UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

JOÃO DOMINGOS AUGUSTO DOS SANTOS PEREIRA

DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS A PARTIR DE BLENDAS POLIMÉRICAS A BASE DE AMIDO

Presidente Prudente

2012

JOÃO DOMINGOS AUGUSTO DOS SANTOS PEREIRA

DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS A PARTIR DE BLENDAS POLIMÉRICAS A BASE DE AMIDO

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do título de Mestre à Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino.
Co-orientador: Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho.

Presidente Prudente
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CAMPUS DE BAURU
FACULDADE DE CIENCIAS DE BAURU

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE JOÃO DOMINGOS AUGUSTO DOS SANTOS PEREIRA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DO(A) FACULDADE DE CIENCIAS DE BAURU.

Aos 13 dias do mês de março do ano de 2012, às 09:00 horas, no(a) Faculdade de Ciencias e Tecnologia de Presidente Prudente, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO do(a) Departamento de Fisica Quimica e Biologia / Faculdade de Ciencias e Tecnologia de Presidente Prudente, Prof. Dr. NERI ALVES do(a) Departamento de Fisica Quimica e Biologia / Faculdade de Ciencias e Tecnologia de Presidente Prudente, Prof. Dr. WILLIAM DIAS BELANGERO do(a) Departamento de Ortopedia e Traumatologia / Universidade Estadual de Campinas, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a argüição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de JOÃO DOMINGOS AUGUSTO DOS SANTOS PEREIRA, intitulado "DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS A PARTIR DE BLENDAS POLIMÉRICAS A BASE DE AMIDO". Após a exposição, o discente foi argüido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO

Prof. Dr. NERI ALVES

Prof. Dr. WILLIAM DIAS BELANGERO

Pereira, João Domingos Augusto dos Santos
Desenvolvimento de biomateriais a partir de blendas poliméricas a base de amido / João Domingos Augusto dos Santos Pereira, 2012.
142 f.: il.

Orientador: Carlos José Leopoldo Constantino.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Presidente Prudente, 2012.

1. Biomateriais. 2. Poli(fluoreto de vinilideno). 3. poli(fluoreto de vinilideno com trifluoretileno). 4. Amido. I – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia. II – Título.

Dedico este trabalho aos meus pais
João e Izabel que com o seu amor
incondicional por mim tornaram possível à
realização deste sonho e ao meu filho
o motivo de tudo na minha vida.

Agradecimento(s)

Ao Prof. Dr. Carlos José L. Constantino, por sua dedicação, paciência e orientação.

Ao Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho, pelo incentivo na execução deste trabalho.

As Prof. Dr. Maria de Lourdes Corradi Custodio da Silva e Prof Ana Pires pela atenção e ajuda neste trabalho.

Aos Prof. Dr. Neri Alves e Prof. Dr. Aldo Eloizo Job, pela amizade e orientação.

Ao Pedro, Diogo, Priscila, Leonardo, Deuber, Carlos, Renivaldo, Elton e demais amigos do DFQB, pela atenção e principalmente por terem muita paciência.

Aos professores, funcionários e colegas, muito obrigado!!!

Agradeço também a CAPES, CNPq e FAPESP.

“Se a Religião se nega a avançar com a Ciência, esta avançará sozinha.”

Allan Kardec

Resumo

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de blendas poliméricas a base de polímeros sintéticos e amido para a obtenção de materiais biocompatíveis que possam ser utilizados como matrizes em processos de regeneração óssea. Os materiais utilizados foram o poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF), o poli(fluoreto de vinilideno com trifluoretileno) P(VDF-TrFE) e o amido de milho. Foram elaboradas blendas de PVDF/amido nas proporções em massa de 90/10, 80/20 e 66/33 e P(VDF-TrFE)/amido na proporção de 66/33. As blendas foram fabricadas em formato cilíndrico para permitir, posteriormente, testes *in vivo* através do implante em ratos. O processo de fabricação das blendas foi o de prensagem (2 ton) a quente, com temperaturas de 155 ºC e 190 ºC para o P(VDF-TrFE)/amido e PVDF/amido, respectivamente. Na investigação das propriedades físicas e químicas das blendas poliméricas utilizaram-se as seguintes técnicas de caracterização: espectroscopia via espalhamento micro-Raman, espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise dinâmico-mecânica (DMA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Após a fabricação das amostras estas foram submetidas a testes *in vitro* sob a ação da enzima α-amilase por períodos de 14, 28 e 42 dias. A espectroscopia vibracional revelou a ausência de interação química entre os polímeros e amido (mistura física) e que o processo de prensagem a quente não produziu qualquer tipo de degradação destes materiais. As próprias fases α e ferroelétrica do PVDF e P(VDF-TrFE) em pó, respectivamente, foram mantidas nas blendas. As imagens de MEV das blendas apresentaram poros na região externa, o que foi atribuída à perda de amido no processo de retirada das amostras dos moldes. Além disso, foram percebidas regiões distintas de materiais, ou seja, o PVDF ou P(VDF-TrFE) e o amido estão separados, possibilitando a identificação de cada material (o amido age como um aditivo). Nas imagens ópticas obtidas pelo micro-Raman o mesmo padrão heterogêneo foi percebido, sendo que, mesmo nas regiões com predomínio de PVDF ou P(VDF-TrFE) o amido se fez presente. Nas medidas de DMA investigou-se o módulo de elasticidade (E'), o qual, independente da proporção de materiais, alcançou valores próximos aos do osso esponjoso. Adicionalmente, quanto maior a quantidade de amido menor foram os valores de E'. No ensaio *in vitro* somente as amostras de PVDF/amido 90/10, para o período de 42 dias, apresentaram redução estatisticamente significativa de sua massa. Contudo,

nos demais grupos deste período foram percebidos tendências de perda de massa. A pouca absorção do amido pode estar relacionada a 2 fatores principais: i) parte do amido presente na amostra foi arrancado da superfície externa no instante da retirada da amostra do molde, como observado por MEV; ii) parte do amido estar presente no interior do cilindro, fora do alcance da ação da enzima. Os resultados do estudo piloto *in vivo* realizado pelo período de 42 dias em animais revelaram que as amostras, independentemente da composição e da proporção, foram toleradas pelo tecido ósseo esponjoso. Esta hipótese pode ser assumida devido ao fato de todos os animais não apresentarem reação inflamatória aguda. Apenas um animal apresentou uma reação inflamatória discrepante em relação aos demais, sendo ainda caracterizada como reação inflamatória crônica em uma pequena região tecidual.

Palavras-chave: Biomateriais; PVDF; P(VDF-TrFE); amido; implantes.

Abstract

This work aims at the development of polymer blends based on synthetic polymers and starch to obtain biocompatible materials that can be used as matrices in the process of bone regeneration. The materials used were poly(vinylidene fluoride) (PVDF), poly(vinylidene fluoride with trifluoretileno) P(VDF-TrFE) and corn starch. It was prepared blends of PVDF/starch mass ratio in 90/10, 80/20 and 66/33 and P(VDF-TrFE)/starch at a ratio of 66/33. The blends were made in a cylindrical shape to allow for later testing *in vivo* in rats by implanting. The manufacturing process of the blends was compressing (2 ton) under heating, with temperatures at 155 ºC and 190 °C for P(VDF-TrFE)/starch and PVDF/starch, respectively. In the investigation of physical and chemical properties of polymer blends the following characterization techniques were used: Raman scattering spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), dynamic mechanical analysis (DMA) and scanning electron microscopy (SEM). After the fabrication of these samples, essays were carried out *in vitro* under the action of the enzyme α-amylase for 14, 28 and 42 days.

The vibrational spectroscopy revealed no chemical interaction between the polymers and starch (physical mixture) and that the process of compressing under heating did not produce any degradation of these materials. Even the α phase and the ferroelectric phase of PVDF and P(VDF-TrFE) powder, respectively, were kept in the blends. SEM images of the blends showed pores in the outer region, which was attributed to the loss of starch in the process of withdrawal of samples from the molds. In addition, distinct regions were observed for the blends, i.e., PVDF or P(VDF-TrFE) and starch are separated, allowing the identification of each material (starch acts as a filler). In the optical images obtained by micro-Raman the same heterogeneous pattern was seen, and the starch was present even in regions with a predominance of PVDF or P(VDF-TrFE). In DMA measurements, the elastic modulus (E'), which, independent of the proportion of materials, reached values close to the cancellous bone. Additionally, the higher starch content the lower values of E'. In the *in vitro* essay, only the samples of PVDF/starch 90/10 for the period of 42 days showed a statistically significant reduction of their mass. However, a tendency of mass loss was also observed for the other blends of PVDF/starch. The expected significant degradation of starch did not happen, which could be related to two main

factors: i) some of the starch present in the sample was pulled from the outer surface at the instant of taking the sample of the mold, as observed by SEM, ii) some of the starch is probably present in the cylinder interior, out of the action enzyme. The results of the pilot study *in vivo* carried out for a period of 42 days in animals have shown that samples regardless of the composition and ratio were tolerated by the cancellous bone. This hypothesis can be assumed due to the fact that all animals showed no acute inflammatory reaction. Only one animal showed an inflammatory reaction, being further characterized as a chronic inflammatory reaction in a small region of tissue.

Keywords: Biomaterials; PVDF; P(VDF-TrFE); starch; implants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da amilose (a) e da amilopectina (b).....36

Figura 2 – Estrutura química dos meros de PVDF (a) e P(VDF-TrFE) (b).....40

Figura 3 – Estrutura cristalina da fase α não polar do PVDF; a, b e c são os parâmetros da célula unitária.....42

Figura 4 – Estrutura cristalina da fase β polar do PVDF, a, b e c são os parâmetros da célula unitária.....42

Figura 5 – Estrutura cristalina da fase γ polar do PVDF. As setas indicam a orientação dos momentos de dipolos nas moléculas; a e b são os parâmetros da célula unitária.....42

Figura 6 – Conformações moleculares mais importantes do PVDF: (a) TTT; (b) TGTG` e (c) TTTGTTTG`. As esferas de cor preta, branca (menor) e branca (maior) correspondem aos átomos de carbono, hidrogênio e flúor, respectivamente.....43

Figura 7 – Classificação dos modos de vibração molecular. (+) indica movimento na direção de sair da página e (-) indica movimento na direção de entrar na página....46

Figura 8 – Espalhamento elástico e inelástico da radiação incidente pelas moléculas. Espalhamentos: (a) Rayleigh; (b) Stokes; (c) anti-Stokes.....47

Figura 9 – Prensa utilizada para fabricação dos cilindros de polímeros sintético/natural, a qual dispõe de um controlador de temperatura.....52

Figura 10 – Molde de metal utilizado na fabricação dos cilindros de polímeros sintético/natural.....52

Figura 11 – Amostra cilíndrica e microtubo.....56

Figura 12 – Preparação do animal, em destaque a região na qual foi realizada a tricotomia, para a posterior implantação da amostra.....62

Figura 13 – Área da incisão cirúrgica isolada por campos estéreis, corte do: (a) tecido epitelial e (b) articulação do joelho.....62

Figura 14 – Procedimento de implantação das amostras nos animais. Sequência de etapas: (a) perfuração da região intercondiliana do osso fêmur, (b) orifício para a inserção da amostra, (c) amostra posicionada, (d) amostra sendo implantada.....63

Figura 15 – Suturas realizadas após a cirurgia, (a) plano muscular e (b) e plano da pele.....63

Figura 16 – Amostra removida do osso fêmur dos animais após o período de seis semanas.....65

Figura 17 – MEV da amostra (região externa) de PVDF/amido na proporção 66/33, não implantada, aumentos de: (a) 30X – escala: 800 µm, (b) 500X – escala: 50 µm, (c) 2000X – escala: 10 µm.....69

Figura 18 – MEV da amostra (região externa) de PVDF/amido na proporção 80/20, não implantada, aumentos de: (a) 30X – escala: 800 µm, (b) 500X – escala: 50 µm, (c) 2000X – escala: 10 µm.....70

Figura 19 – MEV da amostra (região externa) de PVDF/amido na proporção 90/10, não implantada, aumentos de: (a) 30X – escala: 800 µm, (b) 500X – escala: 50 µm, (c) 2000X – escala: 10 µm.....71

Figura 20 – MEV da amostra (região externa) de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33, não implantada, aumentos de: (a) 30X – escala: 800 µm, (b) 500X – escala: 50 µm, (c) 2000X – escala: 10 µm.....72

Figura 21 – Espectro de espalhamento Raman (400 a 3100 cm-1) do amido e PVDF em pó e da amostra de PVDF/amido na proporção 66/33.....75

Figura 22 – Espectros de espalhamento Raman (400 a 3100 cm-1) do amido e PVDF em pó e da amostra de PVDF/amido na proporção 80/20.....76

Figura 23 – Espectros de espalhamento Raman (400 a 3100 cm-1) do amido e PVDF em pó e da amostra de PVDF/amido na proporção 90/10.....77

Figura 24 – Espectros de espalhamento Raman (400 a 3100 cm-1) do amido e P(VDF-TrFE) em pó e da amostra de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33.....78

Figura 25 – Espectro de FTIR (ATR) (700 a 1800 cm-1) do amido e PVDF em pó e das amostras de PVDF/amido nas proporções 66/33, 80/20 e 90/10.....82

Figura 26 – Espectro de FTIR (ATR) (700 a 1800 cm-1) do amido e P(VDF-TrFE) em pó e da amostra de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33.....83

Figura 27 – Curvas do módulo de armazenamento (E') das amostras de PVDF/amido nas proporções 66/33, 80/20 e 90/10; e de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33.....86

Figura 28 – Curvas do módulo de perda (E'') das amostras de PVDF/amido nas proporções 66/33, 80/20 e 90/10; e de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33.....87

Figura 29 – MEV da amostra (região externa) de PVDF/amido na proporção 66/33, após 14 dias de ensaio in vitro, aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm, (b) 500X - escala: 50 µm, (c) 2000X - escala: 10 µm; após 28 dias de ensaio in vitro, aumentos de: (d) 40X - escala: 800 µm, (e) 500X - escala: 50 µm, (f) 2000X - escala: 10 µm; após 42 dias de ensaio in vitro, aumentos de: (g) 40X - escala: 800 µm, (h) 500X - escala: 50 µm, (i) 2000X - escala: 10 µm.....94

Figura 30 – MEV da amostra (região externa) de PVDF/amido na proporção 80/20, após 14 dias de ensaio in vitro, aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm, (b) 500X - escala: 50 µm, (c) 2000X - escala: 10 µm; após 28 dias de ensaio in vitro, aumentos

de: (d) 40X - escala: 800 µm, (e) 500X - escala: 50 µm, (f) 2000X - escala: 10 µm; após 42 dias de ensaio in vitro, aumentos de: (g) 40X - escala: 800 µm, (h) 500X - escala: 50 µm, (i) 2000X - escala: 10 µm.....95

Figura 31 – MEV da amostra (região externa) de PVDF/amido na proporção 90/10, após 14 dias de ensaio in vitro, aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm, (b) 500X - escala: 50 µm, (c) 2000X - escala: 10 µm; após 28 dias de ensaio in vitro, aumentos de: (d) 40X - escala: 800 µm, (e) 500X - escala: 50 µm, (f) 2000X - escala: 10 µm; após 42 dias de ensaio in vitro, aumentos de: (g) 40X - escala: 800 µm, (h) 500X - escala: 50 µm, (i) 2000X - escala: 10 µm.....96

Figura 32 – MEV da amostra (região externa) de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33, após 14 dias de ensaio in vitro, aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm, (b) 500X - escala: 50 µm, (c) 2000X - escala: 10 µm; após 28 dias de ensaio in vitro, aumentos de: (d) 40X - escala: 800 µm, (e) 500X - escala: 50 µm, (f) 2000X - escala: 10 µm; após 42 dias de ensaio in vitro, aumentos de: (g) 40X - escala: 800 µm, (h) 500X - escala: 50 µm, (i) 2000X - escala: 10 µm.....97

Figura 33 – MEV da amostra (secção transversal) de PVDF/amido na proporção 66/33, após 14 dias de ensaio in vitro, aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm, (b) 500X - escala: 50 µm, (c) 2000X - escala: 10 µm; após 28 dias de ensaio in vitro, aumentos de: (d) 40X - escala: 800 µm, (e) 500X - escala: 50 µm, (f) 2000X - escala: 10 µm; após 42 dias de ensaio in vitro, aumentos de: (g) 40X - escala: 800 µm, (h) 500X - escala: 50 µm, (i) 2000X - escala: 10 µm.....99

Figura 34 – MEV da amostra (secção transversal) de PVDF/amido na proporção 80/20, após 14 dias de ensaio in vitro, aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm, (b) 500X - escala: 50 µm, (c) 2000X - escala: 10 µm; após 28 dias de ensaio in vitro, aumentos de: (d) 40X - escala: 800 µm, (e) 500X - escala: 50 µm, (f) 2000X - escala: 10 µm; após 42 dias de ensaio in vitro, aumentos de: (g) 40X - escala: 800 µm, (h) 500X - escala: 50 µm, (i) 2000X - escala: 10 µm.....100

Figura 35 – MEV da amostra (secção transversal) de PVDF/amido na proporção 90/10, após 14 dias de ensaio in vitro, aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm, (b)

500X - escala: 50 µm, (c) 2000X - escala: 10 µm; após 28 dias de ensaio in vitro, aumentos de: (d) 40X - escala: 800 µm, (e) 500X - escala: 50 µm, (f) 2000X - escala: 10 µm; após 42 dias de ensaio in vitro, aumentos de: (g) 40X - escala: 800 µm, (h) 500X - escala: 50 µm, (i) 2000X - escala: 10 µm.....101

Figura 36 – MEV da amostra (secção transversal) de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33, após 14 dias de ensaio in vitro, aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm, (b) 500X - escala: 50 µm, (c) 2000X - escala: 10 µm; após 28 dias de ensaio in vitro, aumentos de: (d) 40X - escala: 800 µm, (e) 500X - escala: 50 µm, (f) 2000X - escala: 10 µm; após 42 dias de ensaio in vitro, aumentos de: (g) 40X - escala: 800 µm, (h) 500X - escala: 50 µm, (i) 2000X - escala: 10 µm.....102

Figura 37 – Espectros de espalhamento Raman (400 a 3100 cm-1) do amido e PVDF em pó e das amostras de PVDF/amido na proporção 66/33, após ensaio in vitro (14, 28 e 42 dias).....103

Figura 38 – Espectros de espalhamento Raman (400 a 3100 cm-1) do amido e PVDF em pó e das amostras de PVDF/amido na proporção 80/20, após ensaio in vitro (14, 28 e 42 dias).....104

Figura 39 – Espectros de espalhamento Raman (400 a 3100 cm-1) do amido e PVDF em pó e das amostras de PVDF/amido na proporção 90/10, após ensaio in vitro (14, 28 e 42 dias).....105

Figura 40 – Espectros de espalhamento Raman (400 a 3100 cm-1) do amido e P(VDF-TrFE) em pó e das amostras de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33, após ensaio in vitro (14, 28 e 42 dias).....106

Figura 41 – Espectro de FTIR (ATR) (700 a 1800 cm-1) de PVDF em pó (a), amostras após ensaio in vitro do PVDF/amido 66/33 - 14 dias (b), 28 dias (c), 42 dias (d) e do amido em pó (e).....107

Figura 42 – Espectro de FTIR (ATR) (700 a 1800 cm-1) de PVDF em pó (a), amostras após ensaio in vitro do PVDF/amido 80/20 - 14 dias (b), 28 dias (c), 42 dias (d) e do amido em pó (e).....108

Figura 43 – Espectro de FTIR (ATR) (700 a 1800 cm-1) de PVDF em pó (a), amostras após ensaio in vitro do PVDF/amido 90/10 - 14 dias (b), 28 dias (c), 42 dias (d) e do amido em pó (e).....109

Figura 44 – Espectro de FTIR (ATR) (700 a 1800 cm-1) de P(VDF-TrFE) em pó (a), amostras após ensaio in vitro do P(VDF-TrFE)/amido 66/33 - 14 dias (b), 28 dias (c), 42 dias (d) e do amido em pó (e).....110

Figura 45 – MEV da amostra (região externa) de PVDF/amido na proporção 66/33, após 42 dias de ensaio in vivo, aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm; (b) 500X - escala: 50 µm; (c) 2000X - escala: 10 µm.....112

Figura 46 – MEV da amostra (região externa) de PVDF/amido na proporção 90/10, após 42 dias de ensaio in vivo, aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm (Inset: aumentos de 200X - escala: 100 µm e 2000X - escala: 10 µm); (b) 500X - escala: 50 µm; (c) 2000X - escala: 10 µm.....113

Figura 47 – MEV da amostra (região externa) de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33, após 42 dias de ensaio in vivo, aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm (Inset: aumentos de 200X - escala: 100 µm e 2000X - escala: 10 µm); (b) 500X - escala: 50 µm; (c) 2000X - escala: 10 µm.....114

Figura 48 – MEV da amostra (secção transversal) de PVDF/amido na proporção 66/33, após 42 dias de ensaio in vivo, aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm; (b) 500X - escala: 50 µm e (c) 2000X - escala: 10 µm.....116

Figura 49 – MEV da amostra (secção transversal) de PVDF/amido na proporção 90/10, após 42 dias de ensaio in vivo, aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm; (b) 500X - escala: 50 µm e (c) 2000X - escala: 10 µm.....117

Figura 50 – MEV da amostra (secção transversal) de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33, após 42 dias de ensaio in vivo, aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm; (b) 500X - escala: 50 µm e (c) 2000X - escala: 10.....118

Figura 51 – Fotomicrografia da região do implante da amostra de PVDF/Amido 66/33, 42 dias após cirurgia. Coloração Eosina e Hematoxilina, aumentos de: (a) 100X; (b) 200X e (c) 400X.....120

Figura 52 – Fotomicrografia da região do implante da amostra de PVDF/Amido 66/33, 42 dias após cirurgia. Coloração Eosina e Hematoxilina, aumentos de: (a) 100X; (b) 200X e (c) 400X.....121

Figura 53 – Fotomicrografia da região do implante da amostra de PVDF/Amido 90/10, 42 dias após cirurgia. Coloração Eosina e Hematoxilina, aumentos de: (a) 40X e (b) 100X.....122

Figura 54 – Fotomicrografia da região do implante da amostra de P(VDF-TrFE)/Amido 66/33, 42 dias após cirurgia. Coloração Eosina e Hematoxilina, aumentos de: (a) 40X; (b) 100X e (c) 200X.....123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classe de materiais utilizados no corpo humano.....30

Tabela 2 – Ensaios de biocompatibilidade em dispositivos de comunicação externa: tecidos, ossos e comunicação dentária.....31

Tabela 3 – Ensaios de biocompatibilidade em dispositivos para implantes: tecidos e ossos.....32

Tabela 4 – Monômeros utilizados nos fluorpolímeros comerciais.....39

Tabela 5 – Categorias dos fluorpolímeros.....39

Tabela 6 – Informações cristalográficas das fases cristalinas do PVDF.....43

Tabela 7 – Composição das amostras de polímeros sintético/natural.....53

Tabela 8 – Bandas observadas nos espectros Raman do amido.....80

Tabela 9 – Principais atribuições das bandas do espectro de Raman dos filmes de PVDF e P(VDF-TrFE).....81

Tabela 10 – Principais atribuições das bandas do espectro de FTIR do amido.....84

Tabela 11 – Principais atribuições das bandas do espectro de FTIR dos filmes de PVDF e P(VDF-TrFE).....85

Tabela 12 – Medidas inicial, final e perda de massa das amostras de P(VDF-TrFE) 100 % para o ensaio *in vitro* de 28 dias.....89

Tabela 13 – Medidas inicial, final e perda de massa das amostras de PVDF 100 % para o ensaio *in vitro* de 42 dias.....90

Tabela 14 – Medidas inicial, final e perda de massa das amostras de PVDF/amido na proporção 90/10 para o ensaio *in vitro* de 42 dias.....91

Tabela 15 – Média e desvio padrão das medidas inicial, final e perda de massa das amostras de PVDF 100 % para o ensaio *in vitro* de 14, 28 e 42 dias.....91

Tabela 16 – Média e desvio padrão das medidas inicial, final e perda de massa das amostras de PVDF/amido 66/33 para o ensaio *in vitro* de 14, 28 e 42 dias.....92

Tabela 17 – Média e desvio padrão das medidas inicial, final e perda de massa das amostras de PVDF/amido 80/20 para o ensaio *in vitro* de 14, 28 e 42 dias.....92

Tabela 18 – Média e desvio padrão das medidas inicial, final e perda de massa das amostras de PVDF/amido 90/10 para o ensaio *in vitro* de 14, 28 e 42 dias.....92

Tabela 19 – Média e desvio padrão das medidas inicial, final e perda de massa das amostras de P(VDF-TrFE) 100 % para o ensaio *in vitro* de 14, 28 e 42 dias.....92

Tabela 20 – Média e desvio padrão das medidas inicial, final e perda de massa das amostras de P(VDF-TrFE)/amido 66/33 para o ensaio *in vitro* de 14, 28 e 42 dias.....93

SIGLAS

DMA =	Análise dinâmico-mecânica
FTIR =	Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier
MEV =	Microscopia eletrônica de varredura
EtO =	Óxido de etileno
PVDF =	Polifluoreto de vinilideno
P(VDF-TrFE) =	Polifluoreto de vinilideno com trifluoretileno
SEVA-C =	Copolímero de etileno-acetato de vinila

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....24
CAPITULO I: INTRODUÇÃO.....26
1.1 Tecido osséo.....26
1.2 Biomateriais.....29
1.3 Polímeros.....33
1.4 Amido.....34
1.5 Polímeros fluorados - polifluoreto de vinilideno e polifluoreto de vinilideno com trifluoretileno.....38
1.6 Técnicas de caracterização.....44
1.6.1 Espectroscopia vibracional.....44
1.6.1.1 Espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho.....44
1.6.1.2 Espectroscopia de espalhamento Raman.....47
1.6.2 Microscopia eletrônica de varredura.....48
1.6.3 Análise térmica dinâmico-mecânica.....49
CAPÍTULO II: PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....51
2.1 Fabricação dos cilindros de polímeros sintético/natural.....51
2.1.1 Cilindros prensados de polímeros sintético/natural.....51
2.2 Caracterização dos cilindros de polímeros sintético/natural.....54
2.2.1 Microscopia eletrônica de varredura.....54
2.2.2 Espectroscopia de espalhamento Raman.....54
2.2.3 Espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho por transformada de Fourier.....54
2.2.4 Análise térmica dinâmico-mecânica.....54
2.3 Estudo in vitro experimental.....56
2.3.1 Amostras.....56
2.3.2 Meio fisiológico.....57
2.3.3 Enzima α-amilase.....57
2.3.4 Esterilização por óxido de etilieno.....58
2.3.5 Secagem das amostras.....59
2.3.6 Cálculo da perda de massa.....59
2.3.7 Análise estatística.....60
2.4 Estudo in vivo.....61

2.4.1 Animais de experimentação.....61
2.4.2 Modelo experimental.....61
2.4.3 Procedimentos cirúrgicos.....61
2.4.4 Coleta do material.....64
2.4.5 Preparo dos cortes histológicos.....65
2.4.5.1 Fixação e lavagem do material.....65
2.4.5.2 Inclusão em parafina.....65
2.4.5.3 Método da confecção das lâminas.....66
2.4.6 Análise histológica.....67
CAPÍTULO III: CARACTERIZAÇÃO.....68
3.1 Microscopia eletrônica de varredura.....68
3.2 Espectroscopia de espalhamento Raman.....74
3.3 Espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho por transformada de Fourier.....82
3.4 Análise térmica dinâmico-mecânica.....86
CAPÍTULO IV: RESULTADOS DO ENSAIO IN VITRO.....88
4.1 Medidas de massa.....88
4.2 Microscopia eletrônica de varredura.....94
4.2.1 Imagens da superfície externa das amostras.....94
4.2.2 Imagens da secção transversal das amostras.....98
4.3 Espectroscopia de espalhamento Raman.....103
4.4 Espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho por transformada de Fourier.....107
CAPÍTULO V: RESULTADOS DO ESTUDO IN VIVO.....111
5.1 Microscopia eletrônica de varredura.....111
5.1.1 Imagens da superfície externa das amostras.....111
5.1.2 Imagens da secção transversal das amostras.....115
5.2 Análise histológica.....120
CAPÍTULO VI: CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....125
REFERÊNCIAS.....127
ANEXOS.....138

APRESENTAÇÃO

Nesta dissertação são apresentados os resultados obtidos no mestrado, o qual tem como objetivos principais: (i) otimizar a fabricação de blendas de poli(fluoreto de vinilideno), PVDF, ou de seu copolímero poli(fluoreto de vinilideno com trifluoretileno), P(VDF-TrFE), com o amido de milho na forma de cilindros; (ii) estudar as propriedades estruturais e mecânicas das blendas; (iii) implantar tais blendas (cilindros) no osso fêmur de ratos para verificar os efeitos do organismo sobre as blendas e vice-versa após o período de implantação. O PVDF e o P(VDF-TrFE) foram escolhidos por suas propriedades piezelétricos, vislumbrando a aplicação como material biocompatível, principalmente no que se refere à indução do crescimento do tecido ósseo. O amido de milho foi escolhido por sua possibilidade de ser absorvido pelo organismo, gerando uma matriz porosa para o crescimento de tecido. Além disso, o amido pode permitir o controle das propriedades mecânicas da blenda, dependendo da quantidade que é adicionado, e diminuir o custo de fabricação da blenda por apresentar um valor de aquisição menor que do PVDF e do copolímero P(VDF-TrFE). Além da possível compatibilidade entre as propriedades destes materiais e a aplicação desejável, tais escolhas proporcionam uma atuação interdisciplinar envolvendo diferentes pesquisadores, como é o caso do Prof. Antônio José Félix de Carvalho da EESC/USP, que forneceu o amido e todas as informações a ele relacionadas, da Profa. Rebeca Delatore Simões da UNOESTE, que auxiliou no processo de fabricação das amostras, e da co-orientação do Prof. José Carlos Camargo Filho do Departamento de Fisioterapia da FCT/UNESP, responsável pela implantação dos materiais e discussões gerais.

A fabricação das blendas de PVDF ou P(VDF-TrFE) com amido de milho foi realizada pela técnica de prensagem a quente. Este tipo de processamento foi escolhido porque evita a utilização de qualquer tipo de solvente orgânico, os quais têm se mostrado tóxicos ao organismo vivo. Além disso, permite a obtenção de amostras na forma cilíndrica, com dimensões adequadas para o implante no osso fêmur dos ratos. O projeto foi executado em três etapas distintas: 1) fabricação das amostras PVDF/amido nas proporções em massa de 90/10, 80/20 e 66/33 e P(VDF-

TrFE)/amido na proporção em massa de 66/33; 2) testes *in vitro* e 3) testes *in vivo*. O estudo *in vitro* das blendas de PVDF/amido e P(VDF-TrFE)/amido foi realizado sob ação da enzima α-amilase com o intuito de dar suporte ao estudo *in vivo* na fase de implantação das blendas nos ratos. Com relação à implantação, as blendas escolhidas foram as de PVDF/amido nas proporções em massa 66/33 e 90/10 e P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33. O local escolhido foi à região entre os côndilos medial e lateral do osso fêmur. As blendas foram caracterizadas via espectroscopia vibracional (espalhamento Raman e absorção no infravermelho), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise térmica dinâmica mecânica (DMA). Este projeto de mestrado teve origem no trabalho de doutorado da Profa. Rebeca Delatore Simões realizado na FCT/UNESP sob a orientação do Prof. Carlos José Leopoldo Constantino. Na tese de doutorado da Profa. Rebeca as blendas foram produzidas na forma de filmes, ao invés de cilindros, e os implantes foram realizados no dorso de ratos, na região subcutânea, visando verificar a biocompatibilidade das blendas em tecidos moles. A biocompatibilidade foi verificada pelo surgimento de resposta inflamatória normal, ou seja, aguda nos primeiros períodos e reação crônica nos períodos subsequentes, além da presença de tecido de granulação e fibrose cicatricial.

Levando-se em consideração os temas contidos neste trabalho, esta dissertação de mestrado está dividida da seguinte forma: o capítulo I traz uma introdução ao tecido ósseo, uma descrição dos materiais e os princípios físicos básicos das técnicas de caracterização utilizadas. O capítulo II traz o procedimento experimental realizado no trabalho de fabricação dos cilindros de PVDF ou P(VDF-TrFE) com amido de milho em diferentes proporções e informações relativas aos equipamentos e parâmetros utilizados na caracterização das amostras. Também neste capítulo encontram-se os procedimentos experimentais dos estudos *in vitro* e *in vivo*. O capítulo III apresenta os resultados da caracterização estrutural das amostras cilíndricas. O capítulo IV traz os resultados do estudo *in vitro*, bem como os resultados da caracterização estrutural das amostras cilíndricas após o ensaio *in vitro*. O capítulo V contém os resultados da caracterização estrutural das amostras após o ensaio *in vivo* e a análise histológica do tecido ósseo ao quais as amostras foram implantadas. Por fim, encontram-se no capítulo VI as conclusões e as perspectivas futuras.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1.1 Tecido osséo

O osso é um tecido conjuntivo complexo e dinâmico, especializado e altamente organizado. Caracteriza-se macroscopicamente pela sua dureza e resistência mecânica; microscopicamente por ter uma estrutura multifásica, heterogênea e anisotrópica[1]. Além disso, o osso possui relativamente pouca presença de células e muita substância intercelular formada por fibras de colágeno e substâncias de enrijecimento (BUENO e GLOWACKI, 2011). Todos os ossos possuem uma função mecânica, sendo que esta pode ser exercida como suporte estrutural ao corpo, postura e movimentos afins, fornecendo inserção a vários grupos musculares, permitindo a formação de alavancas capazes de fazer os músculos contraírem. Somada à função mecânica, os ossos também protegem os órgãos vitais do corpo (YAMASHITA, *et al.*, 2002) e, além desta, atuam como um reservatório para uma variedade de íons inorgânicos (cálcio, fósforo, etc.) utilizados pelos mais variados sistemas fisiológicos. Conjuntamente com o intestino e rins, os ossos contribuem para a regulação da homeostasia[2] do cálcio no plasma sanguíneo (AN e DRAUGHN, 2000; ETHIER e SIMMONS, 2007; BEHARI, 2009).

O osso responde e adapta-se à carga aplicada e tem a capacidade de remodelação. As células do esqueleto agem continuamente para manter a remodelação, sendo portanto um estado de equilíbrio dinâmico, tanto em termos de sua composição e estrutura quanto em respostas a forças mecânicas externas (ou ausência delas), através da adoção de mudanças em sua arquitetura normal. A remodelação é realizada por células especializadas do tecido ósseo, que são de três tipos: os osteoblastos, que são recrutados para a síntese óssea; os osteoclastos, que são responsavéis pelo processo de dissolução do osso, e os osteócitos e

[1] A propriedade das moléculas e materiais de apresentar variações nas propriedades físicas ao longo de diferentes eixos moleculares da substância.
[2] Processo de regulação pelo qual um organismo consegue a constância do seu equilíbrio.

células de revestimento, que residem permanentemente no tecido osséo (ETHIER e SIMMONS, 2007; BEHARI, 2009).

Etimologicamente, a palavra “piezeletricidade”, outra propriedade apresentada pelos ossos, tem suas raízes na antiga palavra grega “piezin”, que significa estresse ou pressão. O efeito piezelétrico é a capacidade de um material deformar-se em resposta a uma voltagem aplicada através dele e também do material gerar uma diferença de potencial elétrico entre suas extremidades quando enfrenta uma deformação mecânica aplicada (HALPERIN, 2004; LIRANI e LARAZETTI-CASTRO, 2005). Estes são respectivamente os efeitos piezelétricos direto e inverso. De acordo com essas propriedades, um elemento piezelétrico é um transdutor (conversor de energia) eletromecânico (RICHARSON, 1989; UEBERSCHLAG, 2001).

Vários ossos do esqueleto humano durante as atividades normais (andar, correr e sentar) sofrem a ação de forças que podem variar no tempo. O movimento ósseo consiste fisiologicamente não somente de tensão, compressão e cisalhamento, mas também de um momento de flexão que, para o osso longo compacto, pode produzir um gradiente de estresse ou tensão gerando uma combinação de respostas, envolvendo a piezeletricidade, que também pode ser dependente da temperatura e/ou da frequência (HALPERIN, 2004; ZHOU e UESAKA, 2006). A existência da piezeletricidade no osso é conhecida desde 1950 e relacionada ao colágeno, que é uma matriz orgânica cristalina do osso, composto de moléculas de proteína orgânica polares fortemente alinhadas. Além disto, propôs-se que o fenômeno piezelétrico (direto ou inverso) desempenha um importante papel fisiológico no crescimento ósseo, na remodelação e cicatrização de fraturas (HALPERIN, 2004; LIRANI e LARAZETTI-CASTRO, 2005; ZHOU e UESAKA, 2006).

A nutrição do osso depende, entre outros fatores, das solicitações mecânicas que ele recebe. Quando ocorre a diminuição da função ou imobilização (tratamento de fraturas), o organismo parece entender que nem toda a massa óssea é necessária para manter a integridade estrutural, o que implica em uma diminuição na massa óssea e na densidade mineral (VOLPON, 2008). Quando o osso é submetido a um campo elétrico, o efeito piezelétrico inverso origina uma deformação mecânica que altera a atividade celular, estimulando o movimento do fluido intersticial no osso. Isto contribui para o aumento do transporte de nutrientes e metabólitos (LIRANI e LARAZETTI-CASTRO, 2005).

Os defeitos ósseos geralmente ocorrem por trauma, excisão tumoral, degeneração patológica ou revisão de prótese. A reparação ortopédica normal pode ser impedida pelo tecido ósseo resultante e pela perda de tecido mole. Em tais circunstâncias, torna-se necessário a intervenção com transplante de tecido ou empregar a abordagem de engenharia tecidual para facilitar a regeneração e reparação óssea. A prática ortopédica atual para os defeitos ósseos consiste na utilização de enxerto ósseo autógeno, exógeno ou ainda o enxerto de materiais sintéticos (YU *et al.*, 2010).

O tratamento de defeitos ósseos por transplante autógeno, como no uso de osso da crista ilíaca, é considerado atualmente o melhor procedimento a ser adotado. Este procedimento tem elevada capacidade de formação óssea, fornece um arcabouço intrínseco para a formação do osso, possui baixo potencial de resposta imune e apresenta boas propriedades mecânicas. No entanto, caracteriza-se por ter várias limitações, tais como um suprimento finito de osso doador, morbidade do sítio local do doador, dor, possibilidade de danos aos nervos, infecção e fratura. Embora muitos dos problemas associados com a retirada do enxerto autólogo do doador possam ser superados usando enxerto de outro indivíduo (transplante exógeno) ou de um cadáver, este procedimento possui dificuldades adicionais, tais como, a redução da resposta osteogênica[3] e a rejeição potencial do enxerto (SALGADOS, COUTINHO, REIS, 2004).

[3] O processo de formação óssea. Histogênese do osso, incluindo a ossificação.

1.2 Biomateriais

No passado o desenvolvimento dos biomateriais não era orientado por critérios científicos. Eram projetados, sintetizados e fabricados para diversas necessidades industriais (áreas têxtil, aeroespacial e de defesa, por exemplo), sendo testados por tentativa e erro em animais e humanos (PARK e LAKES, 2007). Tal situação levou médicos, biólogos, físicos, químicos e engenheiros de materiais a colaborarem entre si para o desenvolvimento de novos materiais para aplicação na área médica, originando assim a "bioengenharia". Os pesquisadores perceberam a necessidade de controlar a composição, a pureza e as propriedades físicas dos materiais que eles estavam utilizando. Notaram também a necessidade do desenvolvimento de materiais com propriedades novas e especiais (RATNER *et al.*, 2004).

Um biomaterial pode ser definido como qualquer substância (que não seja um fármaco) ou combinação de substâncias que pode ser utilizado por um período de tempo indeterminado para a construção de dispositivos com a intenção de substituir uma parte, sistema ou função do corpo, de forma segura, confiável e fisiologicamente aceitável (SHI 2006; PARK e LAKES 2007). Podem ser classificados também quanto à origem em biológicos ou sintéticos (BARBUCCI, 2002). A tabela 1 traz alguns materiais que são utilizados no corpo humano.

Os biomateriais são distintos das outras classes de materiais por causa dos critérios especiais de biocompatibilidade que têm que satisfazer. Devem ainda atender às seguintes exigências: não ser cancerígeno, apresentar resistência à corrosão, ter baixa toxicidade e desgaste, ser esterilizável, funcional e manufaturável. No entanto, dependendo da aplicação, diferentes exigências podem surgir e, às vezes, esses requisitos podem ser completamente opostos (HIN, 2004).

Tabela 1 – Classe de materiais utilizados no corpo humano.

Material	Vantagens	Desvantagens	Exemplos
Polímeros (nylon, silicone, poliéster, politetrafluoretileno)	Resiliente, fácil de fabricar	Não é forte, se deforma com o tempo, pode degradar	Suturas, vasos sanguíneos, outros tecidos moles
Metais (Titânio e suas ligas de cobalto-cromo, ouro, prata, aço inoxidável)	Forte, resistente e dúctil	Podem corroer, denso, difícil de fabricar	Próteses, raíz de implantes dentários, marcapasso, fios de sutura, placas e parafusos
Cerâmicas (Alumina zircônia, fosfatos de cálcio, incluindo hidroxiapatita)	Biocompatível	Quebradiças, rigidas, frágil em tensão	Implantes dentais e ortopédicos
Compósitos (polimetilmetalicrato-hidroxiapatita)	Rijo, feitos sob medida	Difícil de fabricar	Cimento ósseo

Fonte: PARK e LAKES, 2007.

Biocompatibilidade indica a aceitação de um objeto estranho ao corpo (por exemplo um implante artificial) pelos tecidos circundantes e pelo corpo como um todo, ou seja, é a habilidade de um material ser compatível com os tecidos vivos. O material não deve perturbar ou induzir resposta no hospedeiro, mas sim promover a harmonia e uma boa integração tecido-implante (PARK e LAKES, 2007). Uma resposta inflamatória inicial é esperada e às vezes é considerada essencial no processo de cura. No entanto, a inflamação prolongada não é desejável, pois pode ser indicação de necrose tecidual ou de incompatibilidade (HIN, 2004). Os produtos das reações com os fluídos corpóreos devem ser tolerados pelos tecidos vizinhos do corpo, mantendo a função normal do tecido inalterada. A biocompatibilidade é função da localização do implante, bem como da sua reatividade química e da sua forma (CALLISTER, 2008). A avaliação da biocompatibilidade de um objeto ou produto para registro, como material de uso em saúde, deverá ser comprovada conforme disposto na norma ISO 10993. A tabela 2 apresenta os ensaios que comprovam a biocompatibilidade em dispositivos de comunicação externa. Na tabela 3 encontram-se os ensaios para os dispositivos utilizados como implantes (ABDI, 2011). Nas tabelas 2 e 3 os testes de reprodutibilidade/desenvolvimento e o de

biodegradação, ambos suplementares, não são aplicados a produtos que interagem com o tecido ósseo.

Tabela 2 – Ensaios de biocompatibilidade em dispositivos de comunicação externa: tecidos, ossos e comunicação dentária.

Ensaios		**Duração do contato**		
		Limitado[4]	Prolongado[4]	Permanente[4]
Iniciais	Citotoxicidade	X	X	X
	Sensibilização	X	X	X
	Reatividade Intracutânea ou de Irritação	X	●	●
	Toxicidade sistêmica (aguda)	●	●	●
	Toxicidade sub-crônica (sub-aguda)		●	●
	Genotoxicidade		X	X
	Implantação		X	X
	Hemocompatibilidade			
Suplementares	Toxicidade crônica			●
	Carcinogenicidade			X
	Reprodutibilidade/Desenvolvimento			
	Biodegradação			

Legenda: X – ensaios contemplados pela norma ISO 10993; ● ensaios adicionais que devem ser realizados. Fonte: ABDI, 2011.

[4] Tempo de duração de contato: limitado (menos que 24 horas); prolongado (de 24 horas até 30 dias); permanente (mais que 30 dias).

Tabela 3 – Ensaios de biocompatibilidade em dispositivos para implantes: tecidos e ossos.

Ensaios		**Duração do contato**		
		Limitado[4]	Prolongado[4]	Permante[4]
Iniciais	Citotoxicidade	X	X	X
	Sensibilização	X	X	X
	Reatividade Intracutânea ou de Irritação	X	●	●
	Toxicidade sistêmica (aguda)	●	●	●
	Toxicidade sub-crônica (sub-aguda)		●	●
	Genotoxicidade		X	X
	Implantação		X	X
	Hemocompatibilidade			
Suplementares	Toxicidade crônica			X
	Carcinogenicidade			X
	Reprodutibilidade/Desenvolvimento			
	Biodegradação			

Legenda: X – ensaios contemplados pela norma ISSO 10993; ● ensaios adicionais que devem ser realizados. Fonte: ABDI, 2011.

A biodegradação é definida como a degradação gradual de um material mediado por atividade biológica específica, com a conversão de material em intermediários de menor complexidade ou produtos finais de solubilização, de hidrólise simples, ou de hidrólise catalisadas por enzimas (SHALABY e BURG, 2004). Porém, as condições em que ocorre e a cinética das reações são extremamente variáveis. A taxa de degradação de polímeros é regulada por diversos fatores físico-químicos intrínsecos (peso molecular médio, distribuição do peso molecular, cristalinidade, equilíbrio hidrofílico-hidrofóbico do polímero, a existência de ligações hidrolisáveis, área de superfície) e extrínsecos (natureza do ambiente biológico/celular, estresse aplicado) RUIS *et al.*, 2008).

1.3 Polímeros

A palavra polímero é derivada das palavras gregas polis "muitos" e meros "partes". Assim, um polímero é uma molécula grande (macromolécula) construída pela repetição de unidades químicas de pequeno porte denominadas meros. A natureza química dos polímeros começou a ser elucidada no início dos anos 1920, quando Hermann Staudinger concluiu em suas pesquisas sobre o amido, borracha natural e celulose que estes compostos consistiam de cadeias gigantes de átomos de carbono (adicionadas de átomos de oxigênio, no caso dos polissacarídeos) mantidas unidas por ligações covalentes. Staudinger reformulou a teoria de cadeias moleculares e introduziu a palavra *Makromolekül* na literatura científica em 1922 (EBEWELE, 2000). Essa ideia foi recebida com incredulidade e foi ridicularizada por colegas. Porém, em uma reunião científica em Dusseldorf, em 1926, Staudinger apresentou resultados, incluindo a determinação das massas molares, o que levou à aceitação gradual da ideia nos anos seguintes (BOWER, 2002).

Os polímeros utilizados em aplicações médicas podem ser categorizados em quatro grupos: inertes; naturais; bioativos e biodegradáveis, sendo que esta classificação não separa claramente um grupo de polímero de outros. Atualmente os polímeros são amplamente utilizados em medicamentos e em procedimentos cirúrgicos, incluindo aplicações intracorpórea, paracorpórea e extracorpórea, repectivamente dentro, na interface e fora do organismo (SRICHANA e DOMB, 2009).

1.4 Amido

O amido é um dos mais importantes polímeros naturais estudados para a produção de materiais biodegradáveis. O amido é uma matéria prima promissora devido a sua abundante disponibilidade em decorrência da produção ser maior que a demanda. Também porque a poluição causada pelos polímeros sintéticos de origem petroquímica tem levado ao desenvolvimento de materiais poliméricos mais adequados aos critérios de preservação ambiental (MALIK *et al.*, 2010). O amido é um polissacarídeo produzido por diversas plantas (FERREIRA, 2008) e representa a principal fonte de armazenamento energético na forma de carboidratos (ARAÚJO, 2010). O amido é digerível por uma série de organismos vivos variando de bactérias a humanos (PASHKULEVA *et al.*, 2010). Além disto, apresenta propriedades hidrofílicas (STAGNER e NARAYAN, 2011) e higroscópicas[5] (JIMÉNEZ *et al.*, 2012). Muitos amidos comerciais são isolados de vegetais tais como milho, trigo, batata e mandioca. Estes vegetais contêm elevadas quantidades de amido, normalmente entre 60 e 90% em peso seco (SIMÕES, 2009).

A organização do amido se dá na forma de grânulos nos quais o tamanho, formato, morfologia, composição e estrutra supramolecular dependem da fonte botânica. O diâmetro dos grânulos geralmente varia de menos de 1 µm a mais de 100 µm, e o formato pode ser esférico, ovóide, ou ligeiramente irregular (BERTOLINI, 2010). Além disto, apresenta propriedade de associação intermolecular forte via ligação de hidrogênio formada pelos grupos de hidroxila na superfície do grânulo (XIAO, LU, XU, 2009).

A estrutura química do amido é composta por unidades de glicoses ligadas principalmente através de ligações glicosídicas α-D-(1 → 4). Embora a elucidação estrutural do amido esteja sendo efetuada, geralmente é estabelecido que o amido é um material heterogêneo contendo duas microestruturas na sua cadeia: a amilose e a amilopectina. A amilose é essencialmente uma estrutura linear de unidades de glicose α-1,4 ligadas entre si. As moléculas de amilose são compostos de 200 a 20000 unidades de glicose, formando um estrutura em hélice devido aos ângulos de ligação entre as unidade de glicose. A amilopectina é uma estrutura altamente ramificada de cadeias curtas α-1,4 (cerca de 30 unidades de glicose) unidas por ligações α-1,6, aproximadamente a cada 20 ou 30 unidades de glicose, ao longo da

[5] Material que absorve a umidade do seu ambiente circundante.

cadeia. As moléculas de amilopectina são formadas por cerca de dois milhões de unidades de glicose (PAWAR *et al.*, 2008; YU, 2009).

A Figura 1 mostra a estrutura da amilose e amilopectina. A maioria dos amidos possui proporções de amilose e de amilopectina quase idênticas, sendo que a composição que prevalece é a que apresenta de 22 a 26% de amilose e de 74 a 78% de amilopectina (FERREIRA, 2008). Também na estrutura química das cadeias do amido encontram-se muitos grupos hidroxila. Destes, dois estão ligados ao segundo e terceiros carbonos da glicose, hidroxilas secundárias, e um grupo hidroxila primário conecta-se ao sexto carbono, quando este não está ligado. Os grupos hidroxila disponíveis nas cadeias de amido potencialmente apresentam reatividade específica para álcoois. Em outras palavras, eles podem ser oxidados e reduzidos, podendo participar na formação de ligações de hidrogênio, éteres e ésteres (TOMASIK e SCHILLING, 2004).

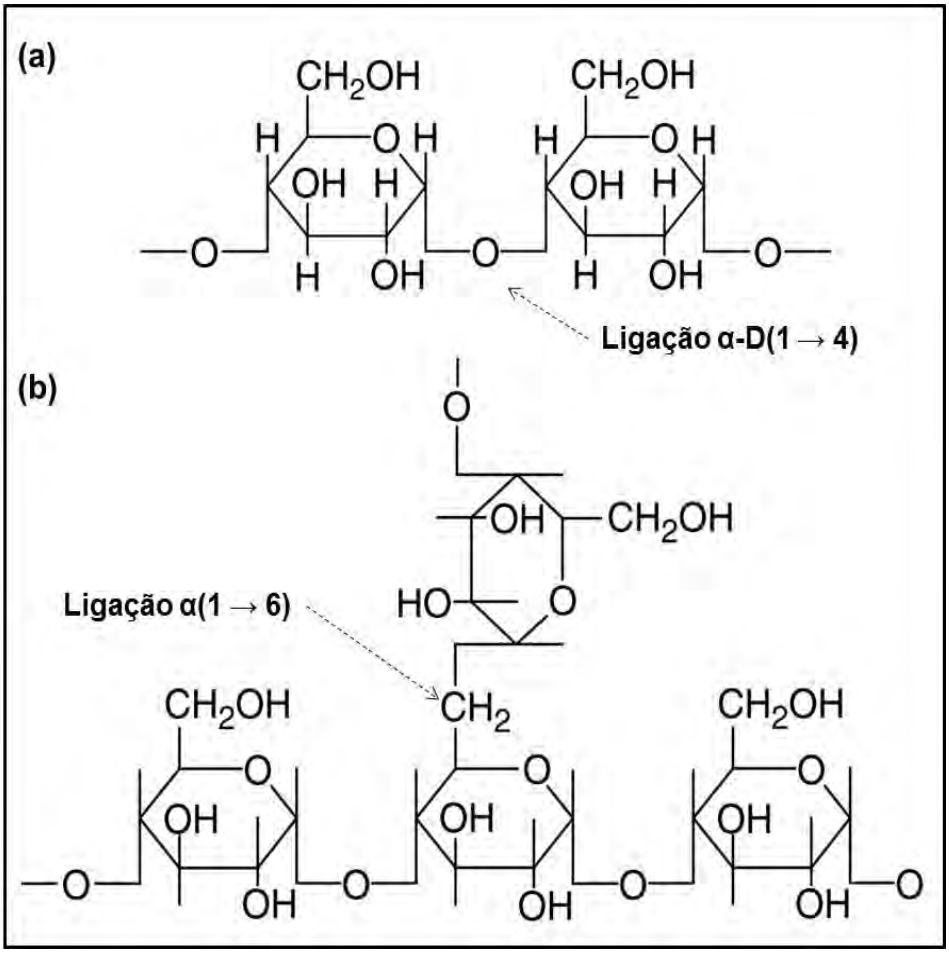

Figura 1 – Estrutura da amilose (a) e da amilopectina (b).

A notável biodegradabilidade do amido o distingue de outros polissacarídeos como a celulose, tornando-o um excelente material para exploração comercial. Na área de biomateriais a exploração deste polissacarídeo iniciou há somente 15 anos. Tal demora foi devido às pobres propriedades mecânicas e suas dificuldades de processamento. Além disto, o amido é um polímero sensível a umidade e os produtos de amido puro são muito quebradiços. A mistura com polímeros é uma das abordagens que permitem superar estes problemas (PASHKULEVA *et al.*, 2010).

Blendas à base de amido têm demonstrado uma grande versatilidade de processamento e utilização em diferentes campos de aplicação (PASHKULEVA *et al.*, 2010). A utilização do amido como um biomaterial na área biomédica encontra aplicação como polímero biodegradável em sistemas de liberação controlada de drogas (BALMAYOR *et al.*, 2008; DUARTE, MANO, REIS, 2010); em *scaffolds* de engenharia de tecidos para a regeneração óssea e de cartilagens (GOMES *et al.*, 2008, TUZLAKOGLU *et al.*, 2009, SANTOS *et al.* 2010) e como implantes de

substituição óssea e cimentos ósseos (SUNDARAM, DURANCE, WANG, 2008). Especificamente para a área ortopédica foi proposto o uso de blendas baseadas em amido como um material análogo ao osso para fixação temporária de fraturas (REIS e CUNHA, 1995).

1.5 Polímeros fluorados - polifluoreto de vinilideno e polifluoreto de vinilideno com trifluoretileno

Os materiais fluorados têm a sua relevância relacionada a variadas áreas de pesquisas e aplicações, tais como a produção de energia, microeletrônica e fotônica, pigmentos, utensílios domésticos, dispositivos médicos, tecnologia automotiva, aeroespacial e de plásticos (KEMNITZ e TRESSAUD, 2010), representando um grupo bastante especializado de materiais poliméricos. Possuem notável versatilidade apresentando-se como resinas rígidas, termoplásticos e elastômeros. Além disso, podem ser semicristalinos ou totalmente amorfos. Exibem também uma combinação única de propriedades relevantes, ligadas principalmente à baixa polarizabilidade, a forte eletronegatividade do átomo de flúor (F), ao seu pequeno raio de Van der Waals (1,32 Å) e a forte energia de ligação entre os átomos de carbono (C) e F (485 $kJ \bullet mol^{-1}$) que tem um impacto positivo na resistência à oxidação e à estabilidade hidrolítica. Sendo assim, os fluorplásticos com elevado conteúdo de F apresentam alta resistência à degradação (química, térmica, de envelhecimento e climática), excelente inatividade (solventes, hidrocarbonetos, ácidos e álcalis), baixa constante dielétrica, baixa inflamabilidade, baixos índices de refração e de absorção da umidade (AMEDURI, 2009).

A química dos fluorpolímeros é derivada de compostos utilizados na indústria de refrigeração. Em 1930 foram feitos esforços para desenvolver refrigerantes líquidos atóxicos, inertes e de baixa ebulição. A descoberta inesperada do politetrafluoretileno (PTFE) por Roy Plunkett em 1938 nos laboratórios da Du Pont durante a pesquisa com refrigerantes inaugurou o campo dos perfluorpolímeros[6] e a sua posterior comercialização. Desde aquela época um grande número de novos tipos de polímeros contendo o F tem sido desenvolvido, particularmente nas últimas duas décadas. Os monômeros comercialmente importantes são apresentados na tabela 4. Estes podem ser combinados para produzir homopolímeros, copolímeros e terpolímeros. Diversos fluorpolímeros têm elevado ponto de fusão, notavelmente o PTFE e perfluoralcóxi alcano (PFA). Fluorpolímeros comerciais com exceção de PTFE e fluoreto de polivinil (PVF) são processáveis por moldagem a temperatura elevada em formatos de filmes, chapas,

[6] Composto orgânico com flúor em que todos os átomos de hidrogênio foram substituídos por átomos de flúor na cadeia carbônica, entretanto a molécula também contém pelo menos um átomo ou grupo funcional diferentes.

contornos e molduras usando métodos convencionais de fabricação. As categorias de fluorpolímeros comerciais estão listadas na tabela 5 (DROBNY, 2009).

Tabela 4 – Monômeros utilizados nos fluorpolímeros comerciais.

Composto	**Fórmula**
Etileno	$CH_2 = CH_2$
Tetrafluoretileno	$CF_2 = CF_2$
Clorotrifluoretileno	$CF_2 = CClF$
Fluoreto de Vinilideno	$CH_2 = CF_2$
Fluoreto de Vinil	$CFH = CH_2$
Propileno	$CH_3CH = CH_2$
Hexafluorpropeno	$CF_3CF = CF_2$
Éter Perfluormetilvinil	$CF_3OCF = CF_2$
Éter Perfluorpropilvinil	$CF_3CF_2CF_2OCF = CF_2$

Fonte: DROBNY, 2009.

Tabela 5 – Categorias dos fluorpolímeros.

		Parcialmente Fluorados	**Perfluorados**
Cristalinos	Resinas	ETFE	PTFE
		PVDF	PFA
		PVF	FEP
		PCTFE	
Amorfos	Resinas	LUMIFLON (FEVE)	CYTOP
			TEFLON AF
	Elastômero	FKM	FFKM
		AFLAS (FEPM)	

Nota: ETFE, copolímero de etileno e tetrafluoretileno; PCTFE, poli(clorotrifluoretileno); FEVE, etileno vinil éter fluorado; MFA, copolímero de éter perfluormetilvinil e tetrafluoretileno; PFA, copolímero de éter perfluorpropilvinil e tetrafluoretileno; FEP, copolímero etileno propileno fluorado; PVDF, poli(vinilideno fluoreto); PVF (fluoreto de polivinil).
Fonte: DROBNY, 2009.

Os materiais orgânicos ferroelétricos têm atraído continuada atenção por várias décadas, desde a descoberta da ferroeletricidade[7] em polímeros fluorados, como no polifluoreto de vinilideno (PVDF) e em seus copolímeros, por exemplo, com o trifluoroetileno (PVDF-TrFE). A estrutura química do PVDF e do P(VDF-TrFE) é apresentada na Figura 2. O PVDF é um polímero termoplástico semicristalino, com boa estabilidade mecânica e química (alto nível de estabilidade a ácidos e bases). As características físicas e elétricas do PVDF dependem do seu peso e distribuição moleculares, conformação das cadeias, forma cristalina e de defeitos de encadeamento (AMEDURI, 2009). Muito do interesse pelo PVDF advém de suas

[7] Propriedade que um material dielétrico possui de poder apresentar polarização na ausência de um campo elétrico.

potenciais aplicações como material piezelétrico, piroelétrico e ferroelétrico, especialmente no campo de sensores e dispositivos atuadores (KUWAJIMA *et al.*, 2009; TIWARI *et al.*, 2009; LIU *et al.* 2010).

As propriedades ferroelétricas do PVDF podem ser melhoradas por modificação química por meio de copolimerização com TrFE, em virtude da tendência do polímero cristalizar-se na fase β (KOIZUMI, 1995). Em particular, os copolímeros de P(VDF-TrFE) com conteúdo de VDF de 50-85 mol% têm sido amplamente reportados para possíveis aplicações como dispositvos de mémoria ROM (*ready only memory*). Nesta faixa de composição, o copolímero P(VDF- TrFE) apresenta uma fase β ferroelétrica estável à temperatura ambiente com polarização espontânea dos dipolos C-F e uma mudança única na conformação da cadeia entre trans-trans (ferroelétricos, polar) e trans-gauche (paraelétrica, não-polar) perto de sua temperatura de transição Curie[8] (PRABU, KIMA, PARK, 2009).

No PVDF-TrFE o surgimento da piezeletricidade está associada aos seguintes fatores: a quantidade de VDF (na faixa de 0,65 a 082) e de TrFE no polímero; a temperatura de recozimento (140 °C) e; ao processo conhecido como *poling*, o qual consiste em aquecer o polímero a altas temperaturas na presença de um campo elétrico, e resfriar até a temperatura ambiente com o campo elétrico aplicado (KOGA e OHIGASHI, 1986).

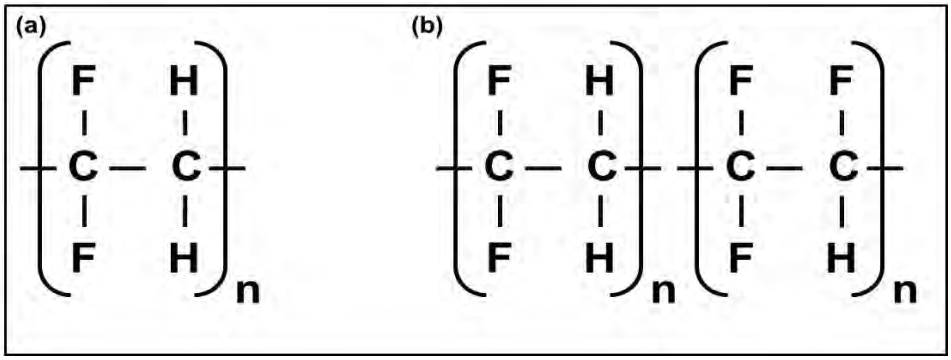

Figura 2 – Estrutura química dos meros de PVDF (a) e P(VDF-TrFE) (b).

O PVDF apresenta cristalinidade típica de 50 a 70% com cinco formas cristalinas distintas denominadas α, β, γ, δ e ε, sendo que as mais frequentes são as α, β, e γ (AMEDURI, 2009). Este polimorfismo está diretamente relacionado com o tamanho do raio de Van der Waals do átomo de F (1,32 Å) ser ligeiramente maior que do átomo de hidrogênio (H) (1,20 Å). A Figura 3 (TASHIRO, 1995) traz a fase α,

[8] A temperatura acima da qual um material ferrimagnético e ferromagnético torna-se paramagnético.

a mais comum, sendo cineticamente mais favorável, tal fase é formada a partir do resfriamento do PVDF. Apresenta uma conformação trans gauche na qual as cadeias poliméricas estão em conformação apolar (TGTG') e os átomos de H e F alternam-se de forma regular em ambos os lados da cadeia (BACHMAN e LANDO, 1981), apresentando uma estrutura tipo hélice. A Figura 4 (TASHIRO, 1995) apresenta a fase β polar que é a mais termodinamicamente estável. Esta fase apresenta uma conformação (TTT) em zigue-zague das cadeias poliméricas (NASEF, SAIDI, DAHLAN, 2002). A fase β possui propriedades ferroelétricas (DILLON *et al.*, 2006) que se originam a partir da orientação do forte dipolo nas unidades monoméricas [CH_2CF_2] ao longo da cadeia polimérica. Tal fase pode ser obtida por alguns processos, tais como: i) extrusão a partir do PVDF na fase γ; ii) recozimento em altas temperaturas a partir do PVDF na fase γ; iii) copolimerização com outros polímeros, tais como o trifluoroetileno (PVDF-TrFE) (TASHIRO, 1995); iv) deformação (estiramento) do PVDF, formato de filme, na fase α (CONSTANTINO *et al*. 2005). Assim como para o P(VDF-TrFE), a piezeletricidade no PVDF pode ser obtida pelo processo conhecido como *poling* (KAWAI, 1969). A Figura 5 (TASHIRO, 1995) mostra a fase γ polar que é uma conformação intermediária (TTTGTTTG') entre as fases α e β. A fase γ é obtida quando o polímero sofre estresse mecânico moderado ou quando é aplicada alta temperatura de recozimento (AMEDURI, 2009). Na tabela 6 encontram-se as informações cristalográficas do PVDF. A Figura 6 (TASHIRO, 1995) traz as conformações moleculares mais importantes do PVDF.

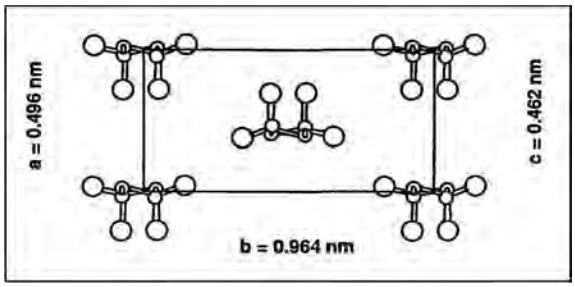

Figura 3 – Estrutura cristalina da fase α não polar do PVDF; a, b e c são os parâmetros da célula unitária. Fonte: TASHIRO, 1995.

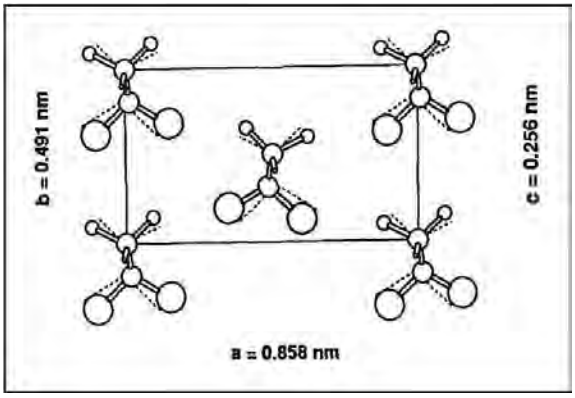

Figura 4 – Estrutura cristalina da fase β polar do PVDF, a, b e c são os parâmetros da célula unitária. Fonte: TASHIRO, 1995.

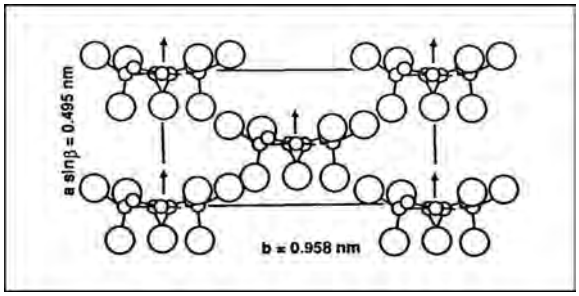

Figura 5 – Estrutura cristalina da fase γ polar do PVDF. As setas indicam a orientação dos momentos de dipolos nas moléculas; a e b são os parâmetros da célula unitária. Fonte: TASHIRO, 1995.

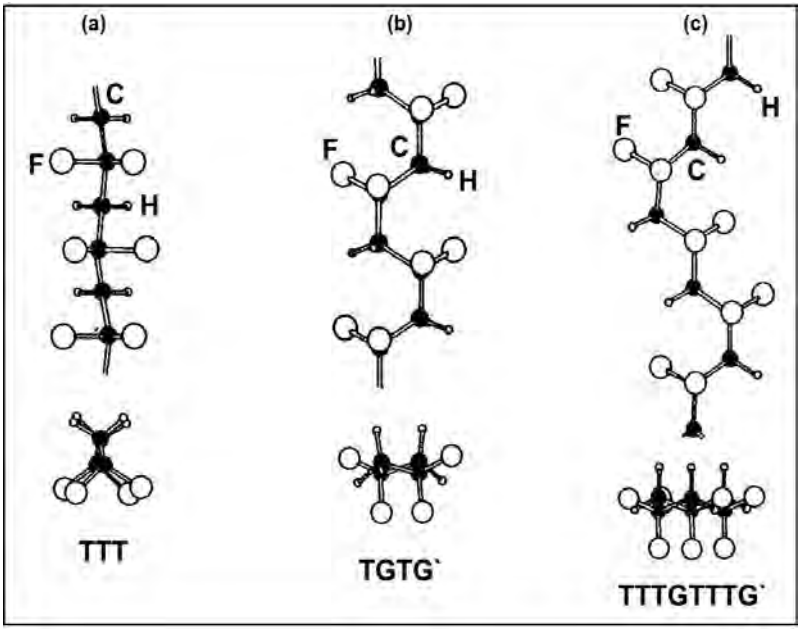

Figura 6 – Conformações moleculares mais importantes do PVDF: (a) TTT; (b) TGTG` e (c) TTTGTTTG`. As esferas de cor preta, branca (menor) e branca (maior) correspondem aos átomos de carbono, hidrogênio e flúor, respectivamente. Fonte: TASHIRO, 1995.

Tabela 6 – Informações cristalográficas das fases cristalinas do PVDF.

	Parâmetros da célula unitária	**Cadeia Molecular**	**N**
Fase β	a = 8,58 Å, b = 4,91 Å , c (e.f.) = 2,56 Å	TTT, planar-zigue-zague	2
Fase α	a = 4,96 Å, b = 9,64 Å, c (e.f.) = 4,96 Å	TGTG`	2
Fase γ	a = 4,96 Å, b = 9,58 Å, c (e.f.) = 9,23 Å	TTTGTTTG`	2

N = número de cadeias por célula unitária; e.f. = eixo da fibra. Fonte: TASHIRO, 1995.

Dentre as variadas aplicações em que o PVDF e seus copolímeros podem ser utilizados, uma nos últimos anos tem alcançado destaque: a aplicação como biomaterial. Nesta linha há aplicações do PVDF e do P(VDF-TrFE) como, por exemplo, em malhas cirúrgicas protéticas para reparação de hérnia abdominal (KLINGE *et al.*, 2002; JUNGE *et al.,* 2009), no desenvolvimento de membranas e *scaffolds* para cultura e arcabouço de células neurais para reposição e reparação de tecido neural devido a doenças ou traumas (LEE *et al.,* 2009; YOUNGA *et al.*, 2010) e no sensoriamento do fluxo sanguíneo em veias do fígado após transplante (JUNG *et al.*, 2009). Na área de abrangência das aplicações como biomateriais, encontram-se aquelas relativas à reparação de tecido ósseo, tais como no desenvolvimento de membranas e *scaffolds* para o favorecimento da adesão, do espalhamento e da proliferação de células de origem mesenquimal (osteoblastos e fibroblastos) (HEUTS *et al.*, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2011).

1.6 Técnicas de caracterização

Atualmente existem várias técnicas de caracterização de polímeros. Neste trabalho os materiais foram caracterizados em termos de suas propriedades estruturais e termomecânicas. A espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*) e a espectroscopia micro-Raman são duas técnicas básicas de espectrocopia vibracional e fornecem informações sobre a identificação, a determinação de grupos funcionais e estrutura das moléculas. Na microscopia eletrônica de varredura (MEV) podemos obter informações sobre a morfologia do material. A análise térmica dinâmico-mecânica (DMA, do inglês *dynamic mechanical analysis*) está no grupo de técnicas que analisam as proriedades térmicas de um material, trazem informações relativas aos processos de relaxação molecular e também para a determinação de suas propriedades mecânicas inerentes, tais como módulo de elasticidade (E'), módulo de dissipação viscosa (E'') e fator de perda do material (tan δ).

1.6.1 Espectroscopia vibracional

Na espectroscopia vibracional a identificação dos modos vibracionais de uma molécula e a detecção das vibrações moleculares ocorre pela absorção da radiação na região espectral do infravermelho (IR) ou pelo espalhamento inelástico da luz por uma molécula na faixa da radiação visível (VIS) e ultravioleta (UV). A espectroscopia vibracional pode ser utilizada para analisar gases, líquidos e sólidos, sendo amplamente utilizada para examinar materiais inorgânicos e orgânicos (LENG, 2008).

1.6.1.1 Espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho

A região espectral do IR compreende a radiação com número de onda (k) que varia de cerca de 12800 cm^{-1} a 10 cm^{-1} ou com comprimento de onda (λ) de 0,78 a 1000 μm (HOF, 2003). O espectro IR é subdividido em três regiões denominadas: IR próximo - região espectral situada entre 12800 cm^{-1} (0,78 μm) e 4000 cm^{-1} (2,50 μm), IR médio - corresponde à região entre 4000 cm^{-1} (2,50 μm) e 200 cm^{-1} (50,00

μm) e IR distante - faixa do espectro entre 200 cm^{-1} (50,00 μm) e 10 cm^{-1} (1000,00 μm) (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2007). A espectroscopia de absorção no IR é certamente uma das mais importantes técnicas analíticas disponíveis atualmente. Uma de suas grandes vantagens é que praticamente qualquer amostra, nos mais variados estados, pode ser estudada. Líquidos, soluções, pastas, pós, filmes, fibras, gases e superfícies podem ser analisados. A técnica é rápida, sensível e de fácil manuseio (HOF, 2003; STUART, 2004).

A técnica de espectroscopia de absorção no IR é baseada nas vibrações dos átomos de uma molécula e as características do espectro obtido (frequência, intensidade e forma das bandas de absorção) estão diretamente relacionadas com a estrutura molecular, apresentando-se como uma propriedade física única do composto analisado. Um espectro de absorção no IR é comumente obtido por meio da incidência de radiação na faixa do IR (ondas eletromagnéticas que correspondem às vibrações fundamentais das ligações dos átomos) através de uma amostra e determinando-se qual fração da radiação incidente é absorvida. Os picos (ou bandas) presentes no espectro obtido correspondem à frequência de vibração de uma parte da molécula da amostra a ser analisada (HOF, 2003; STUART, 2004; LENG, 2008).

No processo de absorção da radiação IR, a qual apresenta variações de energia na ordem de 8 a 40 kJ/mol, a energia absorvida promove o aumento da amplitude dos movimentos de vibração das moléculas (PAVIA *et al*., 2009). A absorção ocorre devido a varição do momento de dipolo elétrico (μ) da molécula durante o seu movimento vibracional. Nestas circunstâncias o campo elétrico alternado da radiação pode interagir com a molécula e causar variações na amplitude de seus movimentos. Moléculas de espécies polinucleares, com distribuição de cargas assimétricas, apresentam variação no μ. Contudo, em moléculas de espécies homonucleares como O_2, N_2 ou Cl_2, não ocorre variação do μ. Como consequência, tais compostos não absorvem a radiação IR (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2007).

As vibrações de uma molécula poliatômica podem ser consideradas como um sistema de osciladores acoplados. Se na molécula houver N átomos, existirá um total de 3N graus de liberdade de movimento para todos os átomos da molécula. Subtraindo as translações puras e as rotações da molécula inteira sobram (3N-6) graus de liberdade vibracionais para uma molécula não linear e (3N-5) graus de

liberdade vibracionais para uma molécula linear. As vibrações são classificadas em duas categorias distintas: estiramento axial e deformação angular. Nas vibrações de estiramento temos uma variação contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos. Nesta categoria temos estiramentos simétricos e antissimétricos. Nas vibrações de deformação temos a variação no ângulo entre duas ligações. Nesta categoria temos quatro tipos diferentes: *scissoring* (deformação simétrica no plano), *rocking* (deformação antissimétrica no plano), *wagging* (deformação simétrica fora do plano) e *twisting* (deformação antissimétrica fora do plano). A Figura 7 demonstra as vibrações moleculares descritas (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2007).

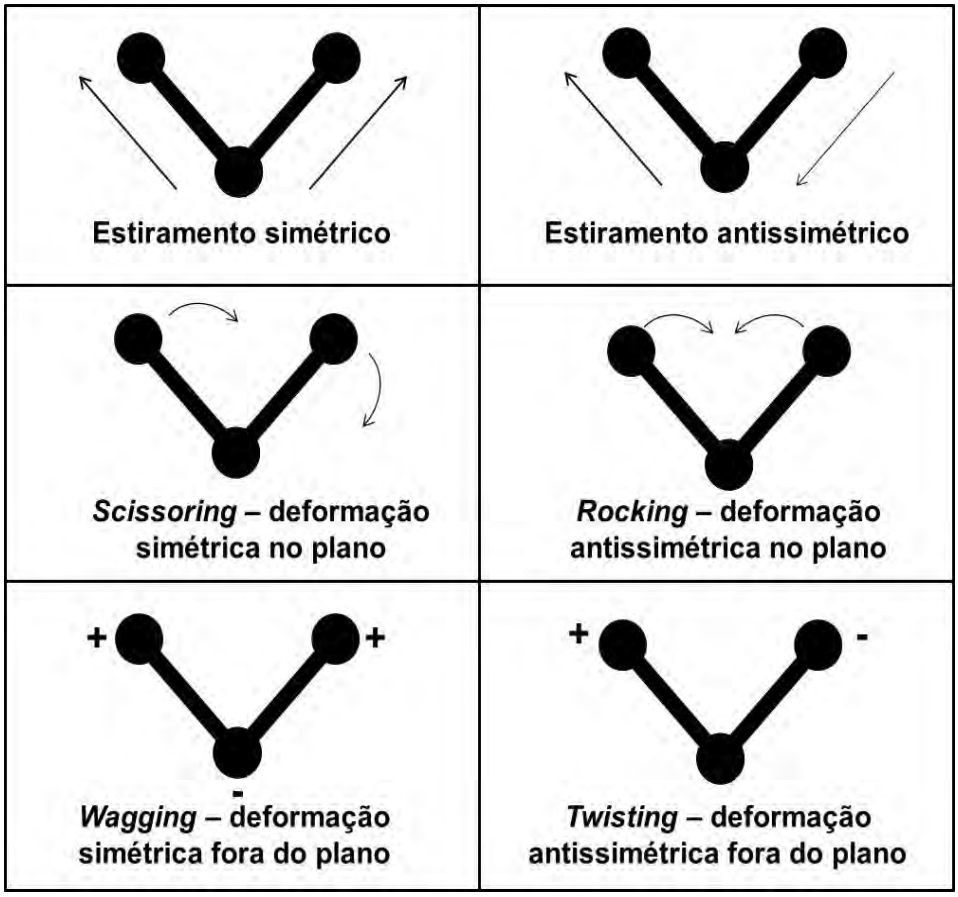

Figura 7 – Classificação dos modos de vibração molecular. (+) indica movimento na direção de sair da página e (-) indica movimento na direção de entrar na página.

1.6.1.2 Espectroscopia de espalhamento Raman

A espectroscopia Raman é baseada no fenômeno de espalhamento da radiação eletromagnética pela matéria. Quando os materiais são irradiados por uma radiação eletromagnética monocromática, esta será espalhada pelas moléculas tanto de maneira elástica como inelástica. Na Figura 8(a) o espalhamento elástico (Rayleigh) significa que a radiação espalhada tem a mesma frequência ν_e da radiação incidente ν_i, ou seja $\nu_i = \nu_e$. Já no espalhamento inelástico (Raman), Figuras 8(b) e 8(c), a luz espalhada possui frequência diferente da radiação incidente, assim temos $\nu_i \neq \nu_e$ (SMITH, 2005; AROCA, 2006; LENG, 2008).

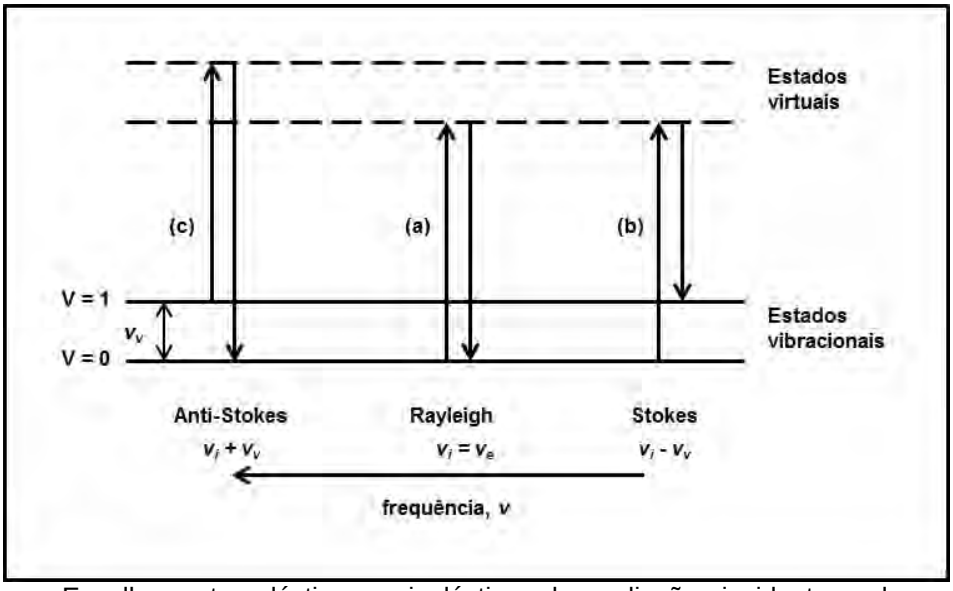

Figura 8 – Espalhamento elástico e inelástico da radiação incidente pelas moléculas. Espalhamentos: (a) Rayleigh; (b) Stokes; (c) anti-Stokes.

Podemos relacionar a energia *E* de um dado estado vibracional com a frequência vibracional da molécula ν_v. Assim, a variação de energia correspondente à diferença de energia entre os níveis de vibração molecular inicial e final será dada pelas mudanças de frequência dos fótons espalhados. Se a frequência do fóton diminui de ν_i a $(\nu_i - \nu_v)$, o nível final de energia de vibração molecular é maior que a energia inicial, Figura 8(b). Neste caso ocorre o espalhamento denominado de Stokes. Se o fóton aumenta a frequência de ν_i a $(\nu_i + \nu_v)$, o nível de energia final é menor do que a energia inicial, Figura 8(c). Neste caso tem-se o espalhamento anti-Stokes. A intensidade do espalhamento anti-Stokes é significativamente inferior que a do espalhamento Stokes. Isto ocorre porque, a temperatura ambiente, geralmente

os níveis vibracionais excitados são menos densamente populados do que o nível vibracional fundamental (SMITH, 2005; SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2007; LENG, 2008).

Classicamente, ao aplicar-se um campo elétrico a um átomo ou molécula, a distribuição eletrônica é modificada, consequentemente a geometria molecular é distorcida (AROCA, 2006). Para se ter um modo Raman ativo, a radiação incidente deve induzir mudanças na polarizabilidade (α_0) de uma molécula. Um campo elétrico é capaz de gerar um dipolo induzido na molécula porque seus núcleos carregados positivamente são deslocados no sentido do campo e seus elétrons são deslocados no sentido contrário do campo (LENG, 2008). A polarizabilidade é uma medida da capacidade de induzir o vetor momento de dipolo (P) por um campo elétrico, sendo definida pela seguinte equação:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_i t) + \tfrac{1}{2}(\partial\alpha/\partial q)_0 q_0 E_0 \{\cos[2\pi(\nu_i + \nu_v)t] + \cos[2\pi(\nu_i - \nu_v)t]\}$$

Na equação acima E_0 é a intensidade do campo elétrico. A polarizabilidade determina a deformação da nuvem de elétrons de uma molécula por um campo elétrico externo. Matematicamente a atividade Raman exige que a primeira derivada da polarizabilidade com relação à vibração na posição de equilíbrio não seja zero (LENG, 2008; COLOMBAN e GOUADEC, 2009), ou seja:

$$(\partial\alpha/\partial q)_{q=0} \neq 0$$

1.6.2 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica versátil e examina a estrutura microscópica dos materiais. Encontra aplicação em muitos campos, tais como, pesquisas médicas, ciência e engenharia dos materiais, indústria eletrônica e de semicondutores, geologia e ciência forense. A MEV apresenta como vantagens, em relação à microscopia ótica, elevada resolução de 2 a 5 nm. Em comparação a microscocpia eletrônica de trasmissão (MET), tem maior simplicidade na preparação das amostras. Além disto, permite a análise de materias de grande espessura. Também possui elevada resolução lateral, grande profundidade de foco

(imagem com aparência tridimensional) e facilidade de combinação com microanálise química (EGERTON, 2005; MICHLER, 2008).

Na interação dos elétrons do feixe eletrônico (elétrons primários) com a matéria podem ocorrer as seguintes situações: os eletróns sofrem reflexão ou os elétrons penetram no material fornecendo energia aos elétrons dos átomos presentes na amostra, os quais podem ser ejetados (elétrons secundários). Os elétrons ejetados são emitidos com uma variedade de energias, sendo mais difícil concentrá-los em uma imagem pelas lentes eletrônicas. Para solucionar este problema utiliza-se o princípio de digitalização, no qual os elétrons primários são focados em uma sonda eletrônica de pequeno diâmetro que é varrida em toda a amostra. Faz uso do fato que campos elétricos ou magnéticos aplicados perpendicularmente a um feixe de elétrons podem ser usados para mudar a direção de deslocamento dos mesmos. Ao digitalizar simultaneamente em duas direções perpendiculares, uma área quadrada ou retangular da amostra pode ser coberta e a imagem desta área poderá ser formada através da captura de elétrons secundários de cada ponto da amostra (EGERTON, 2005).

1.6.3 Análise térmica dinâmico-mecânica

O estudo de materiais elásticos e viscoelástico sob condições de estresse ou tensão cíclica é chamada de análise dinâmico-mecânica (DMA). As alterações periódicas de estresse ou tensão permitem a análise da resposta dinâmica da amostra em relação à outra variável (WUNDERLICH, 2005; CHARTOFF, MENCZEL, DILLMAN, 2009) e fornece uma medida de quão resistente uma amostra pode ser. Além disso, fornece informações do amortecimento de um material, o qual está relacionado com a energia que um material pode absorver. A DMA é comumente usada em uma variedade de materiais, por exemplo, termoplásticos, termofixos, compósitos e biomateriais. As amostras podem ser avaliadas numa variedade de formas, incluindo barras, tiras, discos, fibras e filmes (DUNCAN, 2008).

O comportamento viscoelástico pode ser definido como a resposta a uma força aplicada ou deslocamento de material exibindo um comportamento tempo-dependente, como observado em polímeros, por exemplo. A viscoelasticidade é uma combinação de comportamento viscoso e elástico. A resposta da deformação ocorre em uma taxa específica, determinada pela estrutura (molecular ou física) da

amostra em teste (DUNCAN, 2008). Nos experimentos com DMA a tensão cíclica aplicada é representada por uma função senoidal que pode ser generalizada, em notação complexa, como:

$$\varepsilon_{(t)} = \varepsilon_0 \, e^{i\omega t}$$

Onde ε_0 é a deformação na amplitude máxima, ε_t é a deformação num dado tempo, ω é a freqüência de oscilação angular em radianos da onda senoidal (rad/s) e t é o tempo. Uma análise do ciclo de estresse e tensão provê a relação do estado estacionário do estresse em resposta à tensão aplicada. Esta relação é uma quantidade complexa, o módulo de elasticidade complexo do sistema (E^*), que apresenta componentes em fase e fora de fase é definido como:

$$\sigma_{(t)}/\varepsilon_{(t)} = E^* = E' + iE''$$

Onde $\sigma(t)$ é a tensão a um dado tempo, E’ é o módulo de elasticidade, E’’ é o módulo de dissipação viscosa. E’ também é referido como módulo de armazenamento e E’’ como módulo de perda. O fator de perda do material ou tangente de perda é dado como:

$$\tan \delta = (E''/E')$$

O fator de perda do material representa a razão de energia dissipada por ciclo da energia armazenada. Fisicamente o módulo de armazenamento E’ está relacionado com a rigidez do material e o módulo de perda E’’ refere-se a capacidade de amortecimento do material.

CAPÍTULO II

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Fabricação dos cilindros de polímeros sintético/natural

O PVDF empregado na fabricação dos cilindros foi o Florafon F4000 HD adquirido da empresa Atochem na forma de pequenos tarugos com massa molar de 64,03 g/mol. O PVDF sofreu um processo de moagem, em um moinho criogênico, no qual foram obtidas dimensões de aproximadamente 0,03 mm de diâmetro. A moagem ocorreu no Departamento de Engenharia de Materiais (DEMA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O copolímero P(VDF-TrFE) 72/28 (em massa) foi obtido da Piezotech na forma de pó. O amido de milho nativo foi fornecido pelo professor Antônio J. F. de Carvalho, atualmente na ESSC/USP, com 28% de amilose e tamanho médio de partícula de 25 μm, cujo nome comercial é Amidex 3001 (*corn products*). A vidraria utilizada em cada experimento foi lavada com água e detergente neutro, enxaguada em água corrente, depois água destilada e, por fim, em acetona. A secagem da vidraria ocorreu em temperatura ambiente.

2.1.1 Cilindros prensados de polímeros sintético/natural

Os cilindros de PVDF e de P(VDF-TrFE) foram fabricados através da fusão do pó destes materiais em uma prensa de até 15 toneladas da marca Forte *Charllot* monitorada por um controlador de temperatura modelo PXV da marca Contempcom (Figura 9). Os materiais para a fabricação dos cilindros de PVDF/amido e P(VDF-TrFE)/amido foram misturados manualmente em um almofariz e em seguida tamisados em uma peneira com abertura de 0,21 mm. O conteúdo misturado foi então distribuído cuidadosamente sobre os orifícios do molde, este colocado entre duas folhas de *Kapton* sobrepostas e prensado de acordo com os parâmetros de prensagem descritos posteriormente neste capítulo.

Figura 9 – Prensa utilizada para fabricação dos cilindros de polímeros sintético/natural, a qual dispõe de um controlador de temperatura.

Diversos cilindros foram fabricados até que o procedimento de fabricação fosse melhorado e, após esta etapa, fabricou-se o lote com os cilindros estudados neste trabalho. Este processo foi aprimorado por meio de modificações nos parâmetros de temperatura da prensa, pressão exercida sobre os cilindros e tempo de prensagem, os quais influem na homogeneidade da amostra. Foi fabricado um molde constituído por uma placa retangular de alumínio com 3,00 mm de espessura; 100,00 mm de comprimento e 96,00 mm de largura, com 21 áreas circulares vazadas de 3,14 mm^2 (Figura 10).

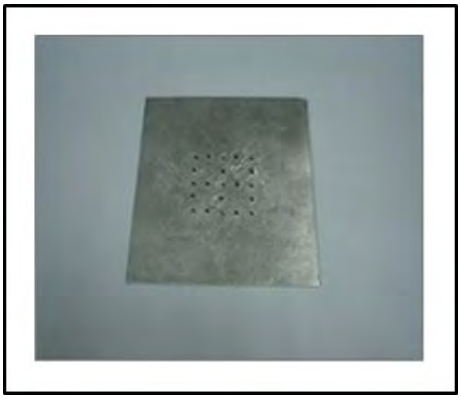

Figura 10 – Molde de metal utilizado na fabricação dos cilindros de polímeros sintético/natural.

As amostras cilíndricas fabricadas possuíam as seguintes dimensões: 3,00 mm de altura e 2,00 mm de diâmetro, correspondendo a um volume de 9,42 mm^3. Estas dimensões foram escolhidas para permitir o posterior implante nas cobaias *in vivo* e também para que os cilindros sejam os mais homogêneos possíveis. As

proporções de polímeros sintético/natural foram adotadas baseando-se em estudos anteriores (SIMÕES, 2009). As proporções de materiais adotadas na composição dos cilindros encontram-se na tabela 7.

Tabela 7 – Composição das amostras de polímeros sintético/natural.

Composição da amostra	**% em massa de cada material em relação à massa total da amostra**
0,45 g PVDF / 0,05 g amido	90,00 % PVDF / 10,00 % amido
0,40 g PVDF / 0,10 g amido	80,00 % PVDF / 20,00 % amido
0,33 g PVDF / 0,17 g amido	66,66 % PVDF / 33,33 % amido
0,33 g P(VDF-TrFE) / 0,17 g amido	66,66 % P(VDF-TrFE) / 33,33 % amido

Abaixo são descritos os parâmetros utilizados em cada etapa da prensagem dos cilindros:

Para os cilindros de PVDF/amido:

- Temperatura da prensa: ~ 190 °C.
- Seis prensagens de dois minutos e duas toneladas, sendo que após a terceira prensagem a face da placa de metal foi trocada de lado.

Para os cilindros de P(VDF-TrFE) /amido:

- Temperatura da prensa: ~ 155 °C.
- Seis prensagens de dois minutos e duas toneladas, sendo que após a terceira prensagem a face da placa de metal foi trocada de lado.

Durante a prensagem fez-se um alívio de aproximadamente 5 segundos entre cada prensagem para liberação das bolhas de ar presentes durante o processo.

2.2 Caracterização dos cilindros de polímeros sintético/natural

2.2.1 Microscopia eletrônica de varredura

A investigação da morfologia das amostras foi realizada utilizando-se a técnica MEV, o equipamento empregado foi da marca Jeol modelo JSM-820 (3 KV e 20 KV). As amostras foram metalizadas com 20 nm de ouro em um equipamento Balzers Union modelo SCD 004.

2.2.2 Espectroscopia de espalhamento Raman

As medidas de espectroscopia Raman foram obtidas com um espectrógrafo micro-Raman, modelo in-Via da marca Renishaw. O laser utilizado possui o comprimento de onda de 785 nm com uma potência na amostra da ordem de microwatt (μW) e a rede de difração foi de 1200 linhas por mm. O tempo de exposição adotado foi de 10 s e a quantidade de acumulações foi igual a cinco.

A microscopia óptica foi obtida por um microscópio óptico da marca Leica (série DMLM), acoplado ao espectrógrafo, cuja objetiva possui um aumento de 50x fornecendo uma resolução espacial da ordem 1,00 μm^2, detector CCD Peltier (resfriado a -70 °C) e plataforma motorizada XYZ (motor de passo – 0,10 μm) onde foram posicionadas as amostras.

2.2.3 Espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho por transformada de Fourier

As medidas de FTIR foram realizadas em um espectrômetro da marca Bruker Optics modelo Vector 22 e utilizou-se o modo de reflexão total atenuada (ATR, do inglês *attenuated total reflectance*) não polarizada, com 128 varreduras e resolução espectral de 4 cm^{-1}.

2.2.4 Análise térmica dinâmico-mecânica

Para a execução das medidas de DMA o equipamento utilizado foi o DMA 242C da marca Netzch. A faixa de temperatura adotada no teste variou de -100 a

200 °C, razão de aquecimento de 5 °C/min, frequência de compressão de 1 Hz e resfriamento com N_2. Estas medidas foram realizadas nas amostras cilíndricas para todas as proporções de PVDF/amido 90/10, 80/20, 66/33 e P(VDF-TrFE)/amido na proporção de 66/33.

2.3 Estudo *in vitro*

2.3.1 Amostras

Colocou-se um cilindro em cada microtubo (tipo *Eppendorf*), sendo que cada um destes possui um volume de 1,50 mL (Figura 11).

Figura 11 – Amostra cilíndrica e microtubo.

A quantidade total de cilindros utilizados neste ensaio de absorção *in vitro* foi de 106, divididos em 18 grupos de 6 amostras cada. Dos 18 grupos, 6 foram grupos controles, sendo 3 deles com amostras de PVDF e os outros 3 com amostras de P(VDF-TrFE) puros em formato cilíndrico. Os 12 grupos restantes correspondem às proporções de materiais, ou seja, 9 para o PVDF/amido nas proporções 66/33, 80/20 e 90/10 e 3 para o P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33. Os 18 grupos foram ainda separados em 3 períodos de implantes: 14, 28 e 42 dias. A separação dos grupos para cada período de implante ocorreu da seguinte forma:

- 1 grupo controle com 6 cilindros de PVDF.
- 1 grupo controle com 6 cilindros de P(VDF-TrFE).
- 1 grupo com 6 cilindros de PVDF/amido 66/33.
- 1 grupo com 6 cilindros de PVDF/amido 80/20.
- 1 grupo com 6 cilindros de PVDF/amido 90/10.
- 1 grupo com 6 cilindros de P(VDF-TrFE)/amido 66/33.

2.3.2 Meio fisiológico

O sistema de tamponamento selecionado para o ensaio enzimático de degradação *in vitro* foi o tampão fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline* - PBS). Uma solução fisiológica que mimetiza a concentração salina do soro humano (0,10 M pH = 7,40), tendo a seguinte composição em sais:

- 1,91 g/L de fosfato monossódico (NaH_2PO_4) anídrico.
- 11,94 g/L de fosfato disódico (Na_2HPO_4) anídrico.
- 7,20 g/L de cloreto de sódio (NaCl).
- 0,02 % w/v de azida sódica (NaN_3).

Na formulação da solução tampão escolheu-se utilizar o fosfato de sódio por ser um reagente com elevada capacidade de tamponamento que é amplamente utilizada na biologia molecular, bioquímica e cromatografia. A maioria das soluções tampão de sódio fosfato neutro é constituída por misturas das formas monobásico (NaH_2PO_4) e dibásico (Na_2HPO_4) em diferentes graus, dependendo do pH desejado. A azida sódica foi adicionada para impedir o crescimento microbiano (AZEVEDO, SANTOS, REIS, 2008; MARTINS *et al*., 2009). Os microtubos foram imersos em um banho ultratermostatizado (Empresa Marconi, modelo MA-184, -10 a 100 °C) na temperatura de 37,00 ± 1,00 °C. A temperatura utilizada foi escolhida por estar dentro do limite fisiológico do corpo humano (ARAÚJO, CUNHA, MOTA, 2010).

2.3.3 Enzima α-amilase

A concentração de α-amilase geralmente encontrada no plasma de sangue humano, em adultos saudáveis, está na faixa de 46 a 244 unidades (U) por litro (MARTINS *et al.*, 2009). Neste trabalho o valor adotado para concentração de α-amilase foi de 150 U/L, escolhido por ser próximo ao valor médio (145 U/L) da faixa de referência citada acima.

A enzima utilizada foi a α-amilase oriunda da saliva humana, tipo IX-A, em forma de pó liofilizado com massa de 2,39 mg e 210,00 U/mg de pó (Sigma referência A0521). A solução enzimática apresenta uma atividade 2400,00 U/mg de proteína, de acordo com o fabricante. Por definição do fabricante uma unidade (U) libera 1,00 mg de maltose a partir do amido em 3 minutos em um pH de 6,90 a temperatura de 20 °C.

Para a produção da solução enzimática que foi adicionada ao tampão PBS procedeu-se da seguinte maneira:

- Primeiramente determinou-se a concentração de α-amilase (U) por mL e o valor encontrado foi de 0,15 U/mL.
- Com este valor e com o de 210,00 U/mg de pó procedeu-se o cálculo da quantidade de α-amilase em mg de pó por mL. O valor encontrado foi de $7,14*10^{-4}$ mg/mL.
- De posse deste último valor e da quantidade em gramas de α-amilase (2,39 mg), obteve-se o valor em mL de solução tampão que deveria ser preparada. O resultado obtido foi de 3347,37 mL. Para evitar a preparação de uma grande quantidade de solução tampão, diluiu-se os 2,39 mg de pó liofilizado em 33,47 mL, ou seja, um solução 100 vezes mais concentrada.
- Obteve-se então 33 microtubos do tipo Eppendorf de 1,00 mL com solução de α-amilase em tampão PBS com concentração de 15,00 U/mL, os quais foram armazenados em congelador (-20 °C).
- Para cada ensaio in vitro, um microtubo contendo 1,00 mL da solução enzimática foi adicionado a 99,00 mL da solução tampão PBS, assim o valor de concentração de 0,15 U/mL foi alcançado. A solução foi homogeneizada cuidadosamente devido à fragilidade da enzima.
- Finalmente o conteúdo desta solução foi transferido para os microtubos contendo as amostras.

2.3.4 Esterilização por óxido de etilieno

Na esterilização das amostras e dos microtubos a técnica utilizada foi a de esterilização por óxido de etileno (EtO). A esterilização foi realizada na empresa OXETIL Ltda. A seguir estão os parâmetros aplicados ao protocolo de esterilização:

- Tempo total do ciclo de esterilização: 5 horas ± 30 minutos.
- Gás utilizado: EtO (de acordo com a portaria interministerial n° 482 de 16/04/1999).
- Vácuo inicial: -0,55 ± 0,10 bar.
- Tempo de condicionamento: 10 ± 1 minutos.
- Tempo de pressurização: 1 a 5 minutos.
- Tempo de fase de esterilização: 210 ± 1 minutos.

- Temperatura: 37,00 a 63,00 °C.
- Umidade relativa: 40,00 a 80,00 %.
- Vácuo final: -0,50 ± 0,10 bar.
- Aeração mecânica: 60,00 ± 10,00 minutos (composto por N_2, aeração e hiperventilação).
- Aeração mecânica forçada: PO-07.021.
- Indicador biológico: Attest marca 3M – lote 2012-11 AA (esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372), resultado negativo.
- Indicador químico multiparamétrico (Comply) e indicador químico (fita Indox): Dentro dos padrões indicativos de esterilização eficiente.
- Cilindro de EtO: 041 (lote do gás).
- Concentração de EtO: 450 a 1200 mg/L, em conformidade com ANSI/AAMI ST 41:1999, 2000 *Association for the Advancement of Medical Instrumentation*.

2.3.5 Secagem das amostras

Após o ensaio *in vitro*, realizou-se o processo de secagem das amostras, o qual consistiu da seguinte sequência de procedimentos: cada amostra foi lavada quatro vezes sucessivas com água deionizada; em seguida realizou-se a secagem com lenço de papel; mais quatro banhos sucessivos com álcool etílico absoluto (99,95%) com a duração de 1 hora cada e secagem com lenço de papel.

2.3.6 Cálculo da perda de massa

As amostras tiveram a sua massa medida com uma balança de precisão da marca Shimadzu do Brasil, modelo AUW220D. Tal medição foi realizada em dois momentos, antes e após o período de ensaio *in vitro.* Porém na segunda medida, antes da medição das massas, procedeu-se o processo de secagem das amostras. Para a obtenção da perda de massa percentual foi empregada a seguinte equação:

$$\text{Perda de massa (\%)} = [(\text{Massa inicial} - \text{Massa final}) / \text{Massa inicial}] * 100$$

2.3.7 Análise estatística

A análise estatística foi aplicada com o objetivo de verificar se houve diferenças significativas entre as medidas das massas inicial e final dos seis tipos de composições nos períodos de 14, 28 e 42 dias de experimento de degradação do amido. Devido ao fato do tamanho amostral de cada um dos grupos não ser suficientemente grande, igual a seis em cada período, aplicou-se o teste não paramétrico de *Wilcoxon*, que não exige as pressuposições que os testes paramétricos estabelecem (distribuição Normal). Outro motivo para a utilização do teste de *Wilcoxon* é que este tem aplicação na comparação de duas amostras de dados pareadas, ou seja, dependentes (FIELD, 2009). Os testes foram realizados no programa computacional SPSS. Para a execução da análise foi utilizado um nível de significância de 0,05 (5 %). As hipóteses do teste são descritas como:

- H_0: as medidas das massas não diferem estatisticamente (inicial e final).
- H_1: as medidas das massas diferem estatisticamente (inicial e final).

Na secção 4.1 encontram-se os resultados que apresentaram significância estatística, além destes também serão apresentados resultados que consideramos relevantes. Os resultados serão apresentados por tabelas das massas final, inicial e percentual de perda de massa das amostras.

2.4 Estudo *in vivo*

No estudo em animais, realizado em caráter de projeto piloto, um número menor de combinações de amostras foram implantadas nos ratos. A quantidade de ratos foi definida pelo professor de estatística Prof. Dr. Carlos Padovani da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

2.4.1 Animais de experimentação

Foram utilizados nove ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus novergicus*, variedade albina, *Rodentia, Mammalia*) com idade de 90 dias, obtidos junto à Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE). Os animais ficaram mantidos no biotério do laboratório de histologia da FCT/UNESP em gaiolas individuais suspensas, sob condições de temperatura ambiente média de 22,00 ± 2,00 °C e alimentados com ração padrão (marca Primor, ração para coelhos e roedores) e água de torneira fornecida *ad libitum*.

2.4.2 Modelo experimental

Os animais foram submetidos a processo cirúrgico para a implantação das amostras na região intercondiliana. Os animais foram separados em três grupos (cada grupo contendo três animais): G1 animais que receberam as amostras de PVDF/amido na proporção 66/33; G2 composto de animais que receberam as amostras de PVDF/amido na proporção 90/10 e; G3 constituído de animais que receberam as amostras de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33. Neste modelo experimental não foram implantadas amostras com a proporção de PVDF/amido 80/20 devido ao modelo tratar-se de um estudo piloto. Além disto, ao realizarmos tal escolha, limitamos assim a quantidade de animais utilizados e; não comprometemos as análises quantitativas e qualitativas das amostras após o estudo.

2.4.3 Procedimentos cirúrgicos

Os animais permaneceram em jejum pré-operatório de 8 horas, sendo a seguir submetidos à anestesia por meio de injeção intramuscular de cloridrato de

ketamina (50,00 mg/mL) e cloridrato de xilazina (20,00 mg/mL) na dose de 25,00 mg/Kg e 3 mg/Kg (HARKNESS e WAGNER, 1993). A manutenção do plano anestésico, quando necessário foi feita com a utilização de injeção intramuscular de ketamina com metade da dose inicial. Para o implante das amostras cilíndricas foi realizada tricotomia da área a ser operada, utilizando-se lâminas de barbear, sendo toda a área lavada com solução de polvedine e posteriormente com solução de álcool iodado a 2% (Figura 12), seguindo-se o isolamento da área cirúrgica por meio de campos estéreis (Figura 13).

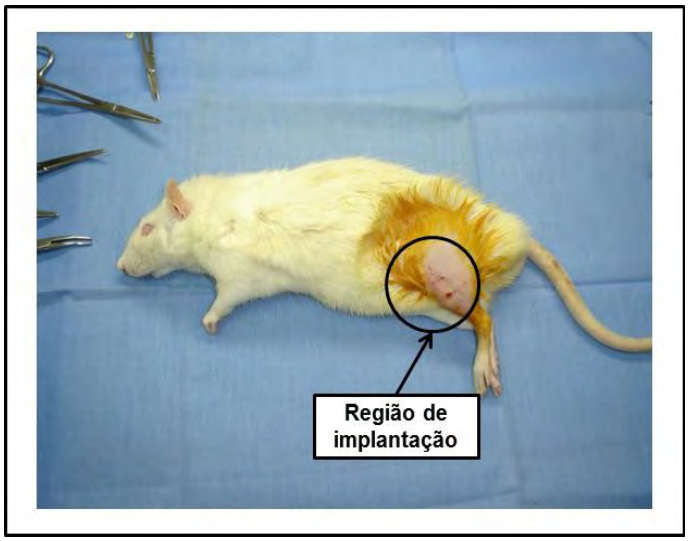

Figura 12 – Preparação do animal, em destaque a região na qual foi realizada a tricotomia, para a posterior implantação da amostra.

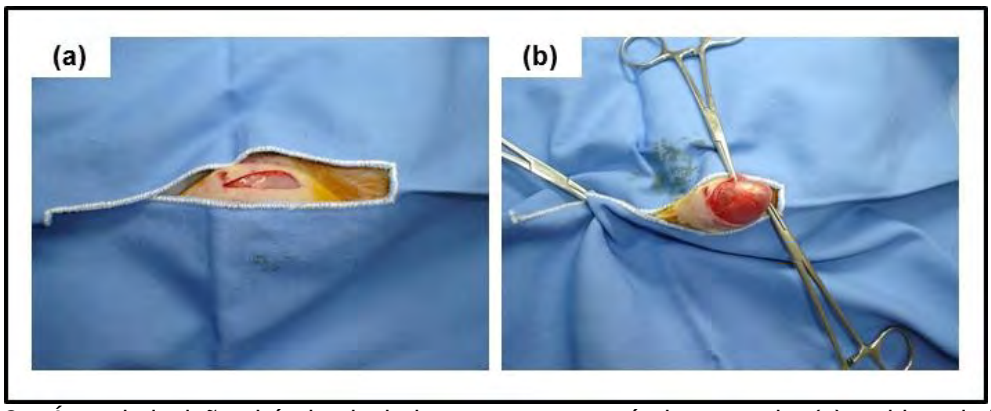

Figura 13 – Área da incisão cirúrgica isolada por campos estéreis, corte do: (a) tecido epitelial e (b) articulação do joelho.

As incisões cirúrgicas foram realizadas com a utilização de bisturi com lâmina n° 22 utilizando-se uma via de acesso lateral do joelho, para em seguida realizar uma artrotomia medial do joelho esquerdo com lateralização da patela. Após a exposição da superfície dos côndilos femoral, foi realizada uma perfuração da

região intercondiliana no eixo medular com profundidade de 3,00 mm, por meio de utilização de broca de aço inoxidável com 1,98 mm de diâmetro, conectada a uma furadeira para pequenos fragmentos (Figura 14). Na superfície da articulação do joelho, após o implante foram realizadas suturas dos planos musculares e da pele com fio mononylon 4-0 (Figura 15).

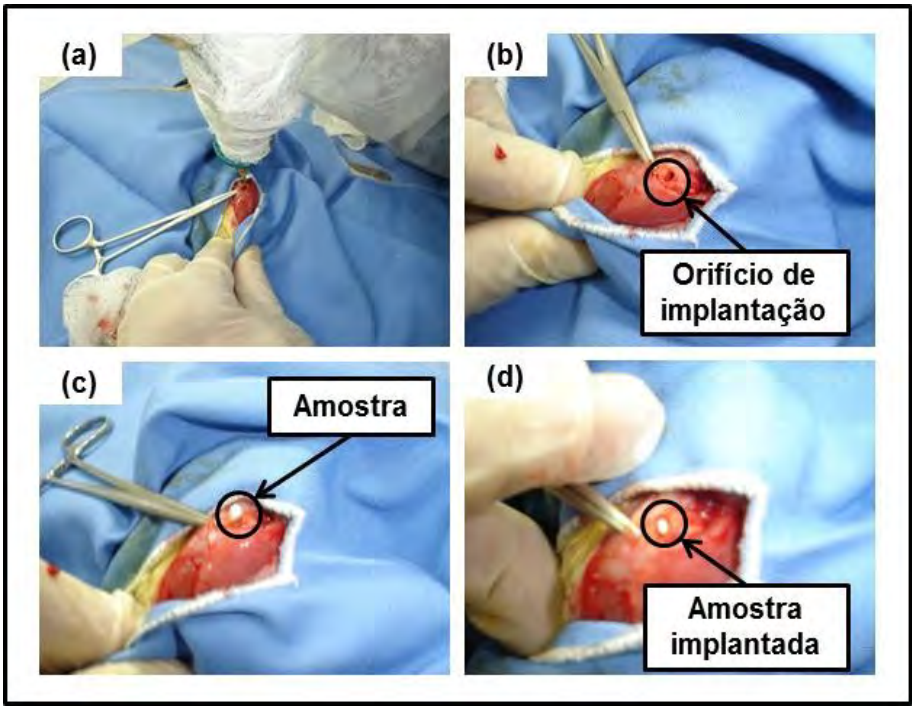

Figura 14 – Procedimento de implantação das amostras nos animais. Sequência de etapas: (a) perfuração da região intercondiliana do osso fêmur, (b) orifício para a inserção da amostra, (c) amostra posicionada, (d) amostra sendo implantada.

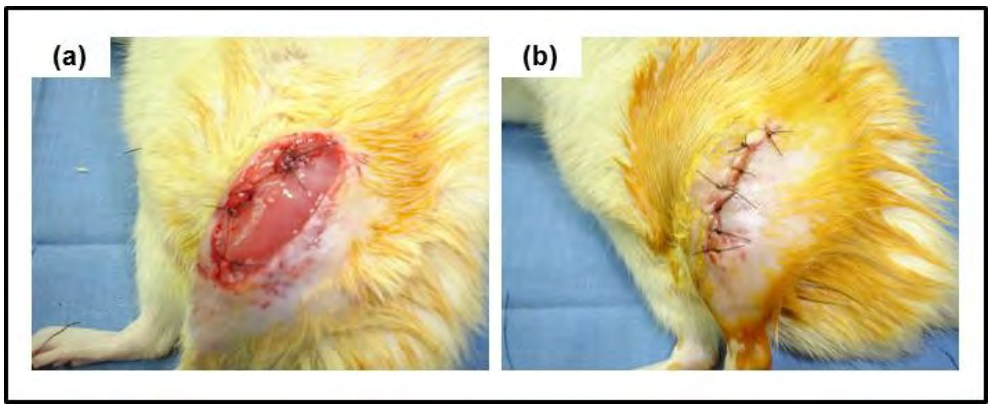

Figura 15 – Suturas realizadas após a cirurgia, (a) plano muscular e (b) plano da pele.

A seguir encontram-se listados os materiais utilizados nos procedimentos cirúrgicos:

- 10 fios de suturas.
- 1 ampola do anestésico cloridrato de ketamina.

- 1 ampola do anestésico cloridrato de xilazina.
- 1 seringa.
- 10 compressas.
- 500 mL de soro fisiológico.
- 1 minifuradeira da marca Mini Grinder, modelo 908.
- 10 aparelhos de barbear descartáveis.
- 10 campos cirúrgicos.
- 4 brocas de aço inoxidável de 1,98 mm de diâmetro.

2.4.4 Coleta do material

Para a coleta do material os animais sofreram eutanásia após seis semanas, contadas a partir data da cirurgia de implantação das amostras, por meio de uma superdose do anestésico pentobarbital sódico via intraperitoneal (150,00 a 200,00 mg/Kg), com a devida observação da cessão dos batimentos cardíacos para prontamente iniciar o procedimento cirúrgico. Este consistiu da retirada da pele da região da articulação do joelho, expondo a região onde os cilindros foram implantados. Os cilindros e os tecidos ósseos da interface osso-polímero contendo o material implantado foram retirados (McMANUS e MOWRY, 1960) e prontamente encaminhados para os procedimentos histológicos e mecânicos. A Figura 16 apresenta uma amostra que foi implantada e removida após o período de estudo estipulado.

Figura 16 – Amostra removida do osso fêmur dos animais após o período de seis semanas.

2.4.5 Preparo dos cortes histológicos

Do material obtido no processo da eutanásia, o cilindro previamente implantado foi removido e o tecido ósseo encaminhado para o processamento histológico, constituído por fixação e lavagem do material, inclusão do tecido em parafina e confecção da lâmina, conforme segue.

2.4.5.1 Fixação e lavagem do material

O tecido foi mantido em solução de formalina a 10 % durante 8 horas para fixação. Transcorrido este tempo, as peças foram lavadas em água corrente por 12 horas.

2.4.5.2 Inclusão em parafina

O processo de inclusão em parafina consistiu da seguinte sequência de etapas: desidratação, diafanização, embebição e inclusão em parafina. Para a desidratação foram realizados três banhos sucessivos de álcool absoluto, com a duração de três horas cada. Em seguida teve início o procedimento de diafanização que consistiu de três banhos sucessivos de Xilol, com a duração de 30 minutos cada. A próxima etapa foi a embebição na qual o tecido foi mergulhado em dois banhos de parafina líquida, aquecida a temperatura de 57 °C, pelo tempo de 30

minutos cada. Por fim, para a inclusão em parafina, colocou-se cada peça de tecido em moldes metálicos e os mesmos foram recobertos por parafina líquida. Após o recobrimento esperou-se a solidificação da parafina, em seguida procedeu-se o retirada e a lapidação das peças, aparando-se as arestas de parafina.

2.4.5.3 Método da confecção das lâminas

O processo de confecção das lâminas é composto pelas seguintes etapas: microtomia, desparafinação, hidratação e coloração, montagem da lâmina.

Para o procedimento de microtomia primeiramente desbastou-se o bloco até que a peça começasse aparecer. Em seguida ocorreu a retirada dos cortes histológicos transversais com 6 µm, por método semi-seriado. Os cortes foram separados com gilete, para posterior flutuação em banho Maria adesivo a 40 °C, para que eles sofressem distensão. Após a distensão foi passado na lâmina histológica um coloide formado por albumina (clara de ovo) e glicerina (1:1). Por fim, os cortes nas lâminas foram retirados com o auxílio de um pincel.

Para a desparafinação, as lâminas com os cortes permaneceram em estufa por uma noite. Após o período de repouso, três banhos sucessivos de Xilol foram realizados, com a duração de 10, 5 e 5 minutos, respectivamente. Sucessivamente aos banhos de Xilol, realizou-se um banho de Xilol-álcool 100% (1:1) por 3 minutos. A próxima etapa foi composta por três banhos de álcool absoluto por 5 minutos cada. E por fim, um banho de álcool 95 % por 5 minutos.

Para a hidratação dos cortes, os mesmos foram mantidos em água corrente durante 10 minutos. Após a hidratação teve início o processo de coloração dos cortes pelo método da Hematoxilina-Eosina (HE). A princípio os cortes foram mantidos em Hematoxilina de Harris por 5 minutos. Em seguida ocorreu a lavagem até a coloração das lâminas assumirem a cor azul. Com a cor desejada obtida realizou-se a diferenciação em HCl a 1% em etanol a 70%. Nova lavagem em água corrente por 10 minutos. Após a lavagem, executou-se a contracoloração com Eosina (solução aquosa 1 % durante 3 minutos). Consecutivamente ocorreu uma nova lavagem em água corrente. Após esta, um banho com álcool 95 % por 3 minutos foi realizado e adicionalmente outros três banhos de álcool absoluto com duração de 5 minutos cada.

Finalmente ocorreu a montagem das lâminas que foi realizada pela deposição de 1 gota de Permount sobre cada lâmina, colocando-se uma lamínula por cima dos cortes. Efetuou-se a limpeza dos excessos e a remoção de bolhas e por fim estas seguiram para secagem em temperatura ambiente.

2.4.6 Análise histológica

As lâminas coradas em HE foram destinadas para a análise da morfologia geral do tecido ósseo a fim de se verificar a biocompatibilidade do material implantado. A análise microscópica qualitativa do padrão de resposta tecidual frente ao implante foi realizada no laboratório de histologia da FCT/UNESP, com a utilização de fotomicroscópio da marca Nikon (modelo Eclipse 50i) acoplado a uma câmera digital da marca Nikon (modelo Infinity 1) e do software NIS Elements D 3.0.

CAPÍTULO III

CARACTERIZAÇÃO

As amostras cilíndricas preparadas por prensagem a quente foram caracterizadas morfologicamente via MEV e espectroscopia micro-Raman e quimicamente via espectroscopia FTIR, complementada por espalhamento Raman. As propriedades mecânicas foram investigadas em função da temperatura via DMA.

3.1 Microscopia eletrônica de varredura

As Figuras 17 a 19 mostram as imagens de MEV das amostras de PDVF/amido nas proporções 66/33, 80/20 e 90/10. A Figura 20 mostra as imagens de MEV das amostras de P(DVF-TrFE)/amido na proporção 66/33. Em todas as imagens os aumentos foram de 30, 500 e 2000 vezes, além disto, as imagens de MEV foram feitas da região externa das amostras.

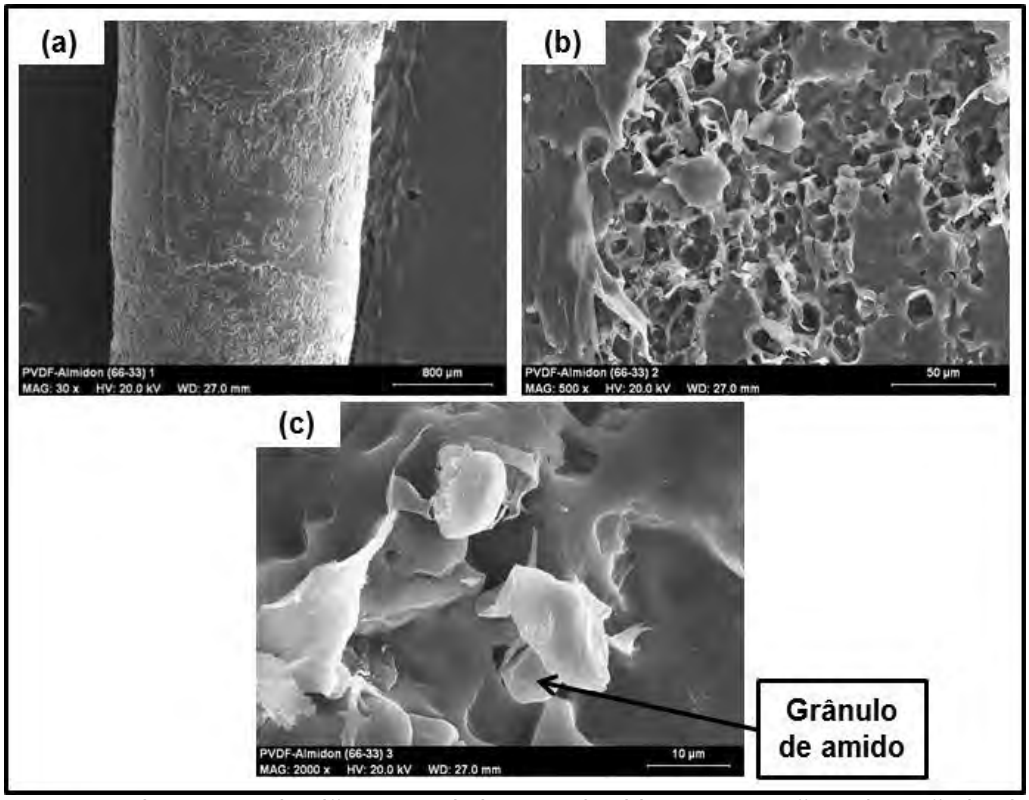

Figura 17 – MEV da amostra (região externa) de PVDF/amido na proporção 66/33, não implantada, aumentos de: (a) 30X – escala: 800 µm, (b) 500X – escala: 50 µm, (c) 2000X – escala: 10 µm.

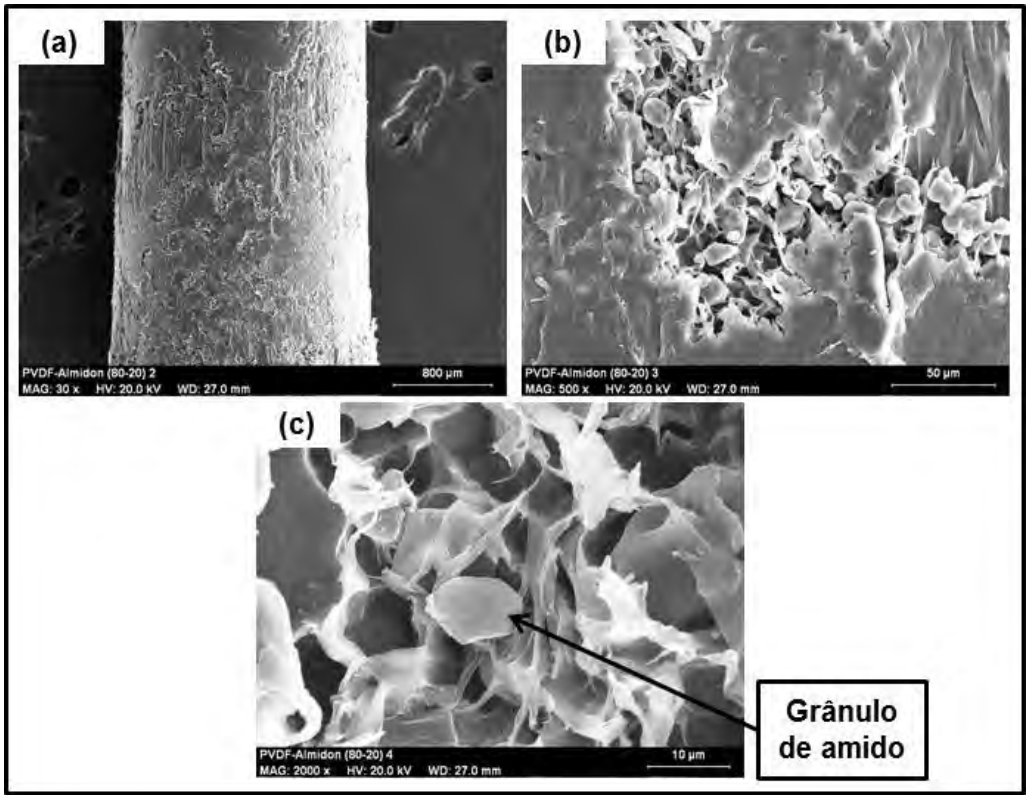

Figura 18 – MEV da amostra (região externa) de PVDF/amido na proporção 80/20, não implantada, aumentos de: (a) 30X – escala: 800 µm, (b) 500X – escala: 50 µm, (c) 2000X – escala: 10 µm.

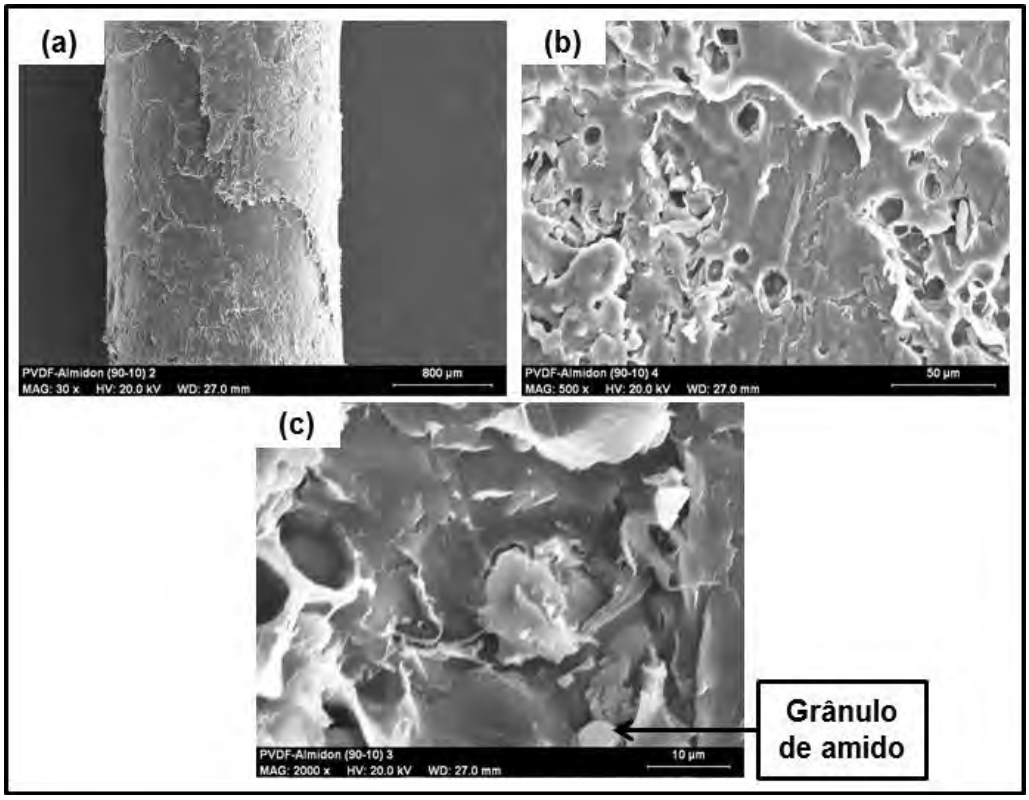

Figura 19 – MEV da amostra (região externa) de PVDF/amido na proporção 90/10, não implantada, aumentos de: (a) 30X – escala: 800 µm, (b) 500X – escala: 50 µm, (c) 2000X – escala: 10 µm.

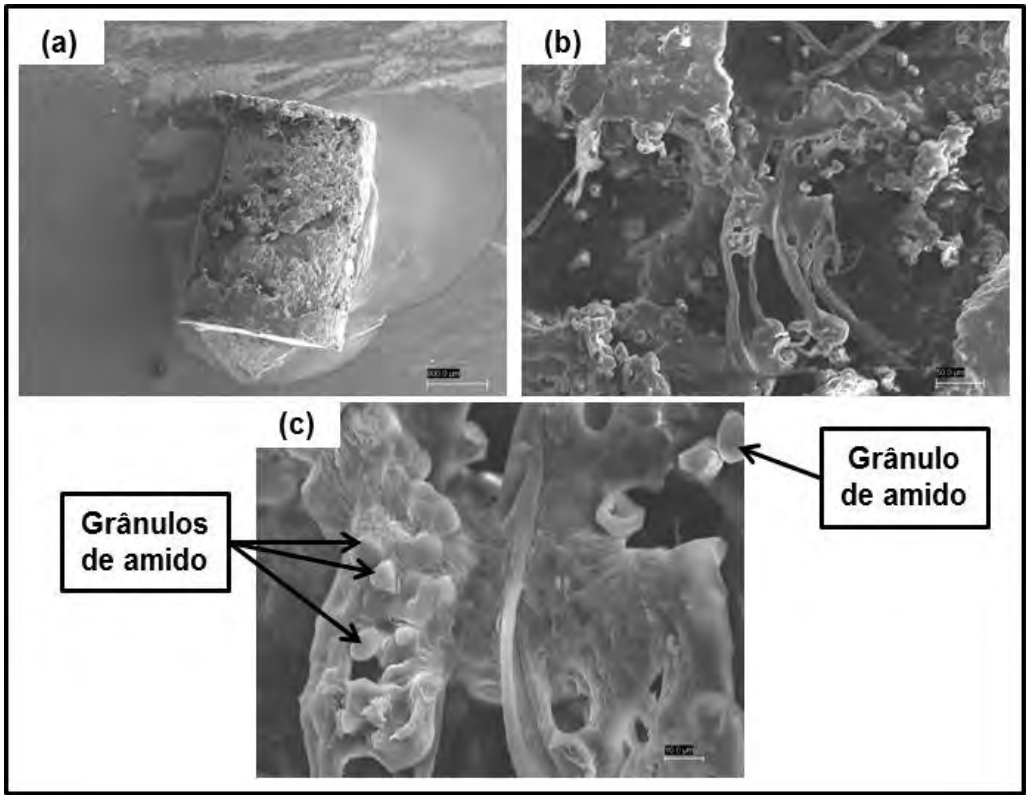

Figura 20 – MEV da amostra (região externa) de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33, não implantada, aumentos de: (a) 30X – escala: 800 µm, (b) 500X – escala: 50 µm, (c) 2000X – escala: 10 µm.

Nas imagens das Figuras 17(a) a 19(a), com um aumento de 30 vezes, e na imagem 20(a), com ampliação de 40 vezes, observou-se que as amostras apresentaram na superfície uma morfologia irregular, independentemente da proporção de amido. PASHKULEVA, AZEVEDO e REIS, 2008 em pesquisa da estrutura de superfície de biomateriais a base de amido de milho também reportaram tal irregularidade na morfologia da superfície de blendas de amido/acetato de celulose preparadas por moldagem via injeção.

As imagens das Figuras 17(b) a 20(b), ampliadas 500 vezes, apresentaram um padrão de morfologia que indica uma dispersão do amido nas amostras compostas de PVDF/amido e P(VDF-TrFE)/amido sem a existência de interação química entre eles, o que é consistente com as amostras de PVDF/amido e P(VDF-TrFE)/amido também preparadas via prensagem a quente e reportadas por SIMÕES *et al.*, 2010. Ao analisar as imagens das Figuras 17(c) a 20(c), já no aumento de 2000 vezes, é possível visualizar os grânulos de amido dispersos na matriz, sendo que os mesmos foram indicados nas respectivas imagens. Ainda nas imagens das Figuras 17(b) a 19(b) foi possível perceber também a presença de poros dispersos

na blenda. Estes poros podem estar presentes devido à perda de amido no momento de remoção das amostras do molde metálico.

3.2 Espectroscopia de espalhamento Raman

A espectroscopia de espalhamento Raman foi utilizada com o intuito de investigar possíveis interações químicas entre materiais das amostras e, adicionalmente, para obter informações quanto à homogeneidade dos filmes em nível microscópico pelo uso do microscópio ótico acoplado ao espectrógrafo. As Figuras de 21 a 23 trazem as imagens ópticas e os espectros das amostras de PDVF/amido nas proporções 66/33, 80/20 e 90/10 juntamente com os espectros de PVDF e amido puros em formato de pó utilizados como referência. A Figura 24 traz as imagens ópticas e os espectros Raman da amostra de P(VDF-TrFE)/amido (na proporção 66/33), bem como do P(VDF-TrFE) e o amido puros em formato de pó também utilizados como referência. Nas Figuras de 21 a 24 as imagens ópticas das amostras cilíndricas foram obtidas com objetiva de 50X (aumento de 500X). Nestas imagens ópticas a região atingida pelo laser foi destacada com uma elipse com as bordas de cor amarela. Na tabela 8 encontram-se as atribuições das principais bandas Raman para o amido (MANO, KONIAROVA, REIS, 2003; FERREIRA, 2008) e na tabela 9 são apresentadas as do PVDF e P(VDF-TrFE) (KOBAYASHI; TASHIRO; TADOKORO, 1975).

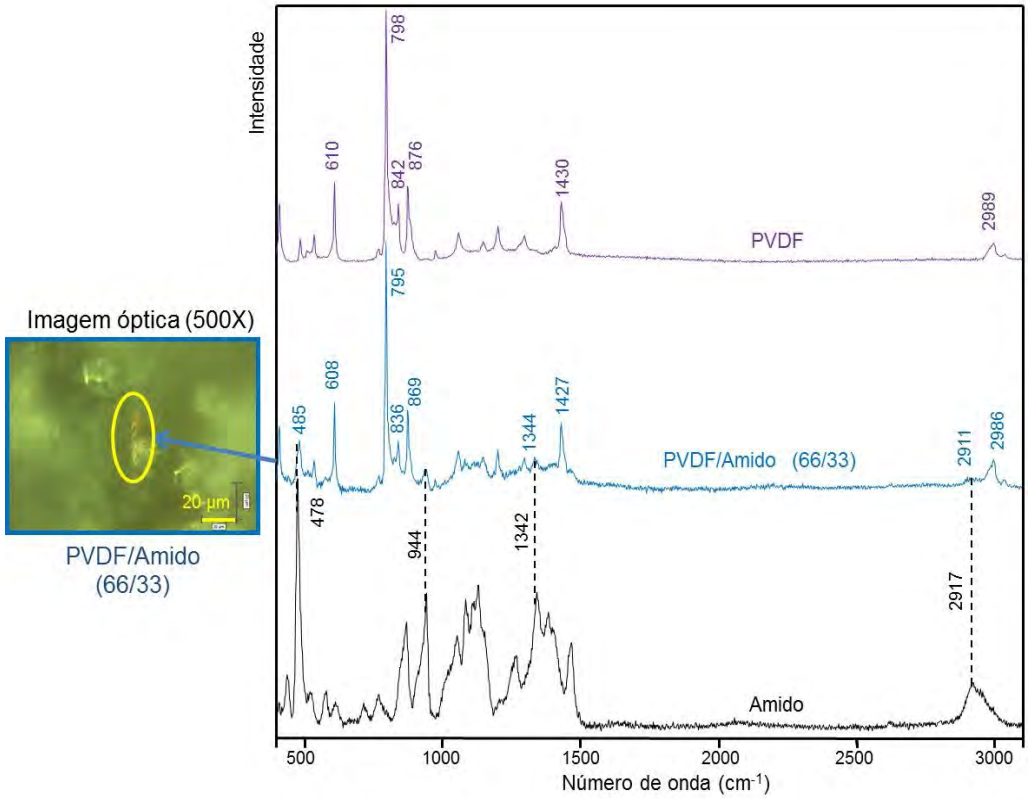

Figura 21 – Espectros de espalhamento Raman (400 a 3100 cm^{-1}) do amido e PVDF em pó e da amostra de PVDF/amido na proporção 66/33.

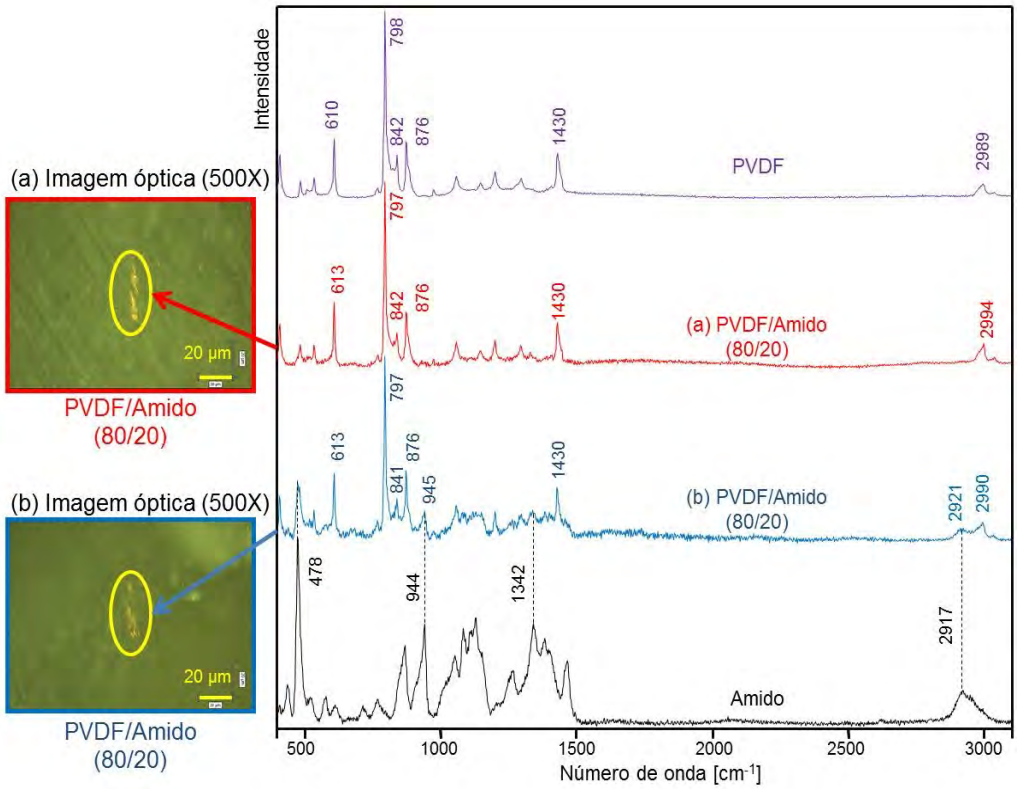

Figura 22 – Espectros de espalhamento Raman (400 a 3100 cm^{-1}) do amido e PVDF em pó e da amostra de PVDF/amido na proporção 80/20.

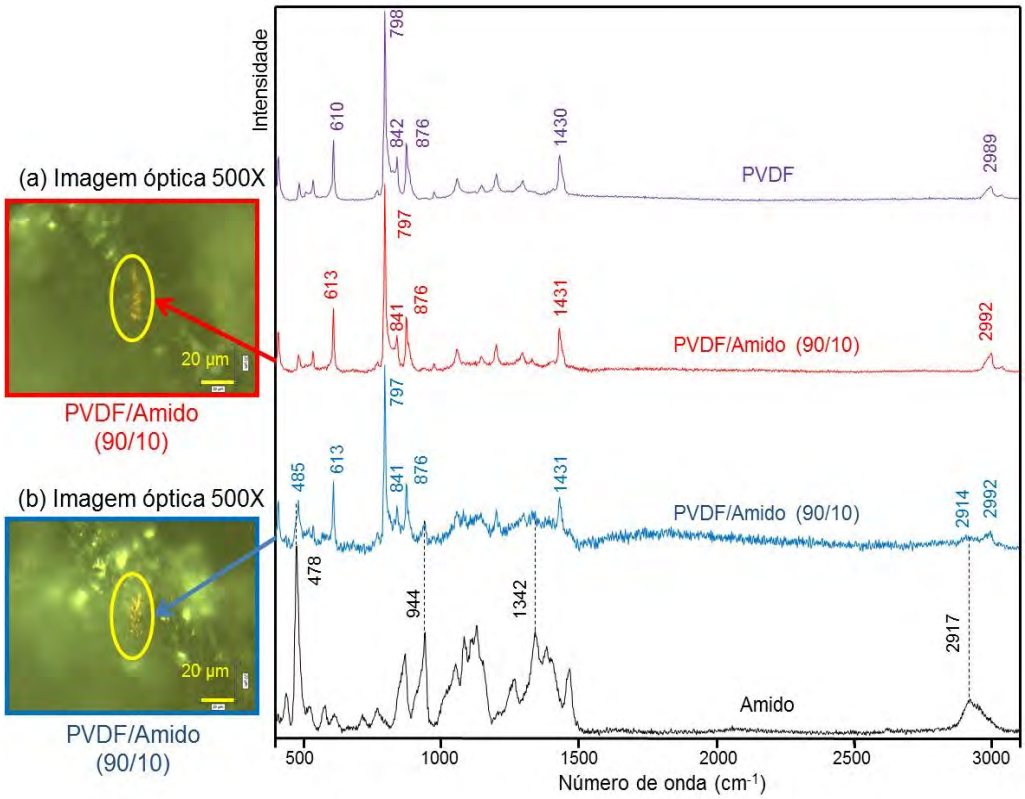

Figura 23 – Espectros de espalhamento Raman (400 a 3100 cm^{-1}) do amido e PVDF em pó e da amostra de PVDF/amido na proporção 90/10.

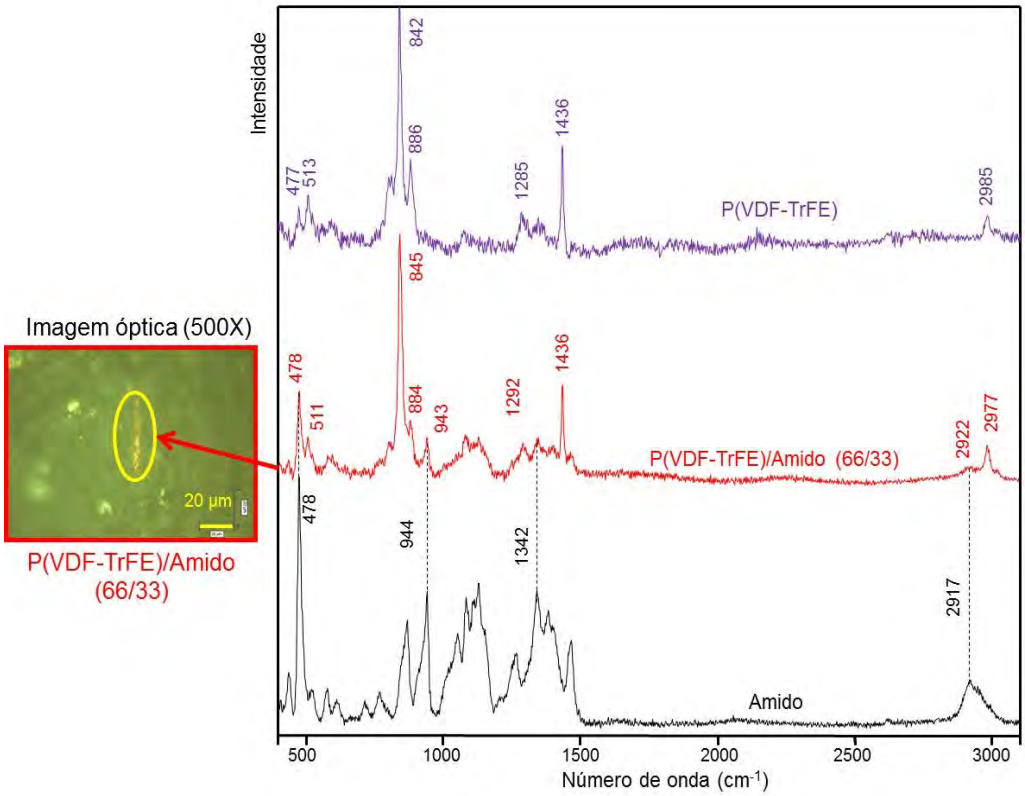

Figura 24 – Espectros de espalhamento Raman (400 a 3100 cm^{-1}) do amido e P(VDF-TrFE) em pó e da amostra de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33.

Nas imagens ópticas das Figuras 22 e 23 foi percebido que existem regiões com distintos domínios, caracterizados por distintas concentrações de amido na matriz de PVDF, o que indica que para estas amostras (PVDF/amido 80/20 e 90/10) a dispersão do amido na matriz de PVDF foi heterogênea. Entretanto, nas Figuras 21 e 24, as imagens ópticas apresentam um padrão de dispersão homogêneo dos materiais (PVDF/amido e P(VDF-TrFE)/amido 66/33). Nestas figuras foram coletados espectros de seis regiões distintas das amostras, e todos apresentaram um perfil muito similar. Adicionalmente observou-se que em certas regiões, as imagens apresentaram perda de nitidez. Tal fato pode ser atribuído à superfície das amostras não serem lisas.

Os resultados de micro-Raman são consistentes com aqueles obtidos via MEV. Comparando-se as imagens de MEV das amostras com as imagens ópticas podemos perceber que na imagem MEV da Figura 17(b) (PVDF/amido na proporção 66/33) também apresentou uma distribuição homogênea do amido na matriz de PDVF, assim como na imagem óptica para a mesma proporção, no caso da Figura 17. Ao se realizar a comparação entre as imagens MEV das Figuras 18(b) e 19(b)

(PVDF/amido nas proporções 80/20 e 90/10, respectivamente) com as imagens ópticas das Figuras 22 e 23, podem-se perceber regiões distintas de PVDF e amido.

No espectro Raman do PVDF em pó das Figuras 21 a 23, as bandas mais intensas foram as seguintes: 798 cm^{-1}, 610 cm^{-1}, 876 cm^{-1}, 1430 cm^{-1}, 842 cm^{-1} e 2989 cm^{-1}, respectivamente. Tal espectro é característico da fase α do PVDF (KOBAYASHI; TASHIRO; TADOKORO, 1975; YANG *et al.*, 2007). Consequentemente, comparando os espectros do pó e das blendas, independentemente da proporção entre o PVDF e o amido, pode-se afirmar que no processo de fabricação das amostras a estrutura cristalina da matriz polimérica não foi alterada.

No espectro PVDF/amido 66/33 da Figura 21 e nos espectros PVDF/amido 80/20 e 90/10 das Figuras 22(b) e 23(b), respectivamente; foi observado que estes espectros das blendas são a superposição dos espectros do PVDF e do amido em pó puros. Tal ocorrência indica que houve uma ausência de interação química dos componentes das blendas, prevalecendo assim à interação física dos materiais. Caso existisse uma interação química, os espectros das amostras teriam a presença de novas bandas ou deslocamentos do número de ondas das bandas do PVDF e/ou amido nas blendas, além de variações nas intensidades relativas em comparações aos espectros dos materiais puros.

Na Figura 24 as bandas mais intensas do P(VDF-TrFE) em pó foram as de 842 cm^{-1}, 1436 cm^{-1}, 886 cm^{-1}, 513 cm^{-1}, 477 cm^{-1}, 1285 cm^{-1} e 2985 cm^{-1}, respectivamente. Tal espectro é característico da fase ferroelétrica do copolímero, similar à fase β do PVDF (KOBAYASHI; TASHIRO; TADOKORO, 1975) e, assim como ocorreu nas blendas de PVDF/amido, no processo de fabricação das amostras a estrutura cristalina da matriz polimérica do P(VDF-TrFE) não foi alterada.

No espectro P(VDF-TrFE)/amido 66/33 da Figura 24 foi observado que este espectro é a superposição dos espectros do P(VDF-TrFE) e do amido em pó puros. Também como ocorrido no caso da combinação PVDF/amido, a superposição dos espectros implica na ausência de interação química dos componentes constituintes das blendas, prevalecendo assim à interação física dos materiais.

Os resultados de micro-Raman para as blendas PVDF/amido e P(VDF-TrFE)/amido são consistentes com os reportados por SIMÕES, 2009 ao analisar os espectros de blendas de filmes finos com composições de materiais de 2,0 g de PVDF com 1,0 g amido e 2,0 g de P(VDF-TrFE) com 1,0 g de amido, ambos na

proporção 66/33. Também se observou que para as blendas compostas de PVDF/amido a fase encontrada foi a α, já para as blendas de P(VDF-TrFE)/amido a fase presente foi a ferroelétrica.

Tabela 8 – Bandas observadas nos espectros Raman do amido.

Banda (cm^{-1})	**Atribuições**
412, 441, 494	Vibrações do esqueleto contendo deformações endocíclicas (glicose)
718, 776, 871	Deformações de grupos laterais COH, CCH e OCH e estiramentos da ligação C-C
953, 1059, 1082, 1129	Estiramento de ligações C-O com contribuições C-C
1212, 1259, 1341, 1388, 1400, 1450	Deformações envolvendo ligações HCH e CH_2OH
2920	Estiramento de ligações C-H

Fonte: MANO, KONIAROVA, REIS, 2003; FERREIRA, 2008.

Tabela 9 – Principais atribuições das bandas do espectro de Raman dos filmes de PVDF e P(VDF-TrFE).

PVDF		**P(VDF-TrFE)**	
Banda (cm^{-1})	**Atribuições**	**Banda (cm^{-1})**	**Atribuições**
412	CF_2 r; CH_2 r		
487	CF_2 δ; CF_2 w	473	CF_2 w
537	CF_2 δ	507	CF_2 δ
613	CF_2 δ; CCC δ		
795	CH_2 r		
838	CH_2 r; CF_2 ν_a	844	CF_2 δ; CH_2 r
874	CC ν_s; CCC δ	881	CF_2 δ; CC ν_s
975	CH_2 t		
1057	CF_2 ν_s; CH_2 w	1073	CC ν_a; CF_2 w; CH_2 w
1147	CC ν_a; CF_2 ν_s		
1200	CF_2 ν_a; CH_2 w		
1297	CF_2 ν_a; CF_2 r	1285	$CF_2\nu_s$; CC ν_s; CCC δ
1430	CH_2 δ; CH_2 w	1429	CH_2 δ
2989	CH_2 ν_s	2974	CH_2 ν_s
3033	CH_2 ν_a	3011	CH_2 ν_a

ν_s: estiramento simétrico; ν_a: estiramento antissimétrico; δ: *scissoring* (deformação angular simétrica no plano); r: *rocking* (deformação angular antissimétrica no plano); t: *twisting* (deformação angular antissimétrica fora do plano); w: *wagging* (deformação angular simétrica fora do plano). Fonte: KOBAYASHI, 1975.

3.3 Espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho por transformada de Fourier

Complementarmente à espectroscopia micro-Raman, a espectroscopia FTIR foi utilizada para estudar possíveis interações entre os componentes das amostras, ou seja, verificar se nas amostras compostas de PVDF/amido e P(VDF-TrFE)/amido ocorreu alguma interação e de qual tipo e para determinar a fase cristalina dos polímeros nas amostras. As Figuras 25 e 26 trazem, respectivamente, os espectros de FTIR das amostras de PVDF/amido nas proporções 66/33, 80/20 e 90/10 e de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33 juntamente com os espectros de PVDF, P(VDF-TrFE) e amido puros em forma de pó utilizados como referência. As principais atribuições das bandas de FTIR para o amido estão na tabela 10 (FERREIRA, 2008) e para o PVDF e P(VDF-TrFE) na tabela 11 (KOBAYASHI; TASHIRO; TADOKORO, 1975).

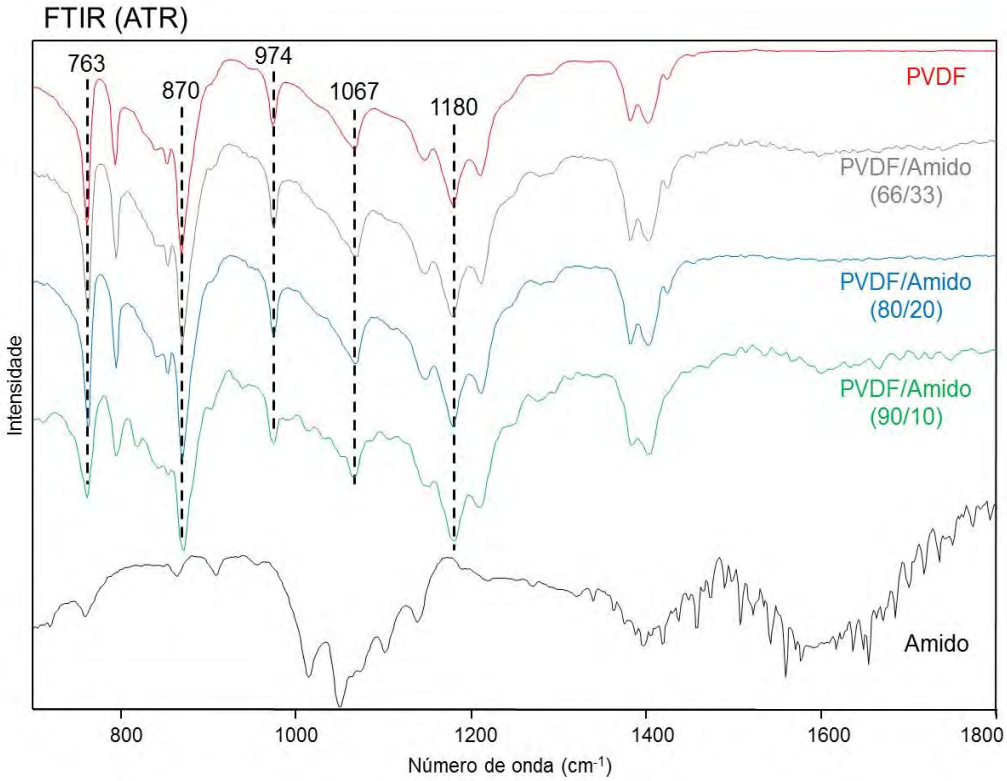

Figura 25 – Espectros de FTIR (ATR) (700 a 1800 cm^{-1}) do amido e PVDF em pó e das amostras de PVDF/amido nas proporções 66/33, 80/20 e 90/10.

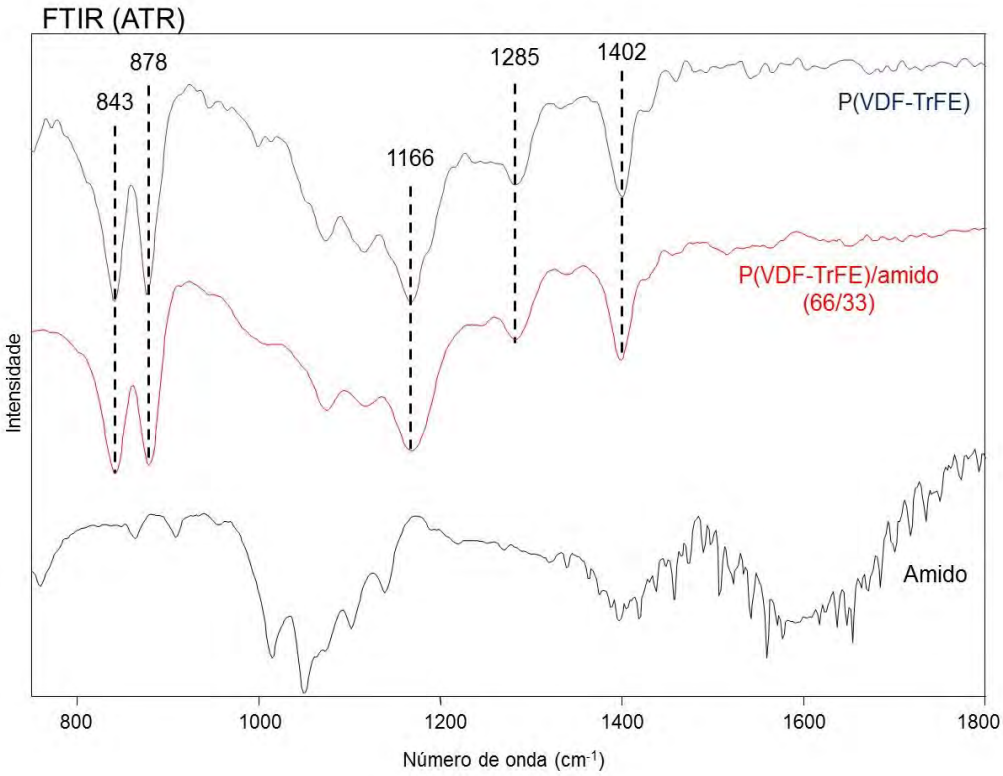

Figura 26 – Espectros de FTIR (ATR) (700 a 1800 cm^{-1}) do amido e P(VDF-TrFE) em pó e da amostra de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33.

Nos espectro de referência do PVDF em pó da Figura 25 as bandas destacadas foram as seguintes: 763 cm^{-1}, 870 cm^{-1}, 1166 cm^{-1}, 1285 cm^{-1} e 1402 cm^{-1}. Tal espectro é característico da fase α do PVDF (KOBAYASHI; TASHIRO; TADOKORO, 1975; YANG *et al.*, 2007). Nas blendas, independentemente da proporção entre o PVDF e o amido, a semelhança com o espectro FTIR do PVDF em pó indica que no processo de fabricação das amostras a estrutura cristalina da matriz polimérica não foi alterada, consistente com o observado via micro-Raman. Na investigação de alguma possível interação química entre os materiais constituintes das blendas, na Figura 25 as bandas presentes não sofreram deslocamentos de número de ondas significativos e nem tão pouco alterações na suas intensidades. Também não foi observado o surgimento de novas bandas. Pode-se então afirmar que o tipo de interação entre o PVDF e o amido foi de natureza física, corroborando o que foi observado via micro-Raman.

Nos espectro de referência do P(VDF-TrFE) em pó da Figura 26 as bandas destacadas foram as seguintes: 843 cm^{-1}, 878 cm^{-1}, 974 cm^{-1}, 1067 cm^{-1} e 1180 cm^{-1}. Tal espectro é característico da fase ferroelétrica do P(VDF-TrFE) (KOBAYASHI; TASHIRO; TADOKORO, 1975; KIM; REYNOLDS; HSU, 1989; REYNOLDS *et al.*,

1989; YANG *et al.*, 2007), a qual correspondente a fase β do PVDF. O espectro blenda foi semelhante ao do P(VDF-TrFE) em pó. Isto indica que no processo de fabricação das amostras a estrutura cristalina da matriz polimérica não foi alterada.

Na investigação de alguma possível interação química entre os materiais constituintes das blendas, na Figura 26 as bandas presentes não sofreram deslocamentos de número de ondas significativos e nem tão pouco alterações na suas intensidades. Além disto, não foi observado o surgimento de novas bandas. Da mesma maneira que ocorreu para o PVDF, podemos então supor para o P(VDF-TrFE) que o tipo de interação entre o P(VDF-TrFE) e o amido também foi de natureza física. Os resultados obtidos pela técnica de FTIR corroboram com aqueles obtidos na espectroscopia Raman tanto com relação à cristalinidade como para interação física entre os materiais e para o processo de fabricação. Resultados similares também foram obtidos por SIMÕES *et al.*, 2010 ao estudar as propriedades estruturais de blendas de P(VDF-TrFE) ou PVDF com amido e/ou borracha natural.

Tabela 10 – Principais atribuições das bandas do espectro de FTIR do amido.

Banda (cm^{-1})	**Atribuições**
900-1250	C-O estiramento
1243	O-H deformação
1325-1445	C-H deformação; *w*
1462	CH_2 deformação
1650	*δ*(O-H) deformação da água
2920	C-H estiramento
3300-3900	O-H estiramento

δ: *scissoring* (deformação angular simétrica no plano), w: *wagging* (deformação angular simétrica fora do plano).
Fonte: MANO, KONIAROVA, REIS, 2003; PARK *et al.*, 2000.

Tabela 11 – Principais atribuições das bandas do espectro de FTIR dos filmes de PVDF e P(VDF-TrFE).

PVDF		**P(VDF-TrFE)**	
Banda (cm^{-1})	**Atribuições**	**Banda (cm^{-1})**	**Atribuições**
612	CF_2 δ; CCC δ`		
762	CF_2 δ; CCC δ		
795	CH_2 r	840	CF_2 ν_s; CC ν_s
870	CC ν_s; CCC δ	878	CH_2 r; CF_2 ν_a; CF_2 r
976	CH_2 t		
1067	CC ν_s		
1149	CC ν_a; CF_2 ν_s		
1179	CF_2 ν_s; CH_2 t	1168	CF_2 ν_a; CF_2 r; CH_2 r
1381	CH_2 δ; CH_2 w	1285	CH_2 ν_s; CC ν_s; CCC δ
1398	CH_2 w; CC ν_a	1399	CH_2 w; CC ν_s
1428	CH_2 δ		

ν_s: estiramento simétrico; ν_a: estiramento antissimétrico; δ: *scissoring* [deformação angular simétrica no plano, C(F)C(H)C(F)]; δ`: *scissoring* [deformação angular simétrica no plano, C(H)C(F)C(H)]; r: *rocking* (deformação angular antissimétrica no plano); t: *twisting* (deformação angular antissimétrica fora do plano); w: *wagging* (deformação angular simétrica fora do plano).
Fonte: KOBAYASHI, 1975.

3.4 Análise térmica dinâmico-mecânica

As Figuras 27 e 28 trazem as curvas de E’ e E’’, respectivamente, das amostras de PDVF/amido nas proporções 66/33, 80/20 e 90/10 e de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33.

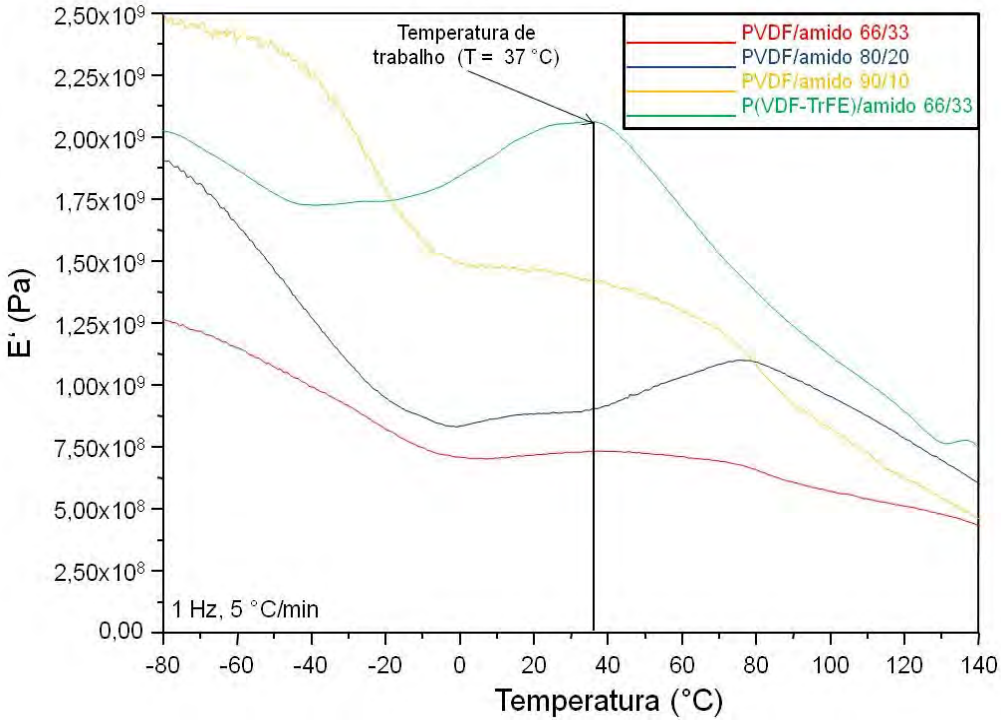

Figura 27 – Curvas do módulo de armazenamento (E') das amostras de PVDF/amido nas proporções 66/33, 80/20 e 90/10; e de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33.

Na Figura 27 para as amostras de PDVF/amido, quanto maior a quantidade de amido, menores foram os valores de E’. Tal situação ocorreu independentemente da proporção de materiais até a temperatura de aproximadamente 80 ºC. Nesta temperatura os valores de E’ da amostra com a proporção de PVDF/amido igual a 80/20 foi maior que a de 90/10. A curva da amostra de P(VDF-TrFE)/amido apresenta duas relaxações, a primeira em forma de ombro ocorreu em torno de -25 °C e a segunda em forma de pico em torno de 30˚C. SENCADAS, LANCEROS-MÉNDEZ e MANO, 2006 encontraram dois valores de relaxações, próximos as temperaturas de -25 °C e 30 °C, respectivamente. Para a primeira relaxação atribuíram aos movimentos segmentares da região amorfa (usualmente denominada de relaxação β); já para a segunda associaram aos movimentos dentro da cadeia na fração cristalina (SENCADAS, LANCEROS-MÉNDEZ, MANO, 2006).

Adicionalmente, independente da proporção de materiais, todas as amostras puderam alcançar valores E' superiores ao do osso trabecular da região distal do fêmur humano (389 MPa) (KATTI, 2004; ETHIER e SIMMONS, 2007).

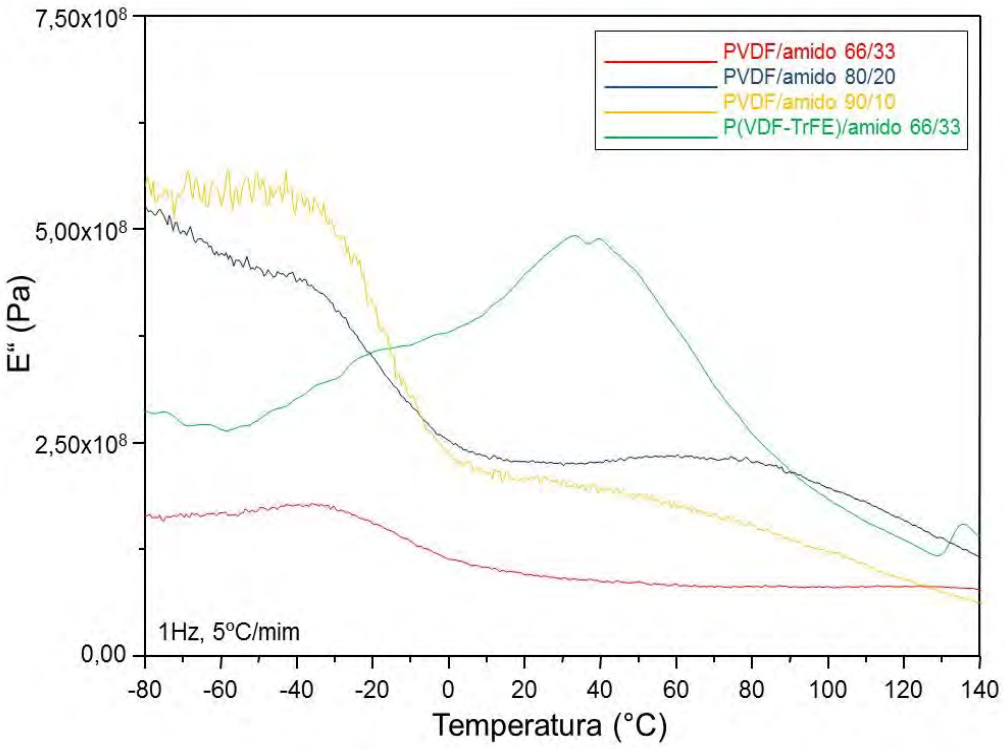

Figura 28 – Curvas do módulo de perda (E'') das amostras de PVDF/amido nas proporções 66/33, 80/20 e 90/10; e de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33.

Na Figura 28 para as amostras de PDVF/amido, quanto maior a quantidade de amido menor foi o módulo de perda (menores valores de E''). Tal comportamento ocorreu independentemente da proporção de materiais até a temperatura de aproximadamente -10 °C. Nesta temperatura os valores de E'' da amostra com a proporção de PVDF/amido igual a 80/20 foi maior que a de 90/10. Em todas as curvas das amostras de PVDF/amido foi observada uma relaxação em -40 °C. Lineares e Costa, 2007 obtiveram da curva E'' o valor da temperatura de transição vítrea do PVDF de -37,1 °C, próximo do valor encontrado na amostra para a primeira relaxação na Figura 28. Na mesma figura para a amostra de P(VDF-TrFE) foram percebidas duas relaxações, sendo a primeira em aproximadamente -20 °C, atribuída aos movimentos segmentares da região amorfa, usualmente denominada relaxação β; e a segunda em 30 °C, associada aos movimentos dentro da cadeia na fração cristalina (SENCADAS, LANCEROS-MÉNDEZ, MANO, 2006).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS DO ENSAIO *IN VITRO*

Os testes *in vitro* foram realizados imergindo-se as amostras por diferentes períodos em soluções contendo a enzima α-amilase. Tais amostras, após os testes *in vitro* foram submetidas à análise de MEV, micro-Raman e FTIR com o objetivo de identificar as ações da α-amilase sobre as amostras. Porém, posteriormente ao período de estudo *in vitro* realizou-se um teste de atividade da enzima α-amilase. Tal procedimento foi adotado devido ao longo período de armazenamento da enzima em refrigerador. Este procedimento deveria ter sido realizado no momento da utilização da enzima no ensaio *in vitro*, caracterizando assim um erro metodológico. Os reagentes utilizados e os procedimentos para a realização do teste encontram-se no Anexo II.

O resultado do teste com a α-amilase indicou que a enzima perdeu a sua atividade. Devido a está perda de atividade, provavelmente os resultados do ensaio *in vitro* foram inconclusivos em relação a ação da enzima. Além disto, não se realizou a repetição do ensaio *in vitro* pelo risco de aquisição de nova enzima inativa. Preferiu-se então executar o estudo *in vivo*. Porém, outros fatores, como a estabilidade química das blendas quando imersas em solução que simula o meio fisiológico, foram investigados.

4.1 Medidas de massa

As massas das medidas iniciais e finais de todos os grupos do estudo foram medidas para os ensaios de 14 dias. Os grupos PVDF 100, PVDF/amido 66/33, PVDF/amido 80/20, PVDF/amido 90/10, P(VDF-TrFE) 100 e P(VDF-TrFE)/amido 66/33 apresentaram p-valores maiores que 0,05, ou seja, não rejeitou-se a hipótese de que as medidas das massas inicial e final foram iguais e podemos concluir que as medidas das massas inicial e final não diferem estatisticamente para o momento de 14 dias.

No período de 28 dias, para as proporções de materiais PVDF 100, PVDF/amido 66/33, PVDF/amido 80/20, PVDF/amido 90/10 e P(VDF-TrFE)/amido 66/33, o teste também apontou p-valores maiores que 0,05, em que rejeitou-se a hipótese de que as medidas das massas inicial e final foram iguais e conclui-se que não há diferenças significativas entre as medidas das massas inicial e final. Apenas a proporção P(VDF-TrFE) 100 apresentou p-valor de 0,043 ($p < 0,05$), logo se pode concluir que houve diferenças significativas estatisticamente entre as medidas das massas inicial e final para essa composição. Como a proporção P(VDF-TrFE) 100 apresentou diferença significativa, foram representadas na tabela 12 as medidas das massas inicial, final e a perda de massa das amostras.

Tabela 12 – Medidas inicial, final e perda de massa das amostras de P(VDF-TrFE) 100 % para o ensaio *in vitro* de 28 dias.

Medida inicial (g)	**Medida final (g)**	**Perda de massa (%)**
$17,15 \times 10^{-3}$	$17,15 \times 10^{-3}$	0,00
$17,38 \times 10^{-3}$	$17,25 \times 10^{-3}$	0,75
$18,65 \times 10^{-3}$	$18,63 \times 10^{-3}$	0,11
$16,34 \times 10^{-3}$	$16,12 \times 10^{-3}$	1,35
$16,61 \times 10^{-3}$	$16,28 \times 10^{-3}$	1,98
$17,76 \times 10^{-3}$	$17,22 \times 10^{-3}$	3,04
$*17,32 \pm 0,76 \times 10^{-3}$	$*17,11 \pm 0,82 \times 10^{-3}$	$*^{a}1,20 \pm 1,07$

Nota: * Valores de média e desvio padrão e $^{a}(p = 0,043)$.

No caso da amostra contendo amido 66/33, a não observação de uma variação significativa de massa via degradação do amido pela ação da enzima pode estar relacionada a 2 fatores principais: i) parte do amido presente na amostra foi arrancado da superfície externa no instante da retirada da amostra do molde, como discutido no capítulo III, seção 3.1 (imagens de MEV); ii) parte do amido pode estar localizado no interior do cilindro, fora do alcance da ação da enzima. Neste último caso, para confirmar tal hipótese, imagens de MEV (subsecção 4.2.2) foram realizadas ao longo da seção transversal da amostra após fratura criogênica. O resultado obtido no grupo controle P(VDF-TrFE) 100 foi surpreendente, pois se esperava que a massa final fosse igual ou maior que a inicial; neste caso devido à adsorção da enzima α amilase nas amostras. No entanto a massa final foi menor que a massa inicial. Tal fato levantou um questionamento que se encontra em aberto.

Para o período de 42 dias, os resultados encontrados apresentaram p-valores maiores que 0,05 para as proporções PVDF/amido 66/33, PVDF/amido 80/20, P(VDF-TrFE) 100 e P(VDF-TrFE)/amido 66/33, ou seja, concluiu-se que não houve diferença estatística significativa entre as medidas das massas inicial e final para cada proporção nesse momento. Para o PVDF 100 e PVDF/amido 90/10 os p-valores obtidos foram de 0,046 ($p<0,05$) para ambas. Com isso, concluiu-se que houve diferenças estatísticas significativas entre as medidas das massas inicial e final dessas proporções.

A diminuição de massa do PVDF, assim como do P(VDF-TrFE), foi um resultado inesperado. No caso da perda de massa não significativa encontrada para as demais amostras de PVDF/amido, as razões poderiam ser as mesmas discutidas anteriormente para as amostras de P(VDF-TrFE)/amido. Mesmo no caso da amostra PVDF/amido 90/10, o valor médio da perda percentual de massa obtido no grupo foi de 0,72 %. As tabelas 13 e 14 trazem as medidas inicial, final e da perda de massa percentual das amostras de PVDF 100 % e PVDF/amido 90/10, respectivamente.

Tabela 13 – Medidas inicial, final e perda de massa das amostras de PVDF 100 % para o ensaio *in vitro* de 42 dias.

Medida inicial (g)	**Medida final (g)**	**Perda de massa (%)**
$16,42 \times 10^{-3}$	$16,23 \times 10^{-3}$	1,16
$16,64 \times 10^{-3}$	$16,36 \times 10^{-3}$	1,68
$16,53 \times 10^{-3}$	$16,32 \times 10^{-3}$	1,27
$15,82 \times 10^{-3}$	$15,83 \times 10^{-3}$	-0,06
$17,45 \times 10^{-3}$	$17,01 \times 10^{-3}$	2,52
$18,19 \times 10^{-3}$	$17,53 \times 10^{-3}$	3,63
$*16,84 \pm 0,84 \times 10^{-3}$	$*16,55 \pm 0,61 \times 10^{-3}$	$*^{a}1,70 \pm 1,26$

Nota: * Valores de média e desvio padrão, $^{a}(p = 0,046)$. Valores negativos (-) para a perda de massa percentual indicam um aumento da massa da amostra.

Tabela 14 – Medidas inicial, final e perda de massa das amostras de PVDF/amido na proporção 90/10 para o ensaio *in vitro* de 42 dias.

Medida inicial (g)	Medida final (g)	Perda de massa (%)
17,48 X 10^{-3}	17,40 X 10^{-3}	0,46
16,68 X 10^{-3}	16,48 X 10^{-3}	1,20
15,02 X 10^{-3}	14,70 X 10^{-3}	2,13
16,40 X 10^{-3}	16,33 X 10^{-3}	0,43
16,53 X 10^{-3}	16,56 X 10^{-3}	-0,18
16,81 X 10^{-3}	16,76 X 10^{-3}	0,30
*16,49 ± 0,000,81	*16,37 ± 0,000,90	*[a]0,72 ± 0,82

Nota: * Valores de média e desvio padrão, [a](p = 0,046). Valores negativos (-) para a perda de massa percentual indicam um aumento da massa da amostra.

MARTINS *et al.*, 2009 analisaram a degradação de *scaffolds* em forma de malha de fibra a base de uma mistura de amido de milho e poli(e-caprolactona) na proporção 30/70 pela ação da α-amilase. Perceberam que a perda de massa percentual foi de aproximadamente 25 % após três dias de imersão, atingindo 30 % após 30 dias. Desconsiderando a significância estatística, uma análise comparativa das médias e desvios padrão das massas das amostras, antes e depois dos ensaios de 14, 28 e 42 dias, revelou uma tendência de diminuição da massa das amostras de PVDF/amido, PVDF e P(VDF-TrFE) puros após os ensaios (tabelas 15 a 19) e uma manutenção para as amostras de P(VDF-TrFE)/amido (tabela 20). Tal resultado é consistente com as hipóteses estabelecidas anteriormente sobre a pouca quantidade de amido disponível para ser degradado pela enzima.

Tabela 15 – Média e desvio padrão das medidas inicial, final e perda de massa das amostras de PVDF 100 % para o ensaio *in vitro* de 14, 28 e 42 dias.

Período (dias)	Média e desvio padrão inicial (g)	Média e desvio padrão final (g)	Perda de massa (%)
14	16,56 ± 0,24 X 10^{-3}	16,46 ± 0,30 X 10^{-3}	0,60 ± 1,01
28	16,90 ± 0,68 X 10^{-3}	16,74 ± 0,48 X 10^{-3}	0,92 ± 1,33
42	16,84 ± 0,84 X 10^{-3}	16,55 ± 0,61 X 10^{-3}	*1,70 ± 1,26

Nota: Valores com (*) indicam resultados com significância estatística, p-valor < 0,05.

Tabela 16 – Média e desvio padrão das medidas inicial, final e perda de massa das amostras de PVDF/amido 66/33 para o ensaio *in vitro* de 14, 28 e 42 dias.

Período (dias)	Média e desvio padrão inicial (g)	Média e desvio padrão final (g)	Perda de massa (%)
14	16,09 ± 0,29 X 10^{-3}	15,75 ± 0,57 X 10^{-3}	2,11 ± 2,79
28	16,26 ± 0,34 X 10^{-3}	16,08 ± 0,33 X 10^{-3}	1,13 ± 2,20
42	15,47 ± 0,74 X 10^{-3}	15,00 ± 1,21 X 10^{-3}	3,12 ± 5,50

Tabela 17 – Média e desvio padrão das medidas inicial, final e perda de massa das amostras de PVDF/amido 80/20 para o ensaio *in vitro* de 14, 28 e 42 dias.

Período (dias)	Média e desvio padrão inicial (g)	Média e desvio padrão final (g)	Perda de massa (%)
14	15,49 ± 1,37 X 10^{-3}	15,58 ± 1,40 X 10^{-3}	-0,59 ± 2,32
28	15,57 ± 1,19 X 10^{-3}	15,20 ± 1,59 X 10^{-3}	2,25 ± 3,71
42	15,42 ± 0,70 X 10^{-3}	15,30 ± 0,62 X 10^{-3}	0,75 ± 1,09

Nota: Valores negativos (-) para a perda de massa percentual indicam um aumento da média das massas da amostras do grupo.

Tabela 18 – Média e desvio padrão das medidas inicial, final e perda de massa das amostras de PVDF/amido 90/10 para o ensaio *in vitro* de 14, 28 e 42 dias.

Período (dias)	Média e desvio padrão inicial (g)	Média e desvio padrão final (g)	Perda de massa (%)
14	15,69 ± 0,52 X 10^{-3}	15,47 ± 0,24 X 10^{-3}	1,32 ± 4,17
28	16,15 ± 0,93 X 10^{-3}	16,06 ± 0,90 X 10^{-3}	0,56 ± 1,28
42	16,49 ± 0,81 X 10^{-3}	16,37 ± 0,90 X 10^{-3}	*0,72 ± 0,82

Nota: Valores com (*) indicam resultados com significância estatística, p-valor < 0,05.

Tabela 19 – Média e desvio padrão das medidas inicial, final e perda de massa das amostras de P(VDF-TrFE) 100 % para o ensaio *in vitro* de 14, 28 e 42 dias.

Período (dias)	Média e desvio padrão inicial (g)	Média e desvio padrão final (g)	Perda de massa (%)
14	18,31 ± 1,21 X 10^{-3}	18,31 ± 1,09 X 10^{-3}	-0,01 ± 1,01
28	17,32 ± 0,83 X 10^{-3}	17,11 ± 0,90 X 10^{-3}	*1,20 ± 1,17
42	17,16 ± 0,56 X 10^{-3}	17,07 ± 0,35 X 10^{-3}	0,49 ± 1,39

Nota: Valores negativos (-) para a perda de massa percentual indicam um aumento da média das massas da amostras do grupo. Valores com (*) indicam resulta dos com significância estatística, p-valor < 0,05.

Tabela 20 – Média e desvio padrão das medidas inicial, final e perda de massa das amostras de P(VDF-TrFE)/amido 66/33 para o ensaio *in vitro* de 14, 28 e 42 dias.

Período (dias)	**Média e desvio padrão inicial (g)**	**Média e desvio padrão final (g)**	**Perda de massa (%)**
14	$14,99 \pm 2,59 \times 10^{-3}$	$15,14 \pm 2,70 \times 10^{-3}$	-0,87 ± 2,09
28	$17,13 \pm 1,64 \times 10^{-3}$	$17,16 \pm 1,62 \times 10^{-3}$	-0,20 ± 0,91
42	$14,13 \pm 1,99 \times 10^{-3}$	$14,33 \pm 2,00 \times 10^{-3}$	-1,47 ± 2,25

Nota: Valores negativos (-) para a perda de massa percentual indicam um aumento da média das massas da amostras do grupo.

Uma informação importante foi a boa estabilidade das amostras, independente da composição e período de estudo, quando em contato com solução que simulou o meio fisiológico. Tal observação foi feita ao verificar-se os valores pequenos na variação da perda de massa percentual dos grupos, tabelas 13 a 18, na faixa de -1,47 ± 2,25, para o P(VDF-TrFE/amido) na proporção 66/33 no ensaio de 42 dias até 3,12 ± 5,50, e para o PVDF/amido nas mesmas proporção de 66/33 e igual período de ensaio.

4.2 Microscopia eletrônica de varredura

4.2.1 Imagens da superfície externa das amostras

Nesta secção as imagens MEV das Figuras 29 a 32, com aumentos utilizados de 40, 500 e 2000 vezes, foram obtidas da região externa das amostras. As Figuras 29 a 32 trazem as imagens de MEV das amostras de PDVF/amido nas proporções 66/33, 80/20 e 90/10, respectivamente. A Figura 32 apresenta as imagens das amostras de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33. Nas Figuras 29 a 32, as imagens denominadas de (a), (b) e (c) correspondem ao ensaio *in vitro* de 14 dias; as designadas por (d), (e) e (f), por sua vez, equivalem ao ensaio *in vitro* de 28 dias e; as chamadas de (g), (h) e (i) correspondem ao ensaio *in vitro* de 42 dias.

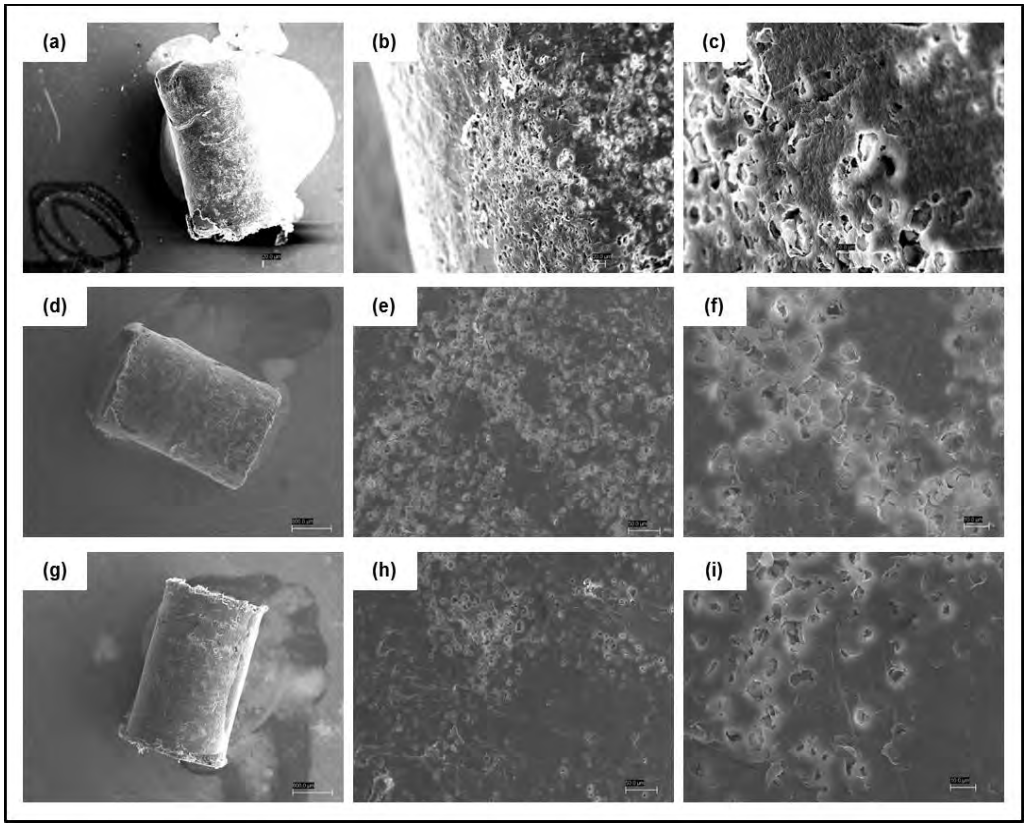

Figura 29 – MEV da amostra (região externa) de PVDF/amido na proporção 66/33, após 14 dias de ensaio *in vitro,* aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm, (b) 500X - escala: 50 µm, (c) 2000X - escala: 10 µm; após 28 dias de ensaio *in vitro*, aumentos de: (d) 40X - escala: 800 µm, (e) 500X - escala: 50 µm, (f) 2000X - escala: 10 µm; após 42 dias de ensaio *in vitro*, aumentos de: (g) 40X - escala: 800 µm, (h) 500X - escala: 50 µm, (i) 2000X - escala: 10 µm.

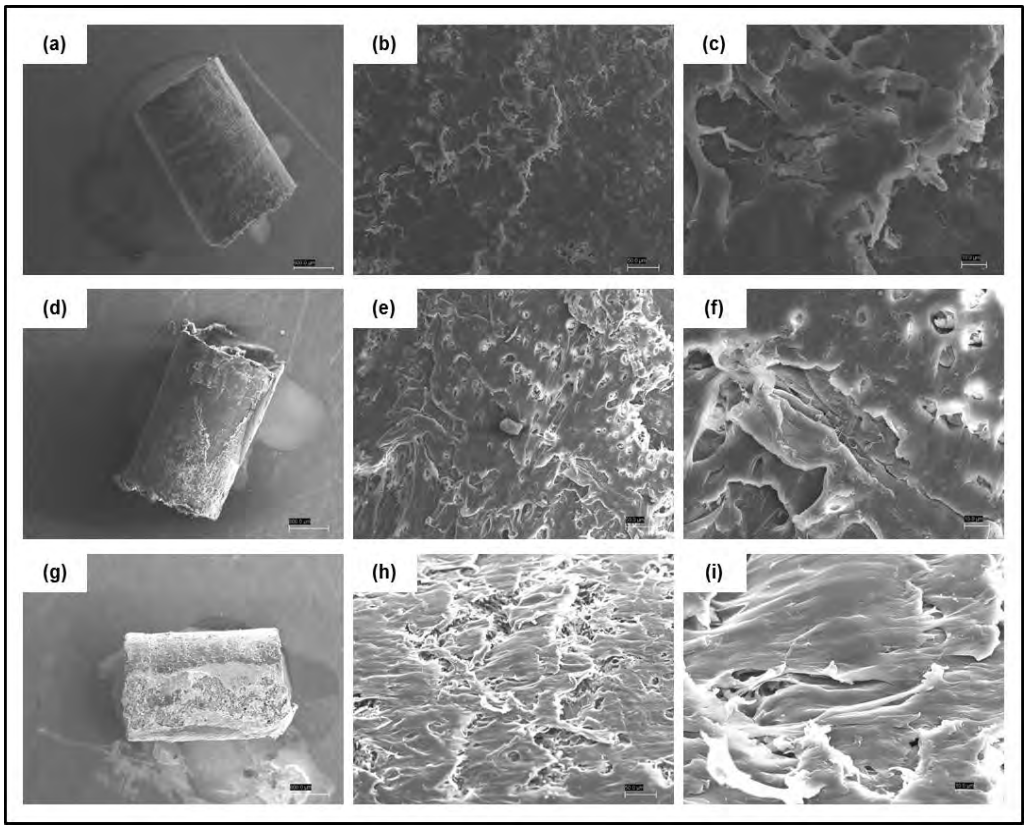

Figura 30 – MEV da amostra (região externa) de PVDF/amido na proporção 80/20, após 14 dias de ensaio *in vitro,* aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm, (b) 500X - escala: 50 µm, (c) 2000X - escala: 10 µm; após 28 dias de ensaio *in vitro*, aumentos de: (d) 40X - escala: 800 µm, (e) 500X - escala: 50 µm, (f) 2000X - escala: 10 µm; após 42 dias de ensaio *in vitro*, aumentos de: (g) 40X - escala: 800 µm, (h) 500X - escala: 50 µm, (i) 2000X - escala: 10 µm.

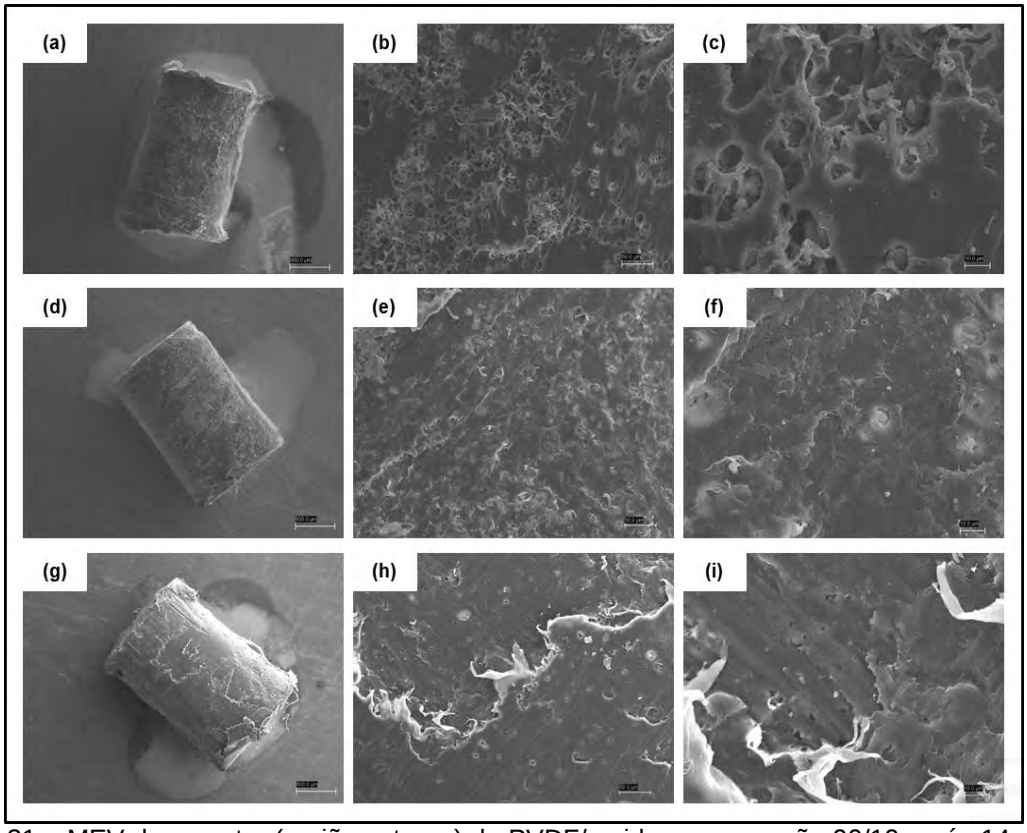

Figura 31 – MEV da amostra (região externa) de PVDF/amido na proporção 90/10, após 14 dias de ensaio *in vitro,* aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm, (b) 500X - escala: 50 µm, (c) 2000X - escala: 10 µm; após 28 dias de ensaio *in vitro*, aumentos de: (d) 40X - escala: 800 µm, (e) 500X - escala: 50 µm, (f) 2000X - escala: 10 µm; após 42 dias de ensaio *in vitro*, aumentos de: (g) 40X - escala: 800 µm, (h) 500X - escala: 50 µm, (i) 2000X - escala: 10 µm.

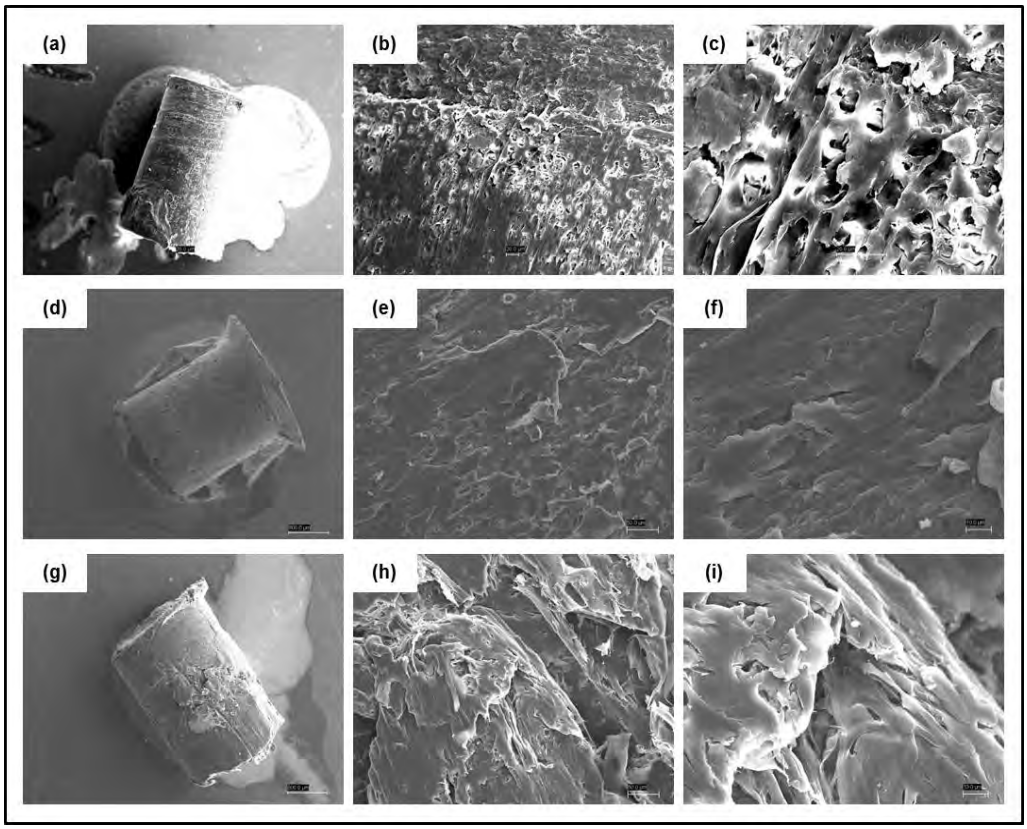

Figura 32 – MEV da amostra (região externa) de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33, após 14 dias de ensaio *in vitro,* aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm, (b) 500X - escala: 50 µm, (c) 2000X - escala: 10 µm; após 28 dias de ensaio *in vitro*, aumentos de: (d) 40X - escala: 800 µm, (e) 500X - escala: 50 µm, (f) 2000X - escala: 10 µm; após 42 dias de ensaio *in vitro*, aumentos de: (g) 40X - escala: 800 µm, (h) 500X - escala: 50 µm, (i) 2000X - escala: 10 µm.

Nas imagens (b), (c), (e), (f), (h) e (i) das Figuras 29 a 31 observou-se que a superfície apresenta uma morfologia irregular e um padrão que indica uma dispersão de grão de amido no PVDF sem a existência de interação química entre eles. Também foi possível observar uma grande quantidade de poros dispersos na matriz polimérica. Ao realizar-se a comparação com as imagens (b) e (c) das Figuras 17, 18 e 19, PVDF/amido na proporção 66/33, 80/20 e 90/10 antes do ensaio *in vitro*, com as imagens (b), (c), (e), (f), (h) e (i) das Figuras 29, 30 e 31 não foi possível perceber claramente, nestas últimas imagens, a presença de grânulos de amido externamente à parede da amostra como observado para antes do ensaio.

Nas imagens (b), (c), (e), (f), (h) e (i) da Figura 32 observou-se que a superfície apresenta uma morfologia irregular, contudo, somente nas imagens (b) e (c) foi observado um padrão que indica uma dispersão de grão de amido no P(VDF-TrFE) sem a existência de interação química entre eles. Contudo, nas imagens (e), (f), (h) e (i) da mesma figura, o padrão dispersivo não foi observado. Verificou-se a presença de grandes áreas de domínio do P(VDF-TrFE).

Para as Figuras 29 a 32, nas imagens que apresentaram poros, a presença destes pode estar relacionada à perda de amido durante o procedimento de retirada das amostras do molde metálico, ou ainda, a presença dos referidos grânulos no interior das amostras (subseção 4.2.2). Tal suposição pode ser formulada porque nos resultados das perdas de massas dos grupos de PVDF/amido, nas proporções 66/33, 80/20, 90/10 e P(VDF-TrFE)/amido 66/33, não ocorreram significância estatística nos ensaios de 14, 28 e 42 dias, ou ainda, apresentaram resultados de pequena magnitude (0,72166% ± 0,82036) no caso do PVDF/amido 90/10, no ensaio de 42 dias.

4.2.2 Imagens da secção transversal das amostras

Nesta secção as imagens MEV das Figuras 33 a 36, com aumentos de 40, 500 e 2000 vezes, foram obtidas da região transversal interna das amostras, sendo que para isto, as amostras sofreram fraturas criogênicas no sentido dos seus respectivos eixos transversais. As Figuras 33 a 35 trazem as imagens de MEV das amostras de PDVF/amido nas proporções 66/33, 80/20 e 90/10, respectivamente. A Figura 36 apresenta as imagens das amostras de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33. Nas Figuras 33 a 36, as imagens denominadas de (a), (b) e (c) correspondem ao ensaio *in vitro* de 14 dias; as designadas por (d), (e) e (f), por sua vez, equivalem ao ensaio *in vitro* de 28 dias; as chamadas de (g), (h) e (i) correspondem ao ensaio *in vitro* de 42 dias.

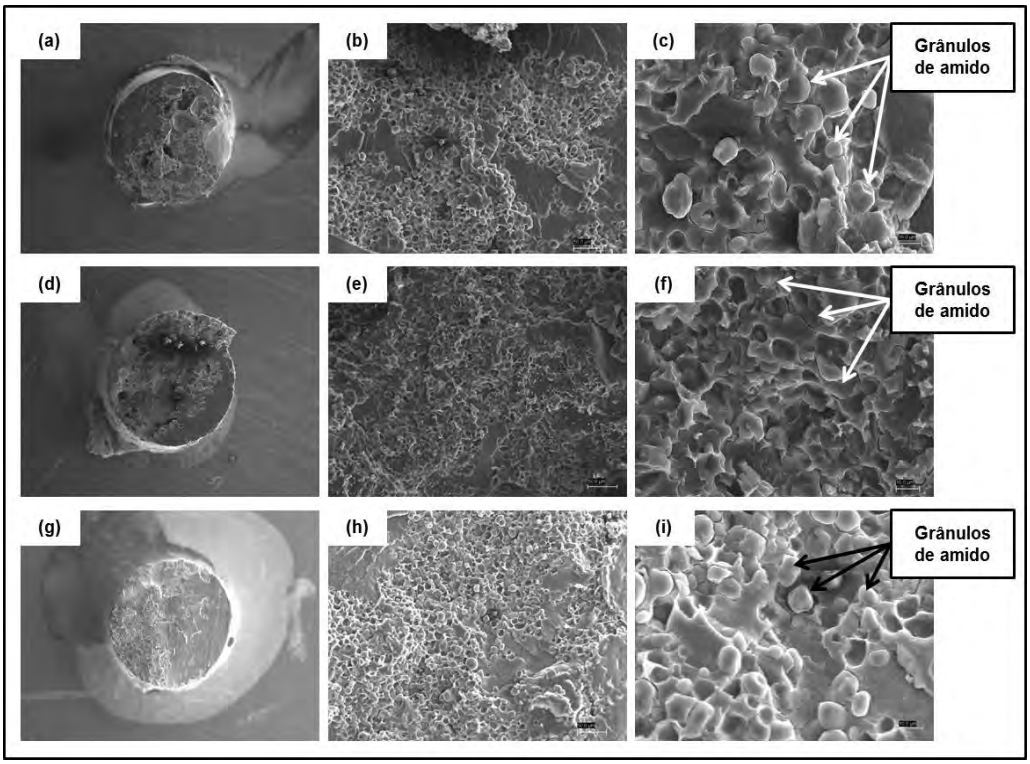

Figura 33 – MEV da amostra (secção transversal) de PVDF/amido na proporção 66/33, após 14 dias de ensaio *in vitro,* aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm, (b) 500X - escala: 50 µm, (c) 2000X - escala: 10 µm; após 28 dias de ensaio *in vitro*, aumentos de: (d) 40X - escala: 800 µm, (e) 500X - escala: 50 µm, (f) 2000X - escala: 10 µm; após 42 dias de ensaio *in vitro*, aumentos de: (g) 40X - escala: 800 µm, (h) 500X - escala: 50 µm, (i) 2000X - escala: 10 µm.

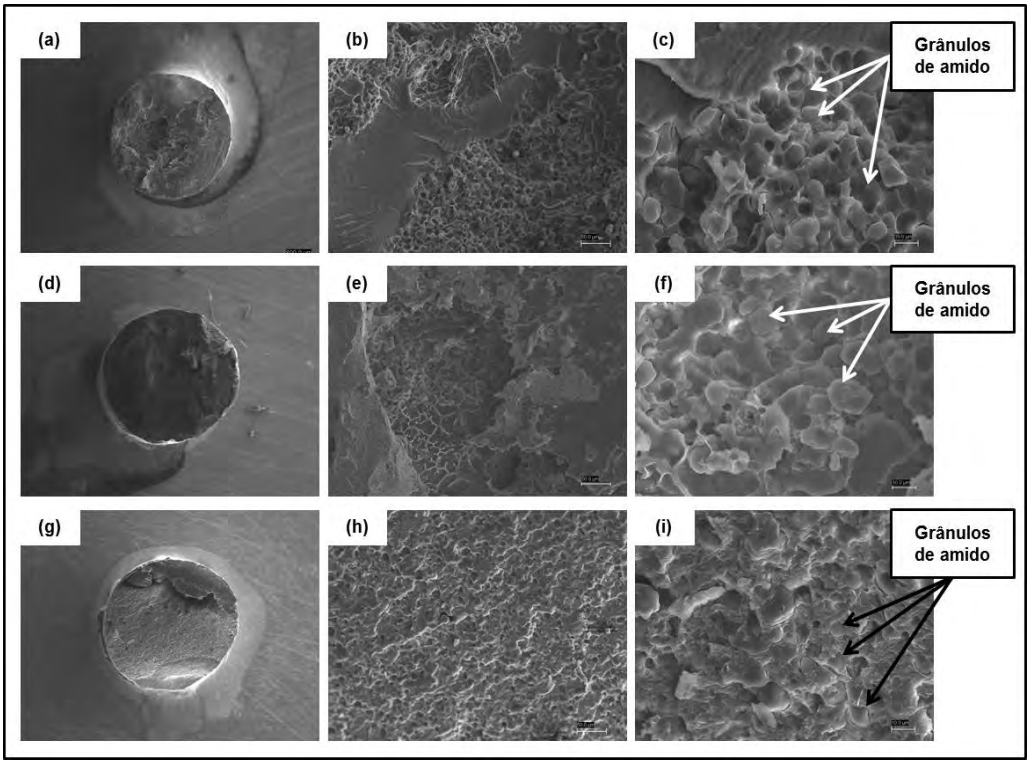

Figura 34 – MEV da amostra (secção transversal) de PVDF/amido na proporção 80/20, após 14 dias de ensaio *in vitro,* aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm, (b) 500X - escala: 50 µm, (c) 2000X - escala: 10 µm; após 28 dias de ensaio *in vitro*, aumentos de: (d) 40X - escala: 800 µm, (e) 500X - escala: 50 µm, (f) 2000X - escala: 10 µm; após 42 dias de ensaio *in vitro*, aumentos de: (g) 40X - escala: 800 µm, (h) 500X - escala: 50 µm, (i) 2000X - escala: 10 µm.

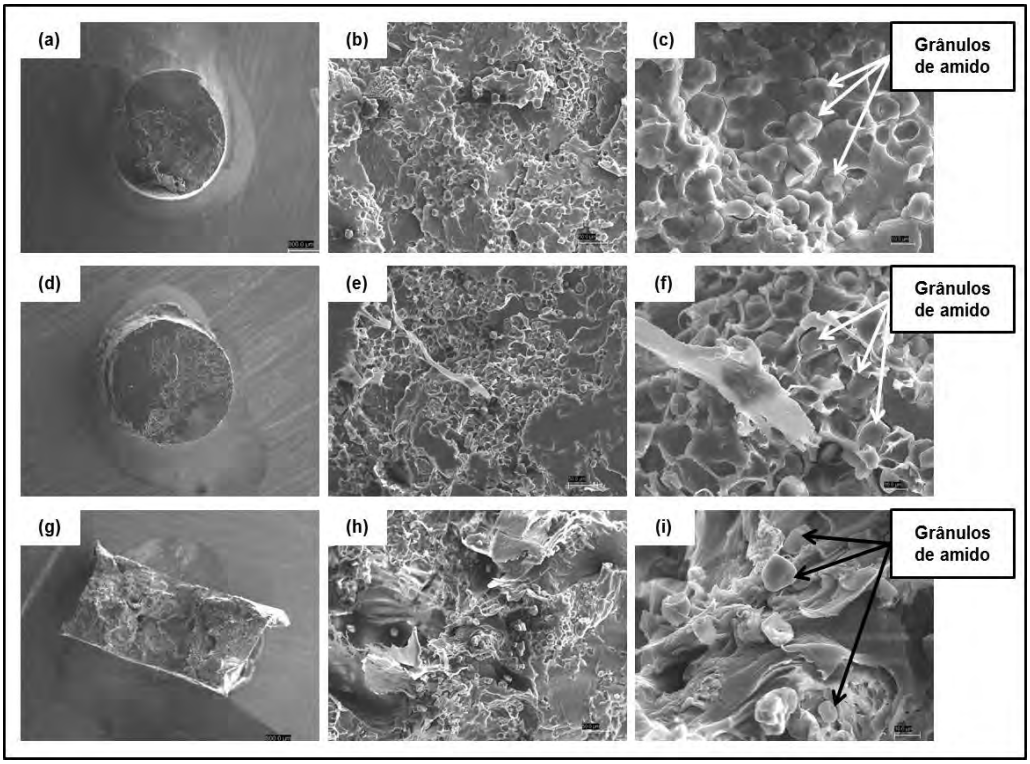

Figura 35 – MEV da amostra (secção transversal) de PVDF/amido na proporção 90/10, após 14 dias de ensaio *in vitro,* aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm, (b) 500X - escala: 50 µm, (c) 2000X - escala: 10 µm; após 28 dias de ensaio *in vitro*, aumentos de: (d) 40X - escala: 800 µm, (e) 500X - escala: 50 µm, (f) 2000X - escala: 10 µm; após 42 dias de ensaio *in vitro*, aumentos de: (g) 40X - escala: 800 µm, (h) 500X - escala: 50 µm, (i) 2000X - escala: 10 µm.

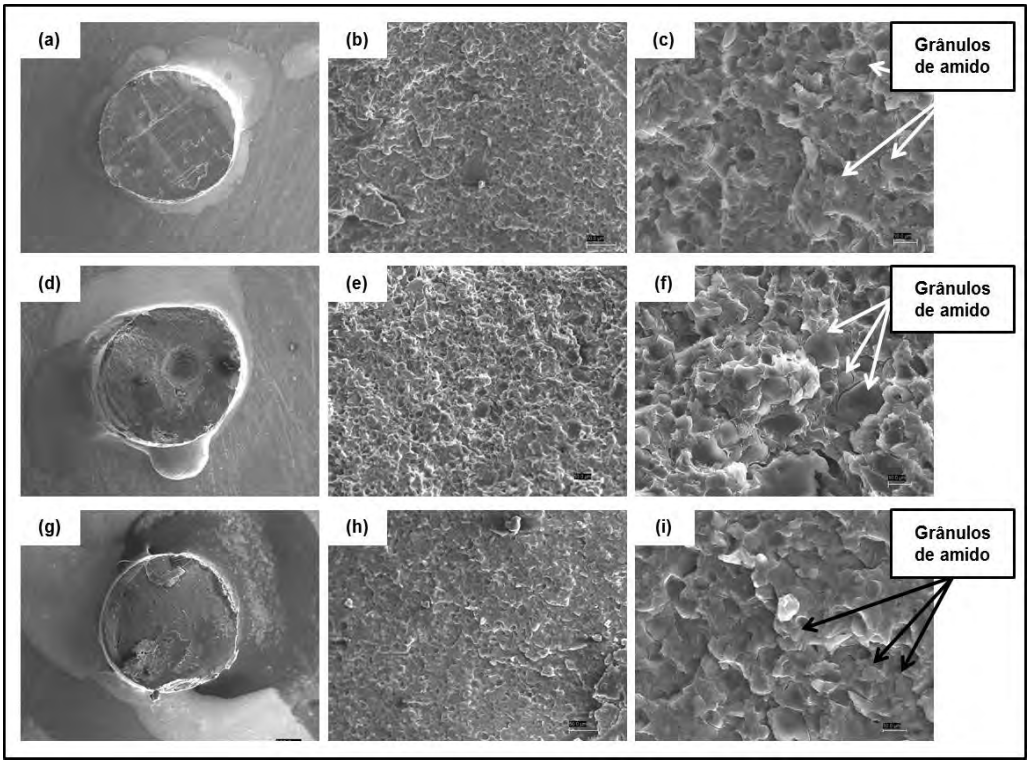

Figura 36 – MEV da amostra (secção transversal) de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33, após 14 dias de ensaio *in vitro,* aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm, (b) 500X - escala: 50 µm, (c) 2000X - escala: 10 µm; após 28 dias de ensaio *in vitro*, aumentos de: (d) 40X - escala: 800 µm, (e) 500X - escala: 50 µm, (f) 2000X - escala: 10 µm; após 42 dias de ensaio *in vitro*, aumentos de: (g) 40X - escala: 800 µm, (h) 500X - escala: 50 µm, (i) 2000X - escala: 10 µm.

Nas imagens (b), (c), (e), (f), (h) e (i) das Figuras 33 a 35 observou-se que a secção transversal apresenta, assim como na região superficial das amostras, uma morfologia irregular e um padrão que indica a dispersão dos grânulos de amido no PVDF sem a existência de interação química entre eles. Também foi possível observar uma grande quantidade de grânulos de amido e de poros dispersos na matriz polimérica. Tal fato confirma a hipótese da pouca degradação de amido pela enzima, devido a pequena quantidade de amido disponível na superfície das amostras para sofrer a ação da α-amilase. Ao fazer uma comparação da morfologia das amostras de PVDF/amido, imagens (b), (c), (e), (f), (h) e (i) das Figuras 33 a 35 com as mesmas imagens das amostras de P(VDF-TrFE)/amido (Figura 36), pode-se observar que as amostras de P(VDF-TrFE)/amido apresentaram melhor adesão física. Tal ocorrência deve estar associada à polaridade introduzida pelos grupos do trifluoretileno.

4.3 Espectroscopia de espalhamento Raman

As Figuras 37 a 39 trazem as imagens ópticas e os espectros das amostras de PVDF/amido nas proporções 66/33, 80/20 e 90/10, respectivamente, e os espectros de PVDF e amido puros em forma de pó. A Figura 40 traz os espectros de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33 e os espectros de P(VDF-TrFE) e amido puros em forma de pó. Nas Figuras 37 a 40 são apresentados os espectros com 14, 28 e 42 dias de ensaio *in vitro* e imagens ópticas das amostras cilíndricas obtidas com objetiva de 50X (aumento de 500X). Nestas imagens ópticas a região atingida pelo laser foi destacada com uma elipse com as bordas de cor amarela.

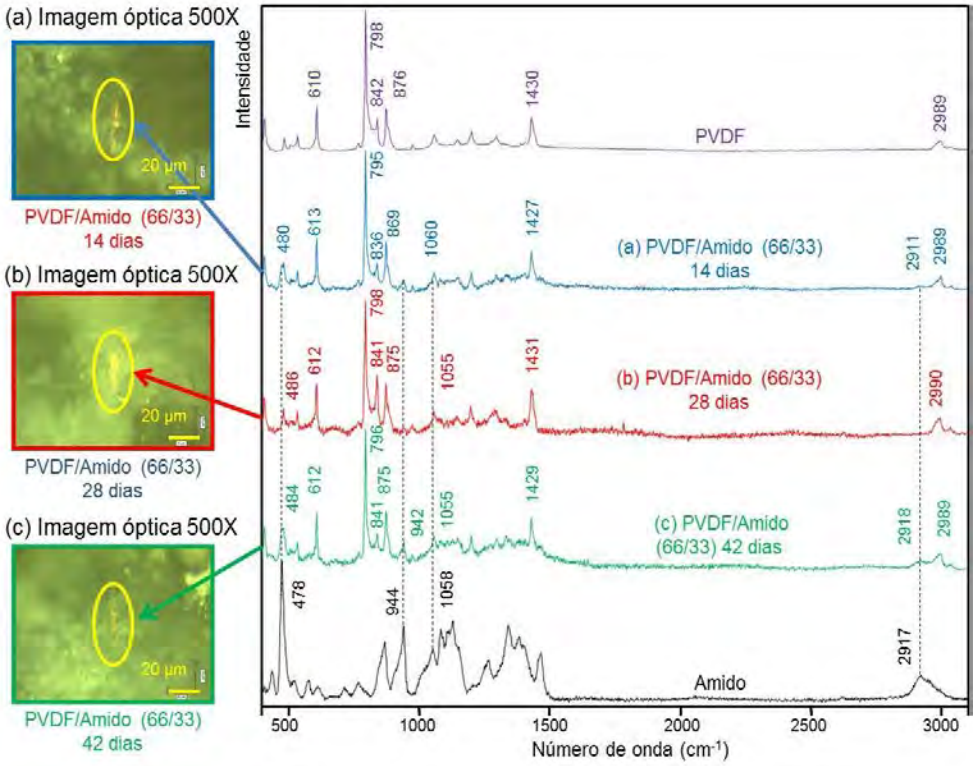

Figura 37 – Espectros de espalhamento Raman (400 a 3100 cm^{-1}) do amido e PVDF em pó e das amostras de PVDF/amido na proporção 66/33, após ensaio *in vitro* (14, 28 e 42 dias).

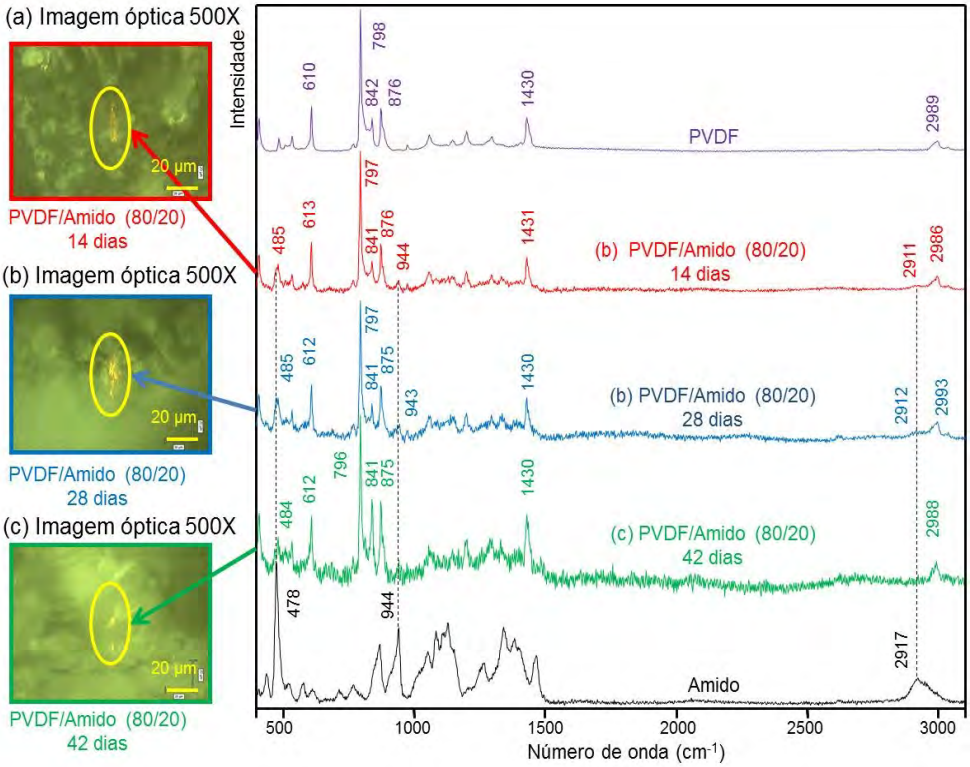

Figura 38 – Espectros de espalhamento Raman (400 a 3100 cm^{-1}) do amido e PVDF em pó e das amostras de PVDF/amido na proporção 80/20, após ensaio *in vitro* (14, 28 e 42 dias).

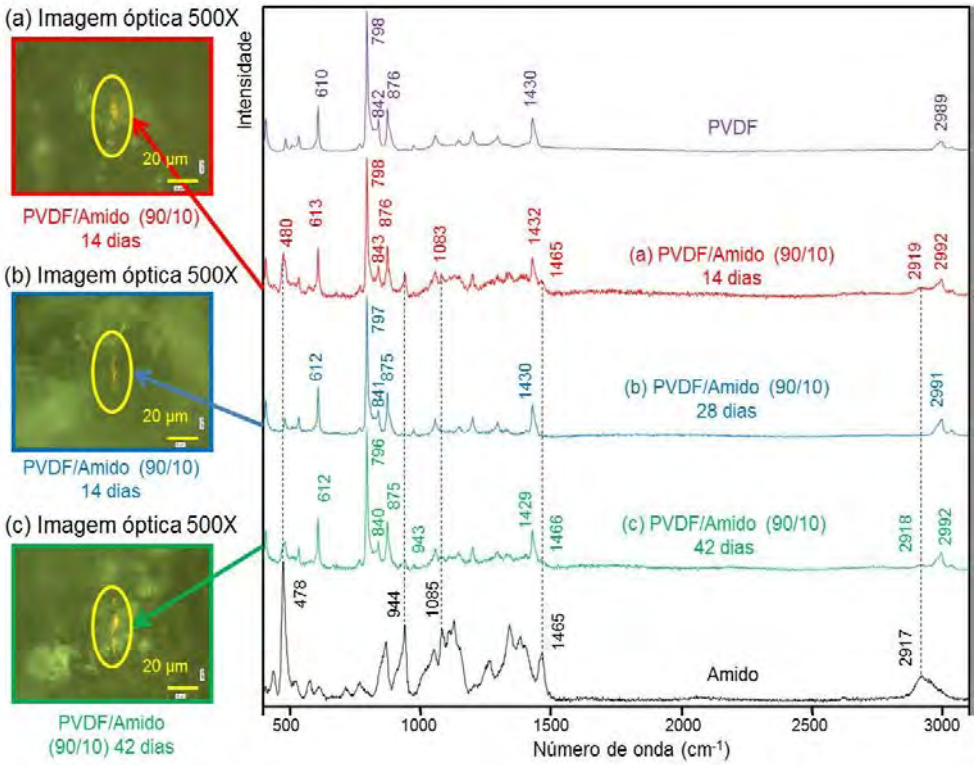

Figura 39 – Espectros de espalhamento Raman (400 a 3100 cm^{-1}) do amido e PVDF em pó e das amostras de PVDF/amido na proporção 90/10, após ensaio *in vitro* (14, 28 e 42 dias).

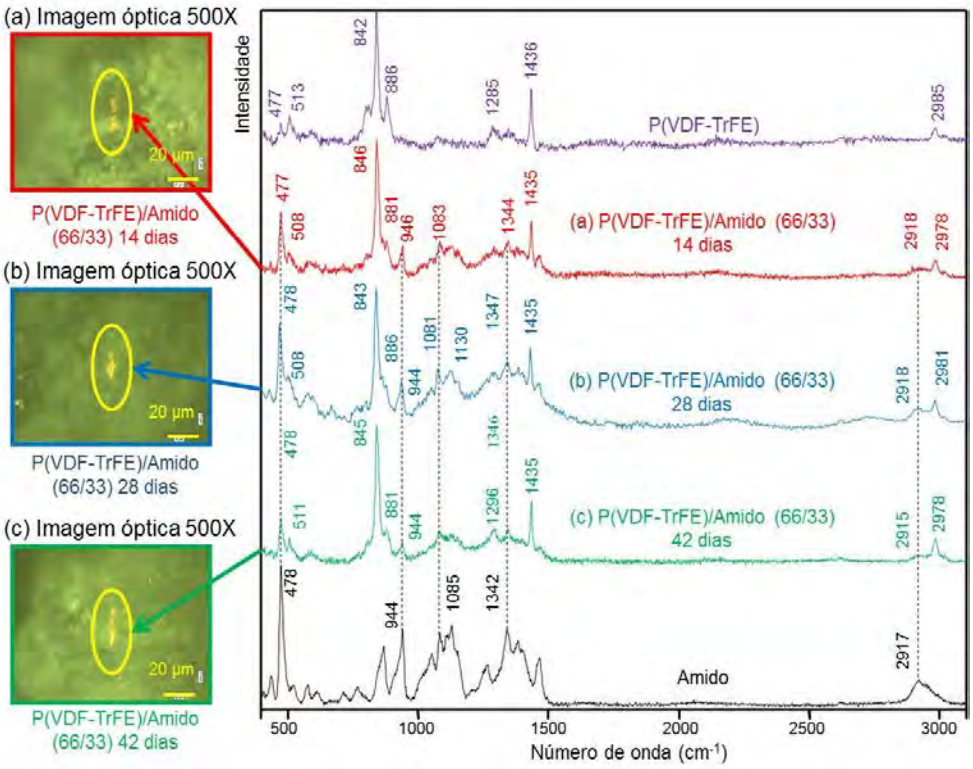

Figura 40 – Espectros de espalhamento Raman (400 a 3100 cm^{-1}) do amido e P(VDF-TrFE) em pó e das amostras de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33, após ensaio *in vitro* (14, 28 e 42 dias).

As mesmas observações feitas na sessão 3.2 relativas à fase cristalina, tipo de interação e dispersão dos materiais podem ser adotadas para as blendas de PVDF/amido e P(VDF-TrFE)/amido das imagens ópticas e dos espectros Raman das Figuras 37 a 40. Assim a fase cristalina apresentada pelo PVDF foi a α e pelo P(VDF-TrFE) a ferroelétrica. Quanto à interação dos materiais esta foi eminente física e com relação à dispersão o padrão observado foi o homogêneo. Com relação à ação da enzima α-amilase no amido das amostras, os espectros Raman e as imagens ópticas permitem afirmar que não ocorreu degradação suficiente do amido pela enzima que pudesse ser identificada pela técnica de espectroscopia Raman. Tal afirmação pode ser feita porque em todos os espectros das amostras foram observadas as bandas do amido independente da composição e da proporção de materiais.

4.4 Espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho por transformada de Fourier

As Figuras 41 a 43 trazem os espectros de FTIR das amostras de PVDF/amido nas proporções 66/33, 80/20 e 90/10, respectivamente. A Figura 44 traz os espectros de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33. Nas Figuras 41 a 44 são apresentados os espectros com 14, 28 e 42 dias de ensaio *in vitro* e os espectros de PVDF, P(VDF-TrFE) e amido puros em forma de pó utilizados como referência.

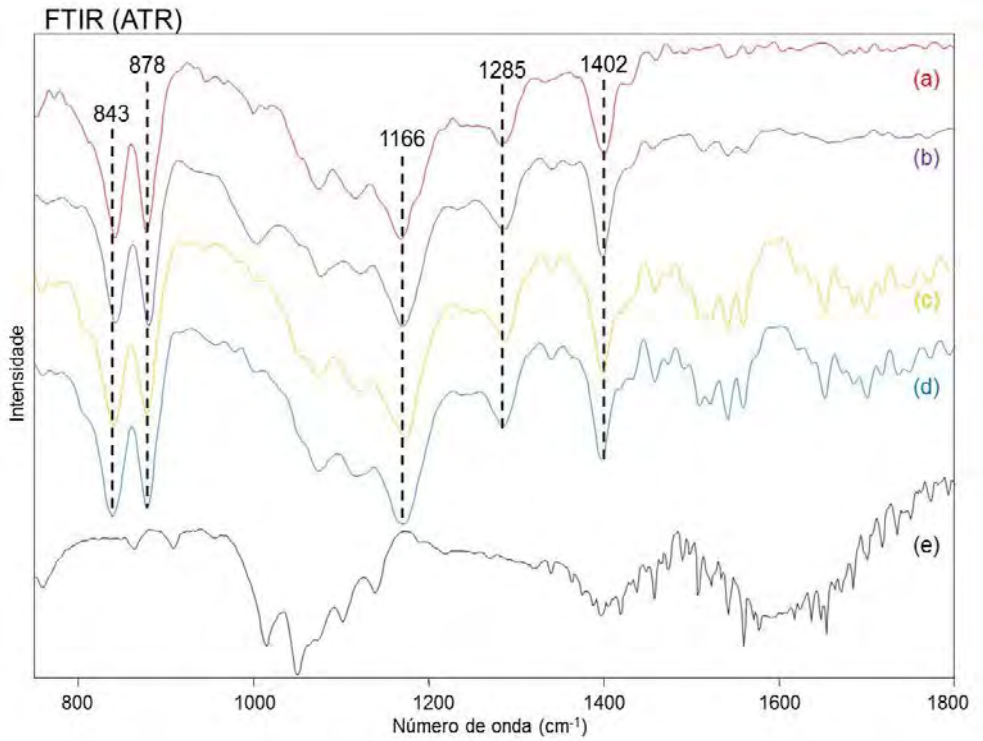

Figura 41 – Espectros de FTIR (ATR) (700 a 1800 cm^{-1}) de PVDF em pó (a), amostras após ensaio *in vitro* do PVDF/amido 66/33 - 14 dias (b), 28 dias (c), 42 dias (d) e do amido em pó (e).

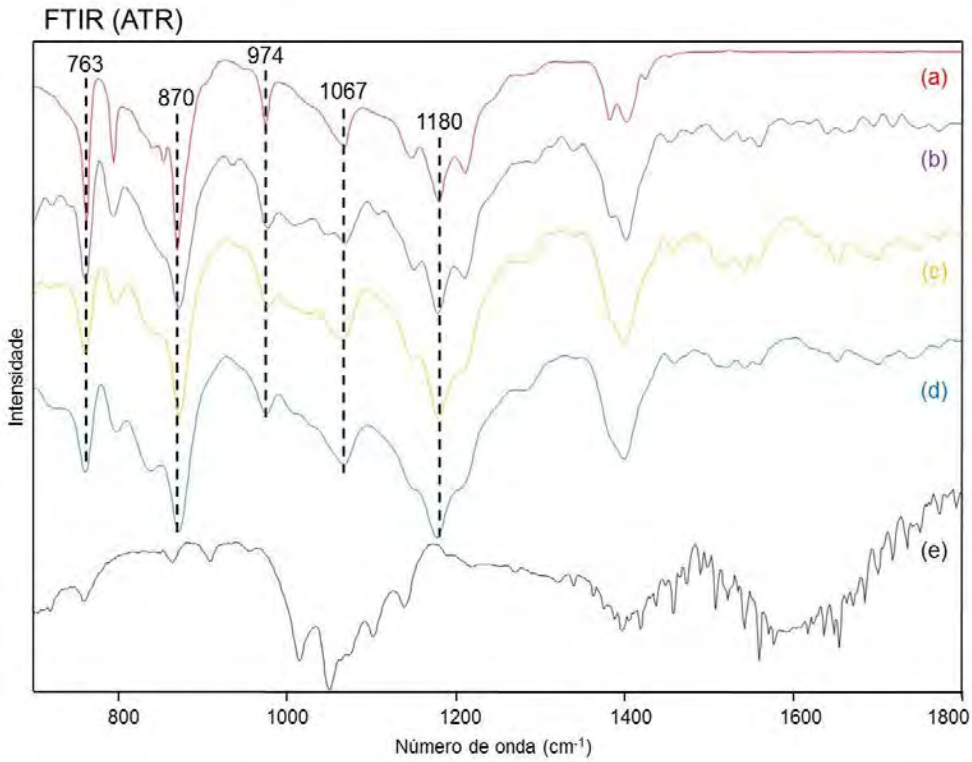

Figura 42 – Espectros de FTIR (ATR) (700 a 1800 cm^{-1}) de PVDF em pó (a), amostras após ensaio *in vitro* do PVDF/amido 80/20 - 14 dias (b), 28 dias (c), 42 dias (d) e do amido em pó (e).

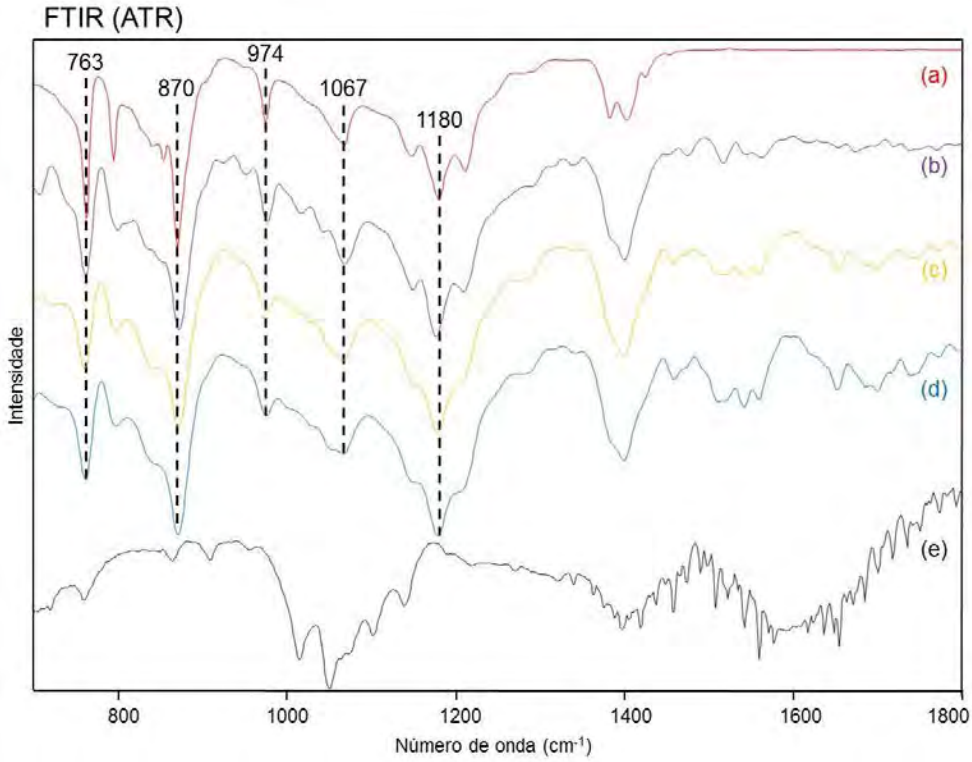

Figura 43 – Espectros de FTIR (ATR) (700 a 1800 cm^{-1}) de PVDF em pó (a), amostras após ensaio *in vitro* do PVDF/amido 90/10 - 14 dias (b), 28 dias (c), 42 dias (d) e do amido em pó (e).

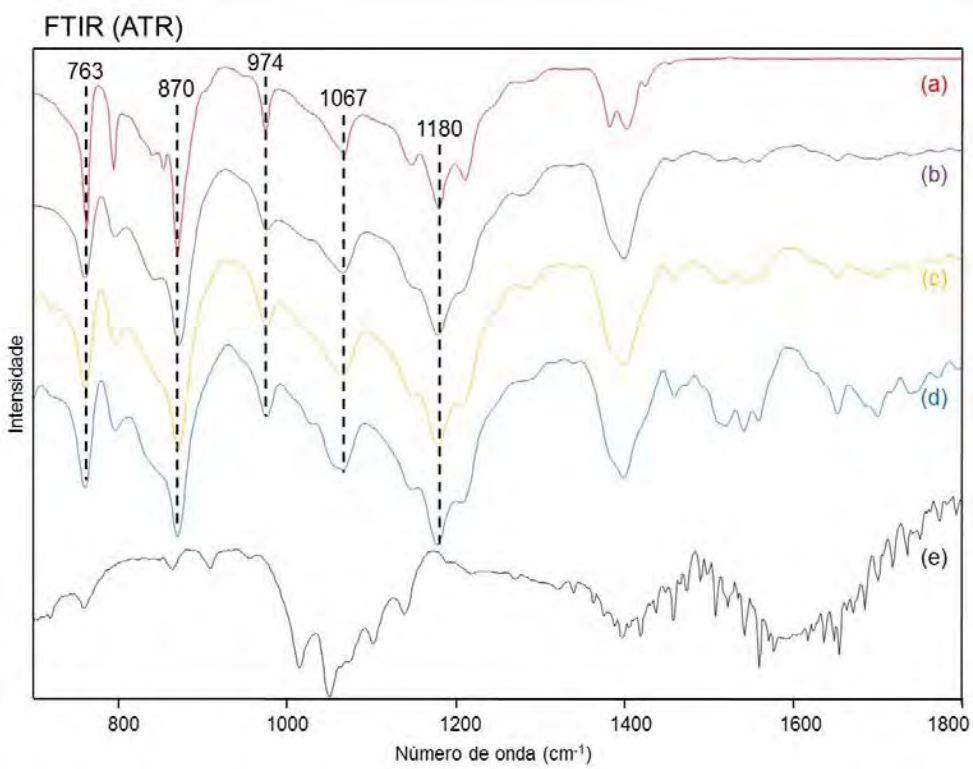

Figura 44 – Espectros de FTIR (ATR) (700 a 1800 cm^{-1}) de P(VDF-TrFE) em pó (a), amostras após ensaio *in vitro* do P(VDF-TrFE)/amido 66/33 - 14 dias (b), 28 dias (c), 42 dias (d) e do amido em pó (e).

As mesmas observações feitas na sessão anterior relativas à fase cristalina e ao tipo de interação entre os materiais podem ser assumidas para as blendas de PVDF/amido e P(VDF-TrFE)/amido dos espectros de FTIR das Figuras 36 a 39.

CAPÍTULO V

RESULTADOS DO ESTUDO *IN VIVO*

5.1 Microscopia eletrônica de varredura

5.1.1 Imagens da superfície externa das amostras

Nesta secção as imagens MEV das Figuras 45 a 47, com aumentos de 40, 500 e 2000 vezes, foram obtidas da região externa das amostras. As Figuras 45 e 46 apresentam as imagens MEV das amostras de PDVF/amido nas proporções 66/33 e 90/10, respectivamente. A Figura 47 mostra as imagens da amostra de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33.

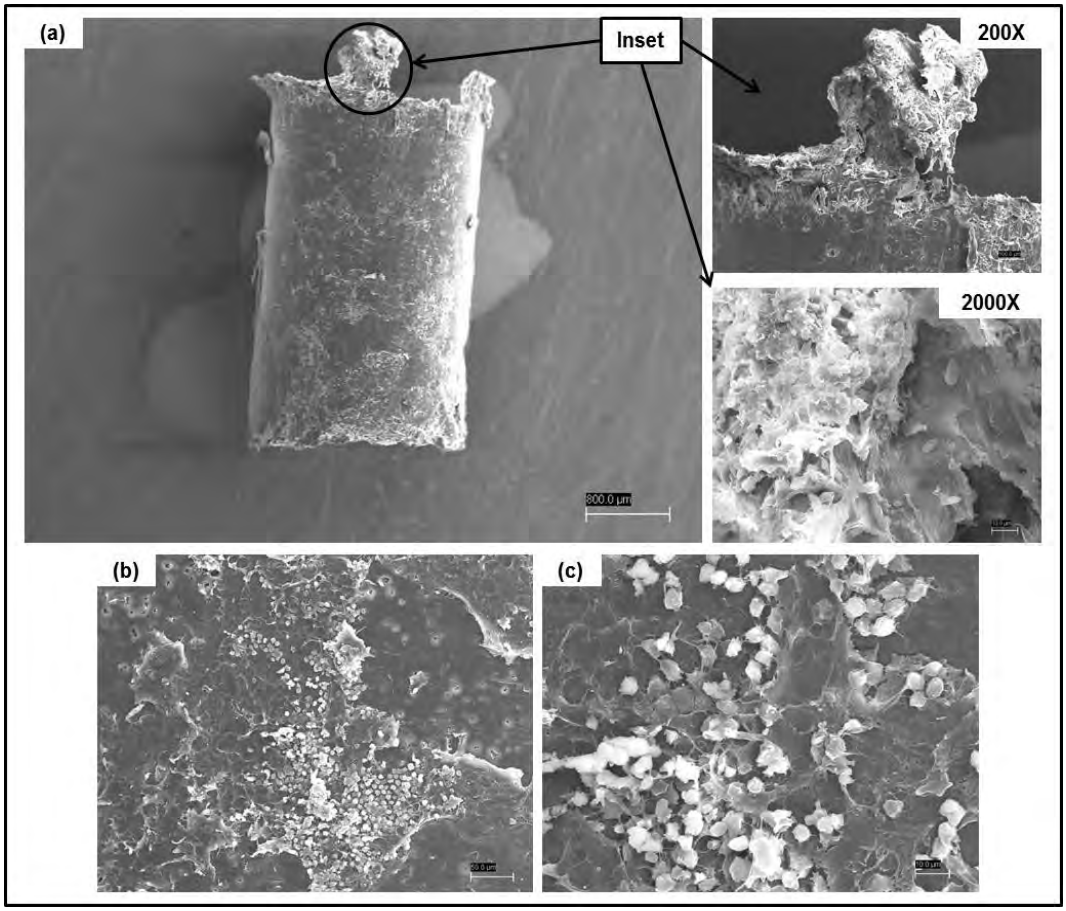

Figura 45 – MEV da amostra (região externa) de PVDF/amido na proporção 66/33, após 42 dias de ensaio *in vivo,* aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm (*Inset:* aumentos de 200X - escala: 100 µm e 2000X - escala: 10 µm); (b) 500X - escala: 50 µm; (c) 2000X - escala: 10 µm.

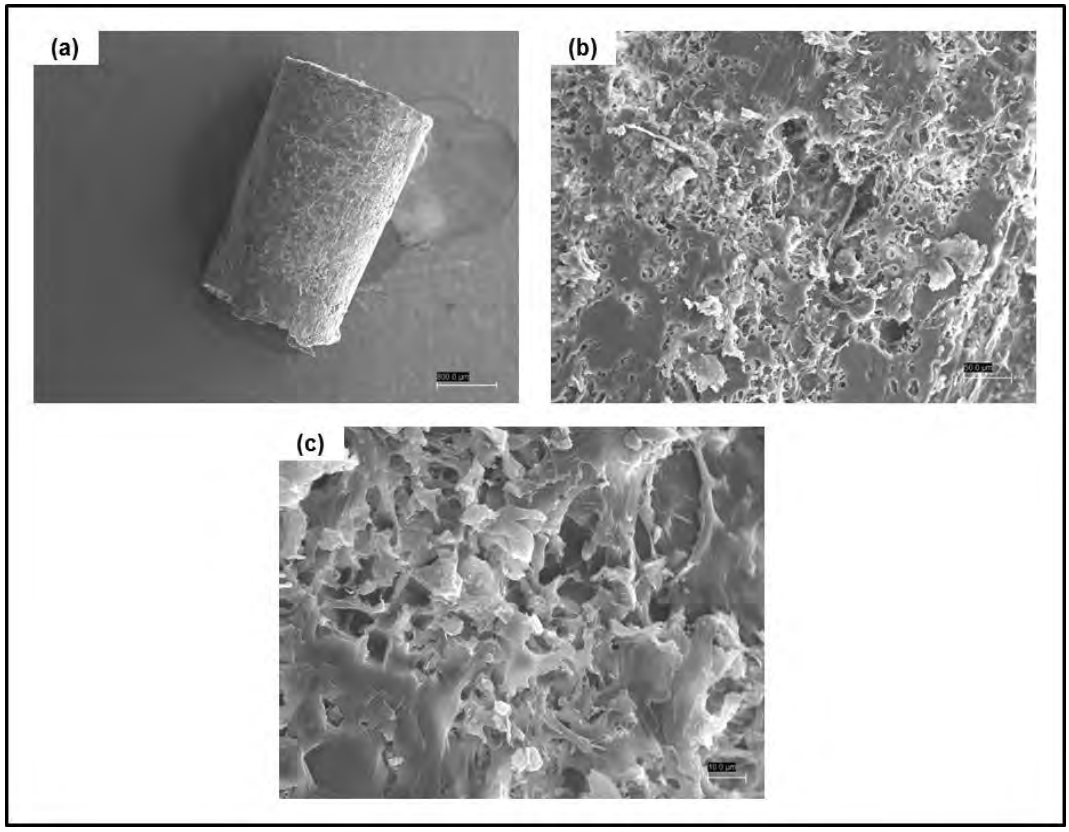

Figura 46 – MEV da amostra (região externa) de PVDF/amido na proporção 90/10, após 42 dias de ensaio *in vivo,* aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm; (b) 500X - escala: 50 µm; (c) 2000X - escala: 10 µm.

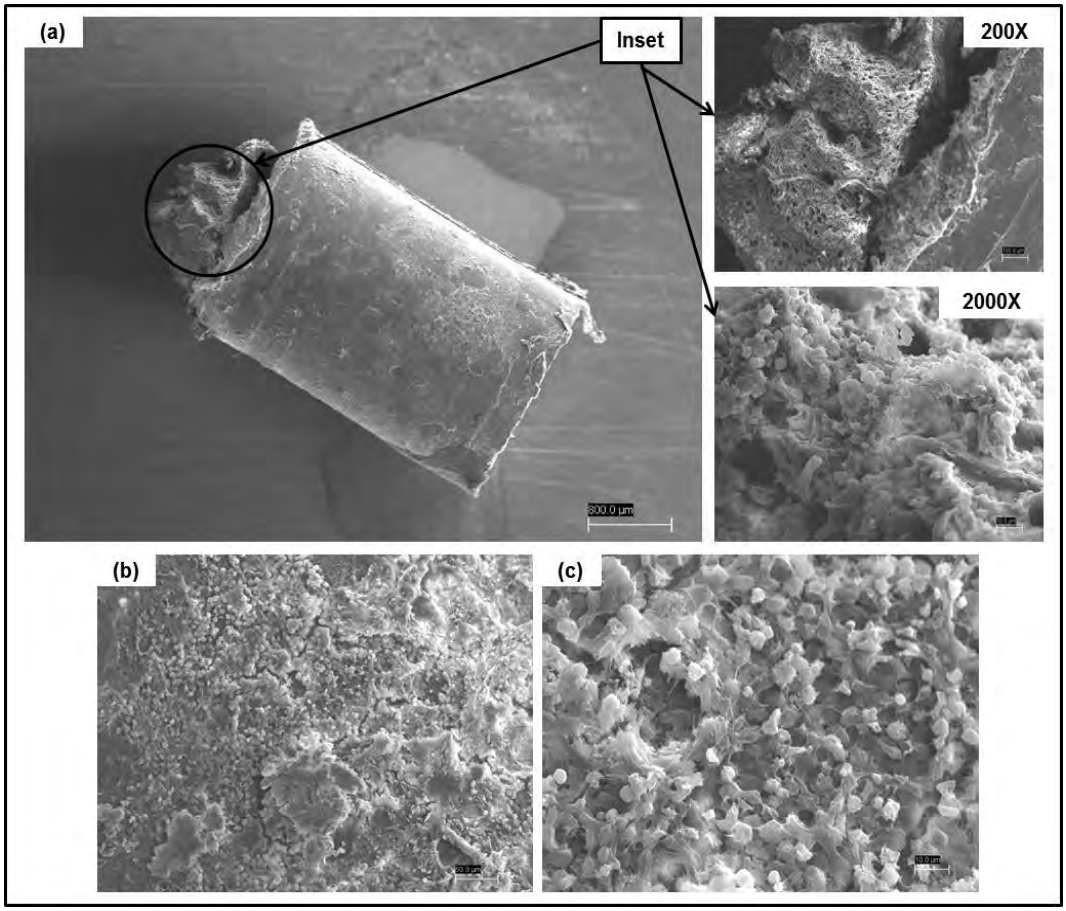

Figura 47 – MEV da amostra (região externa) de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33, após 42 dias de ensaio *in vivo,* aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm (*Inset:* aumentos de 200X - escala: 100 µm e 2000X - escala: 10 µm); (b) 500X - escala: 50 µm; (c) 2000X - escala: 10 µm.

Nas imagens das Figuras 45(a), 46(a) e 47(a), com um aumento de 40 vezes, observou-se que a superfície apresenta uma morfologia irregular, independentemente da proporção de amido na amostra. As imagens (b) e (c) das Figuras 45 a 47 apresentaram um padrão de morfologia que indica uma dispersão do amido no PVDF sem a existência de interação química entre eles. Ao analisar as imagens (c) das Figuras 45 a 47, já no aumento de 2000 vezes, não foi possível visualizar os grânulos de amido dispersos na matriz.

Nas imagens (a) das Figuras 45 e 47 encontra-se em destaque imagens *inset* das extremidades das amostras, nas quais ocorreu a proliferação celular na região externa à amostra. Nas imagens (b) das Figuras 45 e 47, ampliadas em 500 vezes, foram encontradas também agregados celulares semelhantes aos observados nas imagens *inset*. Tal proliferação também foi observada em estudo da biocompatibilidade de materiais biodegradáveis à base de amido moldados por injeção, destinados a aplicações ortopédicas temporárias na substituição óssea,

utillizando-se blendas de amido/copolímero de etileno-acetato de vinila (SEVA-C) implantadas no osso intracortical de cabras por 6 e 12 semanas (MENDES *et al.*, 2001). Ao compararmos as imagens (c) e (b) da Figura 45, PVDF/amido na proporção 66/33, com as da Figura 47, P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33, é possível perceber uma maior agregação celular nas imagens da Figura 47. Tal fato pode ter ocorrido devido à maior polaridade negativa do P(VDF-TrFE) (fase ferroelétrica) incluída pelo F contido no TrFE. Como é de conhecimento na literatura, a maior presença de cargas negativa estimula o crescimento ósseo (BRIGHTON *et al.*, 2001).

5.1.2 Imagens da secção transversal das amostras

Nesta secção as imagens MEV das Figuras 48 a 50, com aumentos de 40, 500 e 2000 vezes, foram obtidas da secção transversal das amostras. As Figuras 48 e 49 apresentam as imagens MEV das amostras de PDVF/amido nas proporções 66/33 e 90/10, respectivamente. A Figura 50 mostra as imagens da amostra de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33.

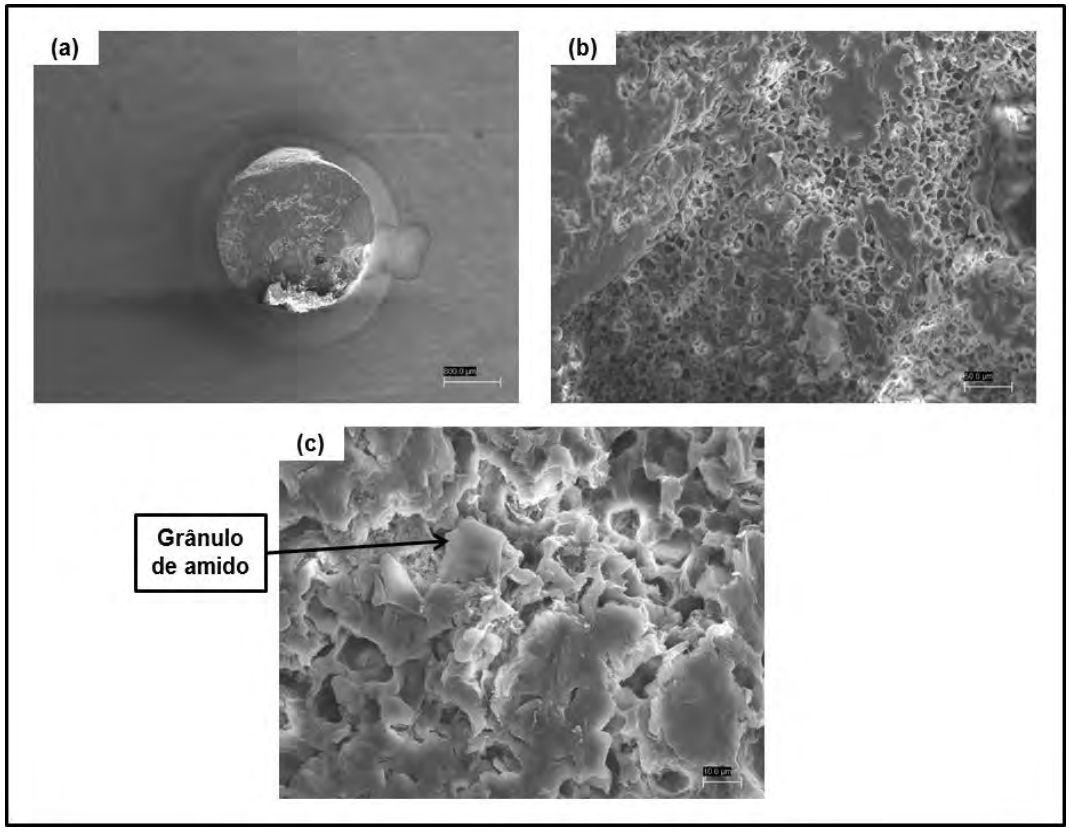

Figura 48 – MEV da amostra (secção transversal) de PVDF/amido na proporção 66/33, após 42 dias de ensaio *in vivo,* aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm; (b) 500X - escala: 50 µm e (c) 2000X - escala: 10 µm.

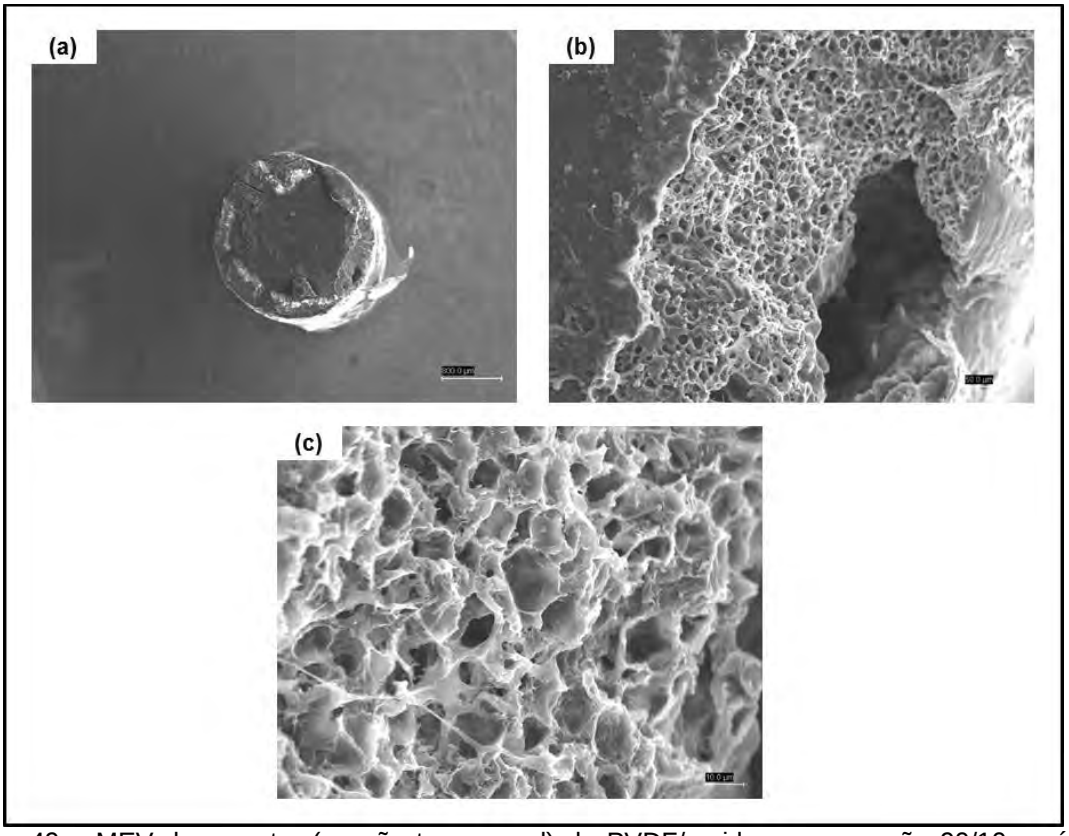

Figura 49 – MEV da amostra (secção transversal) de PVDF/amido na proporção 90/10, após 42 dias de ensaio *in vivo,* aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm; (b) 500X - escala: 50 µm e (c) 2000X - escala: 10 µm.

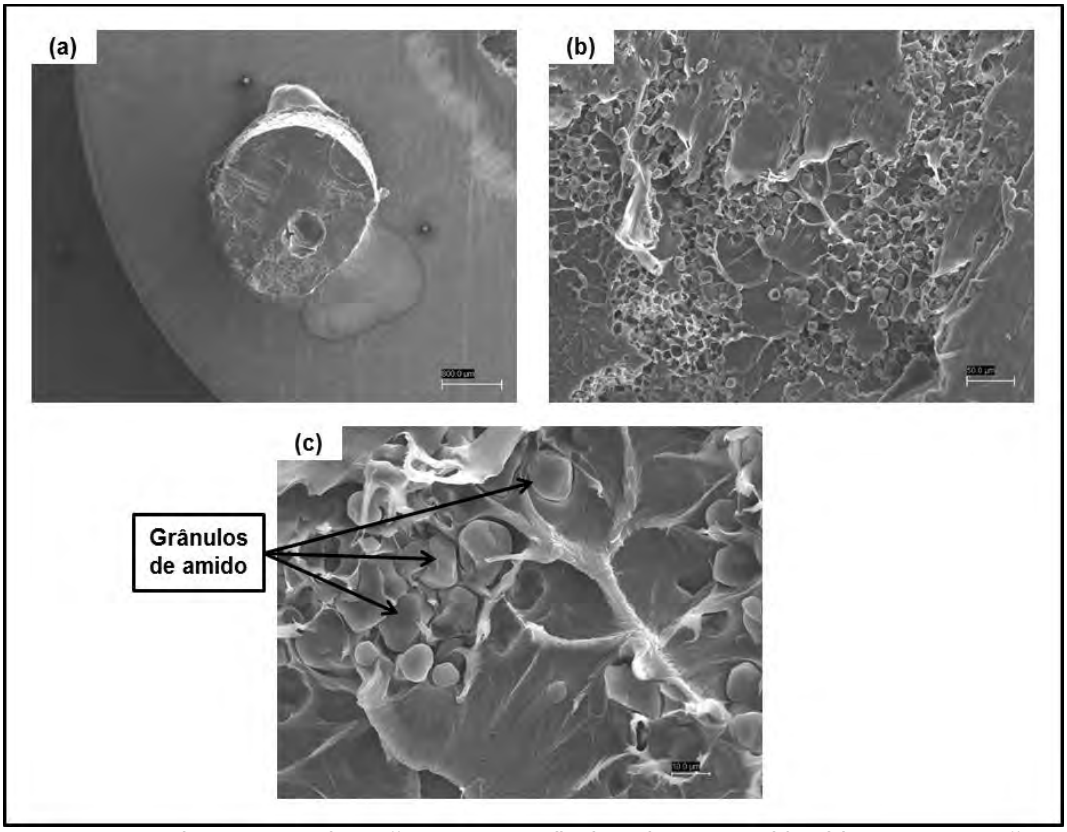

Figura 50 – MEV da amostra (secção transversal) de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33, após 42 dias de ensaio *in vivo,* aumentos de: (a) 40X - escala: 800 µm; (b) 500X - escala: 50 µm e (c) 2000X - escala: 10 µm.

Nas imagens (a) (b) e (c) das Figuras 48 a 50 observou-se que a secção transversal apresenta, assim como na região superficial das amostras, uma morfologia irregular e um padrão que indica a dispersão dos grânulos de amido no PVDF sem a existência de interação química entre eles. Nas imagens (c) das Figuras 48 e 50 foi possível observar grânulos de amido e de poros dispersos na matriz polimérica. SIMÕES *et al.*, 2009 observou em imagens de MEV da secção transversal de blendas de filmes prensados a quente de PVDF/amido, após o período o 60 e 100 dias de implantação em tecido subcutâneo de ratos, uma diminuição dos grânulos de amido, sugerindo uma absorção dos mesmo pelo organismo dos animais. No presente trabalho, a presença dos grânulos de amido no interior das amostras, em virtude do formato cilíndrico da blenda fabricada, não possibilitou o contato dos fluídos do meio extracelular com a região interna das amostras.

Ao fazer uma comparação da morfologia das amostras de PVDF/amido, imagens (a), (b) e (c) das Figuras 48 e 49 com as mesmas imagens das amostras de

P(VDF-TrFE)/amido (Figura 50), pode-se observar que as amostras de P(VDF-TrFE)/amido apresentaram melhor adesão física. SIMÕES *et al.*, 2010 obteve um padrão similar de adesão para blendas de filmes prensados a quente de P(VDF-TrFE)/amido. Tal ocorrência foi atribuída, principalmente, à polaridade introduzida pelos grupos do trifluoretileno. Além disto, nas imagens (b) e (c) das Figuras 48 a 50 observou-se que, diferentemente da região superficial das amostras, não ocorreu proliferação celular no interior.

5.2 Análise histológica

Nesta secção encontram-se as imagens histológicas do tecido ósseo da região intercondiliana do fêmur esquerdo dos animais. Nas Figuras 51 a 54 foram utilizados aumentos de 40, 100, 200 e 400 vezes. As imagens foram obtidas de cortes transversais em relação ao eixo longitudinal da amostra. As Figuras 51 e 52 apresentam as imagens histológicas dos animais que receberam os implantes das amostras de PDVF/amido nas proporções 66/33 (grupo G1). A Figura 53 apresenta as imagens histológicas do animal que recebeu o implante da amostra de PDVF/amido na proporção 90/10 (grupo G2). A Figura 54 mostra as imagens histológicas do animal que recebeu a amostra de P(VDF-TrFE)/amido na proporção 66/33 (grupo G3).

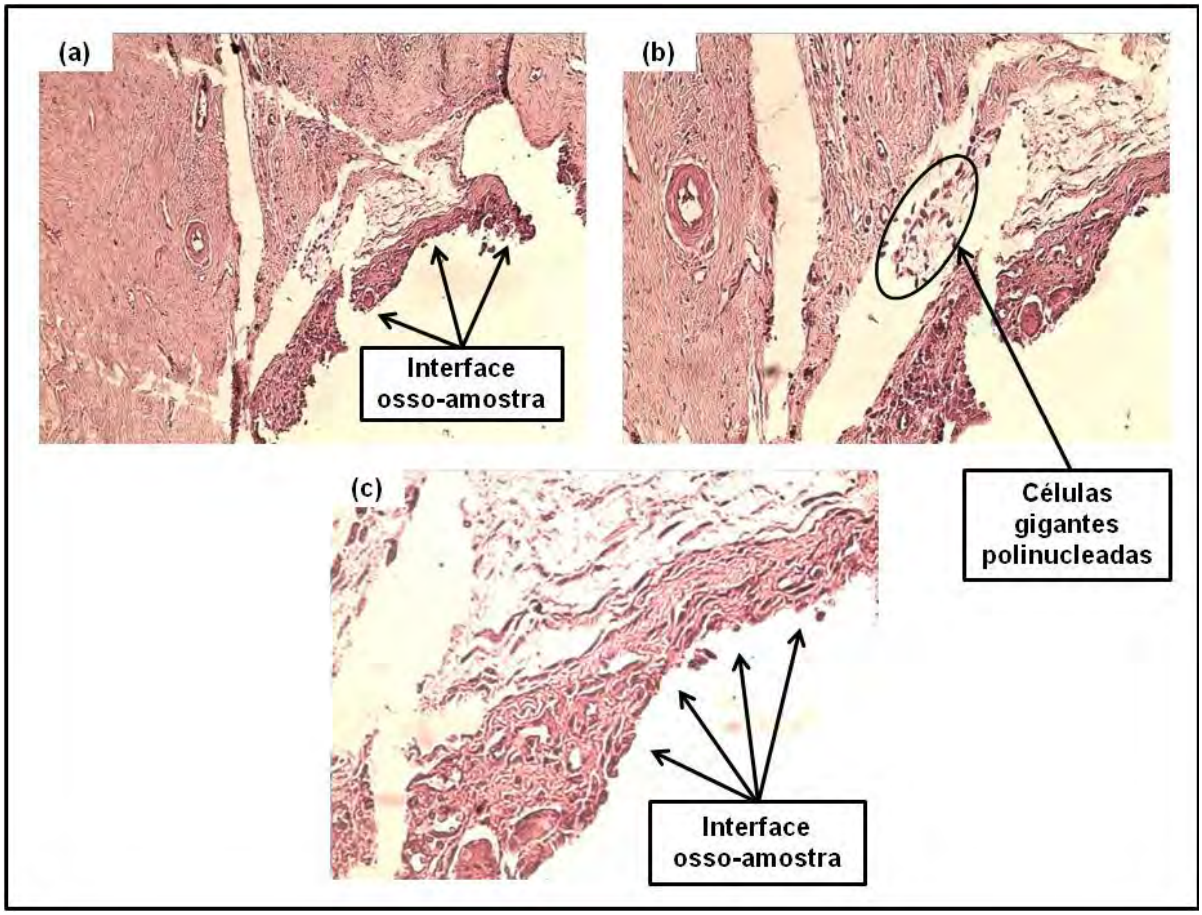

Figura 51 – Fotomicrografia da região do implante da amostra de PVDF/Amido 66/33, 42 dias após cirurgia. Coloração Eosina e Hematoxilina, aumentos de: (a) 100X; (b) 200X e (c) 400X.

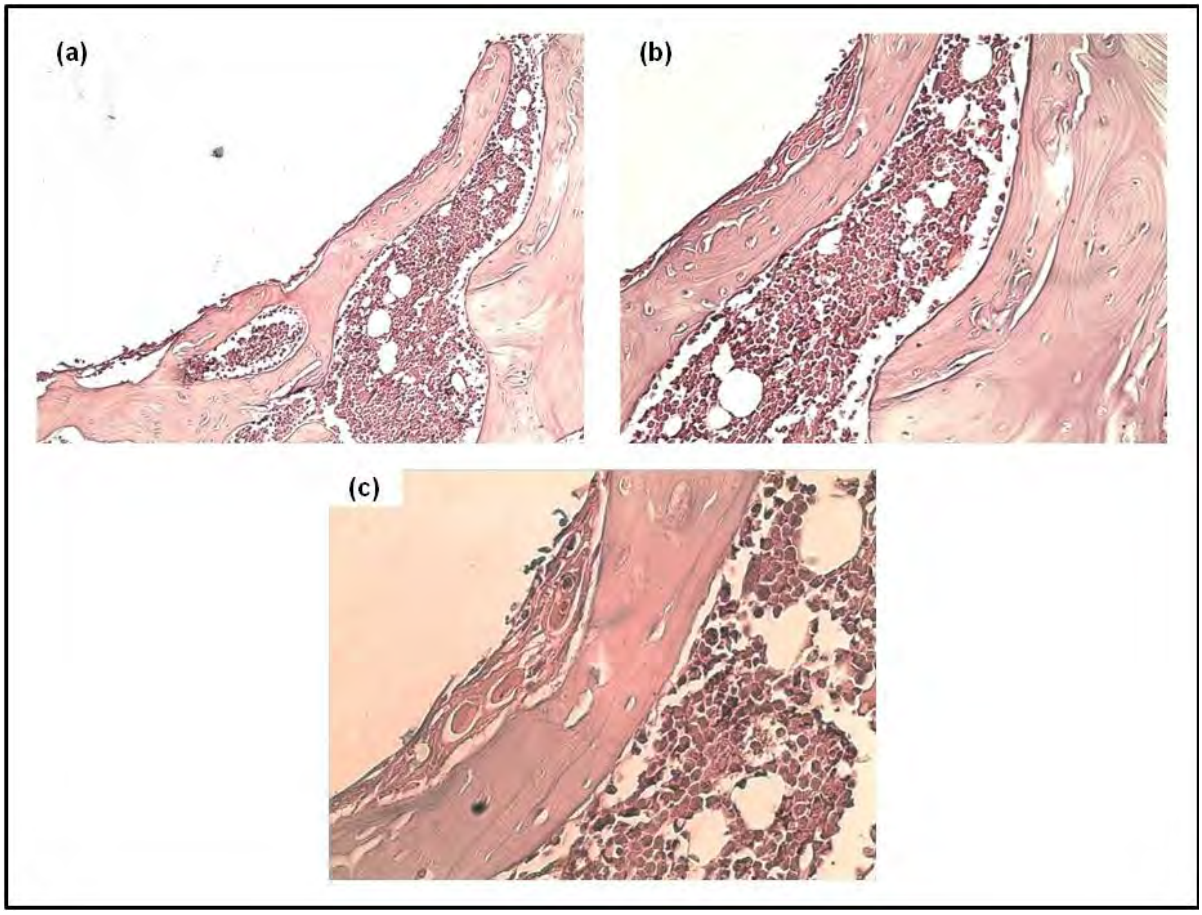

Figura 52 – Fotomicrografia da região do implante da amostra de PVDF/Amido 66/33, 42 dias após cirurgia. Coloração Eosina e Hematoxilina, aumentos de: (a) 100X; (b) 200X e (c) 400X.

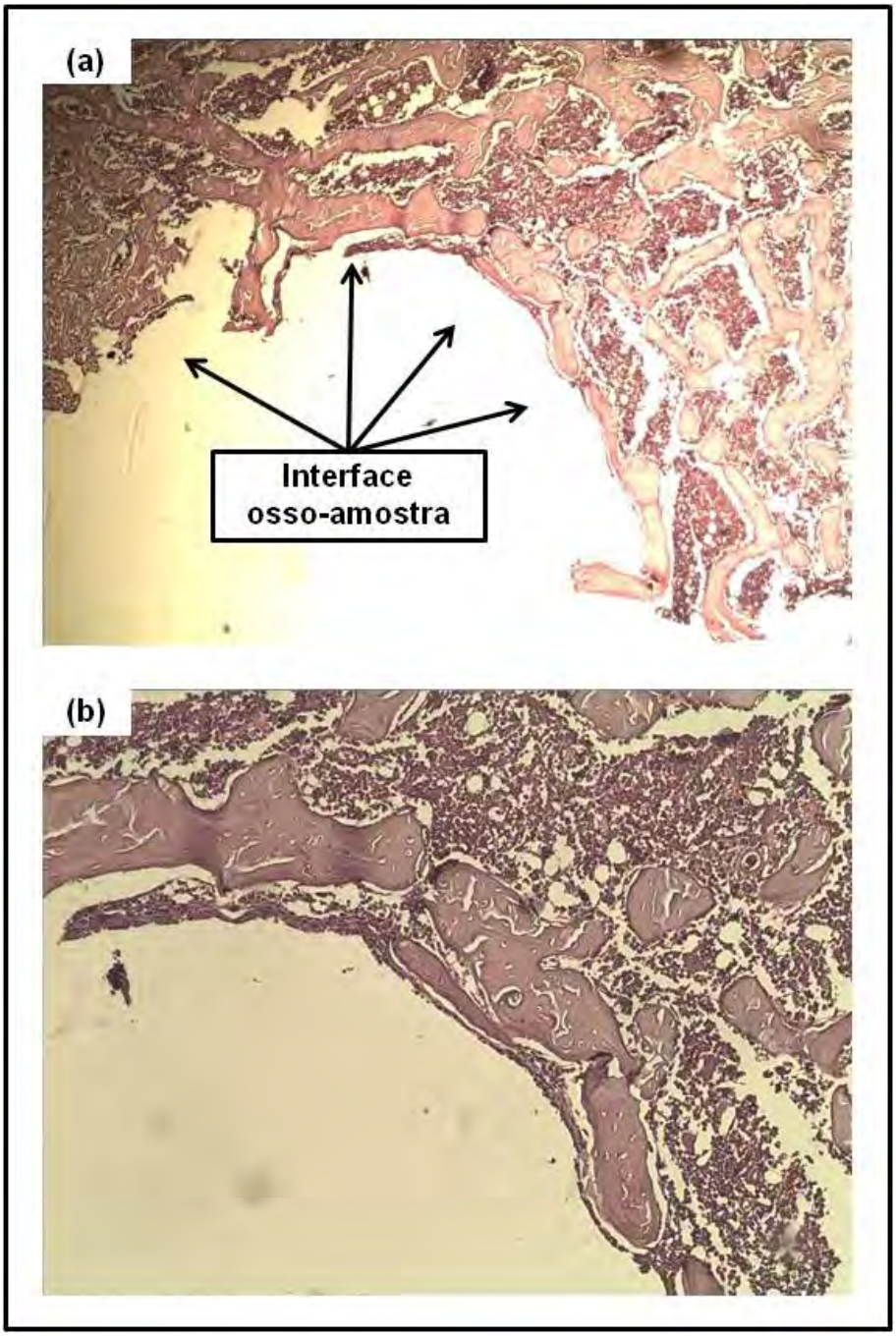

Figura 53 – Fotomicrografia da região do implante da amostra de PVDF/Amido 90/10, 42 dias após cirurgia. Coloração Eosina e Hematoxilina, aumentos de: (a) 40X e (b) 100X.

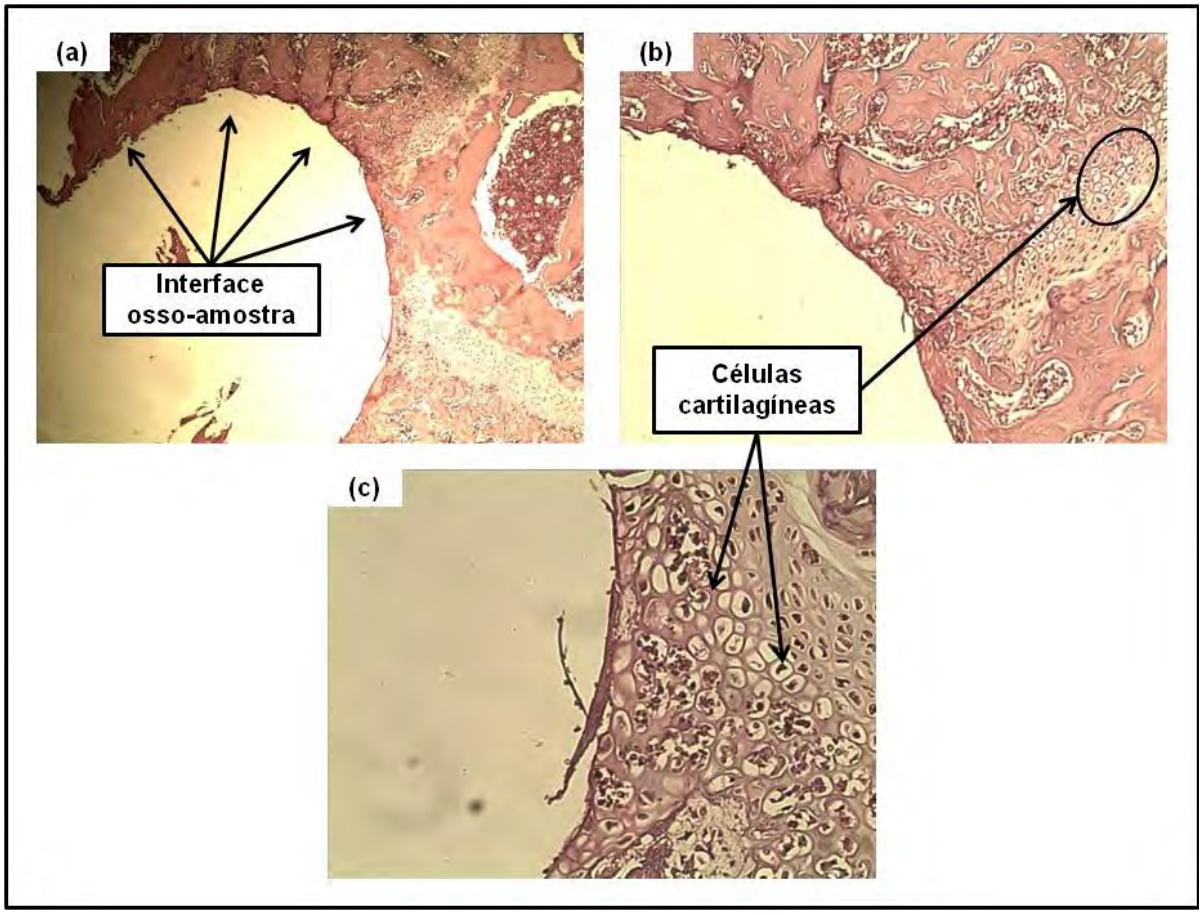

Figura 54 – Fotomicrografia da região do implante da amostra de P(VDF-TrFE)/Amido 66/33, 42 dias após cirurgia. Coloração Eosina e Hematoxilina, aumentos de: (a) 40X; (b) 100X e (c) 200X.

Nas imagens (a) (b) e (c) das Figuras 51 a 54 foram observadas variadas estruturas histológicas dentro do padrão de normalidade, tais como: cartilagem articular, trabéculas ósseas, periósteo e osso esponjoso hematopoiético. Na imagem (b) da Figura 51 encontra-se destacada uma região com presença de células gigantes polinucleadas, indicativas de processo inflamatório na existência de corpo estranho. Fato este também observado nas imagens (a), (b) e (c) da Figura 52 com menor intensidade e restrito a uma pequena área.

A reação inflamatória, composta de macrófagos e células gigantes do tipo corpo estranho, é o estágio final das respostas inflamatórias e de cura de feridas após a implantação de um dispositivo médico, prótese ou biomaterial. Os fatores que modulam a interação de macrófagos e células gigantes são as características químicas, físicas e morfológicas da superfície sintética (ANDERSON, RODRIGUEZ, CHANG, 2008).

As imagens MEV feitas das amostras, independentemente, da proporção de materiais utilizados na blenda, apresentaram superfícies rugosas em todas as

capturas realizadas. As amostras com maior quantidade de amido apresentaram uma tendência maior de possuírem superfícies mais rugosas. Possivelmente esta maior rugosidade justificaria o fato de terem sido encontradas células gigantes polinucleadas nas imagens (a), (b) e (c) das Figuras 51 e 52.

Superfícies relativamente rugosas como próteses vasculares expandidas compostas por poli(tetrafluoretileno) apresentam reação de macrófagos e de células gigantes do tipo corpo estranho, com variados graus de tecido de granulação subjacente a superfície de reposta. A topografia da superfície de contato do biomaterial determina a composição da resposta inflamatória de tipo corpo estranho. Com materiais biocompatíveis, a composição da reação ao corpo estranho no local do implante pode ser controlada pelas propriedades da área superficial do biomaterial, a forma do implante e a relação área superficial e o volume. Implantes fabricados ou materiais porosos apresentam maiores quantidades de macrófagos e células gigantes do tipo corpo estranho, no local de implantação, em comparação com implantes de superfícies lisas, as quais causam fibroses no local de implantação (GAD, 2005).

CAPÍTULO VI

CONCLUSÃO

Neste projeto de mestrado foi possível obter ter as seguintes conclusões:

– O processamento das blendas de PVDF/amido e P(VDF-TrFE)/amido em diferentes proporções por prensagem a quente não alterou as propriedades físicas e químicas dos materiais nas blendas. Além disto, gerou a criação de poros na superfície das amostras (cilindros).

– Foi constatada a ausência de interação química entre os polímeros sintéticos e o amido, o que é positivo, pois pode favorecer sua absorção pelo organismo, gerando poros na matriz polimérica.

– A adição física do amido ao PVDF e P(VDF-TrFE) permite variar as propriedades mecânicas da blenda. Os valores de módulo de armazenamento (E') obtidos foram da ordem de $7{,}50*10^{8}$ a $2{,}00*10^{9}$ Pa, valores superiores ao da região trabecular do osso fêmur (da ordem de 10^{6} Pa).

– Os testes *in vitro*, realizados pela imersão das blendas em solução aquosa contendo enzima α-amilase por 14, 28 e 42 dias, revelaram pouca perda de massa, o que foi um resultado inesperado. A expectativa era uma perda significativa de massa em virtude da degradação do amido pela enzima. Isto pode estar relacionado ao fato de parte do amido ter sido arrancado da superfície externa no instante da retirada da amostra do molde (imagens de MEV) e parte estar presente no interior do cilindro (comprovada pelas imagens de MEV da secção transversal das amostras), fora do alcance da ação da enzima. Outra possibilidade para a pequena perda de amido pode ser atribuída a perda de atividade da enzima. Desta forma, os resultados do ensaio *in vitro* foram inconclusivos.

– Os resultados do estudo piloto *in vivo* realizado pelo período de 42 dias em animais revelaram que as amostras, independentemente da composição e da proporção, foram toleradas pelo tecido ósseo esponjoso. Esta hipótese pode ser assumida devido ao fato de todos os animais não apresentarem reação inflamatória aguda.

– Apenas um animal apresentou uma reação inflamatória discrepante em relação aos demais, sendo ainda caracterizada como reação inflamatória crônica em uma pequena região tecidual.

ETAPAS FUTURAS

– Em relação às etapas futuras pretende-se publicar os resultados aqui apresentados. Para a continuação dos estudos em nível de doutorado o estudante está regularmente matriculado no programa de pós-graduação em Ciências e Tecnologia de Materiais (POSMAT) e com uma proposta de projeto, nesta linha de pesquisa, complementando os estudos de blendas de amido com o PVDF e com o PVDF-TrFE. Além disto, também serão estudados outros polímeros, tais como ácido poli(láctico) (PLA) e o copolímero de etileno-acetato de vinila (EVA). Tais blendas serão caracterizadas e implantadas em organismos vivos na forma de blendas sólidas e, se possível, na forma de espumas, dependendo da viabilidade técnica de se conseguir espumar tais blendas sem a utilização de agentes espumantes tóxicos. A proposta tem por objetivo também promover a interdisciplinaridade entre os pesquisadores, pois, estará envolvido o aluno, com formação na área da saúde, o prof. Dr. José Carlos Camargo do Departamento de Fisioterapia da FCT/UNESP e o prof. Carlos José Leopoldo Constantino do DFQB/UNESP. Pretende-se ainda estender a colaboração com o grupo do prof. Miguel Angel Rodriguez Perez da Universidad de Valladolid, Espanha, especialista na produção e caracterização de materiais espumados, tanto poliméricos quanto metálicos, e com quem temos desenvolvidos projetos bilaterais financiado pela CAPES (processo 118/06 concluído e 260/12 recém aprovado) e pelo Ministério de Ciência e Inovação da Espanha.

REFERÊNCIAS

ABDI - Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. **Manual de registro e cadastramento de materiais de uso em saúde.** Brasília: ABDI. p. 306. 2011.

AN, Y. H.; DRAUGHN, R. A. **Mechanical Testing of Bone and the Bone–Implant Interface.** . 1st Ed. CRC Press. p. 650. 2000.

ANDERSON, J, M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials: Review. **Seminars in Immunology**. v.20, p. 86-100, 2008.

AMEDURI B. From Vinylidene Fluoride (VDF) to the Applications of VDF-Containing Polymers and Copolymers: Recent Developments and Future Trends. **Chem. Rev.** v. 109, n. 12. p. 6632-6686, 2009.

ARAÚJO, M. A.; CUNHA, A. M.; MOTA, M. Enzymatic degradation of starch thermoplastic blends using samples of different thickness. **Journal of Materials Science : Materials in Medicine**, v. 20, p. 607-614, 2010.

ARAUJO, M. A.; CUNHA, A. M.; MOTA, M. Enzymatic degradation of starch-based thermoplastic compounds used in protheses: identification of the degradation products in solution. **Biomaterials**, v. 25, p. 2687-2693, 2004.

ARAÚJO, M. A.; CUNHA, A. M.; MOTA, M. Changes on surface morphology of corn starch blend films. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 94A, n. 3, p. 720-729, 2010.

AROCA, R. **Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy**. 1st Ed. John Wiley & Sons Ltd. p. 233. 2006.

AZEVEDO, H. S.; SANTOS, T. C.; REIS, R. L. Controlling the degradation of natural polymers for biomedical applications. In: REIS, R. L. **Natural-based polymers for biomedical applications**. CRC Press LLC, 2008.

BACHMAN, M. A.; LANDO, J. B. A reexamination of the crystal structure of phase II of poly(vinylidene fluoride). **Macromolecules.**, v. 14, p. 40-46, 1981.

BALMAYOR, E. R.; TUZLAKOGLU, K.; MARQUES, A. P.; AZEVEDO, H. S.; REIS, R. L. A novel enzymatically-mediated drug delivery carrier for bone tissue engineering applications: combining biodegradable starch-based microparticles and differentiation agents. **J Mater Sci: Mater Med.** v. 19, p. 1617-1623, 2008.

BARBUCCI, R. **Integrated Biomaterials Science**. 1st Ed. Kluwer Academic Publishers. p. 1085. 2002.

BEHARI, J. **Biophysical bone behavior: Principles and Applications.** 1st Ed. John Wiley & Sons (Asia) p. 501. 2009.

BERTOLINI, A. C.; Trends in starch applications. In: BERTOLINI, A. C. **Starches: characterization, properties, and applications.** 1st Ed. CRC Press. p. 1-8. 2010.

BOWER, D. I. **An Introduction to Polymer Physics**. 1st Ed. Cambridge University Press. p. 465. 2002.

BRIGHTON, C. T.; WANG, W.; SELDES, R.; ZHANG, G.; POLLACK, S. R. Signal transduction in electrically stimulated bone cells. **J Bone Joint Surg Am.** v. 83-A, n. 10, p. 1514-1523, 2001.

BUENO, E. M.; GLOWACKI, J. **Biologic foundations for skeletal tissue engineering**. 1st Ed. Morgan & Claypool Publishers. p. 220. 2011.

CHARTOFF, R. P.; MENCZEL, J. D.; DILLMAN, S. H. Dynamic Mechanical Analysis (DMA). In. MENCZEL, J. D.; PRIME, R. B**. Thermal Analysis of Polymers: Fundamentals and Applications.** 1st Ed. John Wiley & Sons, Inc. 2009.

CHOI, S. W.; KIM, J. R.; AHN, Y. R.; JO, S. M.; CAIRNS, E. J. Characterization of Electrospun PVdF Fiber-Based Polymer Electrolytes. **Chem. Mater**. v. 19, p. 104-115, 2007.

COLOMBAN, P.; GOUADEC, G. Raman Scattering Theory and Elements of Raman Instrumentation. In. AMER, M. S. **Raman Spectroscopy for Soft Matter Applications.** 1st Ed. John Wiley & Sons, Inc. 2009.

CONSTANTINO, C. J. L.; JOB, A. E.; SIMÕES, R. D.; GIACOMETTI, J. A.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA, O. N.; JR., GOZZI, G.; CHINAGLIA, D. L. Phase Transition in Poly(vinylidene fluoride) Investigated with Micro-Raman Spectroscopy. **Applied Spectroscopy**. v. 59, n. 3, p. 28-32, 2005.

DILLON, D. R.; TENNETI, K. K.; LI, C. Y.; KO, F. K.; SICS, I.; HSIAO, B. S. On the structure and morphology of polyvinylidene fluoride–nanoclay nanocomposites. **Polymer**. v. 47, p.1678-1688, 2006.

DOBLARÉ, M.; GARCIA, J. M.; GÓMEZ, M. J. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. **Eng Fract Mech**. v. 71, p. 1809–1840, 2004.

DROBNY, J. G. Introduction. In:_____. **Technology of fluoropolymers**. 2nd. Ed. CRC Press Taylor & Francis Group. p. 1-2. 2009.

DUARTE, A.R. C.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Enzymatic degradation of 3D scaffolds of starch-poly-(Ɛ-caprolactone) prepared by supercritical fluid technology. Polymer Degradation and Stability. **Polymer Degradation and Stability.** v. 95, p. 2110-2117, 2010.

DUNCAN, J. Principles and Applications of Mechanical Thermal Analysis. In. GABBOTT, P. **Principles and Applications of Thermal Analysis.** 1st Ed. Blackwell Publishing Ltd, 2008.

EBEWELE, R. O. **Polymer science and technology.** 1st Ed. CRC Press LLC. p. 543. 2000.

EGERTON, R. F. **Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM**. 1st Ed. Springer Science Business Media, Inc. p. 211. 2005.

ETHIER, C. R.; SIMMONS, C. A. **Introductory Biomechanics: From Cells to Organisms**. 1st Ed. Cambridge University Press. p. 545. 2007.

FERREIRA, A. L. **Propriedades Vibracionais de Polissacarídeos Naturais.** 2008. 78f. Dissertação (Mestrado em Física) – Ciências exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

FIELD, A. **Descobrindo a estatística usando o SPSS**. 2º Ed. Porto Alegre: Bookman. p. 688. 2009.

FUKADA, E.; YASUDA, I. On the piezoelectric effect of bone. **Journal Applied Physics Japanese**, v. 12, n. 10, p. 1158-1162, 1957.

GAD, S. C. Foreign Body Response.In.:_____. **Encyclopedia of Toxicology**, 2nd Ed. Elsevier Inc., p. 367-369, 2005.

GREGORIO JR. R.; CAPITÃO, R. C. Morphology and phase transition of high melt temperature crystallized poly(vinylidene fluoride). **Journal of Materials Science**. v. 35, p. 299-306, 2000.

GOMES, M. E.; AZEVEDO, H. S.; MOREIRA, A. R.; ELLÄ, V.; KELLOMÄKI, M.; REIS, R. L. Starch–poly(ε-caprolactone) and starch–poly(lactic acid) fibre-mesh scaffolds for bone tissue engineering applications: structure, mechanical properties and degradation behaviour. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. v. 2, p. 243-252, 2008.

HARKWESS, J. E.; WAGNER, J. E. **Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores.** São Paulo: Ed. Roca. p. 238. 1993.

HALPERIN, C.; MUTCHNIK, S.; AGRONIN, A.; MOLOTSKII, M.; URENSKI, P.; SALAI, M.; ROSENMAN, G. Piezoelectric Effect in Human Bones Studied in Nanometer Scale. **Nano Letters.**, .v. 4, n. 7, p. 1253-1256, 2004.

HEUTS, J.; SALBER, J.; GOLDYN, A. M.; JANSER, R.; MÖLLER, M.; KLEE D. Bio-functionalized star PEG-coated PVDF surfaces for cytocompatibility-improved implant components. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**. v. 92A, n. 4, p. 1538-1551, 2009.

HIN, T. S. **Engineering materials for biomedical application**. 1st Ed. World Scientific. p.2-3. 2004.

HOF, M. Basics of Optical Spectroscopy. In: GAUGLITZ, G. e VO-DINH, T. **Handbook of Spectroscopy**. Wiley-VCH. p. 39. 2003.

INCE-GUNDUZ, B. S.; ALPERN, R.; AMARE, D.; CRAWFORD, J.; DOLAN, B.; JONES, S.; KOBYLARZ, R.; REVELEY, M.; CEBE, P. Impact of nanosilicates on poly(vinylidene fluoride) crystal polymorphism: Part 1. Melt-crystallization at high supercooling. **Polymer**. v. 51, p. 1485-1493, 2010.

JIMÉNEZ, A.; FABRA, M. J.; TALENS, P.; CHIRALT, A. Effect of re-crystallization on tensile, optical and water vapour barrier properties of corn starch films containing fatty acids. **Food Hydrocolloids**. v. 26, p. 302-310, 2012.

JUNG, W.; LI, C.; KIM, D. S.; AHN, H. A Sensing Tube with an Integrated Piezoelectric Flow Sensor for Liver Transplantation. In.: 31st Annual International Conference of the IEEE EMBS. Minneapolis, Minnesota, USA, 2009, p. 4469-4472.

JUNGE, K.; BINNEBÖSEL, M.; ROSCH, R.; JANSEN, M.; KÄMMER D.; OTTO, J.; SCHUMPELICK, V.; KLINGE, U. Adhesion formation of a polyvinylidenfluoride/polypropylene mesh for intra-abdominal placement in a rodent animal model. **Surgical Endoscopy**. v. 23, p. 327-333, 2009.

KATTI, K. S. Biomaterials in total joint replacement. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.** v. 39, p. 133-142, 2004.

KAWAI, H. The Piezoelectricity of Poly (vinilidene Fluoride). **Japan J. Appl. Phys.** n. 8, p. 975-976, 1969.

KEMNITZ, E.; TRESSAUD, A. Preface. In: TRESSAUD, A. **Functionalized inorganic fluorides: synthesis, characterization & properties of nanostructured solids**. 1st Ed. John Wiley & Sons, Ltd. 2010.

KIM, K. J.; REYNOLDS, N. M.; HSU, S. L. Spectroscopic Analysis of the Crystalline and Amorphous Phases in a Vinylidene Fluoride/Trifluoroethylene Copolymer. **Macromolecules**. v. 22, n. 12, p. 4395-4491, 1989.

KLINGE, U.; KLOSTERHALFENB, B.; OTTINGER, A. P.; JUNGE, K.; SCHUMPELICKA, V. PVDF as a new polymer for the construction of surgical meshes. **Biomaterials**. v. 23, p. 3487-3493, 2002.

KOBAYASHI, M.; TASHIRO, K.; TADOKORO, H. Piezoelectricity and related properties of vinylidene fluoride and trifluorethylene copolymer. **MJ. Appl Phys**. v. 59, n. 6, p. 2142-2150, 1986.

KOGA, K.; OHIGASHI, H. Molecular Vibrations of Three Crystal Forms of Poly(vinylidene fluoride). **Macromolecules**. v. 8, p. 158-171, 1975.

KOIZUMI, N. Poly(trifluoroethylene). In. NALWA, H.S. **Ferroelectric polymers: chemistry, physics and applications**. 1st Ed. Marcel Dekker, 1995.

KUMAR, S. **Biomechanics in ergonomics.** 2nd Ed. CRC Press Taylor & Francis Group. p. 728. 2007.

KUWAJIMA, S.; HORIE, S.; HORIUCHI, T.; YAMADA, H.; MATSUSHIGE, K.; ISHIDA, K. Crystal and Layer Structures of Ferroelectric Oligomer Thin Films. **Macromolecules,** v. 42, n. 9, p. 3353-3357, 2009.

LEE, Y. S.; EZEBUIROH, C.; COLLINS, C.; ARINZEH, T.L. An Electroactive Conduit for Spinal Cord Injury Repair._____., 2009.

LENG, Y. **Materials Characterization: Introduction to Microscopic and Spectroscopic Methods.** 1st Ed. John Wiley & Sons (Asia). p. 254, 2008.

LIRANI, A. P. R.; LAZARETTI-CASTRO, M.. Evidências da Ação de Agentes Físicos Sobre o Metabolismo do Tecido Ósseo e Seus Potenciais Usos Clínicos. **Arq Bras Endocrinol Metab,** v. 49, n. 6, p. 891-896, 2005.

LINARES, A.; COSTA, J.L. Tensile and dynamic mechanical behaviour of polymer blends based on PVDF. **European Polymer Journal**, v.33, n.4, p. 467-473, 1997.

LIU, Y. L.; LI, Y.; XU, J. T.; FAN, Z. Q. Cooperative Effect of Electrospinning and Nanoclay on Formation of Polar Crystalline Phases in Poly(vinylidene fluoride). **ACS Applied Materials & Interface**, v. 2, n. 6, p. 1759-1768, 2010.

MALIK, A.; PARVEEN, S.; AHAMAD, T.; ALSHEHRI, S. M.; SINGH, P. K.; NISHAT, N. Coordination Polymer: Synthesis, Spectral Characterization and Thermal Behaviour of Starch-Urea Based Biodegradable Polymer and Its Polymer Metal Complexes. **Bioinorganic Chemistry and Applications**. v. 2010, p.1-8, 2010.

MARTINS, P.; NUNES, J. S.; HUNGERFORD, G.; MIRANDA, D.; FERREIRA, A.; SENCADAS, V.; LANCEROS-MÉNDEZ, S. Local variation of the dielectric properties of poly(vinylidene fluoride) during the α-to β-phase transformation. **Physics Letters A**, v. 373, p.177-180, 2009.

MARTINS, A. M.; PHAM, Q. P.; MALAFAYA, P. B.; SOUSA, R. A.; GOMES, M. E.; RAPHAEL, R. M.; KASPER, F. K; REIS, R. L.; MIKOS A. G. The Role of Lipase and α-Amylase in the Degradation of Starch/Poly(e-Caprolactone) Fiber Meshes and the Osteogenic Differentiation of Cultured Marrow Stromal Cells. **Tissue Engineering: Part A**, v. 15, n. 2, p. 295-305, 2009.

MANO, J.F.; KONIAROVA, D.; REIS, R.L. Thermal properties of thermoplastic starch/synthetic polymer blends with potential biomedical applicability. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.14, n.2, p.127-135, 2003.

McMANUS, J. F. A.; MOWRY, R. W. **Staling methods: histologic and histochemical medical division**. 1st Ed. Harper & Brother. p. 310, 1960.

MENDES, S. C.; REIS, R.L.; BOVELL, Y. P.; CUNHA, A. M.; BLITTERSWIJK, C. A.; BRUIJN, J. D. Biocompatibility testing of novel starch-based materials with potential application in orthopaedic surgery: a preliminary study. **Biomaterials**. v. 22, p. 2057-2064, 2001.

MICHLER, G. H. **Electron Microscopy of Polymers**. 1st Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 472, 2008.

NASEF, M. M.; SAIDI, H.; DAHLAN, K. Z. M. Investigation of electron irradiation induced-changes in poly(vinylidene fluoride) films. **Polymer Degradation and Stability**. v. 75, p. 85-92, 2002.

PARK, J.W.; IM, S. S.; KIM S. H.; KIM, Y. H. Biodegradable polymer blends of Poly(L-lactic acid) and gelatinized starch. **Polymer Engineering Science**, v. 40, n.12, p.2539-2550, 2000.

PARK, J.; LAKES, R.S. **Biomaterials: An Introduction**. 3rd Ed. Springer. p. 562, 2007

PASHKULEVA, I.; LÓPEZ-PÉREZ, P. M.; AZEVEDO, H. S.; REIS, R. L. Highly porous and interconnected starch-based scaffolds: Production, characterization and surface modification. **Materials Science and Engineering C**. v. 30, p. 981-989, 2010.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introduction to Spectroscopy**. 4th Ed. Brooks/Cole, Cengage Learning. p. 745, 2009.

PAWAR, R.; JADHAV, W.; BHUSARE, S.; BORADE, R.; FARBER, S.; ITZKOWITZ, D.; DOMB, A. Polysaccharides as carriers of bioactive agents for medical applications. In: REIS, R. L. **Natural-based polymers for biomedical applications**. CRC Press LLC, 2008.

PRABU, A. A.; KIMA, K. J.; PARK, C. Effect of thickness on the crystallinity and Curie transition behavior in P(VDF/TrFE) (72/28) copolymer thin films using FTIR-transmission spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**. v. 49, p. 101-109, 2009.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials Science: An Introduction to materials in medicine.** 2nd Ed. p. 879, 2004.

REIS, R. L.; CUNHA, A. M. Characterization of two biodegradable polymers of potential application within the biomaterials field. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.**6, n.** 12, p. 786-792, 1995.

REYNOLDS, N. M.; KIM, K. J.; CHANG, C.; HSU, S. L. Spectroscopic Analysis of the Electric Field Induced Structural Changes in Vinylidene Fluoride/Trifluoroethylene Copolymers. **Macromolecules**. v. 22, n. 3, p. 1092-1100, 1989.

ROBYT, J. F. Enzymes and Their Action on Starch. In: BEMILLER, J.; WHISTLER, R. **Starch: Chemistry and Technology**. 1st Ed. Academic Press. p. 238-239, 2009

SANTOS, T. C.; MARQUES, A. P.; HÖRING, B.; MARTINS, A. R.; TUZLAKOGLU, K.; CASTRO, A. G.; VAN GRIENSVEN, M.; REIS, R. L. In vivo short-term and long-term host reaction to starch-based scaffolds. **Acta Biomaterialia.** v. 6, p. 4314-4326, 2010.

SALGADOS, A. J.; COUTINHO, O. P.; REIS, R. L. Bone tissue engineering: State of the art and future trends. **Macromolecular Bioscience**. v.4, n.4, p. 743-765, 2004.

STAGNER, J.; NARAYAN, R. Preparation and Properties of Biodegradable Foams. **J. Polym. Environ.** v.19, p. 598-606, 2011.

SENCADAS, V.; LANCEROS-MÉNDEZ, S.; MANO, J. F. Thermal characterization of a vinylidene fluoride-trifluorethylene (75–25) (%mol) copolymer film. **Journal of Non-Crystalline Solids**. v. 352, p. 5376-5381, 2006.

SHALABY, W. S.; BURG, K. J. L. **Absorbable and Biodegradable Polymer.** 1st Ed. CRC Press LLC. p. 243, 2004.

SHI, D. **Introduction to Biomaterials.** 1st. Ed. Tsinghua University Press and World Scientific Publishing. p. 270, 2006.

SHI, R.; ZHU, A.; CHEN, D.; JIANG, X.; XU, X.; ZHANG, L.; TIAN, W. In Vitro Degradation of Starch/PVA Films and Biocompatibility Evaluation. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 115, p. 346-357, 2010.

SIMÕES, R. D.; RODRIGUEZ-PEREZ, M. A.; SAJA, J. A.; CONSTANTINO, C. J. L. Tailoring the Structural Properties of PVDF and P(VDF-TrFE) by Using Natural Polymers as Additives. **Polymer Engineering and Science**. v.49, p. 2151-2157, 2009.

SIMÕES, R. D.; RODRIGUEZ-PEREZ, M. A.; SAJA, J. A.; CONSTANTINO, C. J. L. Thermomechanical characterization of PVDF and P(VDF-TrFE) blends containing corn starch and natural rubber. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 99, p. 621-629, 2010.

SIMÕES, R. D. **Fabricação e caracterização estrutural de filmes de materiais poliméricos visando à aplicação como biomateriais.** 2009. 116 f. (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Materiais), Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 6. Ed. Bookman, p. 836, 2007.

SMITH, E.; DENT, G. **Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach.** 1st. Ed. John Wiley & Sons Ltd, p. 210, 2005

SRICHANA, T.; DOMB, A. J. Polymeric Biomaterials. In. NARAYAN, R. **Biomedical Materials**. 1st Ed. Springer Science+Business Media, LLC, 2009.

STUART, B. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. 1st. Ed. John Wiley & Sons, p. 208, 2004.

SUNDARAM, J.; DURANCE, T. D.; WANG, R. Porous scaffold of gelatin–starch with nanohydroxyapatite composite processed via novel microwave vacuum drying. **Acta Biomaterialia**. v. 4, p. 932-942, 2008.

TASHIRO, K. Crystal Structure and Phase Transition of PVDF and Related Copolymers. In. NALWA, H.S. **Ferroelectric polymers: chemistry, physics and applications**. 1st Ed. Marcel Dekker, 1995.

TEIXEIRA, L. N.; CRIPPA, G. E.; GIMENES, R.; ZAGHETE, M. A.; OLIVEIRA, P. T.; ROSA, A. L.; BELOTI, M. M. Response of human alveolar bone-derived cells to a novel poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene)/barium titanate membrane. **Journal of Materials Science : Materials in Medicine.** v. 22, p. 151-158, 2011.

TIWARI, V. K.; KULRIYA, P. K.; AVASTHI, D. K.; MAITI, P. Radiation-Resistant Behavior of Poly(vinylidene fluoride)/Layered Silicate Nanocomposites. **ACS Applied Materials & Interface**, v. 1, n. 2, p. 311-318, 2009.

TOMASIK, P.; SCHILLING, C. H. Chemical modification of starch. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 59, p. 375-403, 2004.

TSUTSUMI, N.; UEYASUA, A.; SAKAI, W.; CHIANG, C. K. Crystalline structures and ferroelectric properties of ultrathin films of vinylidene fluoride and trifluoroethylene copolymer. **Thin Solid Films.** v. 483, p.340-345, 2005.

TUZLAKOGLU, K.; PASHKULEVA, I.; RODRIGUES, M. T.; GOMES, M. E.; VAN LENTHE, G. H.; MÜLLER R.; REIS, R. L. A new route to produce starch-based fiber mesh scaffolds by wet spinning and subsequent surface modification as a way to improve cell attachment and proliferation. **Journal of Biomedical Materials Research Part A.** n.1, p. 369-377, 2009.

UEBERSCHLAG, P. PVDF piezoelectric polymer. **Sensor Review**, v. 21, n 2, p. 118-125, 2001.

VOLPON, J. B.; CECIM, P. E. S.; MIYASE, C I.; GAVA, N F. O alendronato de sódio na prevenção da osteopenia secundária à imobilização gessada, em ratas: avaliação histomorfométrica. **Rev. bras. ortop.**, São Paulo, v. 43, n. 10, p. 442-451, 2008.

XIAO, C. M.; LU, D. R.; XU S. J. Starch-based completely biodegradable polymer materials. **eXPRESS Polymer Letters.** v. 3, n. 6, p. 366-375, 2009.

YU, L.; CHEN, L. Polymeric Materials from Renewable Resources. In: YU, L. **Biodegradable Polymer Blends and Composites from Renewable Resouces**. 1st. Ed. John Wiley & Sons, 2009. p. 4-7.

YOUNGA, T. H.; CHANG, H. H.; LIN, D. J., CHENG, L. P. Surface modification of microporous PVDF membranes for neuron culture. **Journal of Membrane Science**. v. 350, p. 32-41, 2010.

YU, N. Y. C.; SCHINDELER, A.; LITTLE, D. G.; RUYS, J. Review Biodegradable Poly(a-hydroxy acid) Polymer Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**. v. 93B, n. 1, p. 285-295, 2010.

YANG, Y.; WU, G.; RAMALINGAM, S.; HSU, S. L.; KLEINER, L.; TANG, F. W. Spectroscopic Analysis of Amorphous Structure in Fluorinated Polymers. **Macromolecules**. v. 40, p. 9658-9663, 2007.

YAMASHITA J.; LI, X.; FURMAN, B. R.; RAWLS, H. R.; WANG, X.; AGRAWAL, C. M. Collagen and bone viscoelasticity: a dynamic mechanical analysis. **Jounarl of Biomedical Material Research – Part A.** v.63, n.1, p. 31-36, 2002.

WEBER, N.; LEE, Y. S.; SHANMUGASSUNDARAM, S.; JAFFE, M.; ARINZEH, T. L. Characterization and in vitro cytocompatibility of piezoelectric electrospun scaffolds. **Acta Biomaterialia.** v. 6, p.3550-3556, 2010.

WUNDERLICH, B. **Thermal Analysis of Polymeric Materials**. 1st Ed. Springer Science Business Media, Inc. 2005. p. 412.

ZIRKL, M.; STADLOBER, B.; LEISING, G. Synthesis of Ferroelectric Poly(Vinylidene Fluoride) Copolymer Films and their Application in Integrated Full Organic Pyroelectric Sensors. **Ferroelectrics**, v. 353, p. 173-185, 2007.

ZHOU, S-A.; UESAKA, M. Bioelectrodynamics in living organisms. **International Journal of Engineering Science,** v. 44, n.1, p. 67–92, 2006.

ANEXO I

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Campus de Presidente Prudente FCT 52 ANOS

Presidente Prudente, 24 de novembro de 2011.

Ilmo.(a) Sr.(a)

João Domingos Augusto dos Santos Pereira.

Ref. Projeto intitulado: "Desenvolvimento de biomateriais a partir de blendas poliméricas a base de amido", sob orientação do (a) Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino.

Protocolo nº 05/2011

Recebemos os documentos contendo as alterações sugeridas pelo parecerista para integrarem o projeto acima, os quais foram analisados e estão de acordo com as solicitações.

Decorrente do exposto, o projeto foi **APROVADO**, *ad-referendum* da Comissão de Ética Ambiental.

Diante do cronograma do desenvolvimento da pesquisa, fica estabelecido o seguinte prazo: até a última terça-feira útil do mês de **Abril de 2012** para entrega de **um relatório final sucinto** à CEUA (vide modelo na página da FCT).

Informamos que eventuais emendas (proposta de modificação no projeto inicial) e extensões (proposta de prorrogação ou continuidade da pesquisa) devem ser apresentadas à CEUA de forma clara e sucinta em duas vias impressas, identificando a parte do protocolo a ser modificado e suas justificativas. Entretanto, se houver modificações importantes de objetivos e métodos deve ser apresentado outro protocolo de pesquisa.

Atenciosamente,

PROFA. DRA. REGINA COELI VASQUES DE MIRANDA
COORDENADORA DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Faculdade de Ciências e Tecnologia
Comissão de Ética no Uso de Animais
Rua Roberto Simonsen, 305 - CEP 19060-900 - Presidente Prudente - SP
Tel (18) 3229-5315 - fax (018) 3229-5488 ou (018) 3229-5303 - ceua@fct.unesp.br

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUAs
FCT-UNESP

Protocolo nº 05/2011

Título do Projeto de Pesquisa: **"Desenvolvimento de biomateriais a partir de blendas poliméricas a base de amido"**
Interessado : ***João Augusto dos Santos Pereira***

Análise do relator (com resumo do projeto):

Justificativa: *Este projeto envolverá o estudo das propriedades físicas e* químicas de materiais poliméricos, fundamentais para novas tecnologias, vislumbrando a aplicação destes, como materiais biocompatíveis, principalmente no que se refere à indução do crescimento do tecido ósseo.

Objetivos: *Os objetivos deste projeto são:*
- a otimização do processo de fabricação de blendas prensadas a partir do PVDF poli(fluoreto de vinilideno) e P(VDF-TrFE) poli(fluoreto de vinilideno cotrifluoretileno) com amido de milho para obtenção de matrizes porosas;
- a caracterização dessas blendas via espectroscopia vibracional, microscopia ótica e eletrônica de varredura, analise termodinâmica;
- o implante desses materiais em ratos, visando entender a ação do organismo vivo sobre esta prótese e a contribuição de cada material (matriz e aditivo) na indução do crescimento ósseo.

Metodologia: A aquisição e fabricação dos materiais são descritos de forma clara. As ferramentas utilizadas para o desenvolvimento do projeto estão bem referenciadas no texto. O trabalho experimental utilizará 09 ratos machos Wistar (*Rattus Novergicos*, variedade albina, *Rodentia, Mammalia)* mencionada a idade e a procedência dos mesmos. Ficarão alojados e tratados no Biotério do Laboratório de histologia da FCT/UNESP, com a devida permissão do Prof. responsável. O modelo experimental que envolve os animais esta definido de forma detalhada.

A manutenção da anestesia para o procedimento cirúrgico nos animais esta descrita corretamente embora sem citar uma literatura precedente que justifique seu volume . O implante do material será realizado pelo Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho, coordenador do laboratório de histologia da FCT-UNESP. Para a coleta do material esses animais serão eutanasiados de acordo com as condições propostas pelo Comitê de Ética Animal.

Parecer do relator: O projeto possui relevância cientifica, com utilidade *prática. Os objetivos são claros e importantes. O cronograma de execução está* de acordo com as exigências deste comitê. O protocolo para uso de animais e o modelo experimental se encontram detalhadamente redigidos.
Estão presentes e devidamente assinados: a folha de rosto, termo de compromisso dos pesquisadores, declaração de ausência de ônus financeiro *para a Faculdade de Ciências e Tecnologia – Campus de Presidente Prudente*, autorização para utilização do Laboratório Histologia do Departamento de Fisoterapia da FCT- UNESP- Campus de Presidente Prudente assinadas pelos responsáveis e os dados dos pesquisadores. Sendo assim, considero o projeto **APROVADO.**

[X] Aprovado (o projeto poderá ser iniciado não necessitando retornar á CEUAs para reavaliação).
[ ] Pendente (o pesquisador deve responder aos questionamentos da CEUAs no máximo 60 dias após a data de emissão deste parecer. O protocolo retornará à reunião da comissão).
[ ] Não aprovado.

ANEXO II

Atividade α-amilase

Definição: 1 unidade de atividade da α-amilase é definida como a quantidade em gramas de amido solúvel que é dextrinizado pela enzima em 1 hora à 40 ºC.

Solução de Enzima:

- Solubilizar 0,72 mg da enzima em 5,00 mL de água destilada.

Substrato: o substrato deve ser preparado toda vez que for usado.

- 2,00 g (b.s.) amido solúvel em aproximadamente 100,00 mL de água destilada.
- Transferir quantitativamente, sob agitação, para um béquer com 100,00 mL de água destilada fervendo.
- Ferver a solução por 3 min. e resfriá-la a temperatura ambiente.
- Adicionar 10,00 mL de tampão fosfato 0,05 M pH 6.
- Completar com água destilada para 250,00 mL.

Solução Estoque de Iodo:

- Solubilizar 1,10 g de cristais de iodo em 0,55 g de iodeto de potássio com água destilada.
- Completar o volume para 25,00 mL.

Solução de Iodo Diluída:

- Diluir 1 mL da solução estoque e 10,00 g de iodeto de potássio em 250,00 mL de água destilada.

Solução da Cor Padrão:

- Dissolver 1,25 g de cloreto de cobalto hexahidratado e 0,19 g de dicromato de potássio em 5,00 mL de ácido clorídrico 0,01 N.

Procedimento:

Aquecer 20,00 mL do substrato e 9,00 mL de água destilada, em banho termostatizado a 40,00 ± 0,05 °C por 10 min. Adicionar 1,00 mL da solução de enzima misturando bem. Anotar o tempo exato em que a enzima é adicionada e em intervalos de 1 minuto, remover 1,00 mL da amostra e adicionar 5,00 mL de solução de iodo diluída. Misturar por inversão e comparar com a cor padrão. À medida que a cor vai se aproximando da coloração padrão, pegar amostras mais frequentes preferencialmente a intervalos de 15 seg. O ponto final da reação é o tempo de digestão em que a cor é a mesma da cor padrão e a reação deve estar entre 7 e 20 min.