tendência das células a procurar as depressões para aderir.

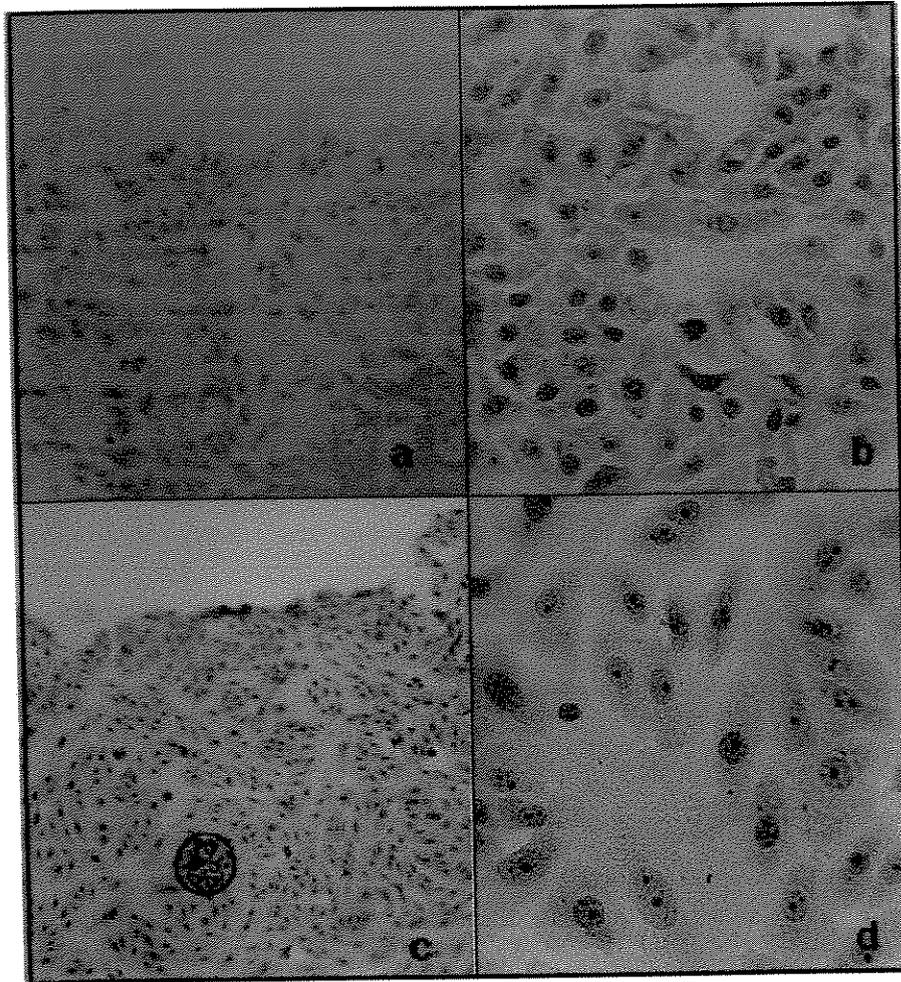


Figura 29: Morfologia de células Vero crescendo sobre GBR (a: aumento de 10x, b: aumento de 40 x) e sobre placa em contato com GBR (c: aumento de 10 x, d: aumento de 40 x).

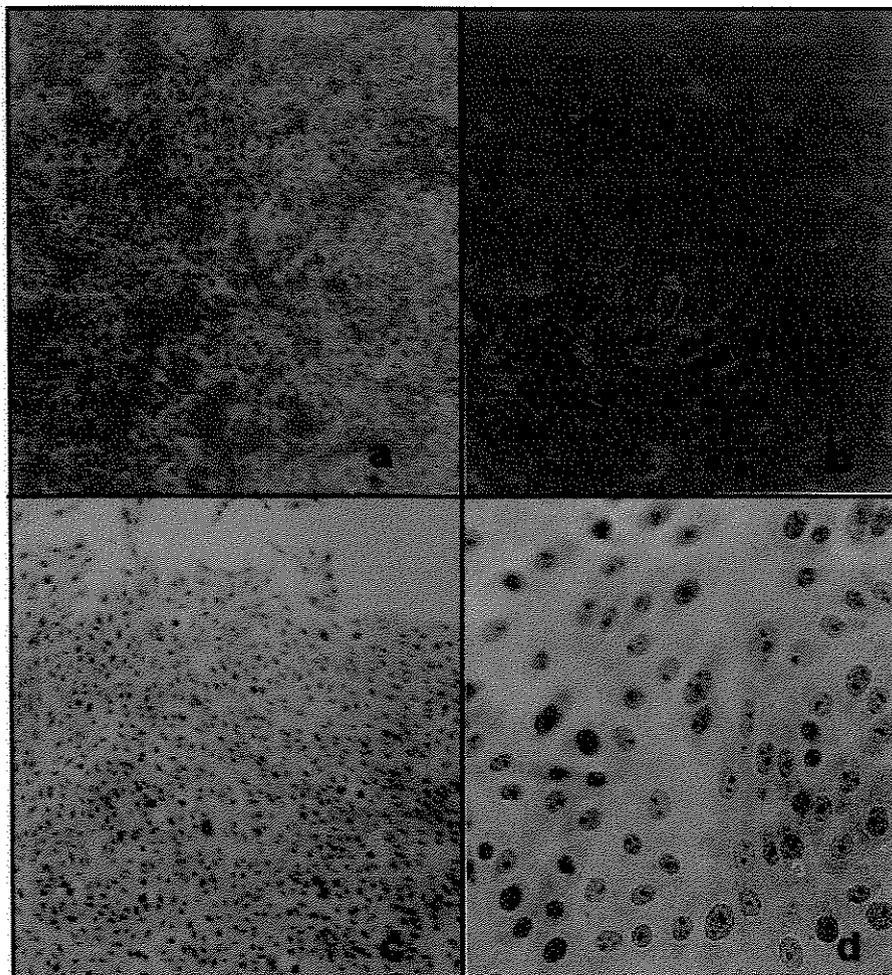


Figura 30: Morfologia de células Vero crescendo sobre IPN1 (a: aumento de 10x, b: aumento de 40 x) e sobre placa em contato com IPN1 (c: aumento de 10 x, d: aumento de 40 x).

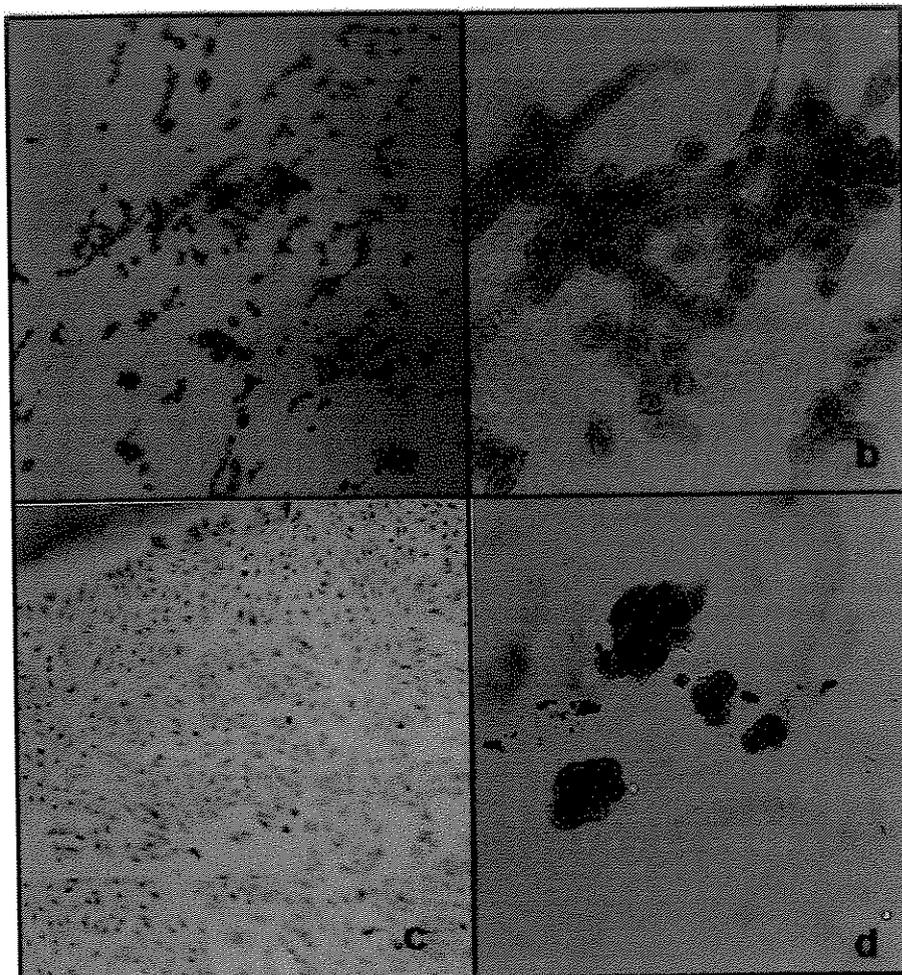


Figura 31: Morfologia de células Vero crescendo sobre IPN2 (a: aumento de 10x, b: aumento de 40 x) e sobre placa em contato com IPN2 (c: aumento de 10 x, d: aumento de 40 x).

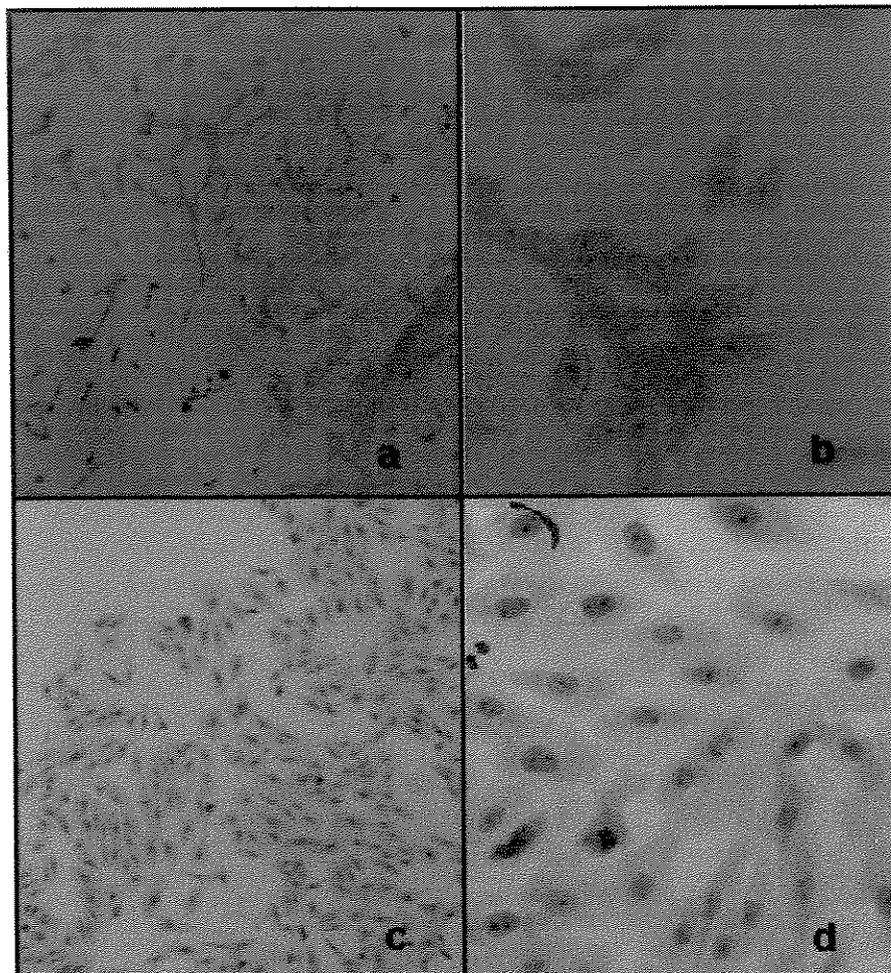


Figura 32: Morfologia de células Vero crescendo sobre IPN3 (a: aumento de 10x, b: aumento de 40 x) e sobre placa em contato com IPN3 (c: aumento de 10 x, d: aumento de 40 x).

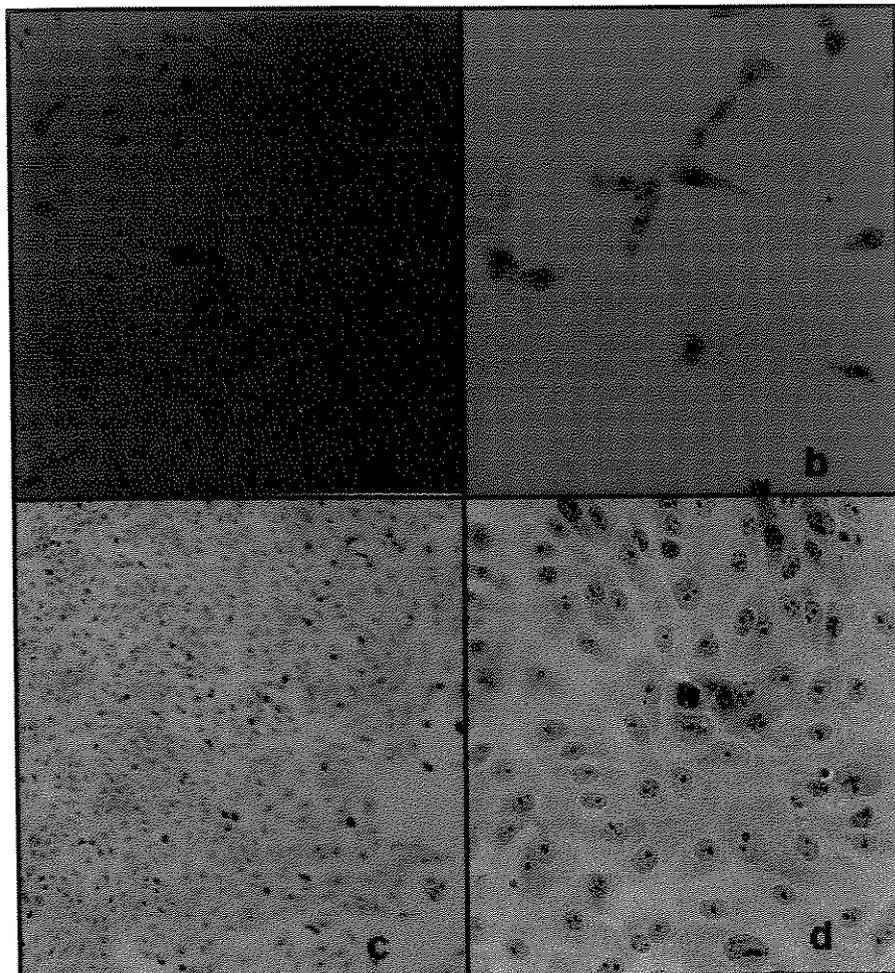


Figura 33: Morfologia de células Vero crescendo sobre PVPR (a: aumento de 10x, b: aumento de 40 x) e sobre placa em contato com PVPR (c: aumento de 10 x, d: aumento de 40 x).

6.2- Testes de adesão de plaquetas

O sangue é um fluido heterogêneo, composto de suspensão de células vermelhas (eritrócitos), brancas (leucócitos) e plaquetas (trombócitos) no plasma. O plasma contém ainda íons inorgânicos e macromoléculas orgânicas, como as proteínas e as enzimas. As principais proteínas envolvidas na coagulação são albumina, fibrinogênio, γ -globulina⁵⁷.

O comportamento dos componente do sangue na interface com um material estranho ao organismo é um problema essencial nas aplicações biomédicas de polímeros sintéticos^{58,59}. Quando o sangue entra em contato com a superfície do material estranho, ocorre primeiramente a adsorção de proteínas do plasma seguida pela adesão e deformação das plaquetas que depois liberam substâncias que desencadeiam o processo de coagulação, resultando em trombose. A compatibilidade com o sangue é alcançada quando há pouca interação das plaquetas com o material. Isso pode ser monitorado analisando-se a quantidade e tipo de proteínas e/ou de plaquetas aderidas e ainda, a formação de trombos.

O estudo da compatibilidade com o sangue pode ser feito em experimentos estáticos ou dinâmicos. Os dinâmicos consideram também o efeito do fluxo sanguíneo, enquanto que os estáticos apenas consideram o contato do fluido biológico com o material.

Como na adesão celular, a adesão de plaquetas (pseudo células) também é governada pela camada de proteínas inicialmente aderida. Essa camada modifica a superfície original e tem influência primordial no processo de coagulação do sangue. Superfícies recobertas com albumina tendem a minimizar a adesão de plaquetas enquanto superfícies recobertas com fibrinogênio ou γ -globulina tendem a aumentar a adesão de plaquetas e as

reações subsequentes que levam a trombose. A seletividade da adesão de proteínas parece ser dirigida pela química e física da superfície do polímero. A adesão de albumina é favorecida quando o material possui superfície hidrofílica enquanto superfícies hidrofóbicas favorecem a adesão de fibrinogênio e γ -globulina^{43, 60, 61}.

Experimental

As amostras foram colocadas em placa descartável de 24 cavidades. Além dos hidrogéis foram submetidos ao teste amostras de poli(cloreto de vinila) (PVC) usado na fabricação de bolsas de sangue e a própria placa de poliestireno, para comparação.

O material foi mantido a 37 °C por 15 minutos, e logo depois ficou imerso em plasma sanguíneo rico em plaquetas por 6 minutos a 37 °C.

O sangue utilizado foi obtido de doador saudável, que não tenha tomado medicamento que afete a função das plaquetas. O plasma rico em plaquetas foi separado por centrifugação, durante circulação extracorpórea, em equipamento de aferese de plaquetas seguindo procedimento rotineiramente usado para doação no Hemocentro da UNICAMP. O material foi utilizado aproximadamente 24 horas após a coleta devido a necessidade de se fazer a sorologia e contagem de plaquetas. Após esse período o anticoagulante usado no processo de coleta (citrato) já não interfere mais nos testes.

Decorrido o tempo de incubação o material foi fixado com glutaraldeído a 2,5% por 10 minutos à temperatura ambiente, e depois mantido em solução aquosa de etanol (70% v/v) para evitar desidratação e proliferação de microorganismos até ser observado e fotografado em microscópio ótico

Olympus CBA-K, com aumento de 100 vezes, usando-se acessório de contraste de fase.

Resultados

Nessa avaliação inicial da hemocompatibilidade foram considerados o aspecto geral e a quantidade de plaquetas aderidas na superfície do material⁶²⁻⁶⁴. Os campos escolhidos para fotografia foram aqueles representativos do comportamento geral observado na superfície dos hidrogéis.

Na superfície da placa de poliestireno sem hidrogel (figura 34) observa-se uma quantidade significativa de plaquetas aderidas enquanto que o PVC (figura 35) apresenta superfície recoberta com fragmentos de plaquetas.

Na superfície dos hidrogéis (figuras 36-40) podem ser observados tanto plaquetas como fragmentos das mesmas. A quantidade de fragmentos aumenta com o aumento da quantidade de PVP nas IPNs, embora a amostras PVPR apresente quantidade de plaquetas aderidas similar a da gelatina.

A explicação para a presença dos fragmentos é apenas hipotética e estaria relacionada com danos sofridos durante o processo de descolamento de plaquetas de superfícies pouco aderentes⁶².

A amostra IPN3 apresenta maior quantidade de fragmentos. Se a hipótese para a presença de fragmentos estiver correta, esse resultado estaria em concordância com os de citotoxicidade onde a quantidade de células aderidas sobre essa amostra era menor comparadas com as outras IPNs.

Embora tenha sido usado contraste de fase na obtenção das micrografias não foi possível obter foco em que a interferência da estrutura do polímero na visualização das plaquetas fosse completamente anulada.

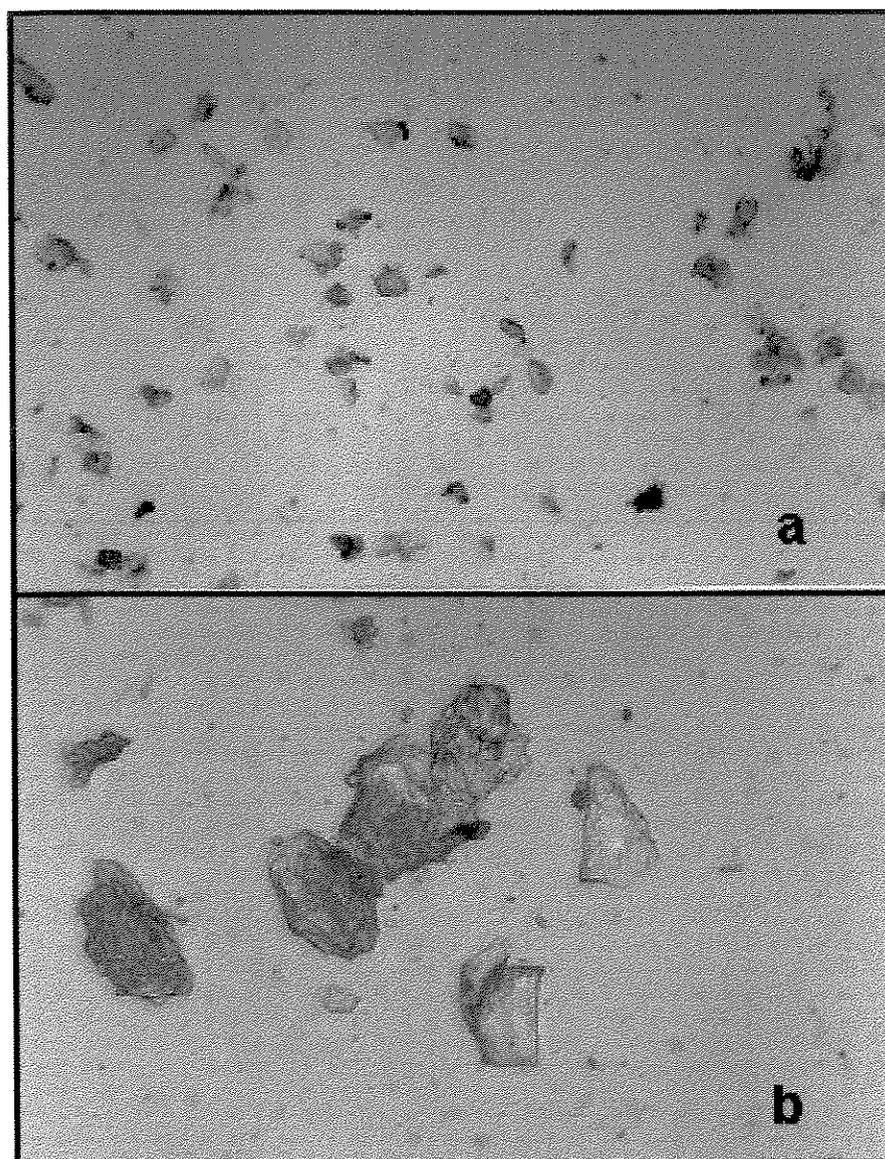


Figura 34: Adesão de plaquetas na superfície de placa de poliestireno; a: aumento de 100x, b: aumento de 400x.

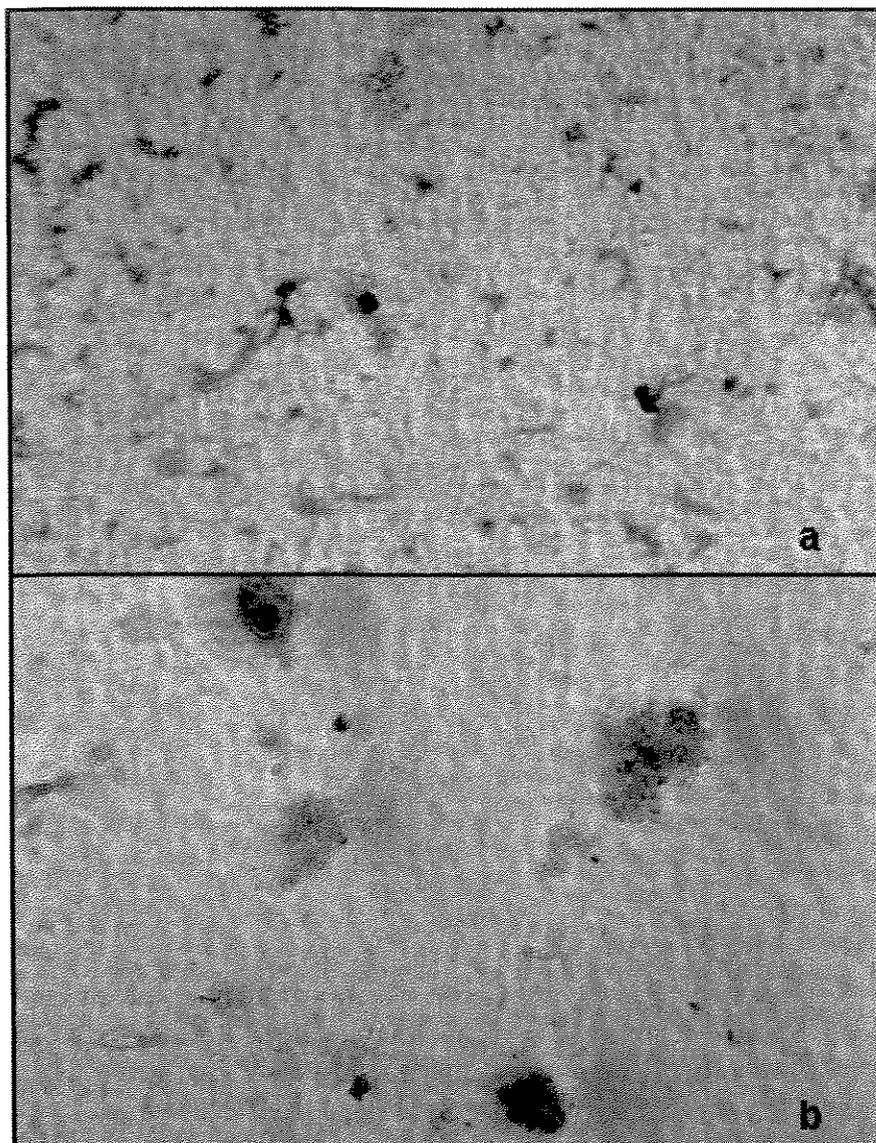


Figura 35: Adesão de plaquetas na superfície de PVC usado em bolsa de sangue; a: aumento de 100x, b: aumento de 400x.

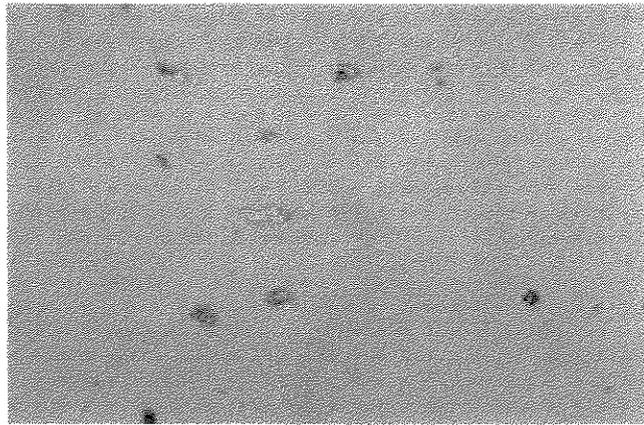


Figura 36: Adesão de plaquetas na superfície de GBR. Aumento de 100x.

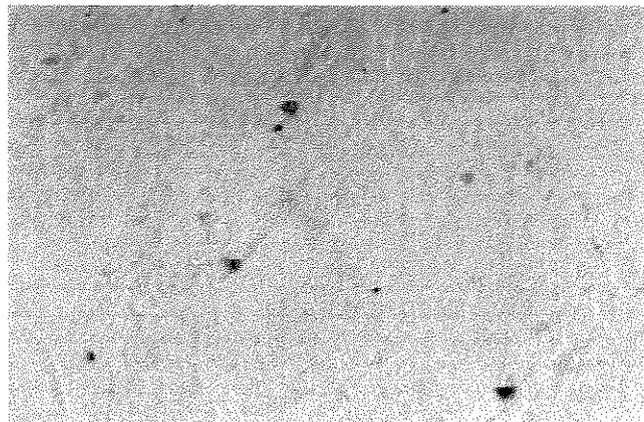


Figura 37: Adesão de plaquetas na superfície de IPN1. Aumento de 100x.

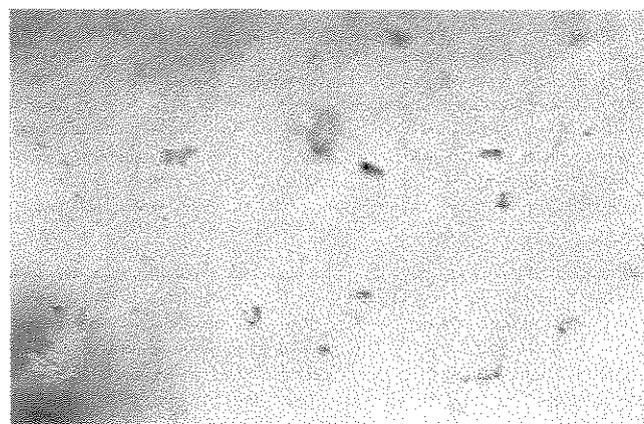


Figura 38: Adesão de plaquetas na superfície de IPN2. Aumento de 100x.

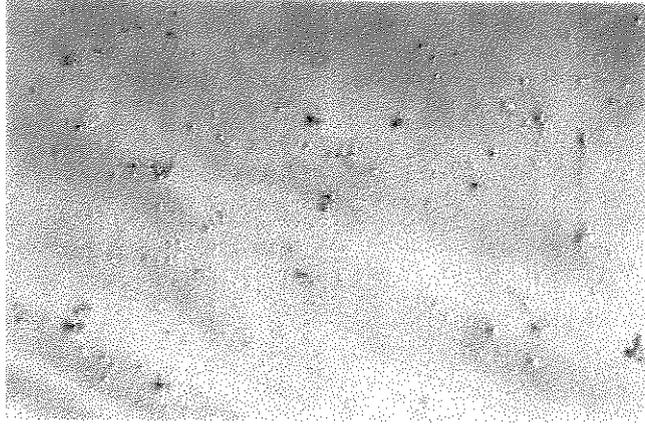


Figura 39: Adesão de plaquetas na superfície de IPN3. Aumento de 100x.

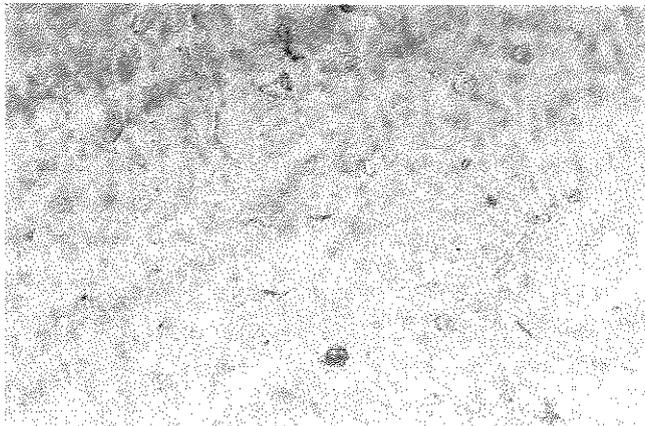


Figura 40: Adesão de plaquetas na superfície de PVPR. Aumento de 100x.

7- CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

7.1 -Conclusões

Os hidrogéis de IPNs baseadas em PVP-gelatina constituem um sistema polimérico miscível nas composições contendo 30 e 50 % em massa de gelatina e imiscível na composição com 70 % de polímero natural, nas condições de preparação utilizadas. A separação de fases só pode ser detectada por DMA, indicando a maior sensibilidade dessa técnica em relação ao DSC, mesmo tendo sido utilizada a versão modulada, que melhora a resolução e a sensibilidade. A quantidade de água incorporada nas amostras no estado desidratado influencia muito as medidas de temperatura de transição vítrea e o comportamento mecânico desses materiais.

Esse sistema apresentou propriedades gerais interessantes para aplicação como biomaterial: não há degradação nem modificação das propriedades físico-químicas na temperatura do corpo humano (aproximadamente 37 °C); a esterilização é feita com sucesso em autoclave ou por imersão em solução etanol/água 70 %. O alto grau de intumescimento facilita a lavagem e esterilização com solução de etanol, enquanto que o comportamento mecânico indica alta elasticidade e capacidade de recuperação da forma após a aplicação de uma tensão. As rugosidades da superfície aparentemente não apresentam efeito negativo na interação do material com sistemas biológicos.

O estudo preliminar de compatibilidade com sangue e tecidos mostrou que as IPNs, de maneira geral, não induziram fortes reações adversas nas

células nem permitiram a adesão de uma grande quantidade de plaquetas em suas superfícies.

Concluindo-se: as IPNs de PVP-gelatina apresentam grande potencial de serem utilizadas em aplicações biomédicas.

7.2- Sugestões para trabalhos futuros

-Testes mecânicos com IPNs em outras composições.

-Estudo da resposta biológica frente a variação da concentração de glutaraldeído nas IPNs.

-Estudos mais profundos para especificar as aplicações para estes materiais:

- cinética de absorção e liberação de drogas,
- permeabilidade a gases e componentes de fluidos biológicos,
- compatibilidade com tecidos *in vivo*,
- compatibilidade com sangue em experimentos dinâmicos e *in vivo*,
- degradação enzimática
- outros aspectos do comportamento mecânico,
- comparação dessas propriedades com as de hidrogéis já disponíveis no mercado

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Vallet-Regí, M., Introduction to the world of biomaterials. *Ann. Quim. Int. Ed.* 1997, **93**: S6-S1.
- 2- Ratner, B. D., Biomedical applications of polymers. Em: Allen, G.; Bevington, J. C. eds., *Comprehensive Polymer Science*. Oxford, Pergamon Press, 1989, 7:201-247.
- 3- Lelah, M. D.; Jordan, C. A.; Pariso, M. E.; Lambrecht, L. K.; Albrecht R. M.; Cooper S. L., Blood compatibility of polyethylene and oxidized polyethylene in a canine A-V series shunt: Relationship to surface properties. Em: Shalaby, S. W.; Hoffman, A. S.; Katner, B. D.; Horbett, T. A. eds., *Polymers as Biomaterials*. New York, Plenum Press, 1984, 257-277.
- 4- Román, J. S., Recent contributions of polymers to design of biomaterials for clinical and surgical applications. *Ann. Quim. Int. Ed.* 1997, **93**: S22-S31.
- 5- Jorge-Herrero, E., Biological biomaterials. *Ann. Quim. Int. Ed.* 1997, **93**: S32-S37.
- 6- Cascone, M. G.; Sim, B.; Downes, S., Blends of synthetic and natural polymers as drug delivery systems for growth hormone. *Biomaterials* 1995, **16**: 569-574.

-
-
- 7- Sartri, B.; Scandola, M., Viscoelastic and thermal properties of collagen/poly (vinyl alcohol) blends. *Biomaterials* 1995, **16**: 785-792.
 - 8- Park, H.; Park, K., Hydrogels in bioapplications. Em: Ottenbrite, R. M.; Huang, J.; Park, K. eds., *Hydrogels and Biodegradable Polymers for Bioapplications*. ACS Symposium Series 627, 1996, 2-10.
 - 9- Manson, J. A.; Sperling, L. H., *Polymer Blends and Composites*. New York, Plenum Press, 1976.
 - 10- Molineaux, P., *Water-Soluble Synthetic Polymers*. Boca Raton, CRC Press, 1983, **1**: 146-178.
 - 11- Anderson, C. C.; Rodriguez, F.; Thurston, D. A., Crosslinking aqueous poly(vinyl pyrrolidone) solutions by persulfate. *J. Appl. Polym. Sci.* 1979, **23**: 2453-2462.
 - 12- Mark, H. F.; Bikales, N. M.; Overberger, C. G.; Menges, G. eds., *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. New York, John Wiley & Sons, 2^a ed., 1989, **17**: 198-257.
 - 13- Masiulanis, B.; Calusinski, G.; Marjanski, W.; Kotschy, M.; Jurkowski, P.; Góralczyk, B.; Staniszevska-Kus, J.; Solski, L.; Krzemien-Dabrowska, A., Investigation on suitability of poly(urethaneimides) as biomaterials. *J. Appl. Polym. Sci.* 1995, **58**: 1441-1454.

-
-
- 14- Macgregor, E. A.; Greenwood, C. T., *Polymers in Nature*. New York, John Wiley & Sons, 1980: 142-147.

 - 15- Veis, A., *The Macromolecular Chemistry of Gelatin*. New York, Academic Press, 1964.

 - 16- Alleavitch, J.; Finch, C. A., *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. New York, John Willey & Sons, 1980: 142-147.

 - 17- Chvapil, M.; Kronenthal, R. L.; Van Winkle Jr., W., Medical and surgical applications of collagen. *Int. Ver. Conn. Tissue Res.* 1973, **6**: 1-61.

 - 18- Olde Damink, L. H. H.; Dijkstra, P. J.; Van Luyn, M. J. A.; Van Wanchen, P. B.; Nieuwebhuis, P.; Feijen, J., Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. *J. Mater. Sci. Mat. Med.* 1995, **6**: 460-472.

 - 19- Felisberti, M. I.; Krieger, V.; Stadler, R., Phase behavior of PVME-c-PS semi-interpenetrating networks. *Makromol. Chem., Makromol. Symp.* 1990, **40**: 223-235.

 - 20- Felisberti, M. I.; Freitas, L. L.; Stadler, R. Mechanical relaxation in miscible polymer systems—The glass transition regime in polyvinylmethylether-c-polystyrene semi-interpenetrating networks. *Polymer* 1990, **31**: 1441-1448.

-
-
- 21- Chatterji, P. R., Glutaraldehyde crosslinked gelatin with polyacrylamide grafts. *J. Macromol. Sci.- Chem.* 1990, **A27**: 435-443.

 - 22- Satyanarayana, D.; Chatterji, P. R., Hydrophilic crosslinked gelatin core with hydrophobic polymethyl acrylate grafts. Conditions of grafting and characteristics of the graft copolymer. *J. Macromol. Sci.- Chem.* 1991, **A28**: 237-249.

 - 23- Brown, M. E., *Introduction to Thermal Analysis: Techniques and Application..* New York, Chapman and Hall, 1988.

 - 24- Manual de Operação do DSC. New Castle, TA Instruments, 1993, Apêndice E.

 - 25- Hermel, H.; Seeboth, A., Configuration transition in thin gelatin layers. *Prog. Colloid Polym. Sci.* 1993, **93**: 264-266.

 - 26- Yannas, I. V.; Collagen and gelatin in the solid state. *J. Macromol. Sci.- Revs. Macromol. Chem.* 1972, **C7(1)**: 49-104.

 - 27- Marshall, A. S.; Petrie, S. E. B., Thermal transitions in gelatin and aqueous gelatin solutions. *J. Photogr. Sci.* 1980, **28**: 128-134.

 - 28- Paul, D. R.; Newman, S., *Polymer Blends.* New York, Academic Press, 1978.

-
-
- 29- Turi, E. A., *Thermal Characterization of Polymers*. Orlando, Academic Press, 1981.
- 30- Lustig, S. R., Caruthers J. M., Peppas N. A., Dynamic mechanical properties of polymer-fluid systems: characterization of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate) hydrogels. *Polymer* 1991, **32**: 3340-3353.
- 31- Ramaraj, B.; Rajalingam, P.; Radhakrishnan, G., Crosslinked latex blends based on gelatin: Synthesis, morphology, thermal, and mechanical properties. *J. Appl. Polym. Sci.* 1991, **43**: 23-28.
- 32- Isasi, J. R.; Cesteros, L.; Katime, I. Study of the miscibility and specific interactions between poly (1-vinyl-2-pyrrolidone) and poly (vinyl formal). *Polymer* 1993, **34**: 2374-2379.
- 33- Kwei, T. K. J., *J. Polym. Sci., Polym. Lett. Edn.* 1984, **22**: 307.
- 34- Ramaraj, B.; Radhakrishnan, G., Interpenetrating hydrogel networks based on gelatin and polyacrylamide: synthesis, swelling, and drug release analysis. *J. Appl. Polym. Sci.* 1994, **52**: 837-846.
- 35- Gonzales, D.; Fan, K.; Sevoian, M., Synthesis and swelling characterizations of a poly(gamma-glutamic acid) hydrogel. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 1996, **34**: 2019-2027.

-
-
- 36- Pathmanathan, K.; Johari, G. P., Relaxation and crystallization of water in a hydrogel. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1994, **90**: 1143-1148.
- 37- Yoshioka, S.; Aso, Y.; Otsuka, T.; Kojima, S., Water mobility in poly(ethylene glycol)-, poly(vinylpyrrolidone)-, and gelatin-water systems, as indicated by dielectric relaxation time, spin-lattice relaxation time, and water activity. *J. Pharm, Sci.* 1995, **84**: 1072-1077.
- 38- Khare, A. R.; Peppas, N. A., Investigation of hydrogel water in polyelectrolyte gels using differential scanning calorimetry. *Polymer* 1993, **34**: 4736-4739.
- 39- Huglin, M. B.; Rego, J. M., Influence of temperature on swelling and mechanical properties of a sulphobetaine hydrogel. *Polymer* 1991, **32**: 3354-3358.
- 40- Kaur, H.; Chatterji, P. R., Interpenetrating hydrogel networks. 2. Swelling and mechanical properties of the gelatin-polyacrylamide interpenetrating networks. *Macromolecules* 1990, **23**: 4868-4871.
- 41- Malmonge, S. M., *Hidrogel Sintético Para Reparo De Defeitos da Cartilagem Articular*. Tese (doutorado). Campinas: Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação, UNICAMP, 1997.
- 42- Durrani, A. A.; Chapman, D., Modification of Polymer surfaces for biomedical applications. Em: Feast, W. J.; Munro, H. S. eds., *Polymer Surfaces and Interfaces*. New York, John Wiley & Sons, 1987, 189-200.

-
-
- 43- Fujimoto, K.; Tadokoro, H.; Ueda, Y.; Ikada, Y., Polyurethane surface modification by graft polymerization of acrylamide for reduced protein adsorption and platelet adhesion. *Biomaterials* 1993, **14**: 442-448.
- 44- Baier, R. E., Conditioning surfaces to suit the biomedical environment: recent progress. *J. Biomech. Eng.* 1982, **104**: 257-271.
- 45- Adams, R. L. P., *Cell Culture for Biochemists*. Amsterdam, Elsevier Science, 1990.
- 46- Freshney, R. I., *Animal Cell Culture. Manual of Basic Technique*. New York, Wiley-Liss, 1987.
- 47- Del Guerra, R. S.; Cascone, M. G. Barbani, N.; Lazzeri, L., Biological characterization of hydrogels of poly(vinyl alcohol) and hyaluronic acid. *J.Mater. Sci. Mater. Med.* 1994, **5**: 613-616.
- 48- Mast, F.; Hoschitzky, J. A. R. D.; Van Blitterswijk, C. A.; Huysmans, H. A., In vitro biocompatibility of EPM and EPDM rubbers. *J.Mater. Sci. Mater. Med.* 1997, **8**: 5-9.
- 49- Ambrosio, L.; Netti, P. A.; Iannace, S; Huang, S. J.; Nicolais, L. Composite hydrogels for intervertebral disc prostheses. *J.Mater. Sci. Mater. Med.* 1996, **7**: 251-254.
- 50- Cascone, M. G.; Lazzeri, L.; Barbani, N.; Polacco, G.; Pollicino, A.; Giusti, P., Dehydro-thermally cross-linked collagen-poly (vinyl alcohol)

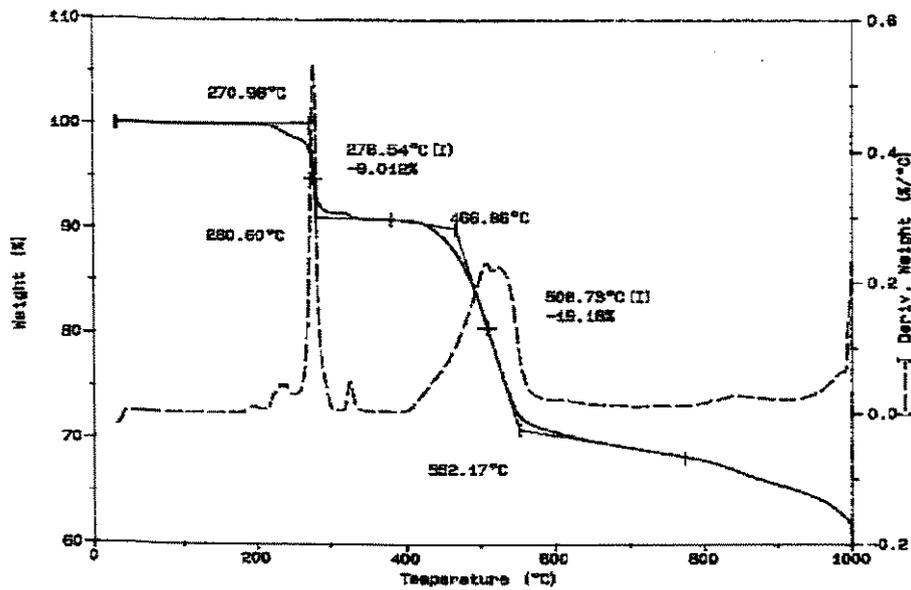
blends: mechanical, biological and surface properties. *J.Mater. Sci. Mater. Med.* 1996, 7: 297-300.

- 51- Ambrosio, L.; Peluso,G.; Davis, P.A. Biomaterials and their biocompatibilities. Em Wisw, D. L. et al. eds., *Human Biomaterials Applications*. Totowa, Humana Press, 1996, 3-17.
- 52- Norma ASTM F813-63, Standard Practice for Direct Contact Cell Culture Evaluation of Materials for Medical Devices.
- 53- Norma ISO 10993-5 (1992) E, Biological Evaluation of Medical Devices -Part 5- Tests for Citotoxicity: *in vitro* methods.
- 54- Spier, R. E; Griffiths, J. B., *Animal Cell Biotechnology*. London, Academic Press, 1985, 1.
- 55- Smetana Jr, K., Cell biology of hydrogels. *Biomaterials* 1993, 14: 1046-1050.
- 56- Dumitriu, S.; Dumitriu-Medvichi, C., Hydrogel and general properties of biomaterials. Em: Dumitriu, S. ed., *Polymeric Biomaterials*. New York, Marcel Dekker, 1994, 3-97.
- 57- Evans, G.; Mustard J. F., Platelet-surface reaction and thrombosis. *Surgery* 1968, 64: 273-280.

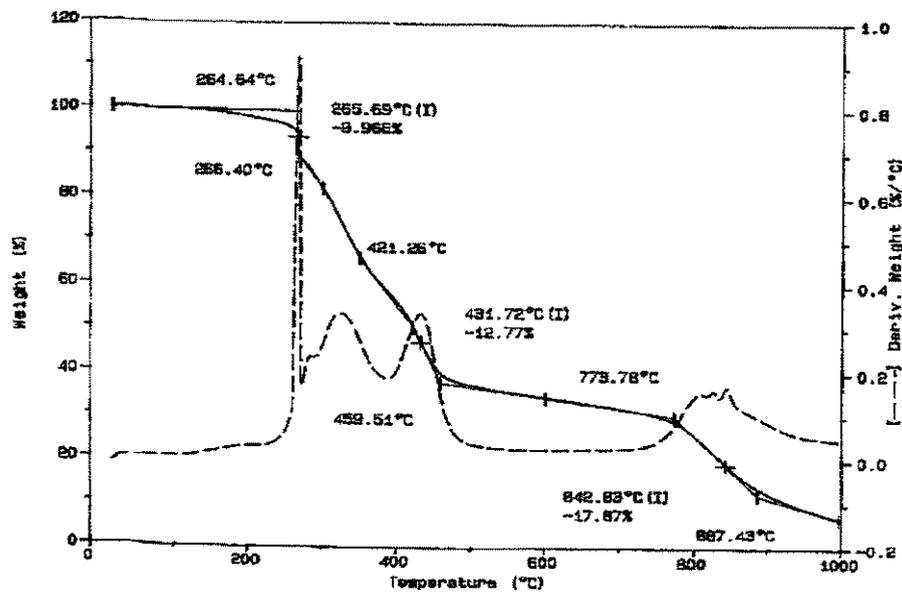
-
-
- 58- Courtney, J. M.; Lamba, N. M. K.; Sundaram, S.; Forbes, C. D., Biomaterials for blood-contacting applications. *Biomaterials* 1994, **15**: 737-744.
- 59- Jozefonvicz, J.; Jozenfowicz, M., Blood contacting materials. Em: Dumitriu, S. ed., *Polymeric Biomaterials*. New York, Marcel Dekker, 1994, 234-371.
- 60- Hoffman, A. S., Modification of materials surfaces to affects how they interact with blood. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1987, **516**: 96-101.
- 61- Lyman, D. J.; Knutson, K.; McNeill, B.; Shibatani, K., The effects of chemical structure and surface properties of synthetic polymers on the coagulation of the blood. IV The relation between polymer morphology and protein adsorption. *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organ.* 1975, **21**: 49-54.
- 62- Jiroušková, M.; Bartunková, J.; Smetana Jr, K.; Lukáš, J.; Vacík, J.; Dyr, J. E., Comparative study of human monocyte and platelet adhesion to hydrogels in vitro-effect of polymer structure. *J.Mater. Sci. Mater. Med.* 1997, **8**: 19-23.
- 63- Queiroz, A. A. A. *Obtenção de Copolímeros de Enxerto Via Radiação Ionizante, Caracterização e Estudo de Suas Propriedades Hemocompatíveis*. Tese (doutorado). São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), 1993.

-
- 64- Paul, W.; Sharma, C. P., Polyacrylonitrile-reinforced poly(vinyl alcohol) membranes: mechanical and dialysis performance. *J. Appl. Polym. Sci.* 1995, **57**: 1447-1454.

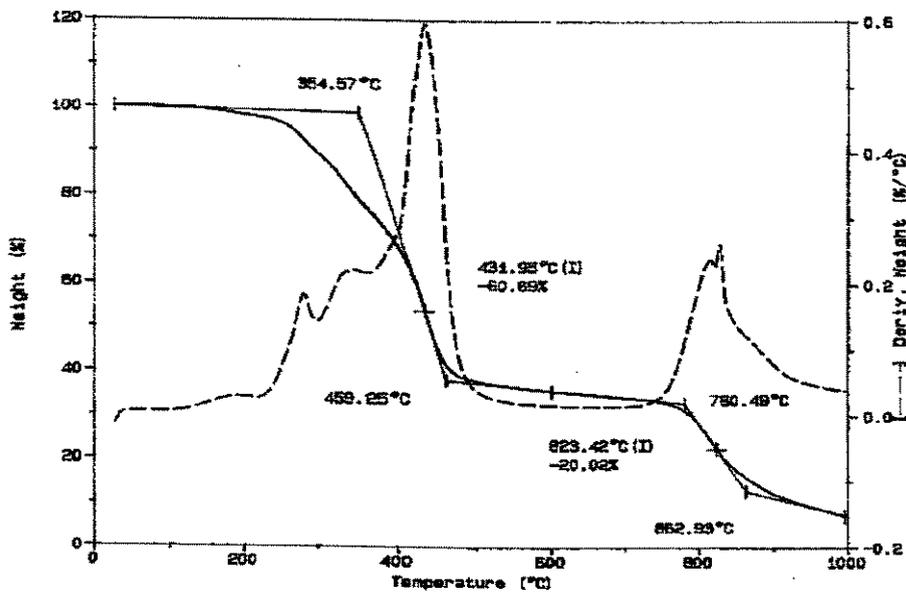
ANEXO I- CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS



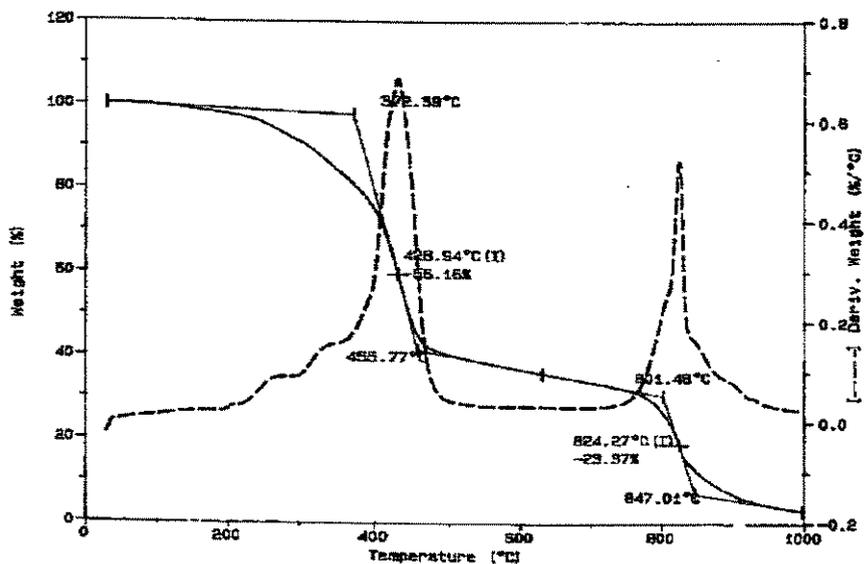
Curva termogravimétrica da Gelatina Reticulada.



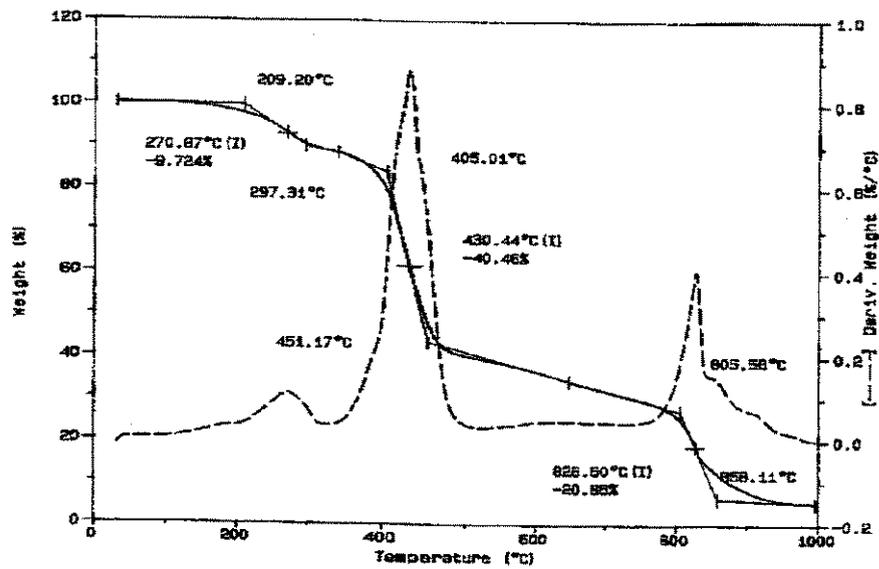
Curva termogravimétrica da IPN1.



Curva termogravimétrica da IPN2.

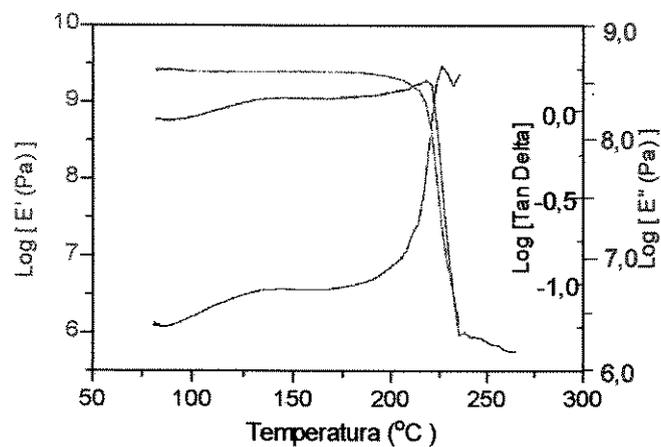


Curva termogravimétrica da IPN3.

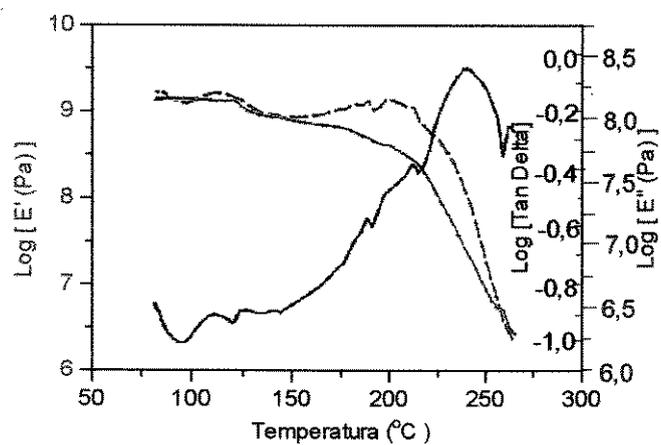


Curva termogravimétrica do PVP reticulado.

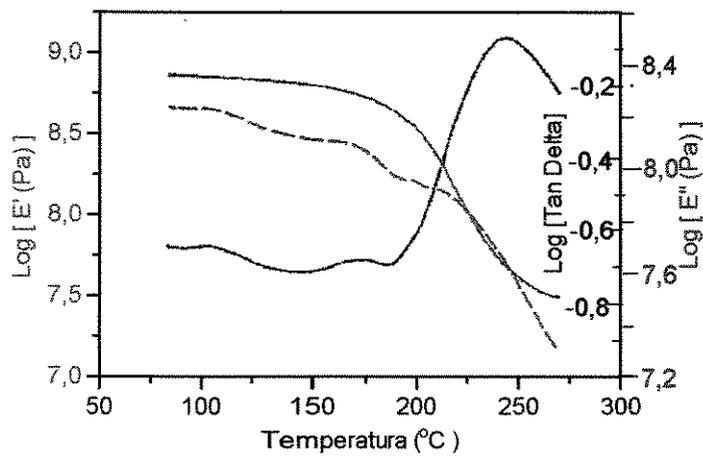
ANEXO II- CURVAS DE DMA



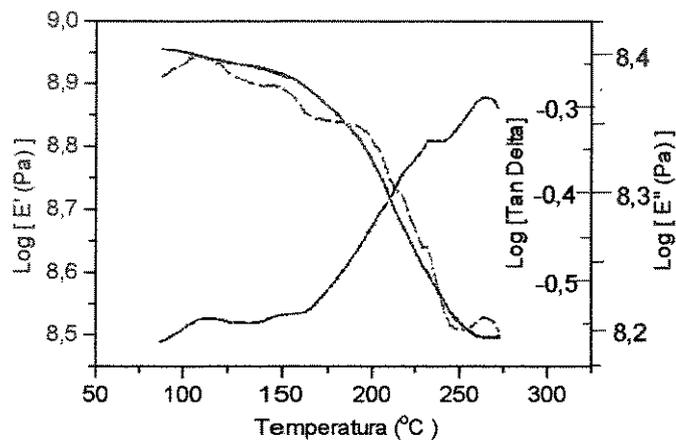
Curvas de DMA para a gelatina reticulada.



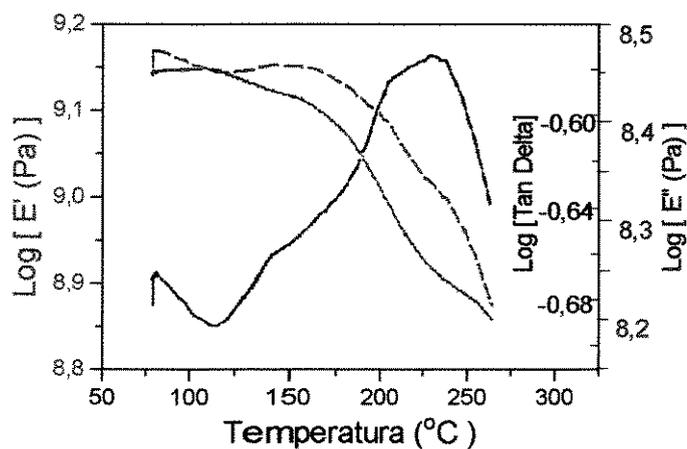
Curvas de DMA para a amostra IPN1.



Curvas de DMA para a amostra IPN2.



Curvas de DMA para a amostra IPN3.



Curvas de DMA para a PVP reticulado.