

Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais



Dissertação de Mestrado

Layla Mosqueira Moura

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
BIOCOMPATIBILIDADE DE BLENDS DE PLGA E PHB**

Belo Horizonte
Agosto de 2014

Layla Mosqueira Moura

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
BIOCOMPATIBILIDADE DE BLENDS DE PLGA E PHB**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais do CEFET-MG, na área de concentração de Ciência e Desenvolvimento de Materiais, na Linha de Pesquisa em Biomateriais.

Orientador: Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva

Coorientadora: Dra. Luciana Maria Silva

Belo Horizonte
Agosto de 2014

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
BIOCOMPATIBILIDADE DE BLENDA DE PLGA E PHB**

Dissertação apresentada em 29 de Agosto de 2014 ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais do CEFET-MG do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais – CEFET-MG, na área de concentração de Ciência e Desenvolvimento de Materiais, na Linha de Pesquisa de Biomateriais, aprovada pela banca examinadora constituída dos professores:

Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva, CEFET-MG - orientador

Prof. Dra. Luciana Maria Silva, FUNED – coorientador

Prof. Dr. Claudinei Resende Calado, CEFET-MG

Prof. Dra. Patrícia Santiago de Oliveira Patrício, CEFET-MG

Belo Horizonte, de 29 de Agosto de 2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade e por ter me dado forças e inspiração para a realização desse trabalho.

Aos meus pais por apoiarem minhas decisões e pela paciência.

Aos meus irmãos, João e Paulo e minha quase irmã Thais pelo apoio e incentivo.

Ao meu namorado Lincoln pelo amor, atenção, incentivo e paciência dedicados a mim.

Ao Prof. Dr. Sidney Nicodemos pela oportunidade, orientação, paciência, colaboração e incentivo.

A Dra. Luciana Maria Silva pela inspiração, apoio, incentivo, confiança e ensinamentos transmitidos.

Ao Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais – CEFET-MG, FAPEMIG e CAPES pelo apoio financeiro.

Aos funcionários do Laboratório de Caracterização de Materiais do CEFET-MG, Bruno e Paulo pela prestatividade, disponibilidade e atenção.

A turma do laboratório de Biologia Celular da FUNED pela disponibilidade e colaboração.

Aos professores Claudinei Rezende Calado, Patrícia Santiago de Oliveira Patrício, Lívio Bruno pela colaboração e ensinamentos.

Aos meus amigos que mesmo distante sempre me apoiaram e incentivaram. A Jacqueline, Clara, Helane, Talita, pelo companheirismo e ajuda.

A todos que contribuíram de forma direta e/ou indireta para a concretização deste trabalho e agregaram em meu conhecimento intelectual e pessoal.

I know I was born and I know that I'll die
The in between is mine (Pearl Jam – I am mine)

RESUMO

Biomaterial pode ser definido como sendo materiais naturais ou sintéticos destinados a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, ampliar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo. O critério geral utilizado para a seleção de materiais poliméricos utilizados em dispositivos médicos incluem propriedades mecânicas e tempo de degradação apropriado para a aplicação. Esses materiais também não devem causar respostas imunes ou tóxicas, além de serem metabolizados pelo organismo após o cumprimento de suas funções. Tanto o PLGA quanto o PHB são polímeros reabsorvíveis onde as ligações ésteres sofrem hidrólise podendo originar cadeias menores (oligômeros até monômeros), com terminações ácidas com o decorrer de sua degradação. Os seus produtos de degradação são reabsorvidos e excretados e, portanto, não acumulam no organismo. A obtenção de blendas ou misturas mecânicas entre dois polímeros biodegradáveis pode ser utilizada de forma eficaz para modificar as propriedades físicas e mecânicas dos polímeros individuais. O objetivo desse trabalho foi produzir, caracterizar físico quimicamente e avaliar a citotoxicidade dos filmes poliméricos obtidos a partir de blendas de PLGA e PHB. Tanto os filmes quanto as blendas foram produzidos através da técnica de *solvent casting*. Após a obtenção dos filmes poliméricos, estes foram caracterizados através das técnicas de MEV, FTIR, DRX, DSC, TGA e ensaio de tração. A avaliação da citotoxicidade foi realizada utilizando o ensaio *in vitro* do MTT. Os resultados sugeriram que as blendas formadas pelo PLGA e PHB podem ser imiscíveis independente da proporção dos polímeros e que seriam necessários mais ensaios para avaliar essa hipótese. Utilizando a proporção 90:10 foi possível observar uma pequena melhora nas propriedades mecânicas. No ensaio de citotoxicidade observou-se ainda que as blendas são aparentemente menos citotóxicas que seus componentes puros. Conclui-se que os materiais aqui estudados apresentam características mecânicas e biológicas que os habilitam para possível utilização como biomateriais.

PALAVRAS-CHAVE: blendas, PLGA, PHB, biodegradável, citotoxicidade.

ABSTRACT

Biomaterial can be defined as material natural or synthetic designed to interact with biological systems to evaluate, treat, augment or replace any tissue or organ function of the body. The general criteria used for the selection of polymeric materials used in medical devices include mechanical properties and degradation time appropriate for the application. These materials also should not cause toxic or immune responses, and are metabolized by the body after fulfilling its functions. Both PLGA and the PHB are resorbable polymers where the ester bonds undergo hydrolysis may yield smaller chains (oligomers to monomers), with sour endings in the course of their degradation. Their degradation products are reabsorbed and excreted, and therefore does not accumulate in the body. Obtaining mechanical mixtures or blends of two biodegradable polymers can be utilized effectively to modify the physical and mechanical properties of the individual polymers. The aim of this work was to produce, characterize physico-chemically and evaluate the cytotoxicity of the polymer films obtained from blends of PLGA and PHB. Both films as the blends were produced by solvent casting technique. After obtaining the polymer films, these were characterized by the techniques of SEM, FTIR, XRD, DSC, TGA and tensile testing. The cytotoxicity in vitro assay was performed using the MTT. The results suggested that the blends formed by PLGA and PHB can be immiscible, independent of the proportion of polymers and that more trials are needed to evaluate this hypothesis. Using the ratio 90:10 was possible to observe a slight improvement in the mechanical properties. In the cytotoxicity assay was observed that the blends are apparently less cytotoxic than their pure components. It is concluded that the materials studied here have mechanical and biological characteristics that enable them to be used as biomaterials.

KEY-WORDS: Blends, PLGA, PHB, biodegradable, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A classificação esquemática dos polímeros de base biológica baseada em suas origens e aos métodos de produção	19
Figura 2 – Estrutura do PHB	21
Figura 3 – Fluxograma de produção do PHB.....	22
Figura 4 – Síntese de poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico), (PLGA).....	24
Figura 5 – Fluxograma das etapas do trabalho.....	28
Figura 6 – Morfologia das fraturas dos filmes de PLGA e PHB.....	37
Figura 7 – Morfologia da blenda 50:50.....	38
Figura 8 – Curvas de DRX dos filmes.....	39
Figura 9 – Espectro de infravermelho do PLGA.....	42
Figura 10 – Espectro de infravermelho do PHB.....	43
Figura 11 – Espectro de infravermelho dos filmes obtidos.....	45
Figura 12 – Curvas da TGA dos filmes obtidos.....	47
Figura 13 – Curvas de DSC dos polímeros, PLGA e PHB, puros.....	48
Figura 14 – Curvas de DSC dos filmes de PLGA, PHB e blenda 50:50.....	49
Figura 15 – Viabilidade de células WI-26 VA4 analisada com a metodologia de MTT.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificação dos filmes produzidos e a quantidade de material utilizado em sua produção.....	28
Tabela 2 – Grau de cristalinidade dos filmes e suas blendas.....	38
Tabela 3 – Bandas na região do infravermelho para o PLGA e seus respectivos grupos químicos.....	39
Tabela 4 – Bandas na região do infravermelho para o PLGA e seus respectivos grupos químicos.....	41
Tabela 5 – Tonset das amostras estudadas.....	43
Tabela 6 – Resultado da TGA para análise do comportamento térmico (desidratação e decomposição) das amostras dos diferentes filmes obtidos.....	44
Tabela 7 – Resultados da DSC para o PLGA e PHB (matérias-primas e literatura)..	48
Tabela 8 – Resultados da DSC para o PLGA, PHB e blenda 50:50.....	50
Tabela 9 – Tensão máxima de tração e percentual de alongamentos dos filmes.....	50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Procedimentos para obtenção das blendas.....	29
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DSC	Calorimetria diferencial de varredura
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difração de raios X
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	(3-(4, 5-dimethylthiazolone-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide)
PGA	Poli (ácido glicólico)
PLGA	Poli (ácido lático- co -ácido glicólico)
PLA	Poli (ácido lático)
PHB	Poli (3-hidroxibutirato)
PHAs	Poli (hidroxialcanoatos)
Tg	Temperatura de transição vítrea
Tm	Temperatura de fusão
TGA	Análise termogravimétrica
ETO	Óxido de etileno
Ra	Rugosidade média

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS: GERAL E ESPECÍFICOS.....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 Biomateriais.....	18
3.2 Polímeros biodegradáveis e biomateriais.....	19
3.3 Poli (3 hidroxibutirato) – PHB.....	22
3.4 PLGA.....	24
3.5 Blendas.....	25
3.6 Biocompatibilidade e ensaios de citotoxicidade.....	27
4 METODOLOGIA.....	29
4.1 Fluxograma.....	29
4.2 Análise estatística.....	30
4.3 Materiais.....	30
4.3.1 PLGA.....	30
4.3.2 PHB.....	30
4.3.3 Clorofórmio.....	30
4.4 Preparo dos filmes.....	30
4.4.1 Filmes puros de PLGA.....	31
4.4.2 Filmes puros de PHB.....	32
4.4.3 Blendas de PLGA e PHB.....	32
4.5 Caracterização físico-química dos filmes.....	33
4.5.1 Análise morfológica dos filmes.....	33
4.5.2 Análise dos parâmetros de cristalinidade dos filmes por difração de raios x (DRX).....	33
4.5.3 Análise dos grupos químicos dos filmes (FTIR).....	34
4.5.4 Caracterização do comportamento térmico dos filmes.....	34
4.5.5 Caracterização das propriedades mecânicas dos filmes (Ensaio de tração).....	35
4.6 Ensaio biológico.....	36

4.6.1 Análise da viabilidade celular por MTT.....	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1 Caracterização físico-química dos filmes.....	38
5.1.1 Análise morfológica dos filmes.....	38
5.1.2 Análise dos parâmetros de cristalinidade dos filmes por difração de raios x (DRX).....	40
5.1.3 Análise dos grupos químicos dos filmes (FTIR).....	42
5.1.4 Caracterização do comportamento térmico dos filmes.....	47
5.1.5 Caracterização das propriedades mecânicas dos filmes (Ensaio de tração).....	51
5.2 Ensaio biológico.....	52
5.2.1 Análise da viabilidade celular por MTT.....	52
6 CONCLUSÕES.....	56
7 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ANEXO 1 – Dados físicos do PLGA 80:20.....	63
ANEXO 2 – Dados físicos do PHB.....	64
ANEXO 3 – Dados físico-químicos do clorofórmio.....	65

1. INTRODUÇÃO

Um biomaterial pode ser definido como sendo um material destinado a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, ampliar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo (WILLIAMS, D.F. 1999). Os biomateriais desempenham um importante papel na saúde humana, sendo os polímeros como, por exemplo, o silicone, o poliuretano, os poliésteres alifáticos e os polihidroxialcanoatos, os principais materiais desse grupo. De acordo com suas propriedades de degradação, os polímeros utilizados como biomateriais podem ser classificados como biodegradáveis ou não biodegradáveis (TIAN, H. et al., 2012).

A utilização de biomateriais bioreabsorvíveis na área médica tem aumentado a cada ano. Dentre estes biomateriais destacam-se os polímeros a base do poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico), PLGA e do poli (3-hidroxi-butirato), PHB, cujas principais características são apresentar curto tempo de degradação e por isso, são aplicados em dispositivos para liberação controlada de medicamentos, suturas, e/ou na regeneração guiada de tecido, dentre outros. Em sistemas não degradáveis existe a necessidade da retirada do dispositivo do organismo, enquanto os sistemas degradáveis são convertidos em substâncias biologicamente compatíveis que excluem a necessidade de um procedimento cirúrgico para a retirada desse dispositivo. É de grande importância que os polímeros, bem como os seus produtos de degradação sejam biocompatíveis e não tóxicos. A utilização de sistemas biodegradáveis, para aplicações temporárias, são os mais indicados, pois evitam implicações indesejadas como o alto custo referente aos procedimentos cirúrgicos, aumento do risco de infecções e um menor tempo de observação que são relacionadas quando há retirada de um implante (VOOREN, 2012).

O estudo de materiais poliméricos sintéticos (artificiais) biodegradáveis tem sido focado no desenvolvimento de dispositivos terapêuticos como próteses temporárias, *scaffolds* tridimensionais porosos para engenharia de tecidos bem como para aplicações farmacológicas, como liberação controlada de fármacos. Algumas aplicações atuais dos polímeros biodegradáveis incluem (1) grandes implantes,

como parafusos ósseos, placas ósseas e reservatórios de contraceptivos, (2) implantes pequenos, como grampos, linhas de sutura e nano ou micro veículos de liberação de fármacos, (3) membranas finas ou filmes para guiar a regeneração de tecidos e (4) malhas multifilamentosas ou estruturas porosas para engenharia de tecidos (VERT, M. 2005).

O critério geral aplicado para a seleção de materiais poliméricos utilizados em dispositivos médicos incluem propriedades mecânicas e tempo de degradação apropriado para o propósito médico. Esses materiais também não devem causar respostas imunes ou tóxicas, além de serem metabolizados pelo organismo após o cumprimento de suas funções. O conhecimento sobre as propriedades dos materiais é essencial por causa de sua influência sobre o resultado biológico, biocompatibilidade e toxicidade do dispositivo. Existe hoje uma grande variedade de polímeros, sintéticos e naturais, que estão sendo utilizados para fins médicos (BARBANTI et al., 2005; TIAN, H. et al., 2012; GHANBARZADEH, 2013).

Recentemente, os avanços na engenharia de tecidos, medicina regenerativa, terapia gênica e liberação controlada de fármacos aumentaram a necessidade do aprimoramento das propriedades dos biomateriais. Cada tipo diferente de aplicação desses materiais requer propriedades específicas, como por exemplo, os *scaffolds* que devem possuir uma boa biocompatibilidade, favorecer a adesão celular além de possuir uma degradação controlada, ou seja, controle do tempo e produtos gerados nesse processo (TIAN, H. et al , 2012).

O PLGA ((poli L-ácido láctico-co-ácido glicólico)), obtido por meio da copolimerização aleatória de PLA e PGA, é bastante investigado para aplicações biomédicas e vem sendo utilizado em dispositivos carreadores e com liberação controlada de fármacos, engenharia de tecidos, *scaffolds* e implantes em geral (MIDDLETON, J.C., TIPTON, A.J. 1998; PORJAZOSKA et al., 2004; BARBANTI et al., 2005). Uma vantagem particular é que, pelo fato de o PLA e PGA possuírem propriedades muito diferentes, a escolha cuidadosa da composição do copolímero permite a otimização do PLGA para as aplicações previstas, ou seja, de acordo com as diferentes composições e a aplicação desejada pode-se variar tempo de

degradação e as propriedades mecânicas. Por exemplo, um aumento na proporção da quantidade de PGA em relação ao PLA pode acelerar o tempo de degradação do PLGA (KOTSAR, A. et al., 2008; GHANBARZADEH, 2013). A importância ainda de se estudar esses materiais se justifica pelo fato de que o processo de degradação por hidrólise geram produtos metabólicos que são absorvidos pelo organismo, tais como o ácido láctico e ácido glicólico. Dessa forma, o PLGA se apresenta em geral altamente biocompatível e atóxico com vários tecidos, além de ser facilmente processado em diferentes dispositivos (MANO et al., 2004).

Os poli-hidroxicanoatos são poliésteres biodegradáveis, que podem ser produzidos por duas vias: as sintéticas e as bacterianas. No caso, a via bacteriana foi utilizada para obtenção do polímero mais comum dessa família o poli (3-hidroxiбутирато) (ou PHB). A biossíntese desse polímero por fermentação aeróbica (bactéria do gênero *alcalígeno*) seguida de extração e purificação gera um polímero isotático e semicristalino. Neste trabalho optou-se pelo uso do polímero biológico (pureza de 99%), com processamento através de solvente natural (vide instrução de uso no apêndice - PHB Industrial - **Biocycle®**) devido sua biocompatibilidade, facilidade de processamento e a degradação que tornam o PHB um excelente candidato também para o uso em engenharia de tecidos (ULERY, et al., 2011).

Tanto o PLGA quanto o PHB são polímeros reabsorvíveis e produzem ácidos com o decorrer de sua degradação. Os seus produtos de degradação são reabsorvidos e excretados e, portanto, não acumulam no organismo (VOOREN, 2012; SIONKOWSKA et al., 2011).

A obtenção de blendas ou misturas mecânicas entre dois polímeros biodegradáveis pode ser utilizada de forma eficaz na modificação das propriedades físicas e mecânicas desses (FWU-LONG, M., et al., 2002). Nesse trabalho obtiveram-se filmes a partir de blendas de PHB e PLGA, estes filmes foram caracterizados físico-quimicamente, e ainda foram avaliadas suas características biológicas e biocompatibilidade.

Com tais controles das propriedades, as aplicações clínicas do PLGA, PHB ou suas blendas têm aumentado expressivamente nos últimos anos, em especial no campo da ortopedia como dispositivos para fixação de fraturas na região crânio-maxilofacial, suportes diversos para crescimento celular e dispositivo para liberação controlada de medicamentos. Além destas aplicações das blendas de PLGA/PHB, em especial na forma de membranas, também tem indicação em stents urológicos e na regeneração guiada de tecido osteocondrais ou tecidos epidérmicos (Jain et al., 2000; QUENTAL et al., 2010).

Os objetivos deste trabalho foram produzir, caracterizar e estudar a resposta citológica dos filmes puros e blendas destes materiais. A técnica de processamento secagem do solvente permitiu sintetizar filmes puros de PLGA e PHB, além das blendas (50:50, 70:30 e 90:10, respectivamente). A estrutura e topografia desses materiais foram confirmadas através análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios-X (DRX) e espectroscopia de infravermelho (FTIR). As propriedades térmicas foram estudadas por DSC, sendo ratificado também através do estudo "in vitro" (ensaio de MTT) das membranas que todos os materiais não são citotóxicos.

2. OBJETIVOS: GERAL E ESPECÍFICOS

2.1. Objetivo geral

Produzir, caracterizar fisicoquimicamente e avaliar a biocompatibilidade de filmes poliméricos obtidos a partir de blendas de PLGA e PHB.

2.2. Objetivos específicos

- Obter filmes puros de PLGA e PHB e suas blendas com diferentes concentrações dos polímeros através da técnica de *solvent casting* ou evaporação de solvente.
- Caracterizar a composição química e estrutural dos filmes obtidos mediante as técnicas:
 - microscopia eletrônica de varredura (MEV),
 - espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR),
 - difração de raios X (DRX),
- Avaliar o comportamento térmico através da análise termogravimétrica (TGA) e da calorimetria diferencial de varredura (DSC).
- Avaliar as propriedades mecânicas através do ensaio de tração dos filmes
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro*, por contato direto, utilizando o ensaio colorimétrico de redução do brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biomateriais

No campo científico das áreas relacionadas à engenharia de tecidos e medicina regenerativa, um biomaterial é definido como sendo uma substância ou material que foi projetado para assumir uma forma que, tanto sozinho ou como parte de um sistema complexo, é utilizado para direcionar, pelo controle das interações com os componentes dos sistemas vivos, o curso de qualquer sistema terapêutico ou de diagnóstico. Em outras palavras, um biomaterial é utilizado para substituir ou auxiliar na função do tecido enquanto em contato com ele, quer internamente, quer externamente (CHEN, Q. et al, 2013; WILLIAMS, D.F. 1999).

A utilização dos biomateriais em determinados tecidos exige um estudo minucioso que vai desde o local do organismo onde será utilizado, o tipo de material a ser utilizado em sua confecção, a tecnologia de obtenção do material e o processo de confecção do produto final (GHANBARZADEH, 2013). Esses fatores podem alterar requisitos imprescindíveis a um biomaterial, uma vez que este é desenvolvido para ser utilizado em contato íntimo com o tecido vivo e é essencial que o material implantado não cause qualquer efeito prejudicial aos tecidos do hospedeiro e órgãos. O maior desses requisitos é sem dúvida a biocompatibilidade do mesmo com o tecido a ser implantado, ou seja, ele deve permitir o crescimento das células e sua adesão bem como seu funcionamento normal e produzir com isso uma resposta imunológica insignificante (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006; O'BRIEN, 2011; CHEN, Q. et al, 2013).

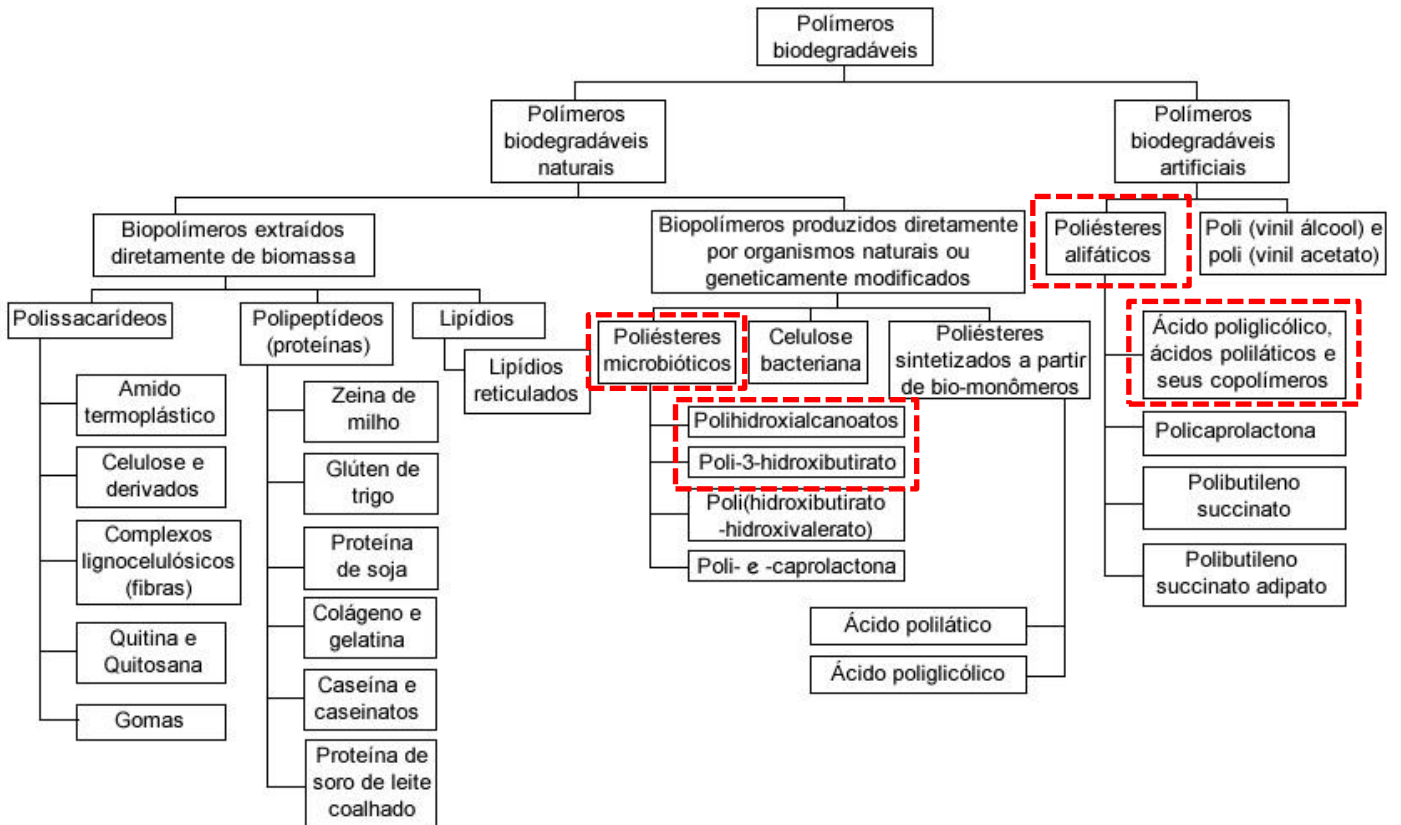
Com o intuito de atender às necessidades da comunidade biomédica, materiais metálicos, cerâmicos e poliméricos têm sido pesquisados. Entre eles, os polímeros possuem um grande potencial principalmente pela flexibilidade existente na química que possibilita através da síntese desses materiais uma grande diversidade de propriedades físicas e mecânicas. Polímeros degradáveis são os de maior interesse, pois esses biomateriais são capazes de ser degradados e excretados ou reabsorvidos sem remoção ou revisão cirúrgica (ULERY, 2011).

Algumas das propriedades mais importantes que são esperadas em biomateriais biodegradáveis são (1) o material não deve causar uma resposta tóxica ou inflamatória quando implantado no corpo; (2) deve ter uma duração aceitável, sendo essa variável de acordo com a aplicação; (3) seu tempo de duração funcional deve ser compatível com o processo de cura ou de regeneração; (4) deve ter propriedades mecânicas apropriadas para a aplicação indicada e a variação dessas propriedades ao longo da degradação do material deve ser compatível com o processo de cura ou regeneração; (5) os produtos da degradação devem ser não tóxicos, metabolizáveis pelo organismo e de fácil excreção e (6) deve apresentar a permeabilidade e processabilidade adequadas à aplicação intencionada (LLOYD, A.W. 2002).

3.2. Polímeros biodegradáveis e biomateriais

Os polímeros biodegradáveis podem ser classificados de acordo com sua composição química, origem e método de síntese, método de processamento, importância econômica, aplicação, etc. A classificação esquemática dos polímeros de base biológica baseada em suas origens e aos métodos de produção, está representada na Figura 1 (GHANBARZADEH, B., ALMASI, H., 2013).

Figura 1 - A classificação esquemática dos polímeros de base biológica baseada em suas origens e aos métodos de produção.



Fonte: GHANBARZADEH, B., ALMASI, H., 2013. Os retângulos vermelhos evidenciam os polímeros utilizados nesse trabalho.

Os biomateriais desempenham um importante papel na área da saúde, sendo os polímeros, tanto sintéticos como naturais, os principais materiais desse grupo. De acordo com suas propriedades de degradação, os polímeros utilizados como biomateriais podem ser classificados como biodegradáveis ou não biodegradáveis (NAIR, L.S., LAURENCIN, C.T. 2007).

Os polímeros biodegradáveis são utilizados principalmente como grandes implantes (parafusos ósseos e placas ósseas), linhas de sutura, veículos de liberação de fármacos, membranas finas ou filmes para a regeneração de tecidos e também na engenharia de tecidos. Os estudos desenvolvidos com esses polímeros biodegradáveis têm sido focados no desenvolvimento de dispositivos como próteses temporárias, *scaffolds* tridimensionais para engenharia de tecidos bem como para

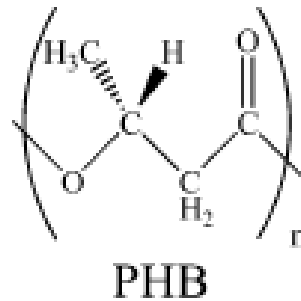
aplicações farmacológicas, como liberação controlada de fármacos (VERT, M. 2005).

Atualmente, os avanços na engenharia de tecidos, medicina regenerativa, terapia gênica e liberação controlada de fármacos promoveram a necessidade de novas propriedades de biomateriais como a biodegradabilidade. Os polímeros biológicos e os sintéticos têm atraído atenção dos pesquisadores, porém, para aplicações médicas, os sintéticos tornaram-se uma alternativa atrativa, pois, apesar da maioria dos polímeros de origem biológica apresentar uma boa biocompatibilidade, algumas podem desencadear uma resposta imunológica no corpo humano. Essa resposta pode ser minimizada através da utilização de um biomaterial polimérico sintético apropriado (TIAN, H. et al., 2012).

O critério geral para a escolha dos materiais poliméricos utilizados em dispositivos médicos incluem propriedades mecânicas adequadas ao tipo de aplicação e tempo de degradação apropriado para o propósito médico. Esses materiais também não devem causar respostas imunes ou tóxicas, além de serem metabolizados pelo organismo após o cumprimento de suas funções. Apesar de existirem muitos polímeros que têm sido desenvolvidos e utilizados para fins médicos, o grupo dos polímeros alifáticos e dos polihidroxicanoatos (PHAs) são ainda muito explorados por causa das propriedades encontradas em seus componentes, dentre esses polímeros encontram-se o PLGA e o PHB. O grande interesse na utilização desses está no fato de que os seus produtos de degradação são reabsorvidos e excretados e, portanto, não acumulam no organismo (VOOREN, 2012; TIAN, H. et al., 2012).

3.3. Poli (3-hidroxiacetato) - PHA

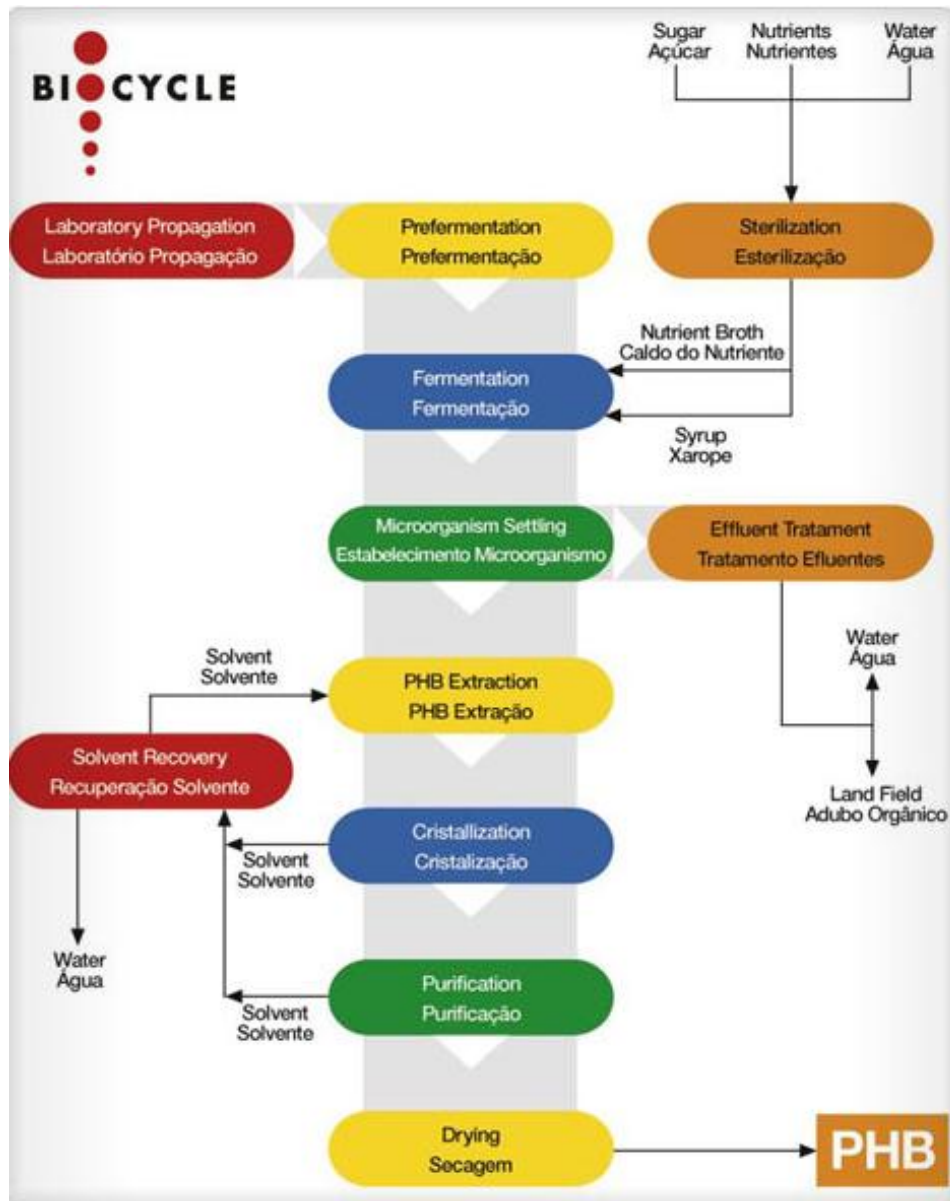
O poli (3-hidroxiacetato), figura 2, é o polímero mais comum da família dos polihidroxicanoatos (PHAs) (ULERY et al., 2011). Os PHAs são poliésteres produzidos naturalmente por uma variedade de microrganismos, incluindo bactérias gram-negativas e gram-positivas, ocorre geralmente sob condições de limitação de nutrientes. (CHEN, Q. et al, 2013).

Figura 2 - Estrutura do PHB.

Fonte: FURUKAWA, T. et al., 2005.

Esse poliéster linear é sintetizado e catabolizado por numerosos organismos e por esse motivo, não surpreende o fato de ser biodegradável. O PHB é acumulado por várias bactérias, onde serve como reserva intracelular de carbono e fonte de energia em casos onde há escassez externa de carbono. A produção do PHB pode ser realizada através de um processo biossintético (Figura 3) que é baseado na fermentação de açúcares por bactérias *Alcaligenes eutrophus*. O PHB, como a maioria dos outros PHAs, é altamente cristalino, quebradiço e relativamente hidrofóbico (QUENTAL, et al., 2010; PHB INDUSTRIAL, 2014, FURUKAWA, T. et al., 2005).

Figura 3: Fluxograma de produção do PHB.



Fonte: PHB Industrial, 2014.

E são suas propriedades físicas e mecânicas alguns dos fatores que limitam a utilização do PHB, pois são consideradas inferiores as de seus copolímeros. O polímero tem uma polidispersão estreita e um grau de cristalinidade, da ordem de 50%. Este elevado grau de cristalinidade torna o polímero muito frágil. PHB tem a Tg em torno de 5°C e a temperatura de fusão depende de sua composição, podendo variar de 160°C a 180°C. (GHANBARZADEH, B., ALMASI, H., 2013; QUENTAL, et al., 2010; PHB INDUSTRIAL, 2014).

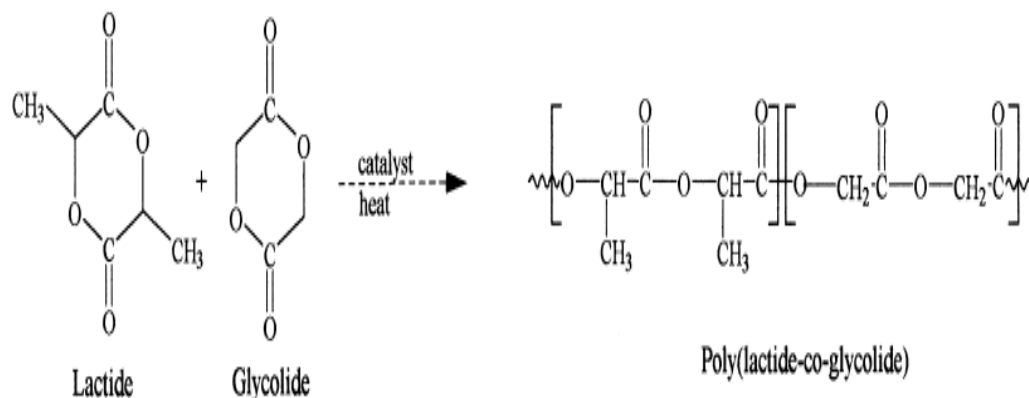
Por causa das suas propriedades, estudos como a produção de filmes com orientação das cadeias poliméricas e até mesmo a produção do PHB com estruturas não convencionais a fim de gerar novas propriedades (resistência mecânica e controle de degradação) em aplicações clínicas diversas. Apesar disso sabe-se que filmes produzidos pela metodologia de evaporação do solvente, muito utilizada, são geralmente bastante frágeis e a orientação das cadeias poliméricas são difíceis de ser reproduzida de forma consistente. A alta cristalinidade do PHB é também um obstáculo à sua aplicação na área médica, uma vez que ela diminui a sua taxa de absorção pelo organismo (QUENTAL, et al., 2010; LUTKE-EVERSLOH, et al., 2001; GHANBARZADEH, B., ALMASI, H., 2013).

O principal produto de sua degradação é o ácido 3-hidroxibutírico que ocorre naturalmente no corpo humano, o que torna a utilização desse polímero como biomaterial favorável (VOOREN, 2012). E por causa disso o PHB possui uma baixa toxicidade e tem sido estudado para a utilização em válvulas cardíacas, pele artificial, dispositivos com liberação controlada de drogas, implantes, entre outros. Já foram estudadas ou estão em desenvolvimento a aplicação dos filmes de PHB em remendos gastrointestinais e neurais para cobrir grandes lesões abertas e também na cobertura de feridas (SODIAN et al., 2000; GHANBARZADEH, B., ALMASI, H., 2013; CHEN, Q. 2013).

3.4. PLGA

O PLGA (poli L-ácido láctico-co-ácido glicólico), obtido a partir da copolimerização aleatória do PLA (ácido poli-láctico) e PGA (ácido poli-glicólico) (Figura 4), é o polímero biodegradável mais investigado para aplicações biomédicas e tem sido utilizados em suturas, dispositivos para liberação de fármacos e engenharia de tecidos (ULERY, 2011).

Figura 4 - Síntese de poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico), (PLGA).



Fonte: MIDDLETON, J.C. (2000).

Diferentes formas de PLGA podem ser obtidas de acordo com as proporções dos monômeros constituintes, por exemplo, o PLGA 80:20 é composto de 80% de ácido láctico e 20% de ácido glicólico. Devido à existência de diferentes copolímeros, estes podem possuir diferentes níveis de amorfismo e/ou baixa cristalinidade. O tempo de degradação está relacionado com proporção das unidades de PLA e PGA. Quanto maior a quantidade de PGA, menor o tempo requerido para a degradação. A degradação do PLGA ocorre através da hidrólise de suas ligações éster e têm como produto os monômeros de ácido láctico e ácido glicólico, estes podem ser eliminados do organismo através de vias metabólicas (VOOREN, 2012).

Além da degradação, a resistência mecânica, o comportamento de inchamento, a capacidade de se submeter à hidrólise do polímero também são diretamente influenciados pelo grau de cristalinidade do PLGA, que é dependente do tipo e da razão molar dos componentes de monômero na cadeia de copolímero (ULERY, 2011; MAKADIA, et al., 2011).

3.5. Blendas

A fim de ajustar as propriedades dos biopolímeros para a aplicação desejada, uma ampla variedade de procedimentos é utilizada para a modificação, tal como a utilização de plastificantes, a incorporação de cargas e reforços de mistura e de

modificação de impacto. O objetivo da mistura pode ser a melhoria ou ajuste de propriedades para uma determinada aplicação. Os objetivos mais comuns são: a redução de custos, a melhoria das propriedades mecânicas em geral ou a diminuição da sensibilidade à água. As misturas de polímeros podem formar sistemas miscíveis, imiscíveis ou parcialmente miscíveis, dependendo da segregação de fase e as interações entre os componentes poliméricos. Uma boa miscibilidade pode levar a uma mistura de polímeros uniforme, com propriedades físicas desejadas ou melhoradas (TANADCHANGSAENG, N., YU, J. 2013; IMRE, 2013).

Os termos relacionados à miscibilidade (miscível e imiscível) referem-se às propriedades intrínsecas do par polimérico, formando sistemas homogêneos ou não. Já os termos referentes à compatibilidade (compatível e incompatível) referem-se às características de desempenho do material, não importando a sua morfologia. Se a combinação das propriedades é vantajosa e corresponde a expectativa, a compatibilidade dos polímeros em questão é boa, e eles são incompatíveis quando as propriedades não são aceitáveis. A compatibilidade pode ser modificada, enquanto a miscibilidade não, pois essa é uma propriedade termodinâmica intrínseca do sistema (AKCELRUD, L. 2007).

Similarmente aos polímeros de engenharia e de mercadorias, a maior parte das combinações de biopolímeros é apenas parcialmente miscível, formando misturas com estrutura heterogênea. As propriedades de todos os sistemas poliméricos heterogêneos, incluindo partículas de polímeros preenchidos, compósitos reforçados com fibras e misturas são determinados por quatro fatores: propriedades dos componentes, composição, estrutura e interações. As interações químicas são muito importantes em blendas do que em outros materiais poliméricos heterogêneos, uma vez que elas determinam a solubilidade recíproca das fases, a espessura e as propriedades da interfase formada durante a mistura e a estrutura da mistura (SANTOS, 2009; IMRE, 2013).

De acordo com Sionkowska (2011), a miscibilidade dos componentes é um aspecto importante na determinação das propriedades das blendas e existem técnicas

simples, rápidas e de baixo custo para o estudo e avaliação da miscibilidade. Entre essas técnicas estão a utilização da calorimetria exploratória diferencial (DSC) para a determinação dos números de temperaturas de transição vítrea (T_g), a viscosimetria e também a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR.)

Apesar da pouca literatura sobre blendas entre PLGA e PHB, é possível encontrar vários estudos sobre blendas de PLA e PHB. A partir desses artigos foi possível desenvolver uma matriz de experimentos para processamento e avaliação das propriedades físico-química e biológica dessas blendas.

3.6. Biocompatibilidade e ensaios de citotoxicidade

De acordo com WILLIAMS, D.F. 1999, biocompatibilidade é a propriedade que um material possui de estabelecer uma resposta adequada no hospedeiro em determinada aplicação. Em alguns trabalhos a biocompatibilidade do biomaterial é classificada de acordo com a sua capacidade de induzir: uma morte celular ou de tecidos (citotoxicidade); a formação de câncer (carcinogenicidade); danos aos genes (mutagenicidade); respostas imunes (pirogenicidade e alergenicidade) ou induzir a coagulação sanguínea (trombogenicidade) (CHEN, Q. et al, 2013).

A análise da biocompatibilidade consiste em uma sequência de ensaios e inclui testes “in vitro” (usando células e tecidos), testes “ex vivo” (quando necessário), modelos animais e estudos clínicos (3 fases distintas). Várias diretrizes e procedimentos foram criados para esta finalidade, por exemplo: organizações padrões nacionais e internacionais (como a Sociedade Americana para Testes de Materiais, da sigla em inglês ASTM), organizações internacionais (como a Organização Internacional para Padronização, da sigla em inglês ISO), e agências federais internacionais (como a FDA e Instituto Nacional de Saúde, da sigla em inglês NIH). Os ensaios “in vitro” utilizando cultura de células foram utilizados com sucesso para avaliar a citotoxicidade de biomateriais. O modelo celular “in vitro” proporcionou uma alta versatilidade para analisar os aspectos primordiais da

biocompatibilidade de biomateriais. Certamente, este modelo é muito útil para se estudar funções (e/ou mecanismos pertinentes) de uma linhagem celular por um período de tempo; contudo, tal procedimento proporciona uma visão limitada da complexa relação celular, biomacromoléculas no meio fisiológico. As células utilizadas são de culturas permanentes de linhagens provenientes de bancos de células (L-929, SaoS-2, HOB, CHO-K1, Vero, etc). Geralmente são preferíveis linhagens celulares permanentes na realização de crescimento “in vitro”, devido a sua maior reprodutibilidade e menor variabilidade nos resultados, no entanto, cultura de células primária também são utilizadas, apesar de apresentarem uma menor reprodutibilidade, eficiência e em alguns casos, disponibilidade limitada. As linhagens de fibroblasto de camundongo (L929) são muito utilizadas em ensaios de biomateriais, devido a sua fácil manutenção de cultura e produziu resultados que possuem alta correlação com os sistemas biológicos reais. Além disso, os fibroblastos são escolhidos por ser células que estão presentes em ferimentos e o principal tipo celular presente na regeneração tecidual.

Os 3 (três) principais ensaios com célula são utilizados para analisar a citotoxicidade (indícios de biocompatibilidade): contato direto, difusão em ágar e extração celular. Estes ensaios diferem na maneira com o que os materiais são expostos ou colocados em contato direto com as células. Para padronizar estes ensaios e comparar os resultados, as variáveis tais como taxa de crescimento celular, tipo de célula, duração do ensaio, tamanho da amostra para ensaio ou área superficial de ensaio devem ser cuidadosamente controlados. A escolha das linhagens celulares se baseia no tipo de análise que será realizada (viabilidade, atividade enzimática, receptores específicos, etc). Para validação dos ensaios são necessários controles positivos e negativos. A metodologia para ensaios com cultura de células primária são descritos pela U.S. Pharmacopeia, padronizado pela ASTM (Sociedade Americana para Testes de Materiais), ISO (Organização Internacional para Padronização) e pelo Instituto Padronização Inglesa (do inglês BSI).

O termo citotoxicidade significa causa de efeitos tóxicos (morte, alterações na permeabilidade da membrana celular, inibição enzimática, etc) a nível celular. Sobretudo o teste de viabilidade celular “in vitro” é utilizado para verificar

citotoxicidade aguda tais como: o LDH (lactato desidrogenase) um marcador de membrana íntegra e o MTT este último foi utilizado neste trabalho, sendo também diversos outros ensaios utilizados para este fim. Estes ensaios são baseados em absorção óptica e análise da diminuição da função celular, detectável por produtos de enzimas específicas que determinam atividades vitais. Os ensaios de citotoxicidade são os ensaios inicialmente utilizados para a avaliação da biocompatibilidade e os ensaios que são utilizados com maior frequência estão presentes na ISO 10993 - 5 que descreve as metodologias incluindo as de contato direto das células e / ou indireta que podem ser escolhidas, dependendo da natureza e da duração do contato do dispositivo com o corpo. Entre esses, estão disponíveis opções para a análise quantitativa e qualitativa da citotoxicidade. A escolha de uma ou mais dessas categorias depende da natureza da amostra avaliada, o local de aplicação e a natureza de seu uso. Esta escolha determina então a preparação das amostras a serem testadas, a preparação de células de cultura, e a forma em que as células são expostas às amostras ou aos seus extratos (ISO 10993 - 5, 2009).

Esses ensaios são utilizados como a avaliação inicial, pois oferecem uma possibilidade, com um custo reduzido, de avaliar novos materiais desenvolvendo um protocolo eficaz, capaz de diminuir assim a probabilidade de insucessos quando dos ensaios *in vivo* em animais e/ou estudos clínicos realizados posteriormente. Outra vantagem da realização desses ensaios é que são relativamente de rápida realização, porém também por esse motivo, são capazes de medir apenas os efeitos limitados do material sobre as células durante as primeiras 12-24 horas após a exposição a substâncias tóxicas (HANKS, C.T. et al. 1996).

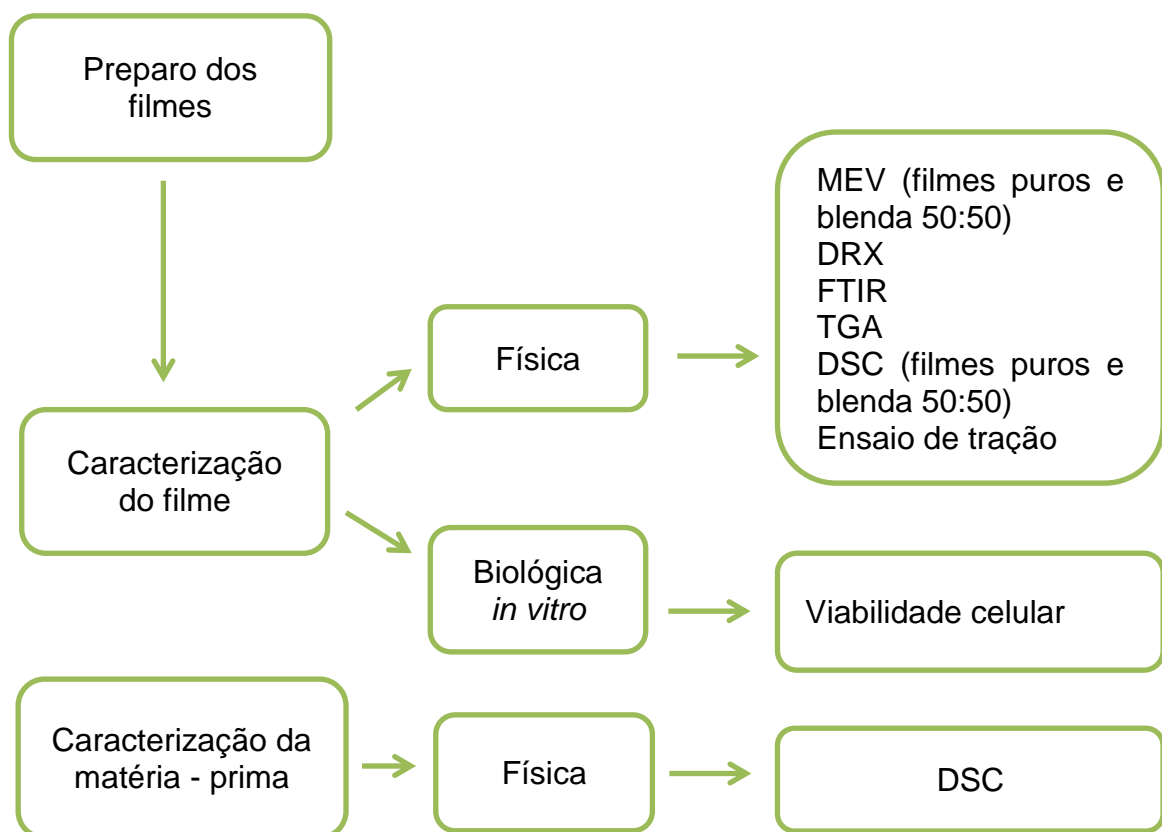
O ensaio de MTT é um método desenvolvido para avaliar a viabilidade celular verificando a atividade de uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase. Trata-se de um ensaio colorimétrico, baseado no uso de sal, o brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5- difeniltetrazólio (MTT), em que este é reduzido apenas por atividade das mitocôndrias em células viáveis. A redução do MTT, da cor amarelada, para a azul de formazana ocorre com padrões comparações com os controles em função dos níveis de células viáveis na amostra, sendo sua densidade diretamente proporcional ao número de células presentes.

4. METODOLOGIA

4.1. Fluxograma

Neste trabalho de pesquisa buscou-se desenvolver uma rota de síntese de blendas de PLGA e PHB e avaliar o seu potencial uso na área de saúde. Para esta finalidade, foi proposta uma matriz dos experimentos visando otimizar a produção dos filmes e a posterior caracterização desse material. Etapas destes procedimentos experimentais podem ser observadas no fluxograma da Figura 5 abaixo.

Figura 5 - Fluxograma das etapas do trabalho.



Legenda: MEV: microscopia eletrônica de varredura; DSC: Calorimetria exploratória diferencial; TGA: análise termogravimétrica; DRX: difração de raios x; FTIR: espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier.

4.2. Análise Estatística

As variáveis quantitativas foram descritas através da média e desvio padrão. Utilizaram-se as ferramentas ANOVA *One Way* para comparação entre os grupos. Os resultados foram apresentados em gráficos e tabelas. O nível de significância adotado foi de 5% ($< 0,05$).

4.3. Materiais

4.3.1. O (poli L-ácido láctico-co-ácido glicólico) ou PLGA foi adquirido na empresa PURAC Biochem by Gorinchem (Holanda, 2010). A proporção entre os monômeros constituintes do polímero utilizado é 80:20 (80% de ácido láctico e 20% de ácido glicólico). Os dados físico-químicos deste material particulado fornecidos pela empresa encontram-se no anexo 1.

4.3.2. Poli (3-hidroxibutirato) ou PHB foi fornecido pelo Departamento de Química do CEFET-MG. Esse polímero, na forma de material particulado, foi fabricado pela empresa PHB Industrial através de uma rota de síntese utilizando a fermentação seguida de purificações do produto e tem como nome comercial Biocycle (Brasil, 2011). Os dados físico-químicos deste material encontram-se no anexo 2.

4.3.3. Clorofórmio P.A. produzido pela empresa Synth® (Brasil, 2013), foi utilizado como solvente para a dissolução dos polímeros para a produção dos filmes e blendas. Os dados físico-químicos deste solvente fornecidos pela empresa encontram-se no anexo 3 .

4.4. Preparo dos filmes

Foram produzidos filmes finos (com espessura menor que 400 μm) tanto com os polímeros puros de PLGA e PHB quanto de suas blendas obtidas através da técnica de evaporação de solvente (ou *solvent casting*). A identificação desses filmes poliméricos foi realizada de acordo com 3 (três) proporções relativas de massas dos

materiais utilizados em sua produção, sendo identificadas estas misturas na Tabela 1.

Tabela 1: Identificação dos filmes produzidos e a quantidade de materiais utilizada em sua produção.

Identificação	Blendas	Massa utilizada	
	Concentrações	PLGA/g	PHB/g
A	PLGA 100%	1,0	-
B	PHB 100%	-	1,0
C	50%PLGA – 50%PHB (50:50)	1,0	1,0
D	70%PLGA – 30%PHB (70:30)	1,4	0,6
E	90%PLGA – 10%PHB (90:10)	1,8	0,2

4.4.1. Filmes puros de PLGA

Os filmes de PLGA puro foram obtidos a partir da dissolução de 1g de PLGA 80:20 em 100 mL de clorofórmio sob agitação magnética a temperatura ambiente até a completa solubilização (aproximadamente 3 horas). Em seguida, para acelerar o processo de evaporação do solvente, a solução foi aquecida a 40°C no próprio agitador até a redução pela metade do volume inicial. Em seguida o aquecimento foi interrompido e a solução mantida no béquer para a lenta evaporação do solvente. Durante esse processo de secagem o recipiente foi coberto com uma folha de papel alumínio com pequenos furos, a fim de manter um controle da atmosfera com altos gradientes do solvente promovendo uma uniformização do processo de formação da película além de evitar a contaminação com sujeiras presentes no ar. Com a evaporação do solvente, o filme já formado foi desmoldado e mantido em estufa a 60°C por 24 horas para a completa remoção do solvente residual.

4.4.2. Filmes puros de PHB

Os filmes de PHB puro foram obtidos utilizando o mesmo procedimento para a produção dos filmes puros de PLGA, exceto pelo fato de que a solução polimérica foi vertida em uma placa de petri e não um béquer. Um grama, 1g, do PHB foi dissolvido em 100 mL de clorofórmio sob agitação magnética a 40°C até a completa solubilização do polímero. A solução foi vertida em placa de petri para a formação do filme e esse sistema (placa de petri mais solução polimérica) foi colocado em um recipiente coberto com uma folha de papel alumínio com pequenos furos. Após a evaporação do solvente, o filme foi e mantido em estufa a 60°C por 24 horas para a completa remoção do solvente residual.

4.4.3. Blendas PLGA e PHB

Para a obtenção das blendas, as concentrações por massa foram pré-determinadas, juntamente com a massa a ser pesada de cada polímero, quadro 1. Inicialmente as soluções dos polímeros puros foram produzidas separadamente. Após a completa solubilização, as duas soluções foram misturadas e mantidas sobre agitação magnética por mais 12 horas. Após esse período a solução foi vertida em placa de petri para a evaporação do solvente e formação do filme. Após a evaporação do solvente, o filme foi e mantido em estufa a 60°C por 24 horas para a completa remoção do solvente residual.

Quadro 1 – Procedimentos para obtenção das blendas

Material	Composição das soluções iniciais	Procedimentos (iguais para todas as blendas)
C Blenda 50:50	1,0g de PLGA em 100mL de clorofórmio. 1,0 de PHB em 100mL de clorofórmio.	<ul style="list-style-type: none"> • Solubilização do PLGA em clorofórmio sob agitação magnética; • Solubilização do PHB em clorofórmio sob agitação magnética constante e aquecimento (40°C); • Após completa solubilização dos polímeros, as soluções foram misturadas; • Agitação magnética por mais 12 horas (sem aquecimento); • Para acelerar o processo de evaporação do solvente, a solução foi aquecida a 40°C no próprio agitador até a redução pela metade do volume inicial. • Solução vertida em placa de petri para finalizar a evaporação do clorofórmio • Secagem em estufa a 60°C por 24 horas para a completa remoção do solvente residual.
D Blenda 70:30	1,4g de PLGA em 140mL de clorofórmio. 0,6g de PHB em 100mL de clorofórmio.	
E Blenda 90:10	1,8g de PLGA em 180mL de clorofórmio. 0,2g de PHB em 100mL de clorofórmio.	

4.5. Caracterização físico - química dos filmes

4.5.1. Análise morfológica dos filmes

A análise morfológica dos filmes foi realizada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), no equipamento SHIMADZU SSX-550 através da leitura dos elétrons secundários com uma tensão de aceleração de 15kV, distância de trabalho de 17mm e magnitude de 500 vezes. Para a análise da superfície do filme e da fratura criogênica da secção transversal (empregando o nitrogênio líquido) por MEV, as amostras foram cobertas com uma fina camada de ouro por pulverização catódica ou *sputtering*.

4.5.2. Análise dos parâmetros de cristalinidade dos filmes por difração de raios X (DRX)

Para a determinação das fases cristalinas e do grau de cristalinidade dos filmes, as amostras foram analisadas por difração de raios – X (DRX). A análise dos filmes foi realizada no equipamento SHIMADZU XRD 7000. Os ângulos de varredura utilizados foram de 10° a 70°. O comprimento de onda utilizado foi de 1,5405Å referente a radiação Cu K α . A velocidade de varredura foi de 2°/min com leitura contínua. Os parâmetros de geração dos raios-X foram: corrente excitação de 30 mA e a tensão de aceleração de 40KV.

A análise do grau de cristalinidade foi realizada a partir das áreas do difratograma com respectiva identificação da fração cristalina (AC) e da fração amorfa (AA) e calculadas utilizando o programa Microcal Origin® 7.0. O grau de cristalinidade (GC) foi determinado a partir da Equação 1.

$$GC = \frac{AC}{(AC + AA)} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

4.5.3. Análise dos grupos químicos funcionais dos filmes (FTIR)

A caracterização dos grupos químicos funcionais foi realizada através de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), em equipamento SHIMADZU IR Prestige-21. Para tal análise foi utilizado o modo de transmitância e o modo de reflexão total atenuada na faixa compreendida entre 400 - 4000 cm⁻¹, sendo realizadas essas caracterizações por FTIR em triplicatas.

4.5.4. Caracterização do comportamento térmico dos filmes

Para a realização do estudo de comportamental térmico do filme foi realizada a análise termogravimétrica (TGA) da perda de massa e a calorimetria exploratória diferencial (DSC) com medição das entalpias de reações, sendo realizados ambos ensaios em triplicatas.

Os ensaios de termogravimetria (TGA) foram realizados em um equipamento SII EXSTAR, modelo TG/DTA7200, em atmosfera de nitrogênio (N₂) com vazão de 90mL/min e taxa de aquecimento 10°C/min. As amostras foram depositadas em um cadinho de alumínio e aquecidas na faixa de temperatura compreendida entre 30°C a 400°C.

Nesta análise termogravimétrica o percentual de perda de massa encontrado foi calculado por meio do uso da equação 4, onde MI é a massa inicial de cada etapa, MF é a massa final de cada etapa e M0 é a massa inicial da amostra.

$$\% \text{ de perda de massa} = \frac{MI - MF}{M0} \times 100 \quad (4)$$

Os ensaios de DSC foram realizados de acordo com os parâmetros utilizados por Loo, S. C. J. et al., 2005 onde as amostras, após depositadas cadinho de alumínio, foram aquecidas a uma razão de 10°C.min⁻¹, partindo de 30°C até 200°C, em atmosfera dinâmica N₂, com uma vazão de 50mL.min⁻¹.

Nestes ensaios de DSC as frações dos filmes puros e das blendas foram transferidas para um cadinho de alumínio com tampa furada no centro em inseridas em um equipamento Shimadzu DSC-60.

4.5.5. Caracterização das propriedades mecânicas dos filmes (Ensaio de tração)

Para avaliação das propriedades mecânicas dos diferentes filmes obtidos, foi realizado o ensaio de tração no qual a tensão máxima de tração (σ), módulo de elasticidade (E) foram obtidos em uma máquina de teste universal Shimadzu AG-X 10kN, de acordo com as especificações da ASTM D882/02. Neste ensaio os filmes sob a forma de gravata borboleta com razão mínima de 8 entre largura e espessura, receberam uma tração de 50N com velocidade de ensaio em 5mm/min. A análise foi realizada utilizando 6 amostras de cada filme e calculada suas médias e desvio

padrão. A análise estatística utilizada nessa caracterização foi à análise de variância (ANOVA).

A tensão máxima de tração (σ) foi calculada de acordo com a equação 5, onde F é a força de tração aplicada e A é a área da seção transversal da amostra.

$$\sigma = F/A \quad (5)$$

O alongamento percentual (AL) é a porcentagem de deformação plástica na fratura e foi calculado através da equação 7, onde (l_f) é o comprimento da amostra no momento da fratura e (l_0) é o comprimento original da amostra.

$$AL (\%) = \frac{(l_f - l_0)}{l_0} \times 100 \quad (6)$$

4.6. Ensaio Biológico

Todas as amostras submetidas ao ensaio de citotoxicidade foram previamente esterilizadas por vapor saturado de óxido de etileno (ETO). Os ensaios de caracterização biológica foram realizados no Serviço de Biologia Celular da Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento da FUNED. Serão seguidas as normas referentes, em especial a ISO 10993-5, e respectivamente as melhores técnicas *in vitro* preconizadas para investigação deste biomaterial degradável.

4.6.1. Análise da viabilidade celular por MTT

A análise da viabilidade celular foi realizada através da redução do sal de brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (ou seja, ensaio de MTT). Este ensaio proporciona um modelo simples e eficaz para detectar células vivas sem o uso de elementos radioativos. Foi utilizada para esses ensaios a linhagem celular WI-26 VA4 de fibroblasto de pulmão humano (ATCC CCL-95.1 - células epiteliais pulmonares – *Homo sapiens*). Estas células são do tipo SV40 transformado, com morfologia epitelial e características de cultura celular aderente.

Em placas de poliestireno de 96 poços os 5 materiais analisados foram incubados (quintuplicadas) com meio mínimo essencial de Eagle – EMEM (suplementado com 10% de soro fetal bovino) por 24 horas a temperatura aproximada de 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂). Após esse período foram adicionadas um total aproximado de 50.000 (5 X 10⁴) células a cada poço sendo que destes, uma série de poços não receberam adição de amostras do material sendo o grupo controle celular positivo (C.P) e outra série, além de não terem amostras do material testado, receberam a adição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), sendo portanto o controle negativo (C.N.).

As placas foram novamente mantidas a temperatura de 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Passadas às 24 horas o meio é retirado da placa e lavado com PBS 1X (100 µl/poço). O MTT (5mg/mL), adicionado logo em seguida, foi primeiramente diluído (1mL) em 9 mL de meio EMEM com 1% de soro fetal bovino (SFB) e 100ul dessa solução foram distribuídos em cada poço. As placas serão incubadas por 3 horas a 37°C. Após a retirada das placas da estufa, as mesmas foram centrifugadas a 1000rpm por 10 minutos para a precipitação do formazan. O meio com MTT foi aspirado e adicionou-se 50µl de DMSO para a solubilização do formazan. Para avaliação da viabilidade celular as absorbâncias dos poços com os cristais de formazan já diluídos foram mensuradas (550nm), com um leitor de microplacas Spectramax M5e (Molecular Devices, USA) e a viabilidade calculada através da seguinte equação 8.

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{\text{Absorbância}_{550\text{nm}} \text{ dos poços de células tratadas}}{\text{Absorbância}_{550\text{nm}} \text{ do controle de vida}} \quad (7)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

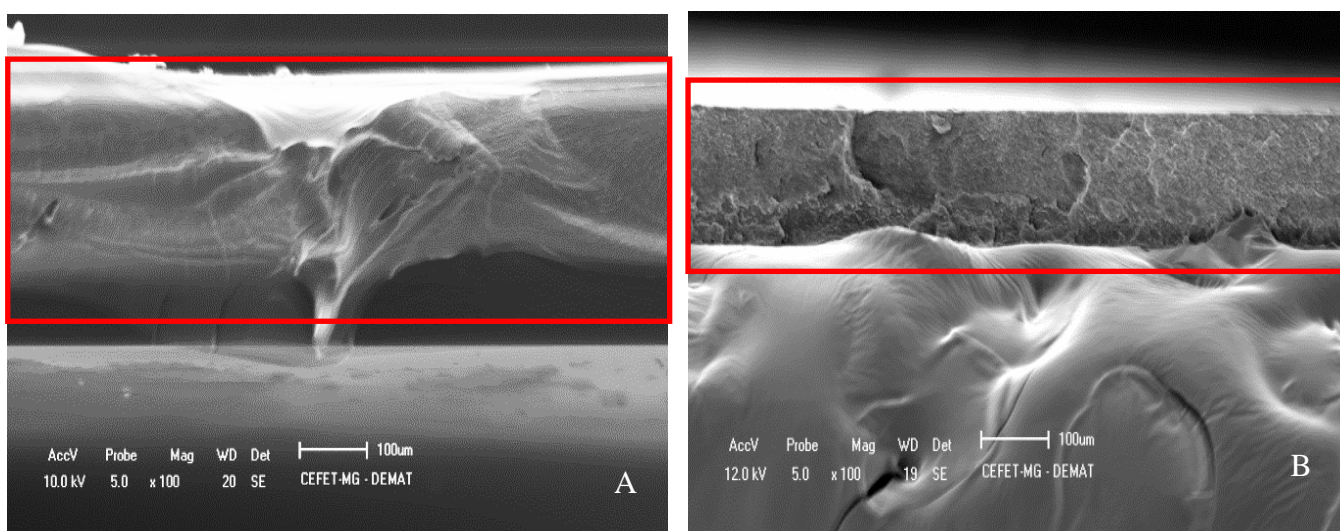
5.1. Caracterização físico-química dos filmes

As análises físico-químicas estão representadas abaixo e referem-se aos filmes puros dos materiais e as blendas estudadas.

5.1.1. Análise morfológica dos filmes

Estão evidenciadas na figura 6 as secções da fratura por resfriamento em N₂ líquido do filme puro de PLGA e da fratura mecânica do filme puro de PHB. É possível observar que o filme de PLGA possui uma aparência mais lisa e homogênea, característica de um material dúctil enquanto a fratura do PHB possui uma aparência mais heterogênea, quebradiça, característica de materiais mais frágeis.

Figura 6 – Morfologia das fraturas dos filmes de PLGA e PHB

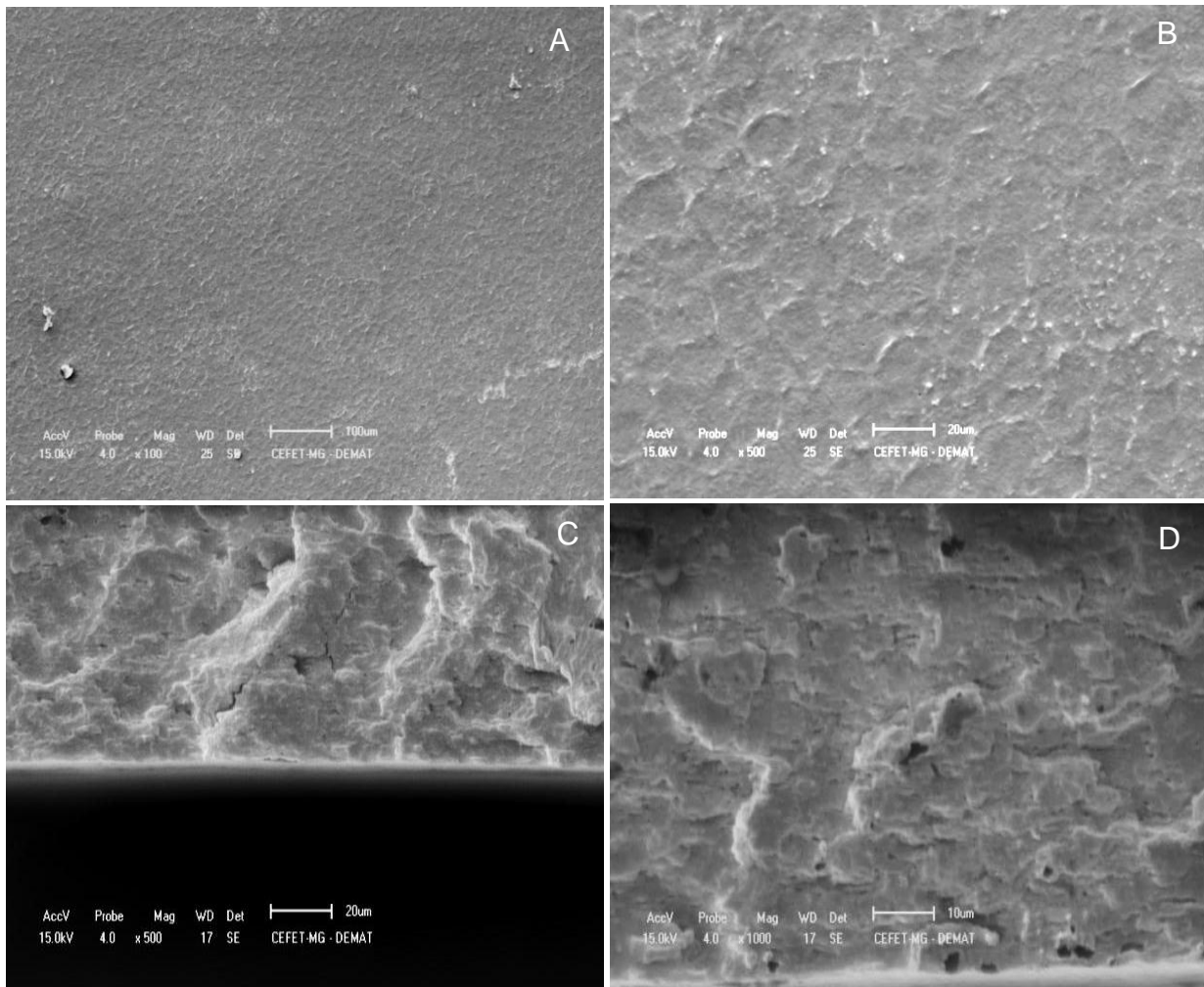


A: Secção da fratura no filme puro de PLGA com aumento de 100X; B: Secção da fratura no filme puro de PHB com aumento de 100X. Os retângulos em vermelho estão evidenciando as fraturas dos filmes.

Na Figura 7 estão mostrados aspectos da superfície de uma das blendas produzidas e também da seção fratura por resfriamento em N₂ líquido. Nota-se a presença de uma topografia com uma macroestrutura formada por anéis irregulares e repetitivos, possivelmente oriundos do processamento por secagem do solvente. Ensaio de

rugosidade revelam uma rugosidade média aritmética (Ra) com valores relativamente baixos mostrando ainda uma pequena variação ao longo da amostra ($0,24 \pm 0,08$) μm .

Figura 7 - Morfologia da blenda 50:50.



A: Superfície da blenda 50:50 com aumento de 100X; B: Superfície da blenda 50:50 com aumento de 500X; C: Secção da fratura da blenda 50:50 com aumento de 500X; D: Secção da fratura da blenda 50:50 com aumento de 1000X.

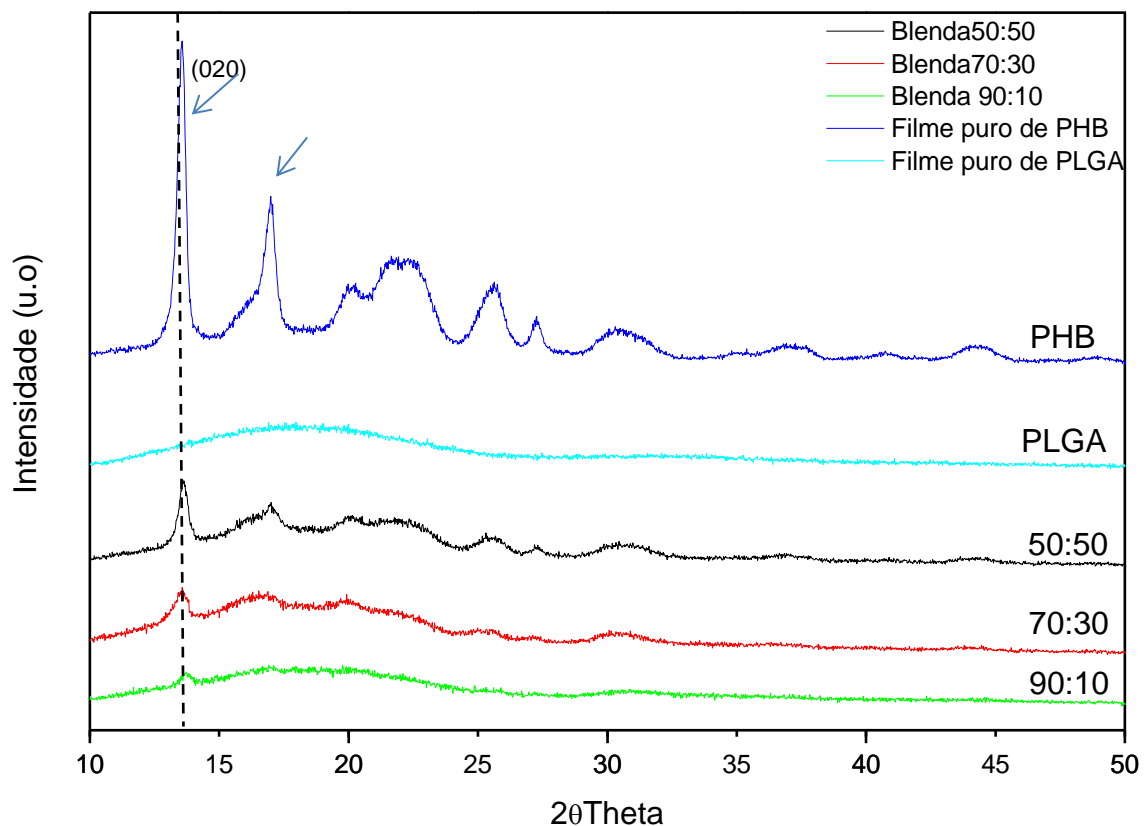
É possível observar que, comparativamente aos filmes puros, a blenda 50:50 (figura 7 A e B) apresenta uma estrutura intermediária (figura 6 A e B), ou seja, é em termos da microestrutura compatível, uma mistura não homogênea ou irregular dos filmes de PLGA e PHB e conseqüentemente pode-se dizer que houve também uma alteração da morfologia da ductilidade observada nos materiais puros. Não foi

possível observar através do MEV aspectos morfológicos que evidenciassem regiões específicas com presença de duas fases distintamente ou segregações.

5.1.2. Análise dos parâmetros de cristalinidade dos filmes por difração de raios X (DRX)

Na figura 8 estão representados os picos obtidos através do DRX das amostras estudadas. O difratograma do filme de PHB mostra presença de 2 picos característicos (evidenciados pelas setas) o primeiro a $13,55^\circ$ e o segundo a $16,90^\circ$ e estão de acordo com o encontrado na literatura (FURUKAWA, T. et al, 2007). O filme de PLGA puro apresenta um perfil 100% amorfo (alo amorfo) e está de acordo com o que foi citado por Loo, S.C.J., et al (2005). O filme de PHB possui um grau de cristalinidade de cerca de 40%.

Figura 8 - Curvas de DRX dos filmes.



Setas evidenciam os picos característicos do PHB (primeira, o pico de $13,55^\circ$ e segunda o pico $16,90^\circ$).

Os dados obtidos para as blendas mostram que o pico pertencente ao PHB, (posição $13,55^\circ$, referente ao plano (020)), está presente em todas as amostras, assim como o perfil amorfo do PLGA, indicando a imiscibilidade dos polímeros em todas as proporções estudadas. Os graus de cristalinidade das amostras estão representados na tabela abaixo (Tabela 2) e está claro que o aumento da quantidade de PLGA na blenda ocasiona na diminuição do grau de cristalinidade das mesmas. Foi observado que o grau de cristalinidade dos polímeros puros é inferior ao observado na literatura. Acredita-se que isso ocorreu devido às condições de contorno experimentais, ou seja, dos dois principais parâmetros de processamento: a velocidade e temperatura de secagem do solvente.

Tabela 2 - Grau de cristalinidade dos filmes e suas blendas.

AMOSTRA	GRAU DE CRISTALINIDADE
A PLGA 100%	Amorfo
B PHB 100%	40%
C 50:50	18%
D 70:30	13%
E 90:10	5%

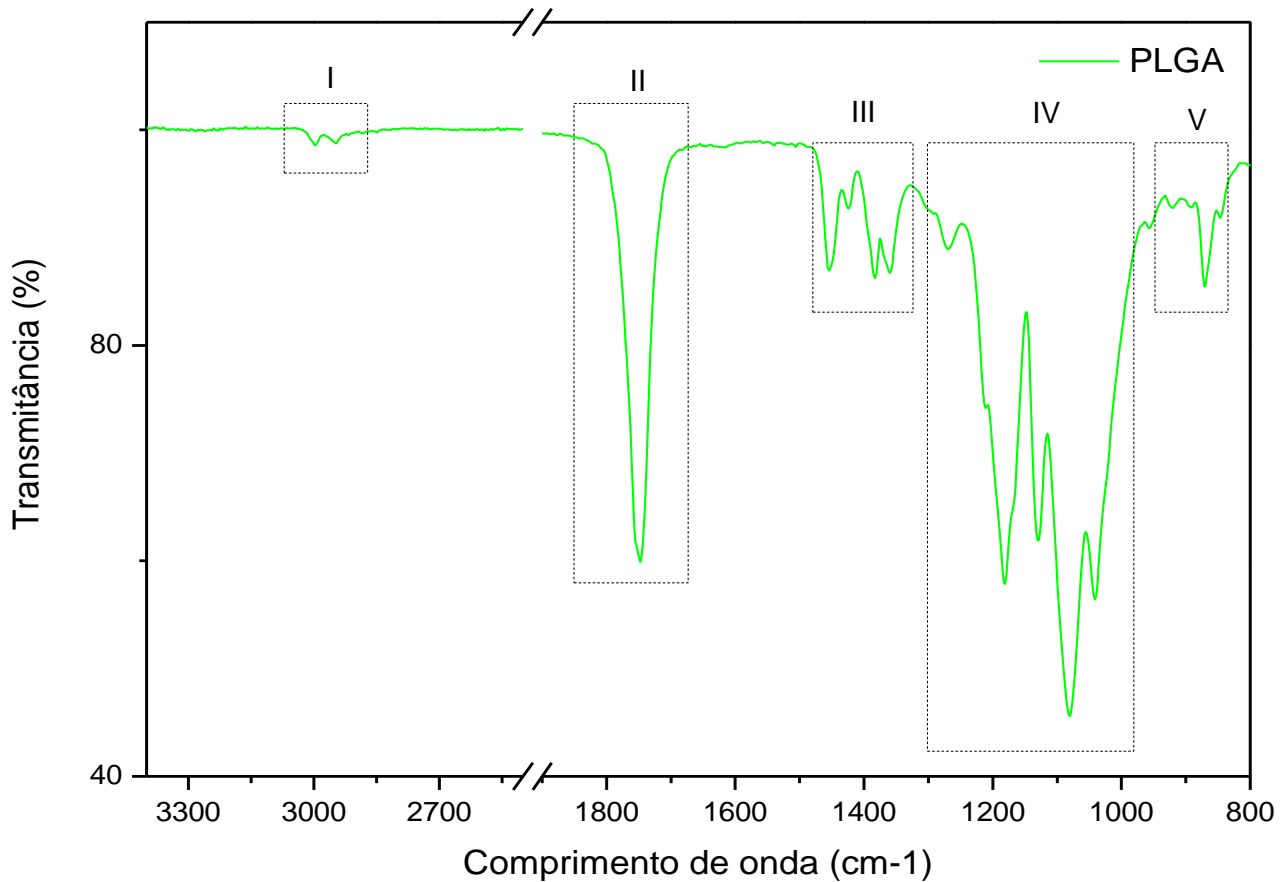
5.1.3. Análise dos grupos químicos funcionais dos filmes (FTIR)

O espectro de infravermelho do filme puro de PLGA está representado na figura 10. Ele foi segmentado em 5 grupos para a identificação das bandas e seus compostos químicos (Tabela 3).

As principais bandas observadas foram em 2998 e 2946cm^{-1} referentes a estiramentos de C-H nos grupos CH_2 e CH_3 , a banda a 1747cm^{-1} é referente ao estiramento de C=O, as bandas entre 1455 a 1360cm^{-1} referem-se a vibrações simétricas e assimétricas de deformação de C-H nos grupos CH_3 e CH_2 . A faixa de 1270 a 1042cm^{-1} são bandas referentes a estiramentos de C-O e C-O-C e a faixa de 920 a 845cm^{-1} a vibrações de flexão de C-H dos grupos CH_3 e CH_2 . (PAMULA, E. et al, 2001; KROK, M. 2011).

Tabela 3 - Bandas na região do infravermelho para o PLGA e seus respectivos grupos químicos.

Grupo	Bandas (cm⁻¹)	Atribuição
I	2998 2946	Estiramento de C-H dos grupos CH ₂ e CH ₃
II	1747	Estiramento C=O
III	1455 1425 1382 1360	Vibrações simétricas e assimétricas de C-H nos grupos CH ₃ e CH ₂
IV	1270 1130 1080 1042	Estiramento de C-O e C-O-C
V	845 870 920	Vibrações de flexão de C-H nos grupos CH ₂ e CH ₃

Figura 9: Espectro de infravermelho do PLGA.

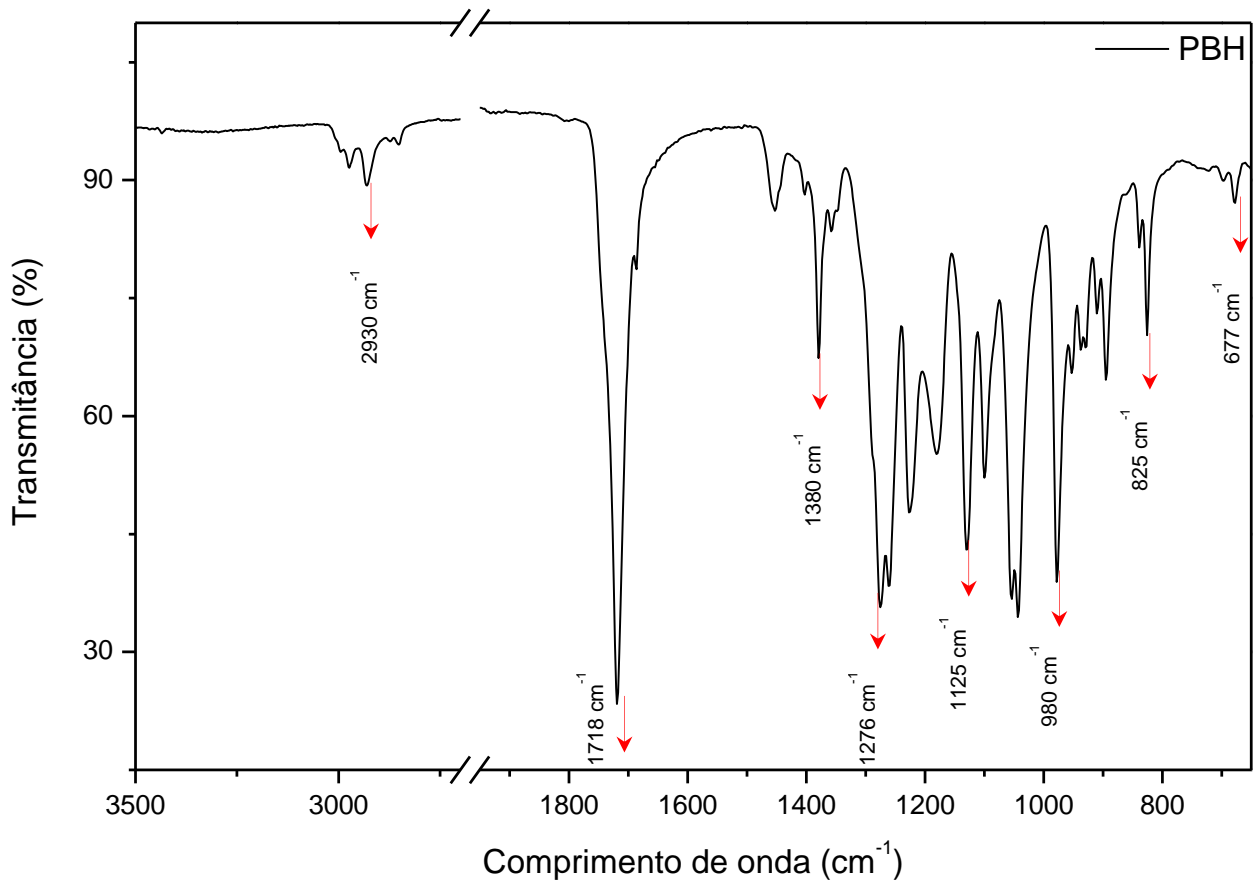
Para o PHB (Figura 11) as bandas (Tabela 4) foram observadas e identificadas e estão de acordo com Furukawa et al. (2005) e Izumi, C.M.S (2010). No caso do PHB, as diferenças que poderiam ser encontradas entre nos resultados, quando comparadas à bibliografia podem estar relacionadas a diferentes graus de cristalinidades das amostras estudadas, que podem variar de acordo com o processamento utilizado, tratamento térmico (IZUMI, C.M.S. 2010).

Tabela 4 - Bandas na região do infravermelho para o PHB e seus respectivos grupos químicos.

Bandas (cm ⁻¹)	Grupos
2975	Estiramento simétrico de CH ₃
2930	Estiramento simétrico de CH ₂
2847	Estiramento de CH
1718	Estiramento de C=O
1458	Deformações simétricas e assimétricas de C-H nos grupos CH ₃ e CH ₂
1380	Deformação simétrica de CH ₃
1276	Estiramento de C-O-C
1256	Estiramento de C-O-C e deformação de CH
1225	Estiramento de C-O-C
1175	Estiramento de C-O-C
1133	Translação ou vibração do CH ₃
1098	Estiramento de C-O-C
1053	Estiramento de C-O
1043	Estiramento de CH ₃
980	Estiramento de CH ₃
953	*
936	*
909	*
895	*
839	Estiramento de C-COO
825	Estiramento de C=O
698	Estiramento de C=O
677	Estiramento de C=O

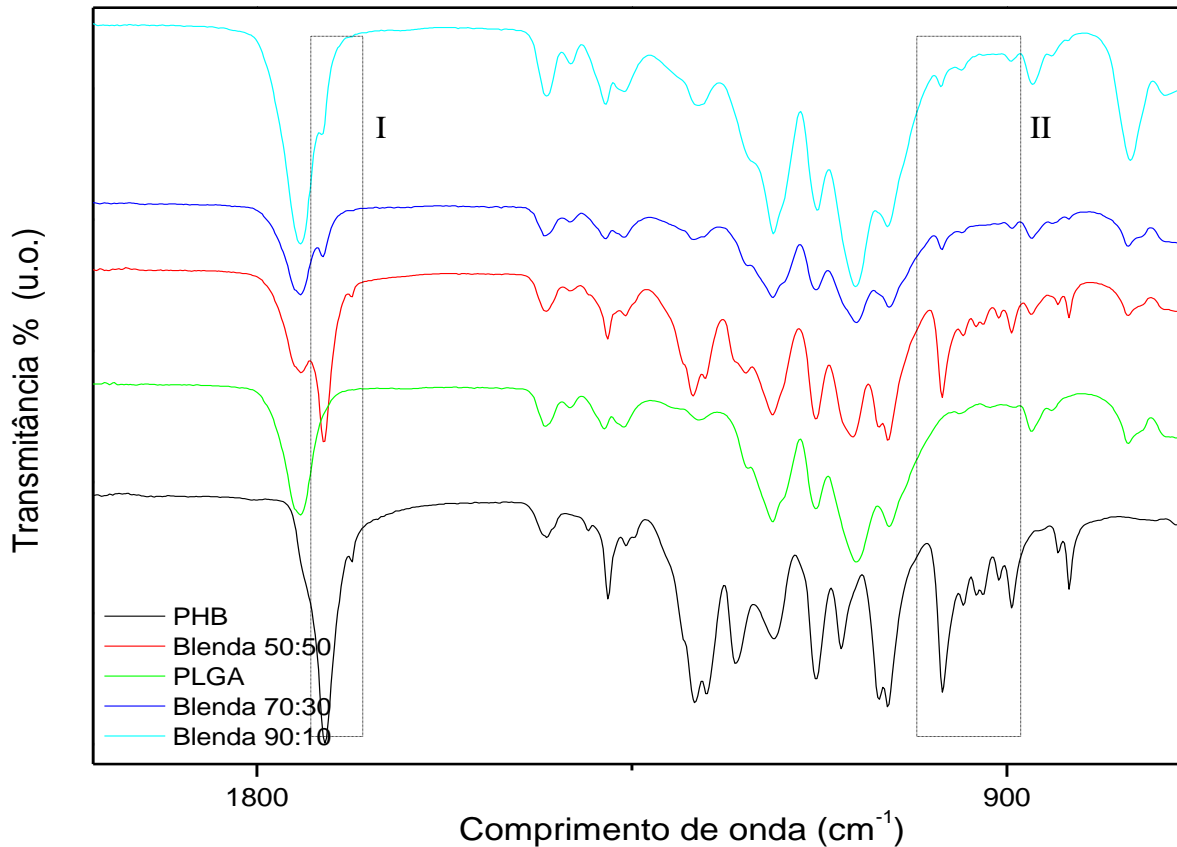
* Bandas também identificadas como pertencentes ao PHB por IZUMI, C.M.S. (2010), porém sem atribuições das mesmas,

Figura 10: Espectro de infravermelho do PHB.



No espectro das blendas de PLGA/PHB, figura 12, todas as bandas observadas para o PLGA e para o PHB são visíveis, sugerindo que não ocorreu nenhuma reação química aparente entre os materiais. Estão marcados (retângulos pontilhados) alguns exemplos em que é possível perceber a presença clara dos filmes puros nas blendas. Podemos perceber que quando há um aumento da intensidade das bandas de PLGA, como no caso da blenda 90:10, este está relacionado provavelmente ao aumento da sua quantidade. Pode-se dizer através da FTIR que as blendas produzidas são imiscíveis.

Figura 11: Espectro de infravermelho dos filmes obtidos.



Os retângulos I e II evidenciam regiões em que é possível observar que bandas pertencentes somente ao PHB estão presentes também nas blendas.

A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma das várias técnicas que têm sido utilizadas para investigar as ligações moleculares específicas nas blendas poliméricas. Quando dois polímeros estão em fases separadas e distintas (sistemas completamente imiscíveis), assume-se que os dois componentes não interagem (exceto, talvez, na interface das duas fases) e nesse caso, o espectro da blenda (mistura) reflete a adição adequada do espectro de infravermelho dos dois componentes individuais (SIONKOWSKA, A. 2009).

5.1.4. Caracterização do comportamento térmico dos filmes

Segundo Abdelwahab, M.A. et al (2012) as temperaturas correspondentes ao início de decomposição (Tonset) para um polímero são essenciais para avaliar as suas estabilidades térmicas e estão apresentadas na tabela 5. De acordo com as Tonset encontradas, o PLGA é mais estável termicamente que o PHB. Todas as blendas apresentaram duas Tonset, sugerindo a imiscibilidades entre os dois componentes. Esses resultados corroboram com os outros já apresentados que também sugeriram a imiscibilidade do PLGA e PHB na formação das blendas e conseqüentemente a formação de duas fases distintas.

Tabela 5: Tonset das amostras estudadas.

Amostra	Tonset (°C)
A PLGA 100%	300
B PHB 100%	250
C 50:50	250/291,5
D 70:30	275/316,5
E 90:10	277/312,5

Na figura 13 é possível observar a curva de TGA dos diferentes filmes obtidos. Três eventos térmicos ocorrem, o primeiro relativo à desidratação, o segundo a decomposição e o terceiro a carbonização dos filmes analisados. Os dados enfatizados foram à desidratação e a decomposição. Nas blendas foi possível observar que há sempre duas quedas de perda de massa, indicando uma possível imiscibilidade dos componentes (Tabela 6).

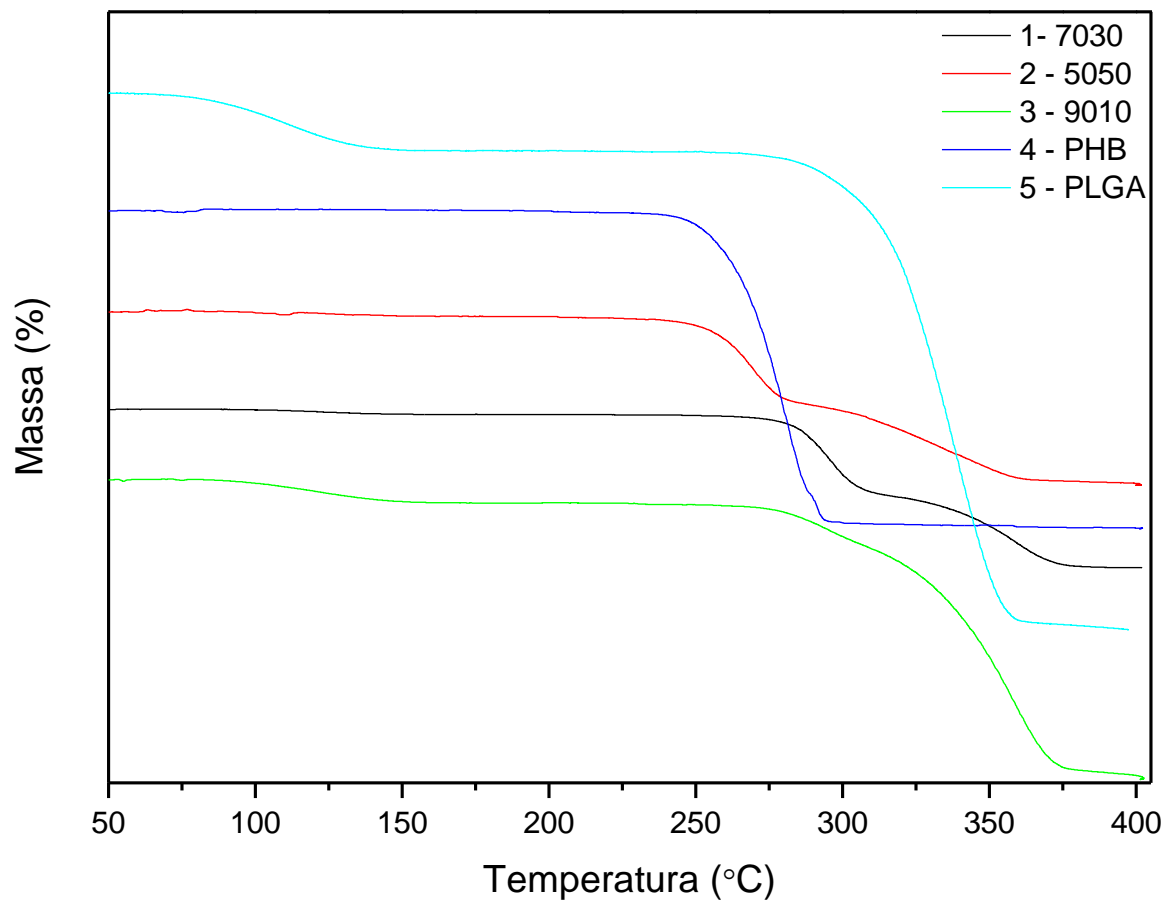
Figura 12: Curvas da TGA dos filmes obtidos.

Tabela 6 – Resultado da TGA para análise do comportamento térmico (desidratação e decomposição) das amostras dos diferentes filmes obtidos.

Amostra/ Evento térmico	Temperatura (°C)	Perda de Massa (%)
PLGA		
Desidratação	60-145	10
Decomposição	264-360	82
PHB		
Desidratação	-	-
Decomposição	235-294	91
50:50		
Desidratação	98-159	2
Decomposição	270-382	97
70:30		
Desidratação	113-154	2,5
Decomposição	239-372	97
90:10		
Desidratação	104-163	5,5
Decomposição	256-375	94

Após a realização do primeiro DSC das amostras, foi realizada outra análise (Figura 14) com a matéria-prima pura (antes do processamento) para verificar a ocorrência de alguma alteração devido à técnica de *casting* ou a presença de impurezas. Foi possível observar que as temperaturas encontradas são similares às encontradas na literatura (Tabela 7).

Figura 13 - Curvas de DSC dos polímeros, PLGA e PHB, puros.

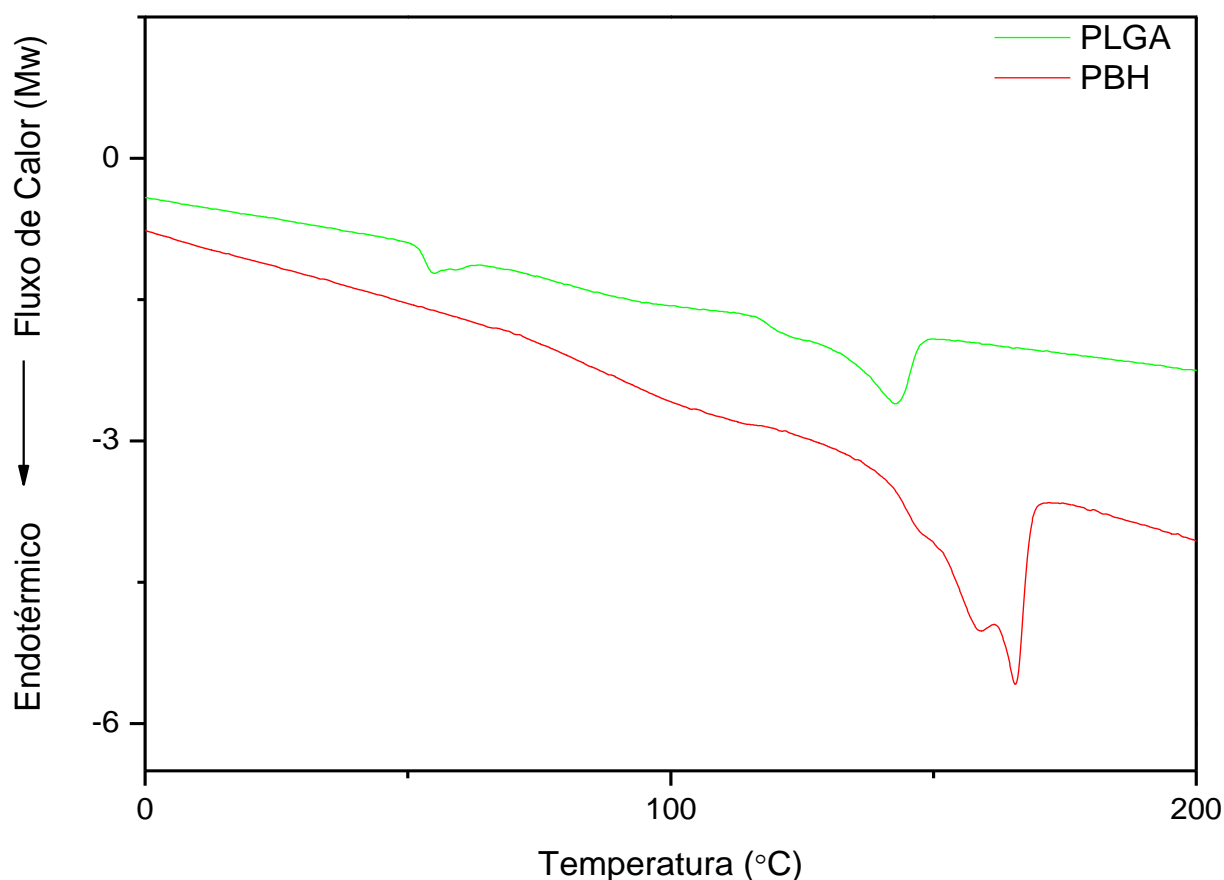


Tabela 7: Resultados do DSC para o PLGA e PHB (matérias-primas e literatura)

Amostra	Tg(°C)	Tm(°C)
PLGA (matéria-prima)	54	143
PLGA literatura*	54-56	128.8-144,5
PHB (matéria-prima)	Não observado	158/165
PHB literatura**	4-5	165-180

Fonte: * MOTTA, A.C. 2006; LOO, J.S.C. 2004; PURAC, 2006.

** PHB INDUSTRIAL, 2013; QUENTAL, et al. 2010.

A Figura 15 mostra o perfil comparativo da análise térmica diferencial dos filmes puros de PHB e PLGA e de sua blenda 50:50. É possível observar que os perfis encontrados nos filmes puros estão presentes no perfil da blenda. A análise

comparativa entre a blenda de 50:50 com os filmes puros foi mais um indicativo da possível imiscibilidade dos componentes dessa mistura. As temperaturas encontradas para as amostras nessa análise estão apresentadas na Tabela 8.

Figura 14 - Curvas de DSC dos filmes de PLGA, PHB e blenda 50:50.

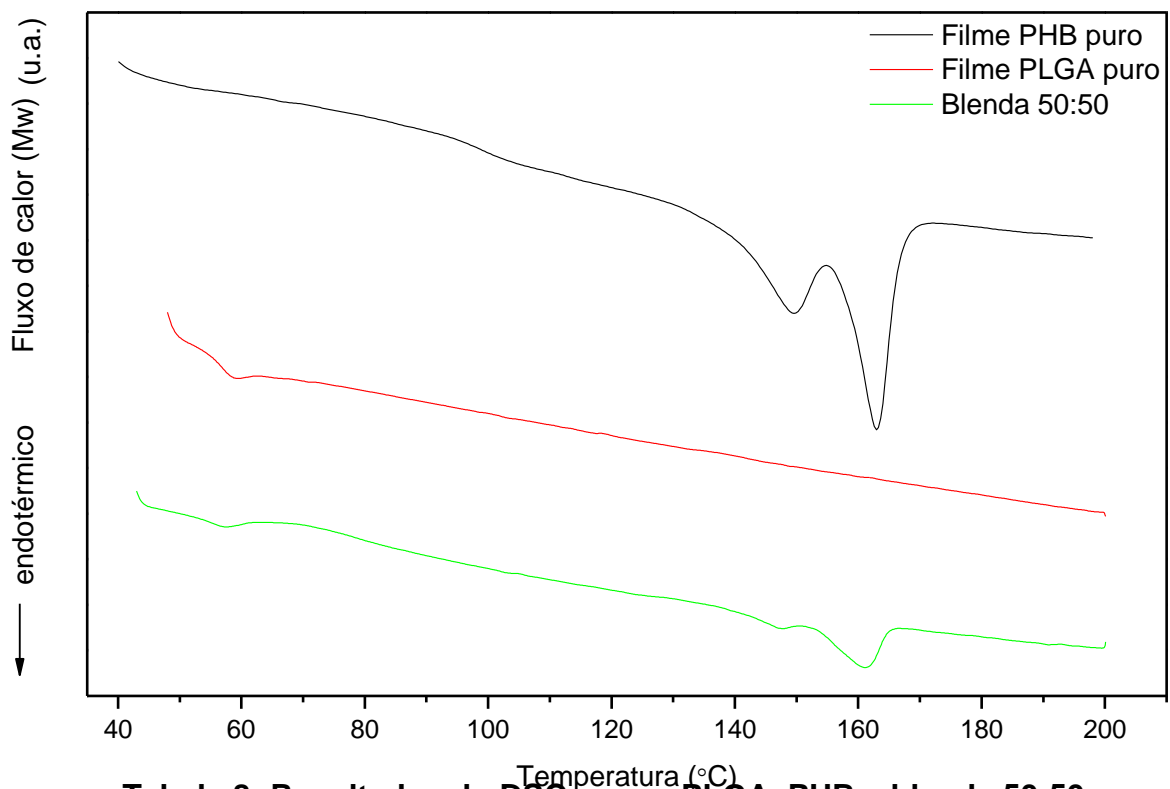


Tabela 8: Resultados do DSC para o PLGA, PHB e blenda 50:50.

Amostra	Tg(°C)	Tm(°C)
PLGA	57	-
PHB	-	149/163
Blenda 50:50	57	148/160

5.2. Caracterização das propriedades mecânicas dos filmes (Ensaio de tração)

Os resultados dos ensaios de tração para os filmes puros e blends são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Tensão máxima de tração e percentual de alongamento dos filmes.

	Tensão máxima de tração (MPa)	Percentual de alongamento (%)
A PLGA 100%	27,0 ± 4,2	69,0 ± 0,9
B PHB 100%	21,0 ± 4,2	3,0 ± 0,1
C 50:50	24,0 ± 6,6	7,0 ± 0,1
D 70:30	28 ± 11	143,0 ± 1,3
E 90:10	30,0 ± 8,4	207 ± 1

De acordo com esses resultados, tanto as blendas quanto o filme de PLGA apresentam a maior resistência à tração do que o filme de PHB. Nas blendas, a elevação da proporção relativa da quantidade de PLGA acarretou um aumento também da resistência à tração para as misturas com maior quantidade de PLGA. Em relação ao percentual de alongamento, o PLGA possui um alongamento maior que o PHB e quanto maior a quantidade de PLGA nas blendas, maior o alongamento, e, portanto mais dúctil parece ser o material. Comparativamente a blenda com 90:10 é a que apresenta as melhores propriedades mecânicas quando comparada com os demais materiais processados neste estudo.

O resultado da análise estatística de variância (ANOVA) utilizada nessa caracterização mecânica apresentou valores significativos com $p < 0,05$. Esta análise estatística revelou que os aumentos de PLGA nas blendas influenciam significativamente somente na tensão máxima de tração e no percentual de alongamento.

A tensão máxima de tração (ou tensão no limite de resistência) foi aparentemente influenciada pelo grau de cristalinidade, tendo reflexo qualitativo na tenacidade destas amostras, como também observado na literatura (ABDELWAHAB, M.A. et al, 2012) .Como o alongamento percentual é uma maneira quantitativa de expressar a ductilidade, observou-se que as blendas 70:30, 90:10 e o filme PLGA apresentam um elevado valor de deformação plástica que o revela sua expressiva ductilidade em comparação com os demais filmes. Quando essa deformação é pequena classifica-se o material como frágil (e.g. PHB e 50:50) e o contrário com dúctil (e.g. o filme de

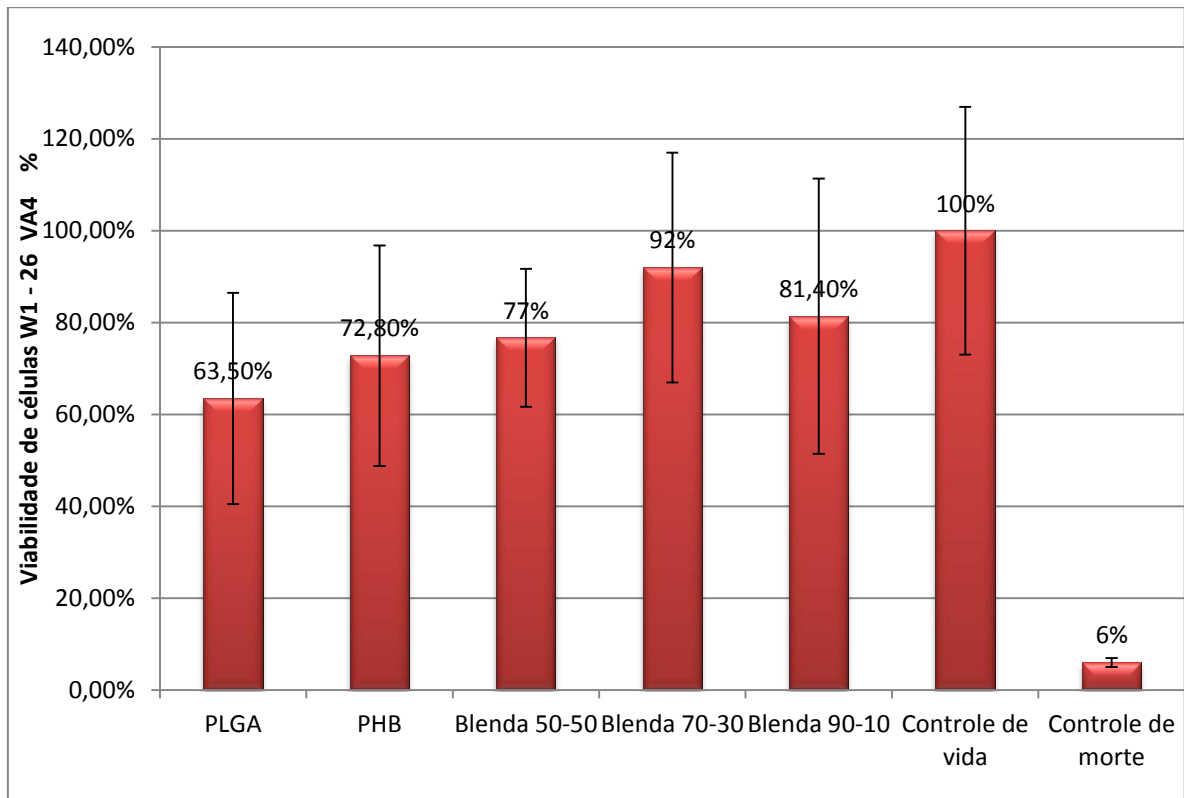
PLGA e as blendas com 70:30 e 90:10), quando a deformação sofrida pelo material é grande (CALLISTER, W.D, 2008; CANEVAROLO, 2002).

5.3. Ensaio Biológico

5.3.1. Análise da viabilidade celular por MTT

Após a realização do ensaio de viabilidade celular por MTT, a leitura do resultado foi realizada e os valores de viabilidade celular plotados em um gráfico, figura 16. Foi possível observar que os materiais puros (PLGA e PHB) apresentaram uma maior citotoxicidade quando comparada as blendas. Yang, X. *et al* (2002) realizou um estudo com filmes puros de PHB e PLA onde a viabilidade apresentada pelas blendas desse polímeros apresentou um relativo ganho quando comparada com os filmes puros. Os gráficos da viabilidade das células demonstram que porcentagem de viabilidade das células WI-26 VA4 variou de 63,8% a 92,4%, utilizando como comparação o controle de células das culturas, células cultivadas no meio sem o material, como 100% de viabilidade respectivamente e o controle negativo, células postas no meio de cultura com adição de peróxido de hidrogênio, substância citotóxica. Com esses resultados podemos dizer que os filmes produzidos são biocompatíveis, uma vez que a toxicidade somente é determinada quando a viabilidade celular é menor que 50%. Esses dados indicam que as blendas tem potencial para utilização como biomateriais.

Figura 15 – Viabilidade de células WI-26 VA4 analisadas com a metodologia de MTT.



6. CONCLUSÕES

Foram obtidos filmes de PLGA e PHB e de suas blendas com diferentes proporções em massa desses polímeros. O método de processamento por evaporação de solvente para a obtenção dos filmes puros de PLGA e PHB e suas blendas se mostrou viável para a síntese de filmes com espessuras de até 400 μm .

A caracterização morfológica das amostras mostrou que os filmes puros de PLGA são relativamente mais homogêneos (característico de materiais mais dúcteis) dos que os demais filmes produzidos e apresentam uma superfície mais lisa quando comparado ao PHB, que apresenta características de materiais mais frágeis. A blenda, na proporção 50:50, apresentou características intermediárias a de seus componentes (compatível com regra da mistura para materiais imiscíveis, e talvez com a formação de uma fase intermediária de ligação). Na análise da fratura da blenda, não foi possível observar a distinção entre as fases poliméricas presentes.

Através da difração de raios-X foi possível confirmar que enquanto o PLGA é amorfo, o PHB possui alto grau de cristalinidade e como possível consequência disso, quanto maior a quantidade de PLGA nas blendas, menor o grau de cristalinidade das mesmas. Foi possível observar também a presença de picos do PHB em todas as blendas, o que indica que o PLGA e o PHB são imiscíveis e não ocorreu a formação de uma nova fase.

Os resultados de espectroscopia de infravermelho corroboraram com os resultados do DRX e foi possível observar nas blendas as bandas dos componentes puros, indicando a imiscibilidade destes.

O comportamento térmico mostrou a presença de dois platôs em todas as blendas, sendo mais um fator que indica a imiscibilidade do PLGA e do PHB.

A blenda com 90:10 é a que apresenta as melhores propriedades mecânicas quando comparada com os demais materiais processados neste estudo. A tensão máxima

de tração (ou tensão no limite de resistência) foi aparentemente influenciada pelo grau de cristalinidade, tendo reflexo qualitativo na tenacidade destas amostras.

Os ensaios de MTT para a avaliação da citotoxicidade mostraram que os filmes obtidos não são citotóxicos. Os filmes puros apresentam uma menor viabilidade celular quando comparados aos controles e/ou com as blendas, o que, no entanto não é um indicativo de citotoxicidade dos mesmos. Pode-se afirmar que todos possuem potencial para aplicação com biomaterial.

As blendas nas proporções aqui estudadas apresentam, portanto, um enorme potencial de aplicação clínica devido ao espectro de novas propriedades mecânicas e ou biológicas obtidas com a mistura, possível controle de degradação no meio fisiológico também em função das razões PLGA/PHB agora selecionáveis em função deste estudo, além da razoável biocompatibilidade (aumento de viabilidade celular nos resultados dos ensaios de citotoxicidade) desses filmes ou blendas. Apesar da baixa miscibilidade na técnica de processamento empregada na obtenção dos mesmos, a metodologia de caracterização utilizada permitiu verificar as principais características estruturais, morfológicas e mecânicas, revelando aspectos poucos explorados na literatura para estes materiais, tais como mudanças na cristalinidade avaliadas por (DRX, FTIR e MEV), parâmetros mecânicos (ensaio de tração) e térmicos (ensaio de DSC) dos filmes, todos agora fortemente previsíveis e influenciados pela regra da mistura.

Apesar de os resultados indicarem certa imiscibilidade entre os componentes das blendas (PLGA e PHB), acredita-se que mais testes devem ser realizados para confirmar essa hipótese, pois em algumas avaliações como no teste de tração com a melhora do percentual de alongamento e em alguns deslocamentos nas temperaturas da TGA ainda deixam dúvidas e uma possibilidade de haver certa miscibilidade parcial entre os materiais.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Primeiramente, seria de grande importância melhorar o processo de produção das blendas, criando um ambiente mais controlado em que a secagem possa ocorrer de maneira homogênea;
- As caracterizações do comportamento térmico, principalmente o DSC devem ser realizados em todas as blendas para uma melhor avaliação dos deslocamentos de temperatura observados nos ensaios realizados nesse trabalho e que indicam uma miscibilidade parcial;
- Os ensaios de tração devem ser realizados com um número maior de amostras, a fim de avaliar melhor o percentual de alongamento, principalmente a melhora observadas nas blendas de 70:30 e 90:10;
- Realizar testes de degradação para avaliar o tempo desta e também o produto da degradação das blendas;
- Realizar mais ensaios para a avaliação da biocompatibilidade, incluindo os ensaios de citotoxicidade indireto (ágar) e genotoxicidade;
- Se possível, avaliar essa blenda em outro processo de produção que não envolva a utilização de solventes, como a extrusão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHAB, A. M., FLYNN, A. CHIOU, B. IMAMC, S. ORTS, W. CHIELLINI, E. Thermal, mechanical and morphological characterization of plasticized PLA e PHB blends. **Polymer Degradation and Stability**, Santa Barbara, v.97, p.1822-1828, 2012.

AKCELRUD, L. **Fundamentos da ciência dos polímeros**. Barueri, Manole, 2007. 288p.

BARBANTI, S.H., Zavaglia, C.A.C., DUEK, E.A.R., Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos, **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, pp. 13-21, 2005

CALLISTER JUNIOR, W. D. **Ciência e engenharia de materiais: uma introdução**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

CANEVAROLO, S.V. **Ciências dos Polímeros**. 1ed. São Paulo. Editora Liber, 2002.

CHEN, Q., et al. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**. Australia, v. 38, n.3-4, p. 584-671, mar-apr. 2013.

FURUKAWA, T. SATO, H. MURAKAMI, R. ZHANG, J. NODA, I. OCHIAI, S. OZAKI, Y. Comparison of miscibility and structure of poly (3-hydroxybutyrate-co-3 hydroxyhexanoate)/poly(L-lactic acid) blends with those of poly(3 hydroxybutyrate)/poly(L-lactic acid) blends studied by wide angle X-ray diffraction, differential scanning calorimetry, and FTIR microspectroscopy. **Polymer**, v.48, p.1749-1755, Jan.2007.

FURUKAWA, T. SATO, H. MURAKAMI, R. ZHANG, J. DUAN, Y. NODA, I. OCHIAI, S. OZAKI, Y. Structure, dispersibility, and crystallinity of poly(hydroxybutyrate)/ poly (L-lactic acid) blends studied by FTIR microspectroscopy and differential scanning calorimetry. **Macromolecules**, v.38, p.6445-6454, May.2005.

FWU-LONG, M., et al. Chitin/PLGA blend microspheres as a biodegradable drug-delivery system: phase-separation, degradation and release behavior. **Biomaterials**, Taiwan, v.23, p.3257–3267, feb. 2002.

GHANBARZADEH, B.; ALMASI, H. **Biodegradable polymers**. In: CHAMY, R.; ROSENKRANZ, F. **Biodegradation** : life of science. Croatia: InTech, P. 141-185. 2013.

HANKS, C.T., WATAHAZ, J. C., SUNI, Z. In vitro models of biocompatibility: a review. **Dent. Mater.** 12:186-193, May, 1996.

IMRE, B.; PUKÁNSZKY, B. Compatibilization in bio-based and biodegradable polymer blends. **European Polymer Journal**, Budapeste, v.49, n.6, p. 1215–1233, Jun. 2013.

ISO. **ISO 10993-1:2009** Biological evaluation of medical devices -- Part 1: Evaluation and testing within a risk management process. Switzerland, 2009.

IZUMI, C.M.S. TEMPERINI, M. L.A. FT-Raman investigation of biodegradable polymers: Poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). **Vibrational Spectroscopy**, v.54, p.127-132, Aug. 2010.

JAIN, R.A., The Manufacturing Techniques of Various Drug Loaded Biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) Devices, **Biomaterials**, v. 21, pp. 2475-2490, 2000.

KOTSAR, A., et al. A New Biodegradable Braided Self-Expandable PLGA Prostatic Stent: An Experimental Study in the Rabbit. *Journal of Endourology*, Tampere, v.22, n.5, p.1065-1070, may 2008.

KROK, M. PAMULA, E. Poly(L-lactide-co-glycolide) Microporous Membranes for Medical Applications Produced with the Use of Polyethylene Glycol as a Pore Former. **Journal of Applied Polymer Science**, v.125, p.187-199, Mar. 2012.

LLOYD, A.W. Interfacial bioengineering to enhance surface biocompatibility. **Medical Device Technology**, Brighton, v.13, n.1, p 18-21, Jan. 2002.

LOO, S. C. J. OOI, C.P. WEE, S.H.E. BOEY, Y.C.F. Effect of isothermal annealing on the hydrolytic degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA). **Biomaterials**, v.26, p.2827-2833, Oct. 2005.

LOO, S. C. J. OOI, C.P. BOEY, Y.C.F. Radiation effects on poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and poly(L-lactide) (PLLA). **Polymer Degradation and Stability**, v.83, p. 259-265, Jul. 2004

LUTKE-EVERSLOH, T, BERGANDER, K, LUFTMAN, H, & STEINBUHEL, A. Identification of a new class of biopolymer: bacterial synthesis of a sulfur-containing polymer with thioester linkages. **Microbiology**, v.147, p. 11-19, Jan. 2001.

MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. Philadelphia. **Polymer**. v.3. p.1377-1397, Aug. 2011.

MIDDLETON, J.C., TIPTON, A.J. Synthetic biodegradable polymers as medical devices. **Med. Plast. Biomater.** Birmingham, mar. 1998. Disponível em: <<http://www.mddionline.com/article/synthetic-biodegradable-polymers-medical-devices>>. Acesso em: 07 de ago. 2013.

MIDDLETON, J. C.; TIPTON, A. J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, Birmingham, v.21, p. 2335-2346, 2000.

MOTTA, A.C., DUEK, E.A.R. Síntese, Caracterização e Degradação “in vitro” do poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico). **Revista Matéria**, v.11, n.3, p. 340-350, Mai.2006.

NAIR, L.S., LAURENCIN, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, Virginia, v.32, n. 8-9, p. 762-798, aug-sep. 2007.

MANO, J., SOUSA, R., BOESEL, L., NEVES N., Bioinert, Biodegradable and Injectable Polymeric Matrix Composites for Hard Replacement: State of the Art and Recent Developments, **Composites Science and Technology**, v. 64, pp. 789–817, 2004.

O'BRIEN, F. J. **Biomaterials and scaffolds for tissue engineering**. Materials today, Dublin, v. 14, n. 3, p. 88-95, mar. 2011

OREFICE, R. L., PEREIRA, M. M., MANSUR, H. S. **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações**. 1. ed. Rio de Janeiro: Ed. Cultura Médica, 2006.

PAMULA, E. BLAZEWICZ, M. PALUSZKIEWICZ, C. DOBRZYNSKI, P. FTIR study of degradation products of aliphatic polyesters-carbon fibres composites. **Journal of Molecular Structures**, v.596, p.69-75, Feb.2001.

PORJAZOSKA, A., GORACINOVA, K., MLADENOVSKA, K., GLAVA, M., Poly(DL-lactide-co-glycolide) Microparticles as Systems for Controlled Release Of Proteins – Preparation and Characterization, **Acta Pharm.**, v. 54, pp. 215-229, 2004.

QUENTAL, A. C., et al. Blendas de PHB e seus copolímeros: miscibilidade e compatibilidade. **Química Nova**. Campinas, v.33, n.2, p. 438-446, jan. 2010.

SANTOS, C. C.; MALMONGE, S.M. Biomateriais poliméricos para reparo de tecidos ósseos e cartilagosos. **Relatório Parcial PDPD/UFABC**, 2009.

SIONKOWSKA, Alina. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. **Progress in Polymer Science**, Torun, v.36, n.9, p.1254– 1276, Sep. 2011.

SIONKOWSKA A, SKOPINSKA J, WISNIEWSKI M. Collagen synthetic polymer interactions in solution and thin films. **Journal of Molecular Liquids**, Torun, v.145, p. 135–8, Jun. 2009.

SODIAN, R, HOERSTRUP, S. P, SPERLING, J. S, MARTIN, D. P, DAEBRITZ, S, MAYER, J. E, & VACANTI, J. P. Evaluation of biodegradable, three-dimensional matrices for tissue engineering of heart valves. **ASAIO Journal**, v.46, p.107-110, Feb.2000.

TANADCHANGSAENG, N., YU, J. Miscibility of Natural Polyhydroxyalkanoate Blend with Controllable Material Properties. **Journal of Applied Polymer Science**, Honolulu, v.129, n.4, p. 2004-2016, aug. 2013.

TIAN, H. et al. Biodegradable synthetic polymers: preparation, functionalization and biomedical application. **Progress in Polymer Science**. Changchun, v.37, p.237-280, Jul. 2012.

ULERY, B.D. et al. Biomedical applications of biodegradable polymers. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 49, p. 832-864, Apr. 2011.

VERT, M. Aliphatic polyesters: great degradable polymers that cannot do everything. **Biomacromolecules**, Montpellier, v.6, n.2, p. 538-546, mar. 2005.

VOOREN, Celine VAN. **Water permeability of PLGA and PHB enriched with additives**. 2012. Master thesis - Chent University, Belgium, 2012.

WILLIAMS, D.F. **The Williams dictionary of biomaterials**. Liverpool: Liverpool University Press, 1999. 364P.

YANG, X. ZHAO, K., CHEN, G.Q. Effect of surface treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates. **Biomaterials**, v.23, p.1391-1397, Jul.2002.

ANEXO 1 - Dados físicos do PLGA 80:20



Purac Biochem bv
 Arkelsedijk 46
 P.O. Box 21
 4200 AA Gorinchem
 The Netherlands

P +31 183 695 695
 F +31 183 695 600

<http://www.puracbiomaterials.com>

RBS N.V. Amsterdam
 Acc. Nr. 47.22.15.248
 VAT Nr. NL003253235B01

Production Date : January 27, 2010
 Retest Date : January 26, 2013

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Brand name : PURASORB PLG 8055
 Product name : 80/20 L-lactide/Glycolide copolymer (molar ratio)
 Batch number : 0910003164

Appearance : white to light tan granules
 Identity (by FTIR) : conforms to reference
 Comonomer ratio, L-lactide : 79 mol%
 Comonomer ratio, Glycolide : 21 mol%
 Inherent viscosity : 5.24 dl/g
 (chloroform, 25°C, c = 0.1 g/dl)
 Specific rotation (chloroform, 20°C) : -142.8 °
 Melting range (DSC, 10°C/min) : 128.8 - 144.5 °C
 Water content (by coulometry) : max. 0.5 %
 Tin content (by AAS) : max. 50 ppm
 Residual solvent : max. 0.1 %
 Residual monomer (by GC) : max. 0.2 %
 Heavy metals : will comply with USP if tested (10 ppm limit test)

This batch complies with the specifications set for this product.

Purac Biochem bv
 Marc-Anton Kruff, Ph.D M.Sc
 Manager Quality/R&D Biomaterials

M. Kruff

Date : February 02, 2012

ANEXO 2 - Dados físicos do PHB



BIOCYCLE 18BC-1 - Propriedades

	ASTM		ISO	
	Valor	Método	Valor	Método
Propriedades Físicas				
Densidade	1,30g/cm ³	D792	1,30g/cm ³	1183
Índice de Fluidiz	16g/10min	D1238 (190°C, 2,16kg)	16g/10min	1133(190°C, 2,16kg)
Propriedades Mecânicas				
Resistência à tração	25MPa	D638	24MPa	527
Alongamento na Ruptura	2,2%	D638	2,0%	527
Módulo de Flexão	2.400MPa	D790	2.450MPa	178
Resistência ao Impacto Izod com entalhe	20J/m	D256	19J/m	180,1/A
Propriedades Térmicas				
Temperatura de fusão cristalina	165-170°C	D3418	-----	-----
Temperatura de Distorção ao Calor - HDT	117°C	D648 (0,45MPa)	117°C	75, B
	65°C	D648 (1,8MPa)	65°C	75, A
Temperatura de Amolecimento Vicat	135°C	D1525	135°C	306, A120

Aplicações:
Injeção, Extrusão,
Termoformagem



PHB INDUSTRIAL S/A

Fazenda da Pedra, s/n - C. Postal 02 - CEP 14150-000 - Serrana - São Paulo - Brasil
Tel: 55 16 3987-9000 - Fax: 55 16 3987-9019 - email: biocycle@biocycle.com.br

ANEXO 3 - Dados físico-químicos do clorofórmio

Labsynth

Empresa Certificada:

99001

ISO
14001

Syntb

DEPARTAMENTO DE CONTROLE DE QUALIDADE REAGENTE ANALÍTICO BOLETIM TÉCNICO			FAB. : 14/02/2013 VAL. : 14/02/2016
PRODUTO CLOROFORMIO P.A. / A.C.S. 10 ^a ed. / ESTABILIZADO COM ETANOL			Origem : ----- Lote Fabricante : -----
LOTE 164136	FÓRMULA C H C l_3	P.M. 119,38	CHAVE AUTENTICIDADE EXEPO-GSKRL-PNUFV-LWTIC

TESTES	LIMITES	RESULTADOS
01 CARACTERÍSTICAS	Líqu. límpido, incolor, odor próprio	de acordo
02 ACETONA / ALDEÍDOS	Passa o teste	P.T.
03 ÁCIDOS E CLORETOS	Passa o teste	P.T.
04 CHUMBO	máx. 0,05ppm	< 0,05ppm
05 CLORO LIVRE	Passa o teste	P.T.
06 COR (APHA)	máx. 10	< 10
07 RESÍDUO DE EVAPORAÇÃO	máx. 0,001%	< 0,001%
08 SUBST. ESCURECIDAS p/ H ₂ SO ₄	Passa o teste	P.T.
09 TEOR	mín. 99,8%	100,0%