

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

JOÃO DOMINGOS AUGUSTO DOS SANTOS PEREIRA

DESENVOLVIMENTO DE BLENDA POLIMÉRICAS DE PLA/AMIDO E
PVDF/AMIDO PARA APLICAÇÕES COMO BIOMATERIAIS.

Presidente Prudente

2016

João Domingos Augusto dos Santos Pereira

**Desenvolvimento de blendas poliméricas de PLA/Amido e PVDF/Amido
para aplicações como biomateriais.**

Tese apresentada como requisito à obtenção do título de doutor à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino

Universidade Estadual Paulista – UNESP – Presidente Prudente – SP

Prof. Dr. Antonio José Félix de Carvalho

Universidade de São Paulo – USP – São Carlos – SP

Prof. Dr. Neri Alves

Universidade Estadual Paulista – UNESP – Presidente Prudente – SP

Prof. Dr. Hermann Bremer Neto

Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE – Presidente Prudente – SP

Prof^a. Dr^a. Rebeca Delatore Simões

Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE – Presidente Prudente – SP

Presidente Prudente, SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Pereira, João Domingos Augusto dos Santos.
Desenvolvimento de blendas poliméricas de
PLA/Amido e PVDF/Amido para aplicações como
biomateriais./

João Domingos Augusto dos Santos Pereira.

Presidente Prudente: [s.n], 2016

ix, 111 f. : il.

Orientador: Carlos José Leopoldo Constantino

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia
Inclui bibliografia

1. PLA. 2. Amido. 3. Sepiolita. I. Pereira, João
Domingos Augusto dos Santos. II. Constantino, Carlos
José Leopoldo. III. Universidade Estadual Paulista.
Faculdade de Ciências e Tecnologia. IV. Título.

ATA DA DEFESA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Bauru



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE JOÃO DOMINGOS AUGUSTO DOS SANTOS PEREIRA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS.

Aos 29 dias do mês de abril do ano de 2016, às 14:00 horas, no(a) Presidente Prudente, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. CARLOS JOSE LEOPOLDO CONSTANTINO - Orientador(a) do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências e Tecnologia - UNESP/Presidente Prudente, Prof. Dr. ANTONIO JOSÉ FÉLIX DE CARVALHO do(a) Departamento de Engenharia de Materiais / Universidade de São Paulo, Prof. Dr. NERI ALVES do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, Prof. Dr. HERMANN BREMER NETO do(a) Departamento de Biofísica / Faculdade de Ciências Agrárias - UNOESTE, Profª Drª REBECA DELATORE SIMÕES do(a) Universidade do Oeste Paulista / UNOESTE, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de JOÃO DOMINGOS AUGUSTO DOS SANTOS PEREIRA, intitulada **DESENVOLVIMENTO DE BLENDA POLIMÉRICAS DE PLA/AMIDO E PVDF/AMIDO PARA APLICAÇÕES COMO BIOMATERIAIS**. Após a exposição, o discente foi arguido 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.

Carlos Jose Leopoldo Constantino
Prof. Dr. CARLOS JOSE LEOPOLDO CONSTANTINO

Antonio José Félix de Carvalho
Prof. Dr. ANTONIO JOSÉ FÉLIX DE CARVALHO

Neri Alves
Prof. Dr. NERI ALVES

Hermann Bremer Neto
Prof. Dr. HERMANN BREMER NETO

Rebeca Delatore Simões
Profª Drª REBECA DELATORE SIMÕES

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao Criador, aos meus pais, ao meu filho,
aos amigos e amigas que me ajudaram
a percorrer esse caminho.*

AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho, pela coorientação e incentivo.

Ao Prof. Dr. Miguel Ángel Rodríguez Perez e Dr. Daniel Velasco Nieto pela atenção e ajuda neste trabalho.

Ao MV. Dr. Osimar de Carvalho Sanches, pela ajuda e sugestões.

Ao Pedro, Diogo, Priscila, Leonardo, Cibely, Diego e a todos do NOIX pela amizade.

A Profa. Dr. Regina Celi Trindade Camargo, Robson, Guilherme, Tati, Thiago, Allan e William do LAPMUS, pela ajuda e amizade.

Aos demais amigos do DF.

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

Agradeço também a CAPES, CNPq e FAPESP.

RESUMO

Espumas de PLA/Amido e PLA/Amido/Sepiolita (SEP) com distintas composições foram produzidas. As amostras foram caracterizadas pelas seguintes técnicas: i) microscopia eletrônica de varredura (MEV); ii) medidas de densidade (ρ); iii) calorimetria diferencial exploratória (DSC), iv) análise mecânica (flexão e tração); v) análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA); vi) testes *in vivo*. Nas imagens de MEV, tanto nos precursores quanto nas espumas, a interface entre as fases foi eminentemente física com duas fases distintas e houve ocorrência de lacunas entre elas, sendo que um aumento no tamanho das lacunas foi observado nas espumas. Observou-se que nas amostras com SEP ocorreu uma maior geração de células com menores dimensões e mais compactas. Isto demonstra que a SEP apresentou, assim como os grânulos de amido, o comportamento de agente de nucleação. Nas medidas de ρ os menores valores ocorreram com as amostras originárias do autoclave e do banho de glicerina, respectivamente. Essas diminuições foram consistentes com a expansão da matriz de PLA observada nas imagens de MEV. Nas medidas de DSC, em geral, a adição do amido ao PLA implicou no aumento da X_c . Tal efeito sucedeu-se devido a interface entre o amido e o PLA ser mais energética, o que facilitou a formação de cristais na matriz de PLA. Nos compósitos contendo SEP, em geral, maiores valores de X_c foram observados quando comparados com as blendas de PLA/amido nas mesmas proporções de materiais. Esse comportamento provavelmente está associado ao efeito da SEP como agente nucleante no PLA. Na análise mecânica, tanto no ensaio de flexão quanto no de tração, com o aumento do conteúdo de amido nas blendas menores foram a resistência e a deformação máxima, bem como a tensão e a deformação de ruptura. Adicionalmente, o mesmo comportamento de diminuição foi mantido para os compósitos com a SEP. No entanto, no ensaio de tração, essas amostras apresentaram medidas com valores maiores do que o das blendas. Nos resultados observados via DMTA, em geral, a adição do amido e da SEP diminuíram a rigidez da matriz PLA, ou seja, valores de E' menores nas blendas e nos compósitos do que nas amostras de PLA puro. No estudo *in vivo*, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCT/UNESP, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil (processo nº 02/2014), foram utilizados 18 ratos machos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*, variedade albina, *Rodentia*, *Mammalia*) com idade de 120 dias, obtidos junto à Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE). Os animais foram submetidos a processo cirúrgico para a implantação das amostras e após 40 semanas, contadas a partir da data da cirurgia de implantação, as amostras foram removidas. Para a análise da morfologia estrutural das amostras e tecidos removidos, medidas de MEV e microscopia ótica (MO) foram realizadas, respectivamente. Observou-se pela técnica de MEV que as superfícies das amostras pós-implante apresentaram um padrão de recobrimento por tecido biológico com morfologia capsular. Nas fotomicrografias obtidas pela MO estruturas como fibras musculares, tecido adiposo (TA) e conjuntivo denso (TCD) foram observados. Além disso, em algumas fotomicrografias foram observados poucos pontos focais de infiltrado inflamatório. Próximo ao tecido muscular foi observada a presença de TA permeado de TCD, caracterizando como um tecido capsular.

ABSTRACT

Foams of PLA/Starch and PLA/Starch/Sepiolite (SEP) with different compositions were produced. The following techniques were used in the samples characterization: i) scanning electron microscopy (SEM); ii) density (ρ) measures; iii) differential scanning calorimetry (DSC), iv) mechanical analysis (flexion and traction); v) dynamic mechanical thermal analysis (DMTA); vi) *in vivo* test. In the SEM images, in both foams and precursors, the interface between the phases was eminently physic with two distinct phases with gaps between them, and an increase in size of the gaps was observed in the foam. It was observed that in the samples with SEP occurred greater generation of smaller cell and more compact. This demonstrates that SEP presented, as well as the starch granules, the nucleating agent behavior. In ρ measures the lowest values were found in samples originating from the autoclave and glycerine bath, respectively. These decreases were consistent with the expansion of PLA matrix observed in the SEM images. In the DSC measurements in general, the starch addition to PLA resulted in increased X_c . This effect happened because the interface between starch and PLA be more energetic, which facilitated the crystals formation in the PLA matrix. In composites containing SEP, generally larger X_c values were observed when compared with the PLA/starch blends in the same proportions materials. This behavior is probably related to the effect of the SEP as a nucleating agent in the PLA. In the mechanical analysis, flexion and traction, with increasing starch content in the blends lower resistance and maximum deformation as the tension and rupture deformation were obtained. Additionally, the same decrease in performance was maintained for composites SEP. However, in the tensile test, these samples showed values greater than the blends. In the results observed via DMTA, in general, the addition of starch and SEP resulted in a stiffness decrease of PLA matrix, that is, E' lower values for blends and composites when compared with pure PLA samples. In the *in vivo* study, approved by the Ethics Committee on Animal Use the FCT/UNESP, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil (process No. 02/2014), 18 rats Wistar (*Rattus norvegicus*, albino variety, *Rodentia*, *Mammalia*) were used with age of 120 days, obtained from the Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE). The animals underwent surgical procedure for samples implantation, after 40 weeks counted from the implantation surgery date, the samples were removed. For structural analysis of removed samples and tissues SEM morphology measurements and optical microscopy (OM) were performed respectively. It was observed by SEM technique that the surfaces of post-implant samples showed a pattern coating by biological tissue with capsular morphology. In the photomicrographs obtained by OM, structures such as muscle fibers; adipose tissue (AT) and dense connective (TDC) were observed. Furthermore, in photomicrographs were observed in some few focal inflammatory infiltrate. Next to the muscle tissue was observed the presence of AT permeated by the TDC, featuring as capsular tissue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Polimerização do PLA.....	9
Figura 2 – Estrutura da amilose (a) e da amilopectina (b)	12
Figura 3 – Estrutura cristalina (a) e célula unitária (b) da SEP.....	14
Figura 4 – Esquema ilustrativo das etapas de processamento dos materiais e amostras.....	18
Figura 5 – Amostras de PLA espumadas por banho de glicerina e por forno de ar forçado.....	22
Figura 6 – Procedimento cirúrgico de implantação da amostra, em destaque a região na qual foi realizada a tricotomia isolada por campos estéreis (a); incisão dos tecidos epitelial e muscular (b-c); alargamento do espaço intramuscular (d); implantação das amostras nos animais (e); suturas realizadas após a cirurgia no plano muscular (f) e plano da pele (g) e limpeza com solução de álcool iodado a 2 % (h).....	27
Figura 7 – Amostra removida da pata traseira dos animais após o período de 40 semanas.....	28
Figura 8 – Imagens de MEV (região interna) de amostras de PLA: injetadas, imagens (a-c) e em autoclave, imagens (d-f). Aumentos: de 20X nas imagens (a) e (d); de 200X nas imagens (b) e (e) e; de 1000X nas imagens (c) e (f).....	31
Figura 9 – Imagens de MEV (região interna) de amostras PLA: em forno, imagens (a-c) e espumadas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos: de 25X e 75X nas imagens (a-b); de 20X e 200X nas imagens (d-e) e; de 1000X nas imagens (c) e (f). Legenda: CF = célula fechada e CA = célula aberta.....	31
Figura 10 – Imagens de MEV (região interna) de amostras injetadas de P10A, imagens (a-c); P20A, imagens (d-f) e P30A, imagens (g-i). Aumentos: de 20X nas imagens (a), (d) e (g); de 200X nas imagens (b), (e) e (h) e; de 1000X nas imagens (c), (f) e (i). Legenda: GA = grânulo de amido.....	33

Figura 11 – Imagens de MEV (região interna) de amostras de P10A, imagens (a-c), P20A, imagens (d-f) e P30A, imagens (g-i). Aumentos de 1000X. Amostras: injetadas, imagens (a), (d) e (g); espumadas em forno, imagens (b), (e) e (h) e; espumadas em banho de glicerina, imagens (c), (f) e (i). Legenda: CF = célula fechada, CA = célula aberta e GA = grânulo de amido.....34

Figura 12 – Imagens de MEV (região interna) de amostras de P10AS, imagens (a-c) e P20AS, imagens (d-f). Aumentos de 1000X. Amostras: em autoclave, imagens (a) e (d); espumadas em forno, imagens (b) e (e) e; espumadas em banho de glicerina, imagens (c) e (f). Legenda: CF = célula fechada, CA = célula aberta e GA = grânulo de amido.....35

Figura 13 – Densidades das amostras PLA, P(10-30)A e P(10-30)AS após extrusão (a) e injeção (b).....36

Figura 14 – Densidade das amostras PLA, P(10-30)A e P(10-30)AS após a permanência no autoclave (a), em forno de ar forçado (b) e em banho de glicerina (c).....37

Figura 15 – Curvas de DSC para a amostra de PLA em distintas etapas do processo. X_c = cristalinidade [%] de cada amostra.....42

Figura 16 – Curvas de DSC para a amostra de P10A em distintas etapas do processo. X_c = cristalinidade [%] de cada amostra.....42

Figura 17 – Curvas de DSC para a amostra de P20A em distintas etapas do processo. X_c = cristalinidade [%] de cada amostra.....43

Figura 18 – Curvas de DSC para a amostra de P30A em distintas etapas do processo. X_c = cristalinidade [%] de cada amostra.....43

Figura 19 – Curvas de DSC para a amostra de P10AS em distintas etapas do processo. X_c = cristalinidade [%] de cada amostra.....44

Figura 20 – Curvas de DSC para a amostra de P20AS em distintas etapas do processo. X_c = cristalinidade [%] de cada amostra.....44

Figura 21 – Curvas de DSC para a amostra de P30AS em distintas etapas do processo. X_c = cristalinidade [%] de cada amostra.....	45
Figura 22 – Curvas de tensão de flexão vs. deformação para distintas composições das amostras.....	51
Figura 23 – Curvas de esforço de tração vs. deformação para distintas composições das amostras.....	52
Figura 24 – Resistência e deformação máximas das amostras no ensaio de flexão. Amostras de PLA/amido (a) e PLA/amido/SEP (b).....	54
Figura 25 – Tensão e deformação de ruptura das amostras no ensaio de flexão. Amostras de PLA/amido (a) e PLA/amido/SEP (b).....	55
Figura 26 – Módulo de elasticidade das amostras no ensaio de flexão. Amostras de PLA/amido (a) e PLA/amido/SEP (b)	57
Figura 27 – Resistência e deformação máximas das amostras no ensaio de tração. Amostras de PLA/amido (a) e PLA/amido/SEP (b)	59
Figura 28 – Tensão e deformação de ruptura das amostras no ensaio de tração. Amostras de PLA/amido (a) e PLA/amido/SEP (b)	60
Figura 29 – Módulo de elasticidade das amostras no ensaio de tração. Amostras de PLA/amido (a) e PLA/amido/SEP (b).....	62
Figura 30 – Curvas de DMTA, módulos E' (a) e E'' (b) das amostras PLA, P(10-30)A e P(10-20)AS injetadas.....	65
Figura 31 – Curvas de DMTA, $\tan \delta$ das amostras PLA, P(10-30)A e P(10-20)AS injetadas.....	66

Figura 32 – Curvas de DMTA, módulos de E' (a) e E'' (b) das amostras P(10-30)A e P(10-20)AS em autoclave.....	68
Figura 33 – Curvas de DMTA, $\tan \delta$ das amostras P(10-30)A e P(10-20)AS em autoclave.....	69
Figura 34 – Imagens de MEV de amostras pré-implante (região externa) de PLA expandidas em forno, imagens (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 100X imagens (a, d), de 500X imagens (b, e) e de 1000X imagens (c, f).....	71
Figura 35 – Imagens de MEV de amostras pré-implante (região externa) de P10A expandidas em forno, imagens (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 100X imagens (a, d), de 500X imagens (b, e) e de 1000X imagens (c, f).....	72
Figura 36 – Imagens de MEV de amostras pré-implante (região externa) de P10AS expandidas em forno, imagens (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 100X imagens (a, d), de 500X imagens (b, e) e de 1000X imagens (c, f).....	72
Figura 37 – Imagens de MEV de amostras pré-implante (região interna) de PLA expandidas em forno, imagens (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 100X imagens (a, d), de 500X imagens (b, e) e de 1000X imagens (c, f).....	73
Figura 38 – Imagens de MEV de amostras pré-implante (região interna) de P10A expandidas em forno, imagens (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 100X imagens (a, d), de 500X imagens (b, e) e de 1000X imagens (c, f).....	73
Figura 39 – Imagens de MEV de amostras pré-implante (região interna) de P10AS expandidas em forno, imagens (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 100X imagens (a, d), de 500X imagens (b, e) e de 1000X imagens (c, f).....	74
Figura 40 – Imagens de MEV de amostras pós-implante (região externa) de PLA expandidas em forno, imagens (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 100X imagens (a, d), de 1000X imagens (b, e) e de 2000X imagens (c, f).....	75

Figura 41 – Imagens de MEV de amostras pós-implante (região externa) de P10A expandidas em forno, imagens de (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 100X imagens (a, d), de 1000X imagens (b, e) e de 2000X imagens (c, f).....75

Figura 42 – Imagens de MEV de amostras pós-implante (região externa) de P10AS expandidas em forno, imagens (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 100X imagens (a, d), de 1000X imagens (b, e) e de 2000X imagens (c, f).....76

Figura 43 – Imagens de MEV de amostras pós-implante (região interna) de PLA expandidas em forno, imagens (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 100X imagens (a, d), de 1000X imagens (b, e) e de 1000X imagens (c, f).....77

Figura 44 – Imagens de MEV de amostras pós-implante (região interna) de P10A expandidas em forno, imagens de (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 100X imagens (a, d), de 1000X imagens (b, e) e de 1000X imagens (c, f).....77

Figura 45 – Imagens de MEV de amostras pós-implante (região interna) de P10AS expandidas em forno, imagens (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 100X imagens (a, d), de 1000X imagens (b, e) e de 1000X imagens (c, f).....78

Figura 46 – Fotomicrografias de tecido muscular e regiões adjacentes de animais com implantes de amostras PLA processadas em forno. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE). Aumentos de 4X imagem (a) e 10X imagens (b-d). Legenda: FM = fibras musculares; TCD = tecido conjuntivo denso; TA = tecido adiposo; FAH = fibra musculares arredondas hipertróficas.....79

Figura 47 – Fotomicrografias de tecido muscular e regiões adjacentes de animais com implantes de amostras PLA processadas em banho de glicerina. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE). Aumentos de 4X imagem (a) e 10X imagens (b-d). Legenda: FM = fibras musculares; TCD = tecido conjuntivo denso; TA = tecido adiposo; FAH = fibras musculares arredondas hipertróficas.....80

Figura 48 – Fotomicrografias de tecido muscular e regiões adjacentes de animais com implantes de amostras P10A processadas em forno. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE). Aumentos de 4X imagem (a) e 10X imagens (b-d). Legenda: FM = fibras musculares; TCD = tecido

conjuntivo denso; TA = tecido adiposo; FAH = fibras musculares arredondas hipertróficas.....81

Figura 49 – Fotomicrografias de tecido muscular e regiões adjacentes de animais com implantes de amostras P10A processadas em banho de glicerina. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE). Aumentos de 4X imagem (a) e 10X imagens (b-d). Legenda: FM = fibras musculares; TCD = tecido conjuntivo denso; TA = tecido adiposo; FAH = fibras musculares arredondas hipertróficas.....82

Figura 50 – Fotomicrografias de tecido muscular e regiões adjacentes de animais com implantes de amostras de P10AS processadas em forno. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE). Aumentos de 4X imagem (a) e 10X imagens (b-d). Legenda: FM = fibras musculares; TCD = tecido conjuntivo denso; TA = tecido adiposo; FAH = fibras musculares arredondas hipertróficas.....83

Figura 51 – Fotomicrografias de tecido muscular e regiões adjacentes de animais com implantes de amostras de P10AS processadas em banho de glicerina. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE). Aumentos de 4X imagem (a) e 10X imagens (b-d). Legenda: FM = fibras musculares; TCD = tecido conjuntivo denso; TA = tecido adiposo; FAH = fibras musculares arredondas hipertróficas.....84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Material e composição das amostras.....	17
Tabela 2 – Perfil de temperatura de injeção para as amostras de PLA, P(10-30)A e P(10-30)AS de 2,0 e 4,0 mm.....	19
Tabela 3 – Parâmetros de carro de injeção para as amostras de PLA, P(10-30)A e P(10-30)AS de 2,0 e 4,0 mm.....	20
Tabela 4 – Tempo e medidas de expulsão de injeção para as amostras de PLA, P(10-30)A e P(10-30)AS de 2,0 e 4,0 mm.....	20
Tabela 5 – Tempo e medidas de injeção para as amostras de PLA, P(10-30)A e P(10-30)AS de 2,0 e 4,0 mm.....	20
Tabela 6 – Tempo e medidas de fechamento de injeção para as amostras de PLA, P(10-30)A e P(10-30)AS de 2,0 e 4,0 mm.....	21
Tabela 7 – Distribuição, descrição e quantidade de animais no estudo <i>in vivo</i>	25
Tabela 8 – Diferença percentual da ρ das amostras em distintas etapas de processamento.....	36
Tabela 9 – T_g [°C] das amostras em distintas etapas de processamento.....	41
Tabela 10 – T_m [°C] das amostras em distintas etapas de processamento.....	41
Tabela 11 – X_c [%] das amostras em distintas etapas de processamento.....	46
Tabela 12 – Fatores de correção da X_c das amostras.....	46
Tabela 13 – Resistência e deformação máximas obtidas no ensaio de flexão.....	53

Tabela 14 – Tensão e deformação de ruptura obtidas no ensaio de flexão.....	53
Tabela 15 – Módulo de elasticidade obtido no ensaio de flexão.....	53
Tabela 16 – Resistência e deformação máximas obtidas no ensaio de tração.....	58
Tabela 17 – Tensão e deformação de ruptura obtidas no ensaio de tração.....	58
Tabela 18 – Módulo de elasticidade obtido no ensaio de tração.....	58
Tabela 19 – T_g e $\tan \delta$ obtidas pela técnica de DMTA das amostras injetadas.....	67
Tabela 20 – T_g e $\tan \delta$ obtidas pela DMTA das amostras em autoclave.....	70

SIGLAS

PLA =	Ácido poli(láctico)
SEP =	Sepiolita
MNT =	Montmorilonita
TPS =	Amido termoplástico
ETO =	Engenharia tecidual óssea
PE =	Polietileno
PP =	Polipropileno
PS =	Poliestireno
PET =	Polietileno tereftalato
PVC =	Cloreto de polivinil
PHA =	Polihidroxialcanoatos
PHB =	Polihidroxibutirato
PHV =	Polihidroxila-valerato
ROP =	Polimerização por abertura de anel
PLLA =	Ácido poli(L-láctico)
PMMA =	Polimetilmetacrilato
MEV =	Microscopia eletrônica de varredura
DSC =	Calorimetria diferencial exploratória
DMTA =	Análise térmica dinâmico-mecânica
MO =	Microscopia ótica

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	4
CAPITULO I: INTRODUÇÃO.....	5
1.1 Osso e sua reparação.....	5
1.2 Engenharia tecidual óssea (ETO) e <i>scaffold</i>	6
1.3 Polímeros.....	8
1.3.1 Ácido poli(láctico) (PLA).....	8
1.3.2 Amido.....	10
1.4 Mineral argiloso – Sepiolita (SEP)	13
CAPÍTULO II: PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	17
2.1 Materiais.....	17
2.2 Produção das amostras.....	18
2.2.1 Extrusão.....	18
2.2.2 Injeção.....	19
2.2.3 Adsorção de CO ₂ em autoclave.....	21
2.2.4 Espumação.....	21
2.3 Técnicas de caracterização.....	23
2.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	23
2.3.2 Calorimetria diferencial exploratória (DSC).....	23
2.3.3 Análise mecânica.....	23
2.3.4 Análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA).....	24
2.3.5 Medidas de densidade.....	24
2.4 Estudo <i>in vivo</i>.....	25
2.4.1 Animais de experimentação.....	25
2.4.2 Modelo experimental.....	25
2.4.3 Esterilização por óxido de etileno (EtO).....	25
2.4.4 Procedimentos cirúrgicos.....	26
2.4.5 Coleta do material.....	27
2.4.6. Descrição da técnica para corte histológico.....	28
2.4.7 Microscopia ótica (MO).....	29
CAPÍTULO III: CARACTERIZAÇÃO.....	30
3.1 Microscopia eletrônica de varredura.....	30

3.2 Medidas de densidade.....	36
3.3 Calorimetria diferencial exploratória.....	40
3.4 Análise mecânica.....	51
3.5 Análise térmica dinâmico-mecânica.....	64
CAPÍTULO IV: ESTUDO IN VIVO.....	71
4.1 Microscopia eletrônica de varredura.....	71
4.2 Microscopia ótica.....	79
CAPÍTULO V: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	86
REFERÊNCIAS.....	89
ANEXOS.....	104

APRESENTAÇÃO

Em nosso grupo de pesquisa, Novos Materiais e Aplicações, no Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT) de Presidente Prudente, algumas dissertações e teses têm sido dedicadas ao estudo de materiais biocompatíveis e nos últimos anos têm sido geradas publicações associadas ao tema. Em 2005 foi reportada a caracterização estrutural de filmes de borracha natural com polifluoreto de vinilideno (PVDF) fabricados por termoconformação.¹ Observou-se que os materiais não interagem quimicamente, prevalecendo as interações físicas. Em outro artigo de 2009, blendas de PVDF, e de seu copolímero com o trifluoretileno P(VDF-TrFE), com amido de milho e borracha natural na forma de filme foram caracterizadas estruturalmente. Nesse trabalho também foi observada a interação física entre os materiais, contudo o amido teve uma maior adesão ao P(VDF-TrFE). Além disso, as estruturas cristalinas das fases α do PVDF e ferroelétrica do P(VDF-TrFE) foram mantidas na blenda.² Recentemente, em 2013, a citotoxicidade (*in vivo*), a reação tecidual de blendas compostas de PVDF, P(VDF-TrFE), amido de milho e borracha natural implantadas em tecidos moles de ratos foram avaliadas. Nesse trabalho, análises por espectroscopia vibracional revelaram que não ocorreram alterações na estrutura química dos materiais das blendas implantadas durante 60 e 100 dias. Os testes de citotoxicidade demonstraram boa tolerância das células ao material. Os testes *in vivo* indicaram uma resposta tecidual inflamatória normal.³ Nessa linha de pesquisa, destaca-se o mestrado do aluno João Domingos, cuja defesa ocorreu em março de 2012. O trabalho desenvolvido pelo aluno abordou, principalmente, a caracterização estrutural do PVDF e do copolímero P(VDF-TrFE), ambos formando blendas com amido de milho, e a possibilidade de aplicação destas blendas como biomaterial. Mostrou-se que a adição do amido ao PVDF e P(VDF-TrFE) permite variar as propriedades mecânicas da blenda, gerar poros quando implantados em organismos vivos e que tais poros servem de sítios para o crescimento de tecidos. Os valores de módulo de armazenamento (E') obtidos são próximos ao do osso trabecular humano e o processamento dos materiais, pela técnica de prensagem a quente, não altera as propriedades físicas e químicas dos constituintes das blendas. Foi constatada também a ausência de interação química entre os polímeros e o amido, o que é positivo, pois favorece a absorção do amido pelo organismo, gerando os poros na matriz polimérica.⁴

Desse modo, houve o interesse em continuar nesta linha de pesquisa, complementando os estudos de blendas de amido com outros polímeros, tais como ácido poli(láctico) (PLA),

dando origem a este projeto de doutorado desenvolvido pelo aluno João Domingos. O projeto de doutorado teve como objetivo principal o desenvolvimento de blendas e compósitos a base de PLA, amido e Sepiolita (SEP) visando a aplicação como biomaterial, além da caracterização estrutural destas blendas e compósitos. O enantiômero L do PLA (PLLA) foi escolhido para compor a blenda com amido por ser originado de fontes renováveis, é degradável por hidrólise simples da ligação éster, não requerendo a presença de enzimas catalisadoras, e absorvível pelo organismo em períodos superiores a 2 anos.⁵ O PLLA tem boa resistência à tração e elevado módulo de Young (4,8 GPa), sendo utilizado na área de biomateriais em aplicações de suporte de carga, tais como dispositivos de fixação ortopédica.^{5,6}

O amido foi escolhido como aditivo ao PLA por também ser originado de fontes renováveis. Além disso, o amido permite ajustar as propriedades mecânicas da blenda pela variação da quantidade de amido adicionada. Favorece a criação de poros por meio de sua degradação (bioabsorvível⁷ e biodegradável⁸) e, durante o processo de espumação, com adsorção prévia de CO₂, serve como centro de nucleação. Outra característica importante atribuída ao amido é de ser um material biocompatível.⁹

A utilização da SEP aplicada como aditivo em polímeros e elastômeros melhora o processamento, a estabilidade dimensional, a resistência mecânica e a resistência térmica.¹⁰ A adição da SEP altera a anisotropia e aumenta a porosidade da blenda. Adicionalmente, existem interações interfaciais fortes formando pontes de hidrogênio entre os grupos silanol na superfície da SEP com as hidroxilas nos polímeros. Tais interações foram verificadas pelas melhorias significativas na resistência à tração, oriundas de uma distribuição uniforme das nanofibras de SEP. O módulo de Young e a energia na ruptura também podem aumentar simultaneamente. No entanto, as propriedades mecânicas de espumas feitas de polímeros e SEP podem deteriorar-se com adições de SEP, devido à maior porosidade, ao tamanho dos poros dos nanocompósitos e ao grau de anisotropia.¹¹

Como parte da formação e execução do doutorado foi realizado um estágio, no formato de doutorado sanduíche, via projeto bilateral CAPES/DGU n° 260/12. O propósito do estágio foi permitir a atuação interdisciplinar envolvendo diferentes pesquisadores da FCT/UNESP, sendo realizado na *Universidad de Valladolid* (UVA), Espanha, com pesquisadores do grupo do Professor Miguel Ángel Rodríguez Pérez. O grupo espanhol dispõe de equipamentos complementares aos existentes na FCT/UNESP, além de muita *expertise* na área de materiais poliméricos, propiciando uma alternativa ao processamento e fabricação das blendas poliméricas e a caracterização da microestrutura destas blendas de forma sistemática.

Considerando-se os temas abordados nesse doutorado, essa tese divide-se da seguinte forma: o capítulo I traz uma introdução sobre implantes, PLA, amido e SEP e suas respectivas aplicações como biomateriais. O capítulo II traz o procedimento experimental realizado no trabalho de fabricação das amostras de PLA/amido e de PLA/amido/SEP em diferentes proporções e informações relativas aos equipamentos e parâmetros utilizados na caracterização das amostras. Nesse capítulo também se encontram os procedimentos realizados no estudo *in vivo*. O capítulo III apresenta os resultados da caracterização das amostras: MEV, DSC, ensaios de tração e flexão. O capítulo IV apresenta os resultados das medidas de MEV das amostras de PLA, PLA/amido e PLA/amido/SEP pré e pós implantes. Também nesse capítulo encontram-se as imagens obtidas pela técnica de microscopia ótica (MO) do tecido muscular dos animais. Por fim, encontram-se no capítulo V as conclusões e perspectivas futuras do doutorado.

OBJETIVOS

Este projeto de doutorado teve como objetivo principal o desenvolvimento de compósitos a base de amido visando à aplicação como biomaterial. Inicialmente os polímeros PLA e PVDF foram escolhidos para compor as respectivas blendas com amido por suas propriedades distintas relativas à origem. Ambos são sintéticos, porém o PVDF é originado de fontes não renováveis e não é absorvível pelo organismo; o PLA é originado de fontes renováveis (monômeros bioderivados) e absorvível pelo organismo.

Porém, ao invés da utilização do PVDF, optou-se pela adição da SEP às blendas de PLA/amido formando compósitos, na expectativa de gerar poros com tamanhos distintos, em maior quantidade e interconectados. Essa última característica é importante no processo de crescimento ósseo, permitindo a penetração do tecido na matriz polimérica (*scaffold*). A sugestão do uso da SEP foi dada pelo Professor Miguel Ángel Rodríguez Pérez, *Universidad de Valladolid* (UVa), Espanha.

Para atingir tais objetivos, as etapas desenvolvidas foram as seguintes: i) otimização da fabricação (extrusão → injeção → dissolução CO₂ → espumação) de blendas de PLA/amido e PLA/amido/SEP (SEP) (matriz/aditivo); ii) caracterização das blendas de PLA/amido e PLA/amido/SEP pelas técnicas de FTIR; análises térmicas (DMTA, DSC e, TGA); microscopias (ótica e MEV); medidas de porosidade e de esforço (tração e flexão) em função do tempo; iii) implante dos materiais em ratos objetivando entender à ação do organismo vivo sobre as amostras e a contribuição de cada material (matriz e aditivo) na indução do crescimento ósseo. Os itens (i) e (ii) foram desenvolvidos na Espanha entre setembro/2012 e agosto/2013. O item (iii) foi desenvolvido no Brasil (a partir de setembro/2013).

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1.1 Osso e sua reparação

O osso é um tecido vivo que continuamente renova sua estrutura. A capacidade de regeneração óssea espontânea permite que a maioria das lesões, tais como fraturas, seja reparada com a terapia convencional. Porém, no caso de grandes defeitos e deformidades congênitas, enxertos ou substituto ósseos são necessários para ajudar na reparação.¹² Da mesma forma, no caso de uma descontinuidade da superfície articular do osso ou de defeitos osteocondrais muito extensos, uma prótese artificial é necessária.¹³ Os tratamentos cirúrgicos de defeitos ósseos grandes incluem o método de *Ilizarov* (transporte ósseo) e transplante de enxerto ósseo. A osteotomia, seguida por distração óssea (técnica de *Ilizarov*) aproveita o potencial de regeneração do osso.¹⁴ Embora problemas relacionados com a integração do enxerto possam ser minimizados, o procedimento é altamente inconveniente para o paciente, que exige um período de recuperação longo, com uma alta taxa de complicação.^{15,16}

A implantação de enxerto emprega fontes autógenas, alogênicas e exógenas de diferentes biomateriais. A auto enxertia compreende a coleta do tecido ósseo de uma área do corpo do paciente (como a crista ilíaca no quadril) e sua transplantação no local de defeito. Esse procedimento cirúrgico é limitado pelo suprimento de osso doador, morbidade do sítio doador e dor, complicações anatômicas e estruturais e reabsorção do enxerto.¹⁷ Por causa dessas complicações, o transplante alogênico (entre indivíduos geneticamente independentes) pode ser usado como alternativa. Enquanto a transformação química e física dos tecidos minimiza as complicações relacionadas a respostas imunes, os enxertos alogênico apresentam, em geral, pobres propriedades mecânicas, difícil reabsorção do enxerto, reduzida capacidade osteogênica e o risco de transmissão da doença.¹⁸ A substituição por osso sintético, feitos principalmente de metal ou cerâmica de fosfato de cálcio e vidros, possuem propriedades osteocondutora, mas não osteoindutora, limitando assim a reparação de defeitos.^{19,20} Além disso, eles não remodelam com o tempo, ou seja, não crescem com o paciente e não alteram a forma em resposta às cargas colocadas sobre o implante.²¹

1.2 Engenharia tecidual óssea (ETO) e *scaffold*

A ETO é um processo complexo e dinâmico que inicia com a migração e o recrutamento de células osteoprogenitoras, seguida por sua proliferação, diferenciação e a formação de matriz, juntamente com a remodelação óssea. Grandes avanços na ETO como uso de *scaffolds* foram obtidos pela utilização de fatores de crescimento, fármacos e entregas de gene. *Scaffolds* ósseos são normalmente feitos de materiais porosos degradáveis que fornecem o suporte mecânico durante a reparação e regeneração do osso danificado ou doente.²² Durante a reparação ocorrem processos, tais como a migração e a proliferação de osteoblastos e de células mesenquimais, bem como o transporte de nutrientes e oxigênio necessários para vascularização durante o desenvolvimento do tecido ósseo.²³⁻²⁵

Scaffolds para a ETO podem ser feitos de vários materiais.²⁶ Os biomateriais cerâmicos tais como a hidroxiapatita e o β -tricálcio fosfato²⁷ são conhecidos por sua biocompatibilidade e bioatividade, mas elas são muito frágeis para aplicações em que suficiente resistência mecânica e resistência à fratura são necessárias.^{24,26,28} Os biomateriais poliméricos são biocompatíveis e biodegradáveis, mas a maioria deles possui pobres propriedades mecânicas.²⁶ O sistema biomecânico ósseo é complexo, o que requer que um *scaffold* ideal apresente os seguintes requisitos: i) biocompatibilidade; ii) boas propriedades mecânicas; iii) poros de dimensões adequadas e iv) bioabsorção.²⁹

A biocompatibilidade de um *scaffold* é descrita como sua capacidade de suportar a atividade celular normal, incluindo sistemas de sinalização molecular sem quaisquer efeitos tóxicos locais e sistemáticos para o tecido do hospedeiro.³⁰ Um *scaffold* para o osso deve ser osteocondutor, permitindo a adesão de células ósseas, a proliferação e a formação de matriz extracelular em sua superfície e poros. O *scaffold* deve também ser capaz de induzir a formação de osso novo através de sinalização biomolecular e do recrutamento de células progenitoras, uma propriedade conhecida como osteoindução. Além disso, necessita formar vasos sanguíneos dentro ou ao redor do implante, num prazo de algumas semanas de implantação, para suportar ativamente nutrientes, oxigênio e resíduos de transporte.³¹

As propriedades mecânicas de *scaffolds* para ossos devem ser compatíveis com as propriedades do osso hospedeiro e com uma transferência de carga adequada. As propriedades mecânicas variam amplamente entre as regiões esponjosa e cortical. O módulo de Young da região cortical varia de 15 a 20 GPa e da região esponjosa entre 0,1 e 2 GPa. A resistência à compressão varia entre 100 e 200 MPa para região cortical e entre 2 e 20 MPa para a região

esponjosa. A grande variação na propriedade mecânica e na geometria óssea torna difícil projetar um *scaffold* ósseo ideal.³¹

Para que os poros de um *scaffold* sejam interligados é necessário que o tamanho dos poros sejam de pelo menos 100 μm de diâmetro para que ocorra a difusão de nutrientes essenciais e de oxigênio.³² No entanto, o tamanho dos poros necessários para o crescimento ótimo do tecido ósseo deve variar de 200 a 350 μm .²⁵ Além disso, estudos recentes indicaram que *scaffolds* porosos com porosidade escalar múltipla, ou seja, poros de dimensões macro e micro, podem alcançar melhores resultados do que *scaffolds* apenas com poros de dimensões macro.³³ Infelizmente, a porosidade reduz as propriedades mecânicas, tais como a resistência à compressão, e aumenta a complexidade para fabricação do *scaffold*. Pesquisadores têm investigado *scaffolds* porosos poliméricos, cerâmicos, de compósitos e metálicos. Biocerâmicas fortes e densas apresentam propriedades mecânicas próximas ao do osso cortical, e os polímeros ao do osso esponjoso, no entanto *scaffolds* de compósitos de polímero e cerâmica são tipicamente mais fracos do que o osso. *Scaffolds* metálicos porosos satisfazem os requisitos mecânicos dos ossos, mas falham ao prover a integração necessária entre implante e tecido, e adicionalmente têm a preocupação da lixiviação de íons metálicos.³⁴

A bioabsorção é outro fator crucial para *scaffolds* na regeneração de tecidos do osso.³⁰ Um *scaffold* ideal não deve apenas ter propriedades mecânicas similares ao tecido hospedeiro, mas também ser capaz de degradar com o tempo *in vivo*, de preferência a uma taxa de reabsorção controlada e eventualmente criando espaço para o novo tecido ósseo crescer. O comportamento de degradação dos *scaffolds* deve variar com base nas aplicações, tais como, de 9 meses ou mais para a fusão espinhal ou de 3 a 6 meses para aplicações cranio-maxilo-facial.^{31,35}

1.3 Polímeros

1.3.1 Ácido poli(láctico) (PLA)

O polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), polietileno tereftalato (PET) e policloreto de vinil (PVC) são polímeros derivados do petróleo. A utilização de combustíveis fósseis na fabricação de plásticos é responsável por cerca de 7 % do consumo de petróleo e gás no mundo.³⁶ Esses recursos indiscutivelmente são finitos, com uma estimativa de ápice da produção mundial para as próximas décadas.³⁷ A grande dependência dos polímeros direciona consideráveis esforços científicos e de engenharia para a descoberta, o desenvolvimento e a modificação desses materiais.⁶ Um exemplo desses esforços pode ser observado na produção de transformados de plástico, que no Brasil no ano de 2014 foi 6,71 milhões de toneladas.³⁸

Os polímeros oriundos do petróleo e derivados possuem algumas vantagens industriais, tais como: i) baixo custo e rapidez na produção; ii) bom desempenho mecânico e iii) boas propriedades de barreira. As desvantagens incluem: i) declínio das reservas e aumento do preço do petróleo e gás nas últimas décadas; ii) preocupações ambientais devido à degradação ou incineração e ao aquecimento global; iii) custos altos e contaminações cruzadas na sua reciclagem e iv) riscos de toxicidade ao consumidor devido a possibilidade de seus monômeros ou oligômeros migrarem para outros materiais.³⁹

Polímeros oriundos de recursos renováveis têm atraído uma crescente atenção nas últimas duas décadas. Geralmente, os polímeros provenientes de recursos renováveis podem ser classificados em três grupos: i) polímeros naturais, extraídos diretamente de matérias-primas naturais, tais como polissacarídeos como o amido e a celulose, proteínas como a caseína, a gelatina e a seda, e procariontes marinhos; ii) polímeros sintéticos, produzidos por síntese química de monômeros bioderivados, como o PLA e iii) polímeros de fermentação microbiana, produzidos por micro-organismos ou bactérias geneticamente modificadas como os polihidroxialcanoatos (PHA), o polihidroxibutirato (PHB), o polihidroxila-valerato (PHV), a goma xantana e a celulose bacteriana. Assim como numerosos outros polímeros à base de petróleo, muitas propriedades dos polímeros originários de recursos renováveis também podem ser melhoradas através da formação de blendas e compósitos.⁴⁰

O PLA é um biopolímero termoplástico, que na natureza pode ser semicristalino ou totalmente amorfo é produzido a partir do ácido láctico por fermentação de produtos agrícolas. O PLA pode ser preparado pelas técnicas de condensação direta do ácido láctico e por polimerização por abertura de anel de lactídeos cíclicos.⁴¹ Atualmente a produção industrial de

ácido láctico baseia-se na fermentação microbiana de carboidratos. Tal processo é economicamente mais viável quando comparado com a rota química e permite a produção de ácido láctico opticamente puro.⁴² Na síntese de PLA a primeira etapa é a conversão do milho (arroz, batata, beterraba, trigo, resíduos agrícolas, etc.) em glicose. Em seguida o ácido láctico é obtido através da fermentação da glicose que é convertida em lactídeos na presença de catalisador.⁴¹ O lactídeo, o anel formado do dímero de ácido láctico é usado na produção de PLA de elevada massa molar na rota de polimerização por abertura de anel (ROP) e, portanto, é um importante intermediário na produção industrial de PLA, como mostrado na Figura 1.⁴²

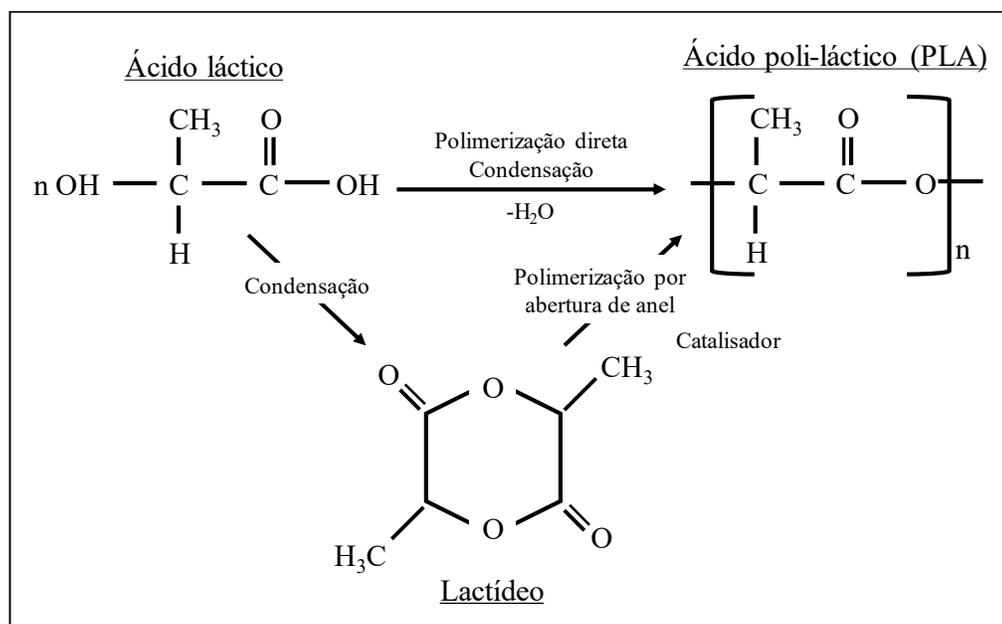


Figura 1 – Polimerização do PLA. Adaptada: Ref. 42.

Devido à natureza quiral do ácido láctico, existem lactídeos de três diferentes formas: L, L-lactídeo, D, D-lactídeo e D,L-lactídeo. Após a purificação por destilação a vácuo, o lactídeo é convertido no polímero PLA através de polimerização na presença de catalisador apropriado. O PLA é um polímero totalmente sustentável e biodegradável, sendo derivado de matérias-primas renováveis. Após a compostagem, os materiais à base de PLA são convertidos em água e dióxido de carbono que são consumidos no cultivo de produtos agrícolas para futura conversão em PLA.⁴¹

O PLA tem propriedades mecânicas comparáveis ao PET e ao PP, que são materiais frequentemente utilizados na indústria automobilística. A temperatura na qual o PLA pode ser fundido em processamento, com equipamentos como extrusoras e injetoras, é adequada para fibras ou aditivos naturais, porque esses não degradam na temperatura de processamento. Além

disso, o PLA é um polímero hidrofóbico devido a presença dos grupos laterais CH₃. Por causa de todas essas propriedades favoráveis, o PLA tem sido escolhido, dentre outros biopolímeros, como polímero matriz em compósitos verdes.⁴²

O poli(ácido L-lático) (PLLA) é usado na engenharia tecidual óssea em associação com outros materiais na produção de *scaffolds*.⁶ A associação pode ser feita com polímeros, como o poli(ε-caprolatona) ou polimetilmetacrilato (PMMA), formando blendas; ou com outros materiais como a hidroxiapatita ou o beta tricálcio fosfato formando compósitos.⁴³⁻⁴⁸ O PLLA também foi estudado e aplicado clinicamente na reparação de ruptura dos ligamentos do joelho de humano^{42,49}, como enxerto de tendão artificial bioabsorvível para o tratamento da ruptura irreparável do manguito rotador.⁵⁰ Pesquisadores compararam a biocompatibilidade e adequabilidade de uma malha tubular bioabsorvível (*stent*) feita de PLLA⁸ e uma órtese de silicone convencional nas vias aéreas de coelho normal.⁵¹ Adicionalmente, parafusos, pinos e hastes de PLLA projetados e auto-reforçados têm sido amplamente utilizados para fixação óssea e atualmente encontram-se disponíveis no mercado produtos de tamanhos e formas variados.

1.3.2 Amido

As preocupações ambientais e a escassez dos recursos fósseis implicaram no crescimento da utilização do amido em aplicações não alimentares nas últimas décadas.⁵² O amido é utilizado como aditivo natural em plásticos e particularmente em poliolefinas.⁵³ O amido possui vantagens, tais como, baixo custo, grande disponibilidade, e ser totalmente compostável sem resíduos tóxicos. As técnicas convencionais utilizadas no processamento de polímeros, tais como a extrusão, a moldagem e a termoconformação, podem ser aplicadas ao amido para a fabricação de produtos com distintas finalidades.⁵⁴

Os materiais à base de amido possuem determinadas limitações, como o difícil processamento e certas propriedades inferiores, por exemplo, pouca estabilidade a longo prazo, alta sensibilidade a água e pobres propriedades mecânicas. Adicionalmente, a concentração de amido na qual um produto útil pode ser obtido, é limitada a um pequeno valor, após esse as propriedades dos materiais são alteradas drasticamente.⁵⁴ As pesquisas de formulações e a compreensão das propriedades térmicas e das propriedades reológicas podem ajudar na resolução dessas limitações. Além disso, variadas blendas à base de amido e biocompósitos têm sido desenvolvidas, demonstrando desempenho aprimorado.⁵⁵

O amido é um polímero biodegradável e renovável produzido por muitas plantas⁸, cuja síntese ocorre nos amiloplastos. O amido permite armazenar a energia obtida da fotossíntese⁵⁶

na forma de carboidratos.⁵⁷ Os seres humanos e seus ancestrais sempre utilizaram produtos ricos em amido. No ano de 2010, grãos de amido foram identificados em moinhos de pedras na Europa (Itália, República Checa e Rússia) com datação de 30.000 anos atrás.⁷ A utilização não alimentar do amido foi desenvolvida pelos egípcios ao cimentarem tiras de papiro juntamente com adesivo de amido de trigo.⁵⁸ Mais tarde, em 700 D.C., o amido de arroz foi usado como tratamento de superfície de jornais chineses. Os romanos também usaram em cremes cosméticos e para engrossar molhos. Atualmente, as principais aplicações do amido não mudaram muito, sendo aproximadamente 60 % usado para fins alimentícios e 40% para aplicações industriais.⁵⁹ Em 2010, o mercado mundial de amido foi estimado em 68 milhões de toneladas⁵⁸ com um valor de 48,8 bilhões de dólares por ano.⁶⁰

O amido é digerível por uma série de organismos vivos, variando de bactérias a humanos.⁶⁰ Além disto, os grânulos de amido apresentam propriedades hidrofílicas⁶¹, higroscópicas⁶² e forte associação intermolecular através das pontes de hidrogênio, devido aos grupos hidroxila na superfície dos grânulos. O ponto de fusão do amido nativo é superior à temperatura de decomposição térmica, daí a pobre estabilidade térmica do amido nativo e a necessidade de conversão para materiais baseados no amido com melhores propriedades.⁵³

Estruturalmente heterogêneo, o amido é composto de polímeros lineares (amilose, 20-30%) e ramificados (amilopectina, 70-80%). A amilose tem uma estrutura de glicoses α -1,4 ligadas entre si por ligações glicosídicas α -D-(1 \rightarrow 4), formando uma estrutura helicoidal devido aos ângulos de ligação entre as unidades de glicose. A amilopectina é uma estrutura de cadeias curtas α -1,4 (30 unidades de glicose) conectadas por ligações α -1,6, aproximadamente a cada 20 ou 30 unidades de glicose, ao longo da cadeia. O amido sofre degradação enzimática em que as ligações α -D-(1 \rightarrow 4) são atacadas pela enzima α -amilase e as ligações α -1,6 são atacadas por glucosidases (Figura 2).⁶³⁻⁶⁵

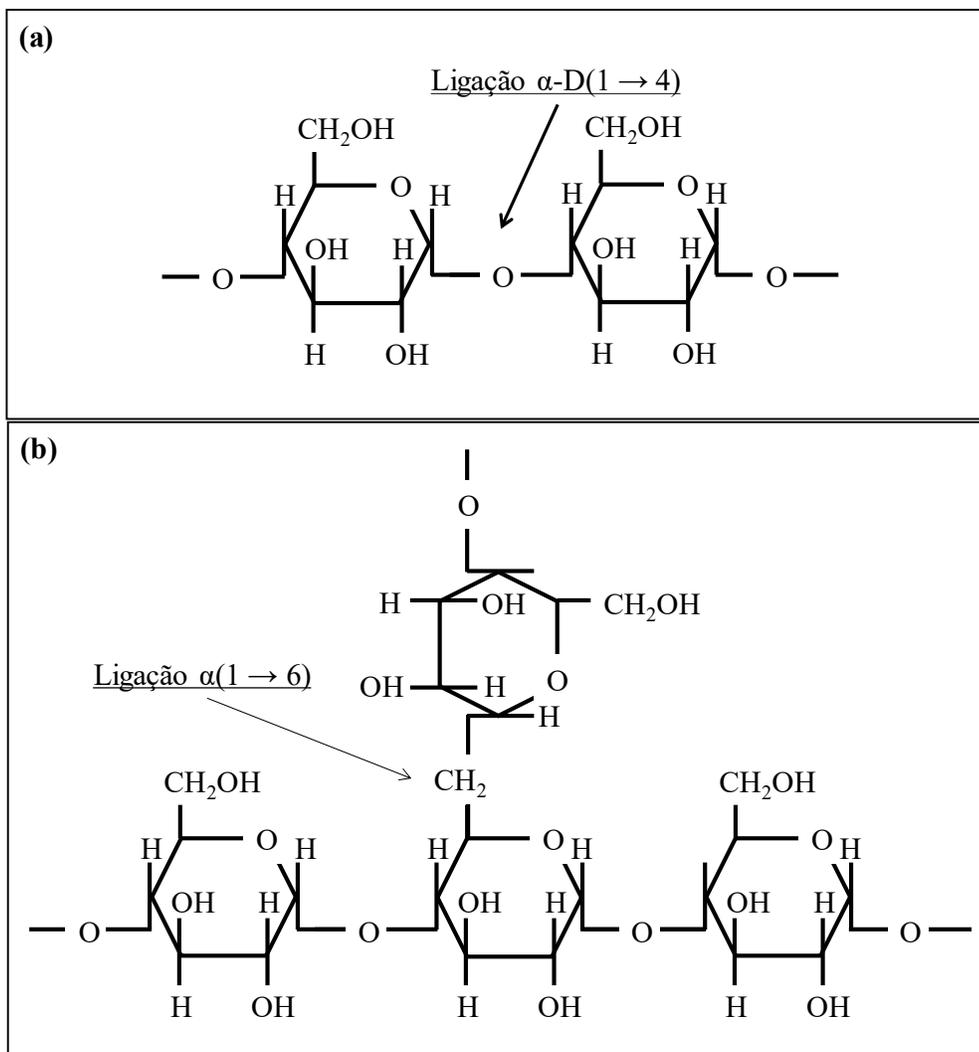


Figura 2 – Estrutura da amilose (a) e da amilopectina (b). Adaptada: Ref. 63-65.

Blendas à base de amido têm demonstrado uma grande versatilidade de processamento e utilização em diferentes campos de aplicação.⁶⁰ A utilização do amido como um biomaterial na área biomédica encontra aplicação como polímero biodegradável^{66,67}; como compósito associado a nanoargila montmorilonita⁶⁸ em sistemas de liberação controlada de fármacos; em *scaffolds* de engenharia de tecidos para a regeneração óssea e de cartilagens⁶⁹⁻⁷¹, em associação a celulose bacteriana microporosa como curativo e pele artificial temporária⁷², e como implantes de substituição óssea e cimentos ósseos.⁷³ 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.^{15,74}

1.4 Mineral argiloso – Sepiolita (SEP)

A SEP é uma argila muito incomum por causa de suas características peculiares e escassa ocorrência. Existem muito poucos depósitos comerciais no mundo e a maior parte da produção mundial dessa argila vem de depósitos de origem sedimentar localizada nas proximidades da capital da Espanha, Madrid.⁷⁵ A SEP possui baixa massa molar, é porosa, com uma grande área de superfície específica. Ao contrário das demais argilas, as partículas individuais de SEP têm uma morfologia em formato de agulha. A elevada área superficial e porosidade, bem como a forma incomum das partículas implicam na sua excelente capacidade de adsorção e de propriedades coloidais que a tornam um material importante para uma ampla gama de aplicações.⁷⁶

Quimicamente, a SEP é um silicato de magnésio hidratado com a fórmula $\text{Si}_12\text{Mg}_8\text{O}_{30}(\text{OH})_4(\text{OH}_2)_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$. A SEP, ao contrário de outras argilas, não é um filossilicato em camadas. Sua estrutura pode ser descrita como um quincunce (um arranjo de cinco objetos, colocados de modo que quatro ocupam os cantos e o quinto o centro de um quadrado ou retângulo, Figura 3) de tipo folhas separadas por canais paralelos.⁷⁷⁻⁷⁹

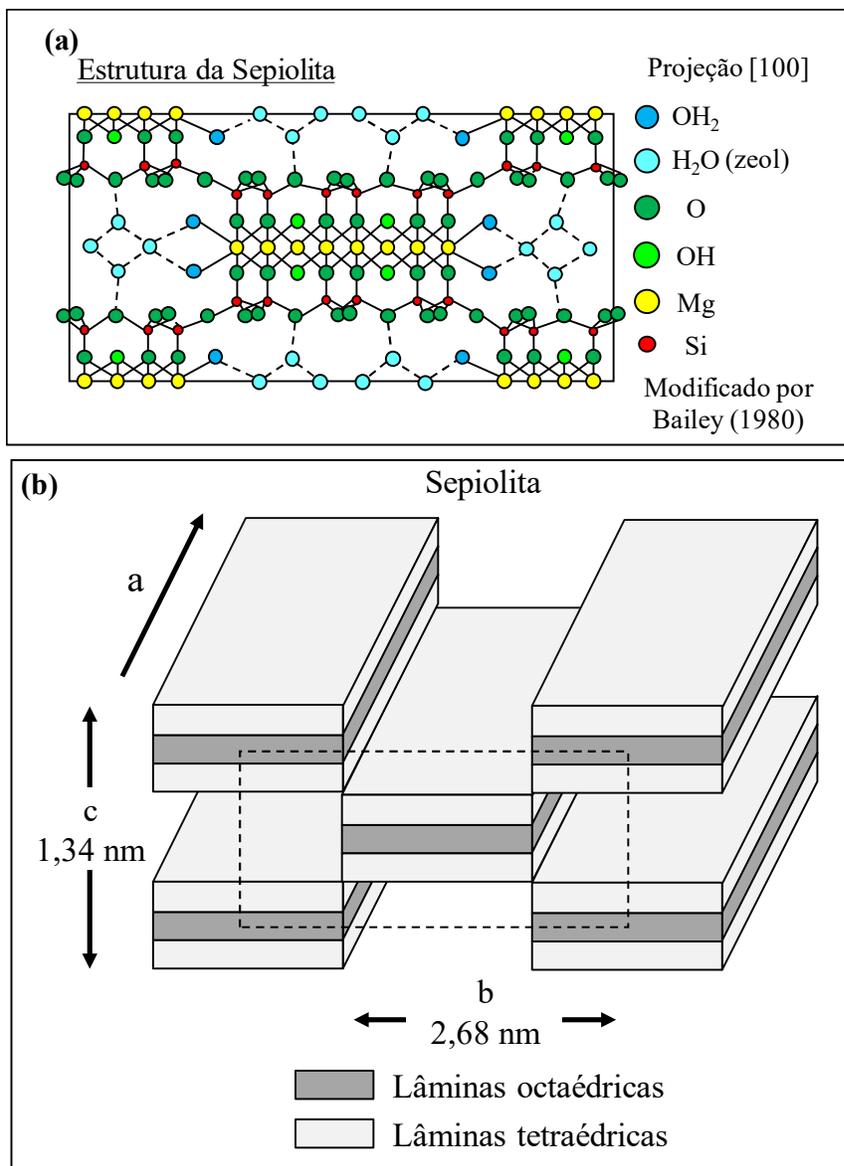


Figura 3 – Estrutura cristalina (a) e célula unitária (b) da SEP. Adaptada: Ref. 77-79.

A SEP possui a maior área de superfície dentre todos os minerais argilosos, variando de 140 a 320 m²/g, com uma alta densidade de grupos silanol (-SiOH) que explica o destacado caráter hidrofílico dessa argila.⁷⁶⁻⁷⁹ A estrutura da SEP não possui uma carga negativa significativa e, portanto, a capacidade de permuta catiônica dessa argila é muito baixa. As minúsculas partículas alongadas de SEP têm um comprimento médio de 1,0 a 2,0 μm, uma largura de 0,01 μm e contêm canais abertos com dimensões de 3,6 Å x 10,6 Å ao longo do eixo da partícula. As partículas de SEP são organizadas formando pacotes fracamente ligados e agregados porosos, com uma extensa rede capilar que explica sua alta porosidade e leve peso devido ao grande espaço vazio.⁸⁰

A SEP absorve vapores e odores e pode absorver aproximadamente seu próprio peso em água ou de outros líquidos. Os grânulos de SEP não se desintegram mesmo quando saturados com líquidos. As soluções coloidais de SEP devem ser dispersas em água ou em outros sistemas líquidos usando misturadores de alto cisalhamento. Uma vez dispersos no líquido, forma-se uma estrutura de partículas alongadas aleatoriamente entrelaçadas que retêm o líquido, aumentando a viscosidade da suspensão. Essa estrutura é estável mesmo em sistemas com altas concentrações de sal, condições que produzem a floculação de suspensões de outras argilas, como a bentonita. A rede aleatória de partículas de SEP contém partículas mais grosseiras no líquido, impedindo sua sedimentação por gravidade e atuando como agente de suspensão. A SEP fornece para as suas suspensões um comportamento pseudoplástico e tixotrópico que a torna um material de interesse em variadas aplicações com o intuito de melhorar a processabilidade, a aplicação ou a manipulação do produto final.¹⁰

As propriedades adsorptivas e coloidais da SEP oferecem soluções específicas para uma ampla variedade de aplicações industriais, tais como, i) absorventes industriais; ii) tratamento de resíduos; iii) transportador para produtos químicos; iv) controle de umidade; v) ingredientes de ração para animais; vi) adubos (fertilizantes); vii) polímeros e elastômeros; viii) aditivos de construção; ix) aditivos reológicos para sistemas aquosos e x) aditivos reológicos para sistemas orgânicos.¹⁰

As interações da SEP com polímeros não ocorrem somente na superfície externa da argila, devido ao número significativo dos grupos silanol (Si-OH), mas também pela penetração nos canais estruturais dos blocos de fibra da SEP.^{81,82} Estudos demonstraram boa capacidade de reforço de SEP nas matrizes poliméricas e tais reforços foram obtidos com pequenos conteúdos de SEP, normalmente inferiores a 10 wt%.^{83,84} Por exemplo, com a presença de 9,1 wt% de SEP, o módulo de elasticidade à compressão e a resistência de espuma de gelatina com um tamanho de célula de 159 µm e uma porosidade de 98 % foram aumentados em 288 % e 308 %, respectivamente. Tais melhorias foram atribuídos aos seguintes fatores: interações fortes entre a gelatina hidrofílica e a SEP, o tamanho reduzido da célula e o efeito de reforço da SEP sobre a gelatina.⁸⁴

A utilização de argilas para fins medicinais tem início pré-histórico. Evidências arqueológicas sugerem a aplicação de argila em feridas e irritações de pele feitas pelo *Homo erectus* e pelo *Homo neanderthalis*. No mundo antigo, textos frequentes comprovam a ingestão de argila, contida na terra, para o tratamento de problemas intestinais e estômocais.^{85,86} Dentre os minerais de argila a SEP é usada em produtos farmacêuticos e cosméticos, por vias oral ou tópica, com as seguintes aplicações: antiácido, protetor gastrointestinal, antidiarreica, cremes

cosméticos, pós e emulsões.⁸⁷ Além disso, a farmacologia moderna emprega argilas como excipientes atuando diversamente como lubrificantes, diluentes, corretores de sabor, emulsionantes, agentes reológicos e modificadores de entrega de drogas.⁸⁸

Foi demonstrado que a incorporação de SEP também aumentou a bioatividade de filmes de gelatina devido a sua carga negativa de superfície, através da indução de maior quantidade de cristalitos de fosfato de cálcio de menores dimensões na superfície do polímero, quando imerso em uma tampão.⁸⁴ Outros pesquisadores perceberam que nanopartículas de hidroxiapatita podem crescer na superfície de nanofibras de SEP, revelando a bioatividade da argila.⁸⁹ Além disso, foi demonstrado que a SEP é biocompatível e atóxico^{90,91}, indicando um uso seguro no campo biomédico.

CAPÍTULO II

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Todos os materiais e amostras produzidas foram secos em estufa, a uma temperatura de 50 °C antes de quaisquer processamentos e medições, pelo período de até 48 h. Esse procedimento foi efetuado para minimizar o efeito da umidade dos materiais na rota de processamento e nas medidas de caracterização das amostras.

2.1 Materiais

O ácido poli-láctico (PLA) utilizado foi o Ingeo 2003D da Nature Works LLC (Estados Unidos da América), uma resina termoplástica adequada para extrusão. O amido nativo utilizado foi o obtido a partir do trigo, com nome comercial de Meritena 200 da Tereos Syral (Espanha). A SEP (UNV-1), não modificada organicamente, é constituída por SEP com um comprimento médio de partícula variando entre 1 e 2 μm e diâmetro da ordem dos nanômetros (cerca de 20-30 nm). As formulações produzidas são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 – Material e composição das amostras.

Material	Composição [wt%]	Denominação
PLA2003D	100/0	PLA
PLA2003D/Amido	90/10	P10A
PLA2003D/Amido	80/20	P20A
PLA2003D/Amido	70/30	P30A
PLA2003D/Amido/SEP	89/10/1	P10AS
PLA2003D/Amido/SEP	79/20/1	P20AS
PLA2003D/Amido/SEP	69/30/1	P30AS

2.2 Produção das amostras

A produção das amostras foi executada em uma sequência determinada de processos, composta de extrusão, injeção, adsorção de CO₂ em autoclave e, por fim, espumação por forno ou espumação por banho de glicerina. A Figura 4 apresenta o esquema de processos até a obtenção das amostras espumadas.

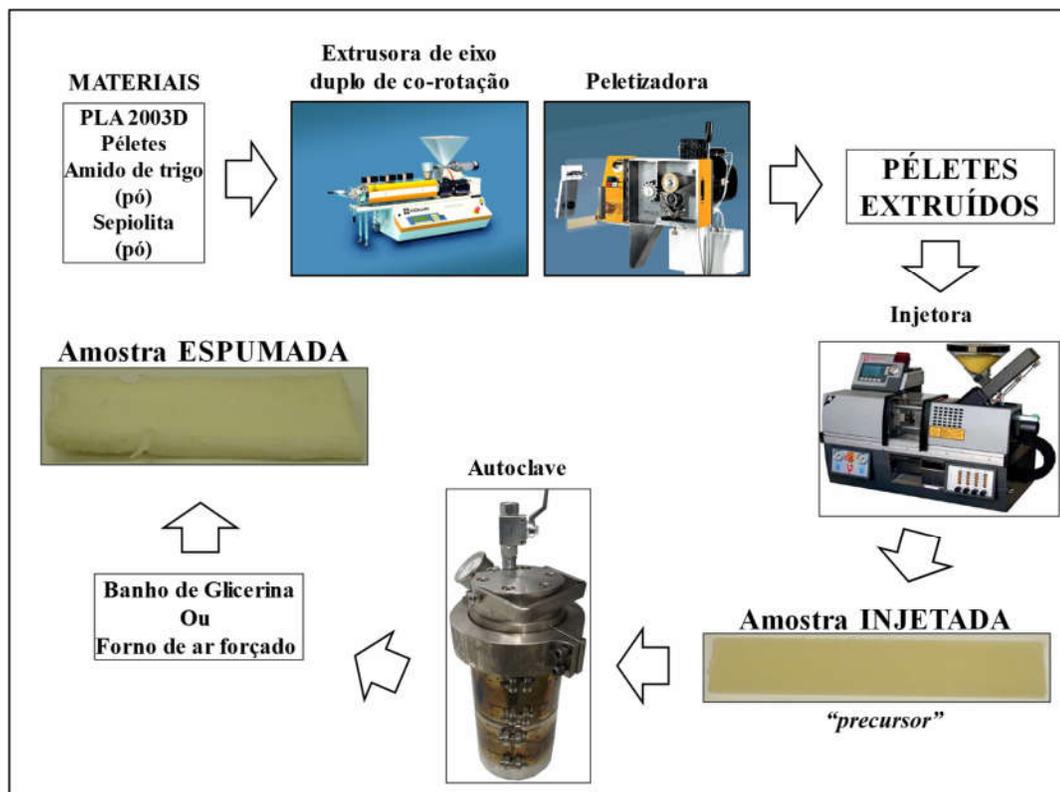


Figura 4 – Esquema ilustrativo das etapas de processamento dos materiais e amostras.

2.2.1 Extrusão

A mistura dos materiais componentes das amostras foi realizada em uma extrusora de rosca dupla da marca *Tech-Line*®, modelo ZK 25T da empresa *Collins* com relação L/D de 24. Nessa etapa de processamento o perfil de temperatura aplicado foi o seguinte: $T_1 = 148$ °C, $T_2 = 151$ °C, $T_3 = 153$ °C, $T_4 = 155$ °C, $T_5 = 156$ °C e $T_F = 156$ °C. A denominação T_1 é a temperatura na região de alimentação de materiais, as temperaturas de T_2 a T_5 são os valores nos distintos módulos e, T_F é a temperatura no orifício de saída. A velocidade de rotação na rosca dupla foi de 30 rpm e a alimentação de materiais foi manual. A corrente elétrica do motor

que gira a rosca durante o processo variou entre 4,2 e 4,3 A. A pressão no orifício de saída, Pr, variou de 140-150 bar. Valores acima desse implicaram em espumação do material extruído. A escolha dos parâmetros de processo de extrusão, ou seja, temperaturas, velocidade de rotação e tipo de alimentação foi determinada para a obtenção da melhor mistura e para evitar que as amostras após a extrusão espumassem devido a umidade presente nos materiais. Na extrusão das amostras com SEP, primeiramente foram processados o PLA e a SEP na proporção 99/1 wt%. Em seguida foi adicionado amido nas composições apresentadas na Tabela 1. Tal procedimento foi adotado porque na extrusão dos três materiais juntos, a extrusora apresentava picos de corrente que automaticamente interrompiam o funcionamento do equipamento.

2.2.2 Injeção

As amostras precursoras de espessura 2,0 mm e 4,0 mm foram produzidas por moldagem por injeção em uma máquina micro injetora da marca *Babyplast*, modelo 6/10P para materiais termoplásticos. Para esta etapa de processo existe um conjunto de seis parâmetros distintos que devem ser aplicados ao equipamento: i) perfil de temperaturas; ii) parâmetros de carro; iii) parâmetros de plastificante; iv) tempos e medidas de expulsão; v) tempos e medidas de injeção; vi) tempo e medidas de fechamento, Tabelas de 2 a 6. As amostras com uma espessura de 2,0 mm foram chamadas de precursores, adequadas para: i) permanência em autoclave; ii) processos de espumação; iii) realização de medidas de DMA e iv) de ensaios mecânicos de tração. As amostras com 4,0 mm foram utilizadas para realizar os ensaios mecânicos de flexão.

Tabela 2 – Perfil de temperatura de injeção para as amostras de PLA, P(10-30)A e P(10-30)AS de 2,0 e 4,0 mm.

	PLA	P(10-30)A	P(10-30)AS
T1 (plastificação) [°C]	195	195	195
T2 (câmara) [°C]	205	205	205
T3 (bocal) [°C]	230	220	220
T4 (molde fixo) [°C]	35	25	25
T5 (molde móvel) [°C]	35	25	25

Tabela 3 – Parâmetros de carro de injeção para as amostras de PLA, P(10-30)A e P(10-30)AS de 2,0 e 4,0 mm.

	PLA	P(10-30)A	P(10-30)AS
Tempo do carro [s]	0	0	0
Velocidade do carro [%]	80	80	80
Tempo de 2ª carga [s]	0	0	0
Velocidade do carro [%]	80	80	80

Tabela 4 – Tempo e medidas de expulsão de injeção para as amostras de PLA, P(10-30)A e P(10-30)AS de 2,0 e 4,0 mm.

	PLA	P(10-30)A	P(10-30)AS
Velocidade de expulsão [%]	20	20	20
Número de golpes	3	3	3
Pressão de expulsão [bar]	50	50	50
Tempo de expulsão [s]	0,5	0,5	0,5
Tempo de coleta dos expulsos [s]	0,5	0	0
Tempo de sopro de ar [s]	0	0	0
Pausa de expulsão [s]	0	0	0
Pausa de fim de ciclo [s]	0	0	0

Tabela 5 – Tempo e medidas de injeção para as amostras de PLA, P(10-30)A e P(10-30)AS de 2,0 e 4,0 mm.

	PLA	P(10-30)A	P(10-30)AS
Carga de material [s]	30	30	30
Tempo de resfriamento [s]	30	25	25
1ª pressão de injeção [bar]	110	110	110
Tempo de 1ª pressão de injeção [s]	10	10	10
2ª pressão de injeção [bar]	110	110	110
Tempo de 2ª pressão de injeção [s]	10	10	10
Sucção [mm]	0	0	0
Velocidade de injeção [%]	100	100	100
2ª velocidade de injeção [%]	100	100	100
Medida de 2ª velocidade de injeção [%]	5	0	0

Tabela 6 – Tempo e medidas de fechamento de injeção para as amostras de PLA, P(10-30)A e P(10-30)AS de 2,0 e 4,0 mm.

	PLA	P(10-30)A	P(10-30)AS
Abertura do carro [mm]	44	44	44
Pressão de fechamento [bar]	110	120	120
Alarme de fechamento [bar]	130	130	130
Medida de pressão de segurança [bar]	10	10	10
Velocidade de fechamento 1 [%]	60	60	60
Velocidade de fechamento 2 [%]	20	20	20
Mudança de velocidade de fechamento [%]	15	15	15
Velocidade de abertura [%]	20	20	20

2.2.3 Adsorção de CO₂ em autoclave

Testes relativos a cinética de adsorção e dessorção de CO₂ nas amostras foram realizados para estabelecer os parâmetros utilizados no autoclave (Anexo I). A impregnação de CO₂ nas amostras foi realizada utilizando-se de autoclave, 40 °C e 80 bar por um período de 24 h. As massas iniciais e finais das amostras foram medidas para a obtenção do percentual de adsorção nas amostras precursoras após 24 h. Adicionalmente, a cinética de adsorção e de dessorção também foram estudadas.

2.2.4 Espumação

A fabricação das espumas ocorreu imediatamente após a remoção das amostras em autoclave. Dois sistemas distintos de espumação foram usados: i) banho de glicerina e ii) forno de ar forçado. Em ambos os sistemas a temperatura utilizada foi de 170 °C durante um período de 30 s. Na Figura 5 encontram-se amostras obtidas pelas duas vias utilizadas.

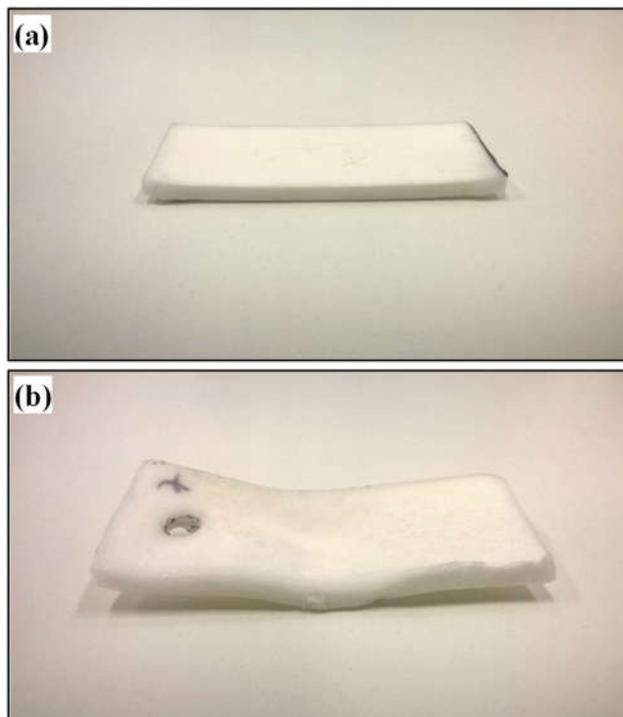


Figura 5 – Amostras de PLA espumadas por forno de ar forçado (a) e por banho de glicerina (b).

2.3 Técnicas de caracterização

2.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microestrutura foi caracterizada utilizando a técnica de MEV, permitindo avaliar a morfologia e a distribuição dos tecidos aderidos às amostras. Para a avaliação das amostras pré-implante dois conjuntos de medidas foram realizados. O primeiro foi realizado na Espanha: região interior das amostras, as quais foram congeladas em N₂ e cortadas para proporcionar uma superfície lisa. O segundo foi realizado no Brasil: região exterior das amostras utilizando o equipamento da marca *Carl Zeiss*, modelo EVO LS 15 (Alemanha). A avaliação da região externa das amostras pós-implante em animais também foi realizada no Brasil. Em todas as amostras a superfície foi revestida com uma deposição de ouro a vácuo.

2.3.2 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

As medidas de DSC foram realizadas utilizando um equipamento da marca *Mettler*, modelo DSC 862. As massas das amostras eram de aproximadamente $10,0 \pm 0,5$ mg; obtidas da região das bordas dessas. A medida foi feita em 3 ciclos de temperaturas distintos: i) de - 40 a 250 °C (1º ciclo); ii) 250 a - 40 °C (2º ciclo); iii) de - 40 a 250 °C (3º ciclo). No 1º e 3º ciclos a razão de aquecimento foi de 10 °C/min; no 2º ciclo a razão de aquecimento foi de -20 °C/min. Adicionalmente, entre o fim do 1º ciclo e o início do 2º ocorreu a manutenção da temperatura em 250 °C por três minutos. A atmosfera utilizada para todas as medidas era composta de N₂ com fluxo de 60,0 mL/min.

2.3.3 Análise mecânica

Os ensaios de tração foram realizados de acordo com a norma ISO 527-1: 2012 e ISO 527-2: 2012. Todas as medições foram realizadas a 5 mm/min. As medidas das amostras eram: $2,2 \pm 0,1$ mm de espessura e $5,1 \pm 0,1$ mm de largura. Os ensaios de flexão foram realizados de acordo com a norma ISO 178:2010. Todas as medições foram realizadas a 5 mm/min. As amostras foram 80,0 mm de comprimento; $3,9 \pm 0,1$ mm de espessura e $9,9 \pm 0,1$ mm de largura.

2.3.4 Análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA)

As medidas de DTMA foram realizadas em um equipamento *Perkin Elmer* modelo DMA7. O equipamento foi calibrado e utilizado, ambos via *software*, de acordo com os procedimentos recomendados pelo manual do fabricante. Os módulos de armazenamento (E'), de perda (E''), o complexo $E^* = (E'^2 + E''^2)^{1/2}$ e a tangente de perda ou o fator de perda ($\tan \delta$) foram obtidos. O modo de deformação aplicado foi o de flexão em três pontos. As amostras foram preparadas para a análise com as seguintes dimensões: 4,0 mm de largura; 25,0 mm de comprimento e 2,0 mm de espessura. A distância entre pontos de contato do suporte da amostra foi de 20,0 mm. A fim de obter as propriedades mecânicas dinâmicas como uma função da temperatura, as experiências foram realizadas a 1 Hz de frequência, entre 30 e 70 °C (amostras injetadas) e de 30 a 100 °C (amostras em autoclave), com uma taxa de aquecimento de 1 °C/min. O equipamento tem um limite para a tensão máxima aplicada (cerca de 30 kPa, para a geometria usada).

2.3.5 Medidas de densidade

As medidas de densidade foram feitas em um equipamento picnômetro de gás da marca *Micromeritics*, modelo *AccuPyc II 1340* com uma taxa de equilíbrio de 0,005 psi/min, utilizando 10 purgas, volume de célula de 37,8480 cm³ e utilizando gás de N₂.

2.4 Estudo *in vivo*

2.4.1 Animais de experimentação

Nesse trabalho foram utilizados 18 ratos machos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*, variedade albina, *Rodentia*, *Mammalia*) com idade de 120 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 $22,00 \pm 2,00$ °C e alimentados com ração padrão (marca Primor, ração para coelhos e roedores) e água potável fornecida *ad libitum*. O presente estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da FCT/UNESP, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil (processo nº 02/2014 – Anexo II) e foi conduzido de acordo com as recomendações do *National Institutes of Health* (NIH).⁹²

2.4.2 Modelo experimental

Os animais foram submetidos a processo cirúrgico para a implantação das amostras. As amostras utilizadas foram as de PLA; PLA/amido na proporção 90/10 e; PLA/amido/SEP na proporção 89/10/1. A distribuição, descrição e quantidade de animais por grupo encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 – Distribuição, descrição e quantidade de animais no estudo *in vivo*

Amostra	Número de animais
PLA espumada em forno	3
PLA espumada em banho de glicerina	3
P10A espumada em forno	3
P10A espumada em banho de glicerina	3
P10AS espumada em forno	3
P10AS espumada em banho de glicerina	3

2.4.3 Esterilização por óxido de etileno (EtO)

Na esterilização das amostras a técnica utilizada foi a EtO. Para verificar a permanência do óxido de etileno no interior das amostras, uma análise residual por cromatografia gasosa foi realizada (Anexo III).

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 \pm 30 minutos;
- Gás utilizado: EtO (de acordo com a portaria interministerial n° 482 de 16/04/1999);
- Vácuo inicial: $-0,55 \pm 0,10$ 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: $-0,50 \pm 0,10$ bar;
- Aeração mecânica: $60,00 \pm 10,00$ minutos (composto por N₂, aeração e hiperventilação);
- Aeração mecânica forçada: PO-07.021;
- Indicador biológico: Attest marca 3M (esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372), resultado negativo;
- Indicador químico multiparamétrico (Comply) e indicador químico (fita Indox): Dentro dos padrões indicativos de esterilização eficiente;
- Concentração de EtO: 450 a 1200 mg/L, em conformidade com ANSI/AAMI ST 41:1999, 2000 *Association for the Advancement of Medical Instrumentation*.

2.4.4 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 (50,0 mg/mL) e cloridrato de xilazina (20,0 mg/mL) na dose de 25,0 mg/Kg e 3,0 mg/Kg.⁹³ A manutenção do plano anestésico, quando necessário, foi feita com a utilização de injeção intramuscular de ketamina com metade da dose inicial. Antes da cirurgia de implantação das amostras realizou-se a tricotomia da pata posterior direita. Em seguida toda a área foi lavada com solução de Polvedine e posteriormente com solução de álcool iodado a 2 %, seguindo-se o isolamento da área cirúrgica por meio de campos estéreis. As incisões foram realizadas com

a utilização de bisturi, lâmina nº 22, utilizando-se uma via de acesso medial, na pata posterior direita entre os músculos tibial posterior - *tibialis posteriori* e tríceps sural - *triceps surae*. Após o implante foram realizadas suturas dos planos musculares e da pele com fio mononylon 4-0 (Figura 6).

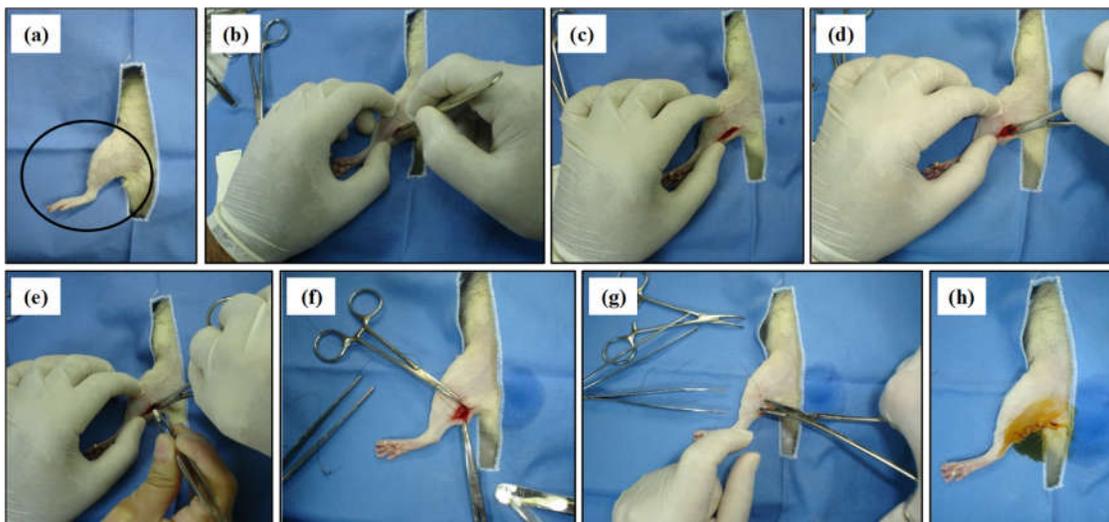


Figura 6 – Procedimento cirúrgico de implantação da amostra. Em destaque a região na qual foi realizada a tricotomia isolada por campos estéreis (a); incisão dos tecidos epiteliais e muscular (b-c); alargamento do espaço intramuscular (d); implantação das amostras nos animais (e); suturas realizadas após a cirurgia no plano muscular (f) e plano da pele (g) e limpeza com a com solução de álcool iodado a 2 % (h).

2.4.5 Coleta do material

Para a coleta do material, após 40 semanas contadas a partir da data da cirurgia de implantação das amostras, os animais permaneceram em jejum pré-operatório de 8 horas e sofreram eutanásia, por meio de uma superdose do anestésico pentobarbital sódico via intraperitoneal (150,0 a 200,0 mg/Kg), com a devida observação da cessão dos batimentos cardíacos para prontamente iniciar o procedimento cirúrgico.^{93,94} Esse consistiu da retirada da pele da região medial da pata traseira direita, expondo a região onde as amostras foram implantadas. As amostras e os tecidos musculares adjacentes (Figura 7) foram retirados e imediatamente armazenados em formol à 10 %. Em seguida foram encaminhados para os procedimentos histológicos e posterior análise. A Figura 7 apresenta uma amostra que foi implantada e removida após o período de estudo estipulado.

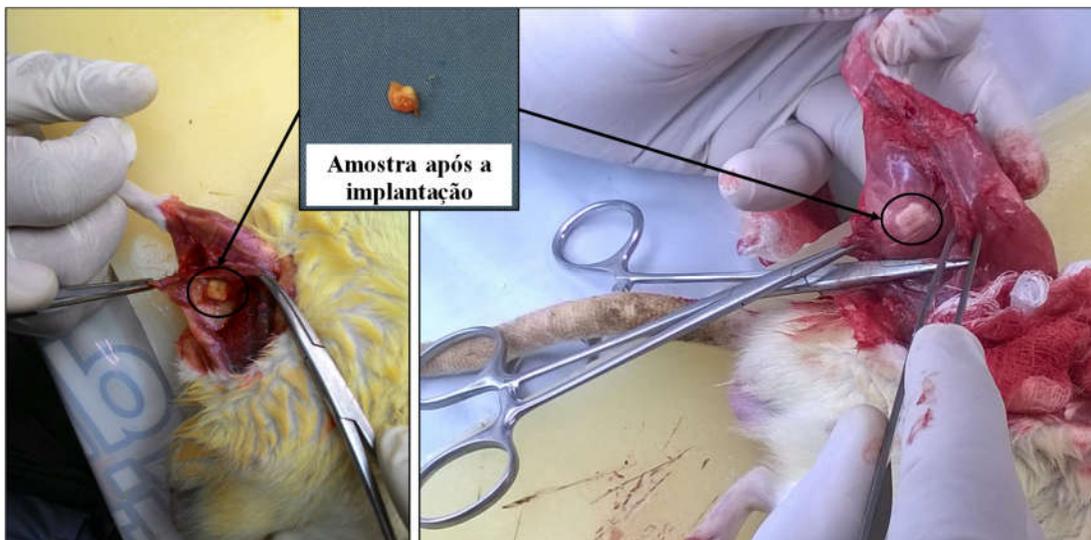


Figura 7 – Amostra removida da pata traseira dos animais após o período de 40 semanas.

2.4.6. Descrição da técnica para corte histológico

Os procedimentos histológicos foram realizados no laboratório HISTOCELL – Soluções em Anatomia Patológica, São Paulo. Nesse laboratório no momento do recebimento das amostras essas foram avaliadas tecnicamente e utilizadas de forma total ou parcial, de acordo com a representatividade necessária.

Em seguida os fragmentos foram inseridos em um cassete com a devida identificação do órgão. Na sequência as amostras foram submetidas a um procedimento de desidratação passando por 1 hora em álcool 70 %, depois em álcool 96 % e por fim em álcool absoluto. Em seguida foram colocadas no reagente xilol onde permaneceram por 2 horas e depois colocadas em um banho de parafina por um período mínimo de 3 horas. Após a conclusão desse processo foi feita a inclusão das amostras no próprio cassete de forma que os fragmentos estivessem na posição ideal para os cortes histológicos.

As amostras foram conferidas com a ordem de serviço do laboratório e colocadas em uma bandeja com gelo para mantê-las devidamente resfriadas. Em seguida as lâminas foram identificadas com as mesmas identificações dos cassetes. Esses com as amostras foram então colocados no equipamento denominado micrótomo onde foram feitos os cortes seriados entre 3 ou 4 micrometros e as fitas produzidas neste processo foram colocadas em um banho-maria com temperatura de 56 °C; após estirar as fitas no banho foram retirados o número de fragmentos necessários e esses foram colocados sobre as lâminas.

Em seguida as lâminas foram para uma estufa com temperatura variável entre 60 °C e 70 °C por 30 minutos. Na sequência realizou-se a coloração das lâminas: i) uma sequência com 3 xilóis por 5 minutos para cada cuba; ii) depois imersão rápida em 5 cubas de álcool, lavadas em água corrente por 5 minutos e iii) posterior colocação no corante Hematoxilina (imersão de 1 minuto) e “contra coradas” com Eosina (imersão de 1 minuto).

Para finalizar o processo de coloração realizamos algumas passagens em álcool absoluto e em seguida pelo xilol. As amostras coradas receberam a cobertura de lamínulas para proteção e melhor visualização no microscópio e finalizando as lâminas foram etiquetadas conforme a identificação inicial.

2.4.7 Microscopia Ótica

As lâminas coradas foram destinadas para a análise da morfologia geral dos tecidos 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*. As imagens foram processadas usando o *software* livre *GNU Image Manipulation Program (Gimp)* versão 2.8.16.

CAPÍTULO III

CARACTERIZAÇÃO

As propriedades das amostras foram avaliadas pelas seguintes técnicas de caracterização: i) a microscopia eletrônica de varredura (MEV) forneceu informações relativas a estrutura morfológica; ii) a técnica de calorimetria diferencial exploratória (DSC) permitiu avaliar a cristalinidade (X_c), a temperatura de transição vítrea (T_g), e a temperatura de fusão (T_m) em todas as etapas de processamento; iii) os ensaios mecânicos de flexão e tração apresentaram o comportamento mecânico. Adicionalmente, tal comportamento em função da temperatura foi medido via análise térmica dinâmico-mecânica (DTMA); e iv) medidas de densidades das amostras também foram realizadas nas diversas etapas da rota de fabricação.

3.1 Microscopia eletrônica de varredura

As Figuras 8 e 9 mostram as imagens de MEV das amostras de PLA. Na Figura 8 encontram-se as imagens com aumentos de 20, 200 e 1000 vezes para as amostras injetadas precursoras e das que estiveram em autoclave. Na Figura 9 encontram-se as imagens das amostras em forno (aumentos de 25, 75 e 1000 vezes) e das espumadas em banho de glicerina (aumentos de 20, 200 e 1000 vezes). As Figuras 10 e 11 mostram as imagens de MEV das amostras de PLA/amido nas proporções 70/30, 80/20 e 90/10. Na Figura 10 encontram-se as imagens das amostras injetadas precursoras com aumentos de 20, 200 e 1000 vezes. Na Figura 11 encontram-se imagens das amostras injetadas e espumadas por banho de glicerina e por forno com aumento de 2000 vezes. A Figura 12 mostra as imagens de PLA/amido/SEP nas proporções 89/10/1 e 79/20/1 com aumento de 1000 vezes. Nas Figuras 8 a 12 as imagens foram feitas da região interna das amostras a partir de fratura frágil criogênica.

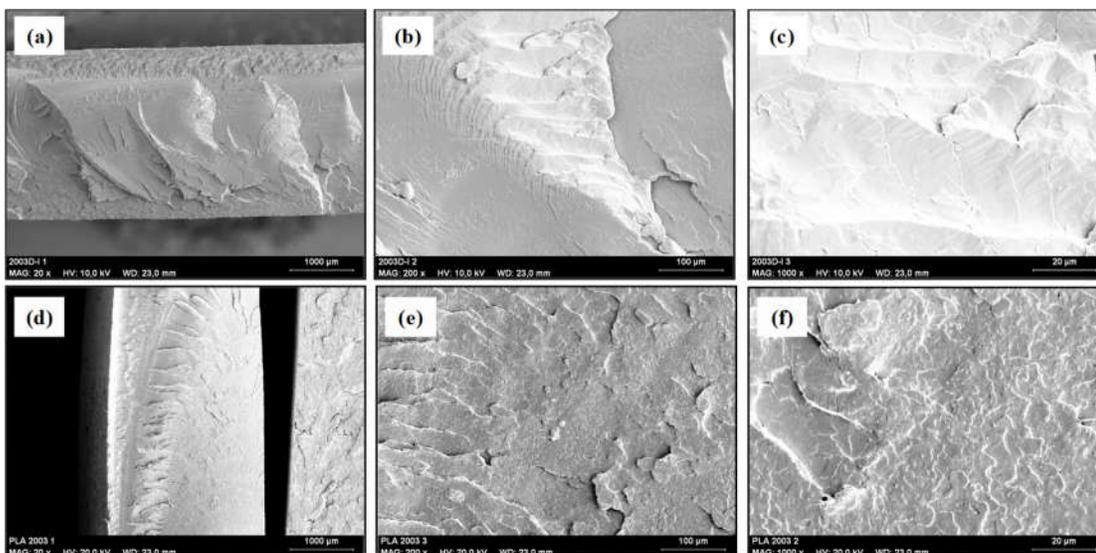


Figura 8 – Imagens de MEV (região interna) de amostras de PLA: injetadas, imagens (a-c) e em autoclave, imagens (d-f). Aumentos: de 20X nas imagens (a) e (d); de 200X nas imagens (b) e (e) e; de 1000X nas imagens (c) e (f).

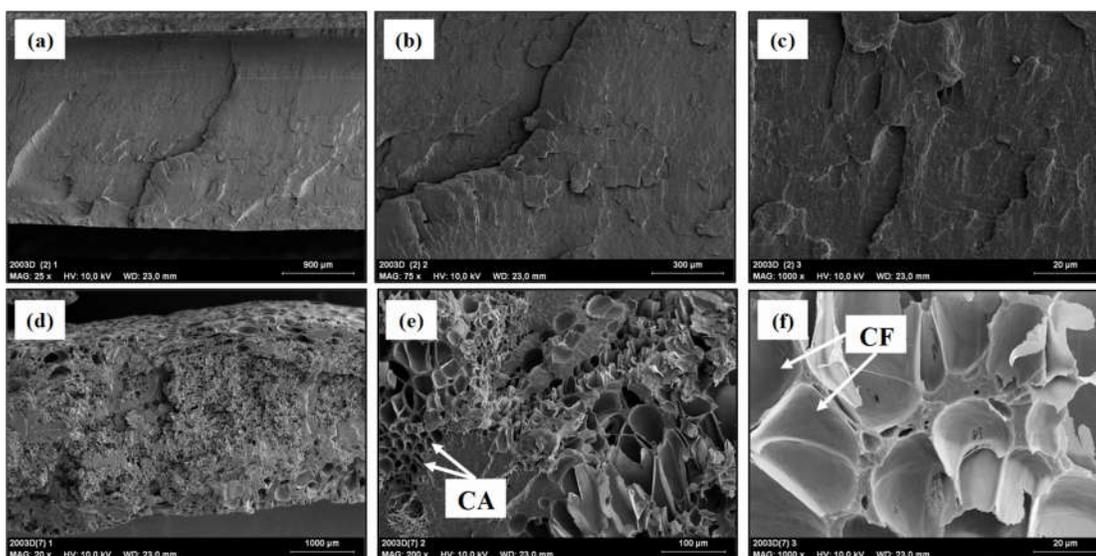


Figura 9 – Imagens de MEV (região interna) de amostras PLA: em forno, imagens (a-c) e espumadas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos: de 25X e 75X nas imagens (a-b); de 20X e 200X nas imagens (d-e) e; de 1000X nas imagens (c) e (f). Legenda: CF = célula fechada e CA = célula aberta.

Na Figura 8 as imagens (a-c) mostram as amostras precursoras de PLA e as imagens (d-f) apresentam aquelas que estiveram em autoclave. Como era esperado, somente uma fase foi observada e que corresponde a matriz polimérica de PLA. Na Figura 9 as imagens (a-c) mostram as amostras de PLA em forno e as imagens (d-f) apresentam as amostras de PLA espumadas em banho de glicerina. Também nas espumas, assim como nas imagens da Figura

8, somente uma fase foi observada e que corresponde a matriz polimérica de PLA expandida. Na Figura 9 ao comparar as imagens (d-f) com as imagens (a-c), verificou-se que as amostras expandidas em banho de glicerina (d-f) apresentaram geração de células, tanto abertas como fechadas. Por sua vez, as amostras que permaneceram em forno não apresentaram geração de células. A diferença morfológica das amostras processadas em forno com as espumadas por banho de glicerina pode estar associada a melhor transferência de calor nesse último processo. Nesse caso, a glicerina líquida aquecida teve melhor contato com a amostra, já para as amostras em forno o calor foi transferido pelo ar aquecido e pelas placas de aço aquecidas que mantinham as mesmas posicionadas dentro do forno.

Matuana (2008) estudou o efeito das condições de formação de espumas (temperatura e tempo) na fração de espaços vazios, na relação de expansão volumétrica, na resistência ao impacto e nas propriedades de tração de PLA espumado. Ele averiguou que as células com maior diâmetro médio foram produzidas na borda das amostras espumadas, independentemente da temperatura de formação da espuma. Isso era esperado, porque a temperatura é sempre maior na camada externa do que no núcleo da amostra na formação da espuma em processos de estado sólido em lotes. O aumento da temperatura de formação de espuma resultou em um aumento significativo do tamanho da célula.⁹⁵ A temperatura mais elevada acelerou a taxa de difusão do gás, o que favoreceu o crescimento das células.⁹⁶

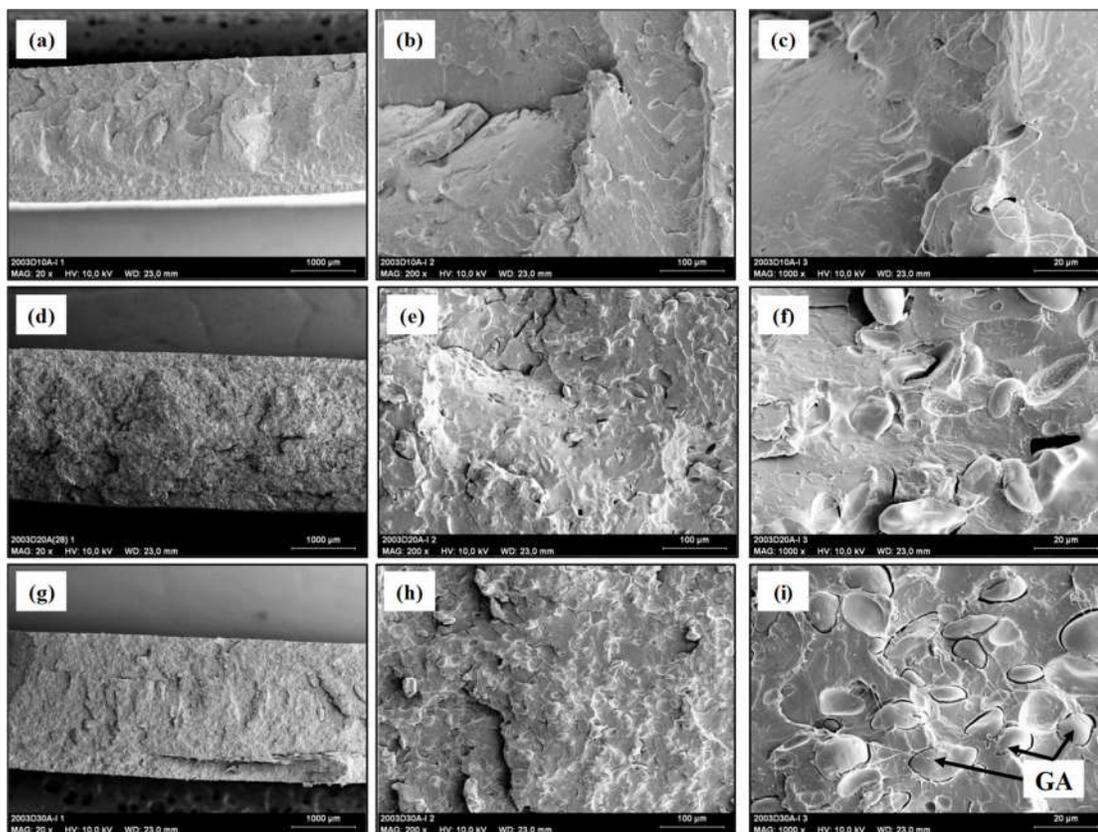


Figura 10 – Imagens de MEV (região interna) de amostras injetadas de P10A, imagens (a-c); P20A, imagens (d-f) e P30A, imagens (g-i). Aumentos: de 20X nas imagens (a), (d) e (g); de 200X nas imagens (b), (e) e (h) e; de 1000X nas imagens (c), (f) e (i). Legenda: GA = grânulo de amido.

Na Figura 10 são apresentadas imagens de amostras precursoras em que foram observadas duas fases distintas, uma para a matriz polimérica PLA e outra para o amido (grânulos). Notou-se também que houve uma boa dispersão dos grânulos de amido no PLA, sendo que a visualização de maiores quantidades de grânulos ocorreu para as amostras P20A, imagens (e) e (f) e; nas amostras P30A imagens (h) e (i), o que era esperado. Wootthikanokkhan et al. (2012) estudaram a eficácia da compatibilização de blendas de PLA e amido termoplástico (TPS) também perceberam que quanto maior o teor de amido, maior a quantidade de grânulos de amido presentes nas blendas.⁹⁷

Em relação à interface entre as fases, essa foi eminentemente física com duas fases distintas e a ocorrência de lacunas entre elas. As lacunas observadas na interface entre os materiais eram esperadas, uma vez que os amidos hidrofílicos e poliésteres alifáticos hidrofóbicos, como o PLA, são termodinamicamente imiscíveis.⁹⁸ Mesmo em blendas de PLA e TPS, a presença de lacunas revela que os dois materiais são pouco miscíveis.⁹⁷

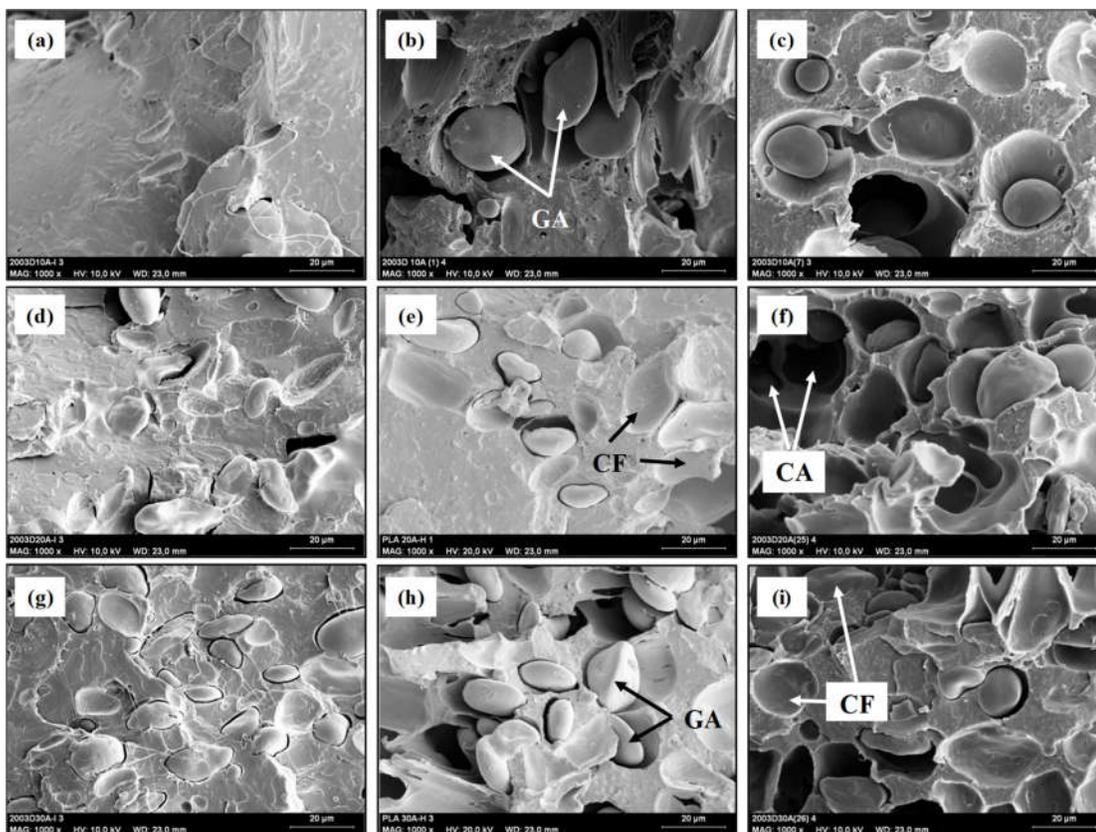


Figura 11 – Imagens de MEV (região interna) de amostras de P10A, imagens (a-c), P20A, imagens (d-f) e P30A, imagens (g-i). Aumentos de 1000X. Amostras: injetadas, imagens (a), (d) e (g); espumadas em forno, imagens (b), (e) e (h) e; espumadas em banho de glicerina, imagens (c), (f) e (i). Legenda: CF = célula fechada, CA = célula aberta e GA = grânulo de amido.

Na Figura 11 as imagens (b-c), (e-f) e (h-i) mostram amostras espumadas, as quais, apresentaram as mesmas características presentes nas amostras precursoras, ou seja, duas fases distintas e a dispersão dos grânulos de amido. No entanto, ao comparar as lacunas entre as fases das espumas com as amostras precursoras, imagens (a), (d) e (g), notou-se um aumento no tamanho das lacunas nas espumas. Isto é devido à expansão da matriz de PLA pela liberação do CO_2 adsorvido nas amostras precursoras durante o período de permanência no interior do autoclave. Além disso, os grânulos de amido atuaram como centros de nucleação para a expansão e geração de poros, após a remoção dos grânulos. Nas imagens (c) e (f) também foram encontradas células abertas e fechadas criadas na expansão da matriz de PLA. Hao et al. (2007) estudaram os efeitos de distintas condições de pressão e períodos na formação de espumas de PLA/amido em CO_2 supercrítico e relataram também a expansão da matriz de PLA com a criação de células abertas e fechadas.⁹⁹

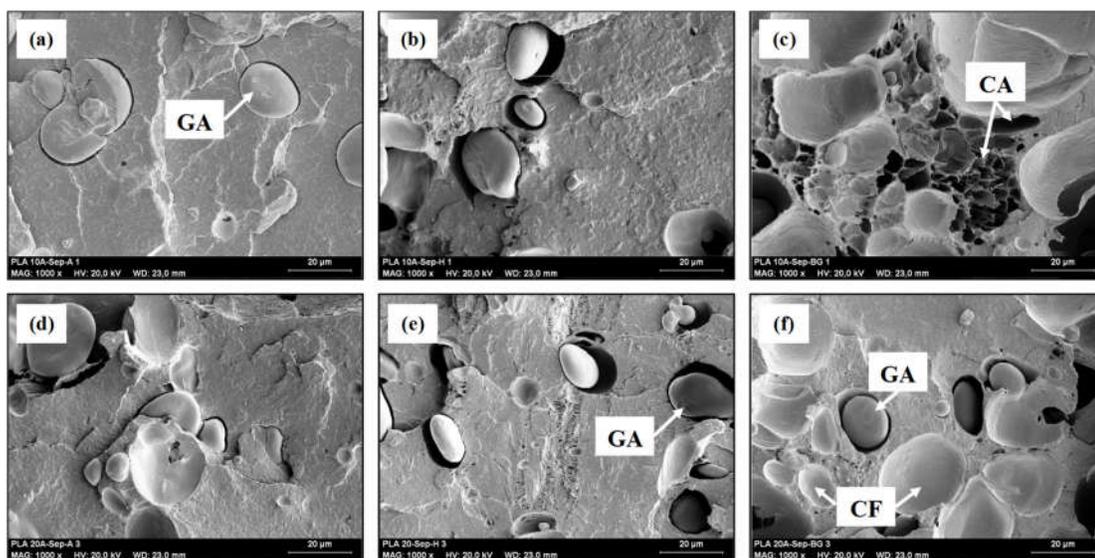


Figura 12 – Imagens de MEV (região interna) de amostras de P10AS, imagens (a-c) e P20AS, imagens (d-f). Aumentos de 1000X. Amostras: em autoclave, imagens (a) e (d); espumadas em forno, imagens (b) e (e); espumadas em banho de glicerina, imagens (c) e (f). Legenda: CF = célula fechada, CA = célula aberta e GA = grânulo de amido.

Nas imagens (b-c) das amostras espumadas de P10AS, e nas imagens (e-f) das amostras espumadas de P20AS da Figura 12, percebeu-se também a presença das duas fases distintas, a dispersão dos grânulos de amido e o aumento no tamanho das lacunas nas espumas, imagens (b-c) e (e-f). Na comparação das amostras espumadas de P10A, imagens (b-c), e P20A, imagens (e-f) da Figura 11, com as de P10AS, imagens (b-c), e P20AS, imagens (e-f) da Figura 11; observou-se que nas amostras de P10AS ocorreu uma maior geração de células com menores dimensões e mais compactas. Isto demonstra que a SEP apresentou, assim como os grânulos de amido, o comportamento de agente de nucleação.

Lee e Hanna (2008) investigaram o efeito de distintas quantidades (1, 3, 5, 7, wt%) de montmorilonita (MNT), uma nanoargila similar a SEP, em espumas de PLA e TPS de tapioca (fécula extraída de mandioc) (90/10 wt%). Nesse trabalho os pesquisadores observaram que na adição de MNT, os nanocompósitos apresentaram um tamanho de célula visivelmente reduzida, células mais compactas e aumento da densidade celular. Segundo os autores, as partículas de MNT dispersas agiram como locais de nucleação para formação de células.¹⁰⁰

3.2 Medidas de densidade

As Figuras 13 e 14 apresentam as densidades das amostras PLA, P(10-30)A e P(10-30)AS em distintas etapas de processamento e a Tabela 8 apresenta os valores percentuais das diferenças das densidades das amostras entre os processos: i) autoclave em relação a injeção e ii) os processos de forno e banho de glicerina em relação à autoclave.

Tabela 8 – Diferença percentual das densidades das amostras entra as etapas de processamento.

Amostra	Aut.-Inj [%]	For.-Aut. [%]	Bg.-Aut. [%]
PLA	0,00	-0,80	-23,20
P10A	-1,56	1,59	-15,08
P20A	2,34	-0,76	-12,21
P30A	-1,53	1,55	-6,98
P10AS	1,59	1,56	-28,13
P20AS	-6,30	11,76	9,24
P30AS	-3,08	5,56	-7,14

Legenda: Inj. = Injeção; Aut. = Autoclave; For = Forno; Bg. = Banho de glicerina. Os valores negativos significaram diminuição na ρ das amostras.

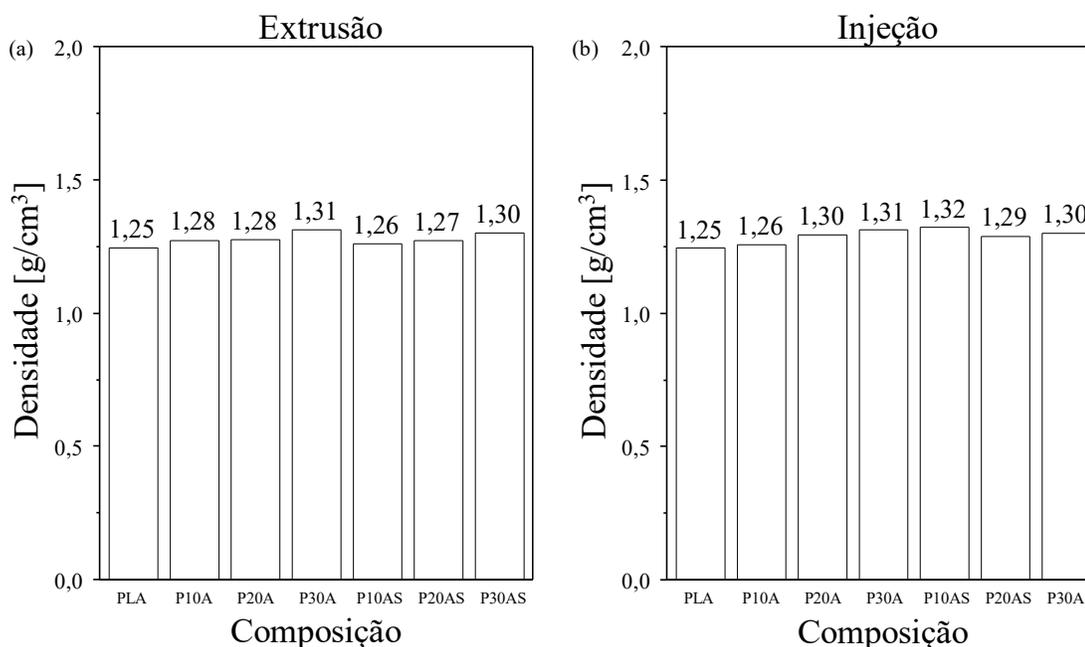


Figura 13 – Densidades das amostras PLA, P(10-30)A e P(10-30)AS após extrusão (a) e injeção (b).

A Figura 13 (a-b) apresenta os gráficos de barras das densidades das amostras para os processos de extrusão e injeção. Nos gráficos da Figura 13 não foram observadas alterações

significativas, tanto com relação a composição das amostras quanto para a etapa de processamento.

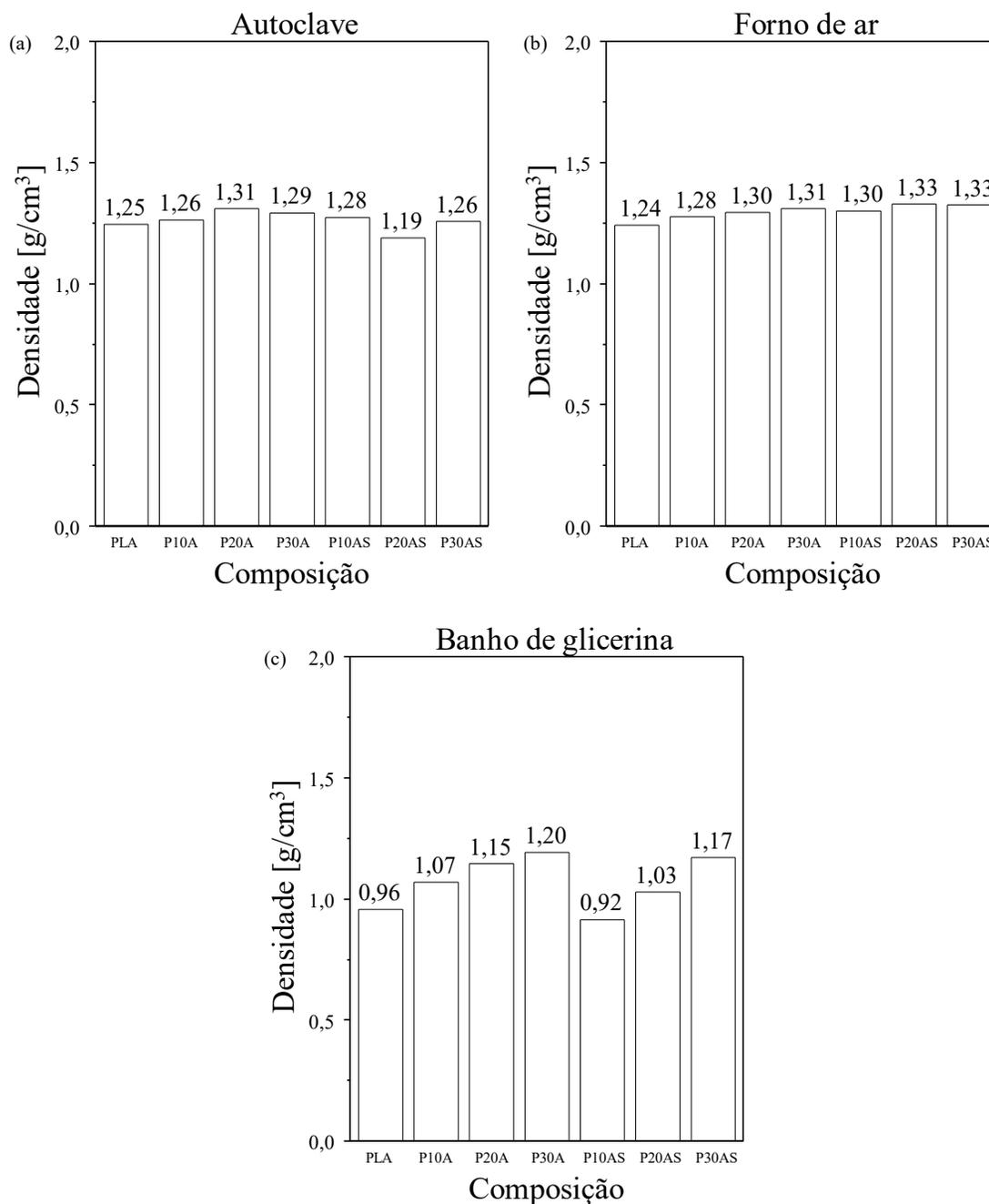


Figura 14 – Densidade das amostras PLA, P(10-30)A e P(10-30)AS após a permanência no autoclave (a), em forno de ar forçado (b) e em banho de glicerina (c).

A Figura 14 (a-c) apresenta os gráficos de barras das densidades das amostras oriundas do autoclave, do forno de ar forçado e do banho de glicerina, respectivamente. Nas amostras

oriundas do autoclave e do forno de ar forçado, Figuras 14 (a-b) respectivamente, as densidades foram similares aos obtidos nas etapas pré-espumação (extrusão e injeção), variando entre 1,19 e 1,31 g/cm³ (autoclave) e 1,24 e 1,33 g/cm³ (forno). Nessa situação podemos verificar que o processo em forno foi ineficaz para espumar as amostras. Na espumação por banho de glicerina, Figura 14 (c), as densidades apresentaram uma diminuição, variando entre 0,92 e 1,20 g/cm³, valores inferiores aos das etapas pré-espumação. Adicionalmente, mesmo na expansão por banho de glicerina o efeito da adição das cargas nas amostras foi notado, com o aumento da densidade com o crescimento da quantidade de amido nas amostras.

Os parâmetros de impregnação de CO₂ e a permanência das amostras no interior do autoclave, foram os seguintes: i) temperatura de 40 °C; ii) pressão de 80 bar e iii) período de 24 h. Adicionalmente, foram colocadas amostras com mescla de materiais, sendo assim, era de se esperar que as ρ variassem pouco, neste caso entre 1,19 e 1,31 g/cm³, Figura 14 (a). As amostras em autoclave que apresentaram uma redução percentual nas ρ em comparação com a das amostras injetadas foram as P20AS e P30AS, respectivamente de 6,30 e 3,08 % (Tabela 20). Esses valores obtidos podem estar associados a presença dos grânulos de amido e da SEP, que apesar de servirem como centros de nucleação podem ter impedido maiores expansões volumétricas e conseqüentemente menores densidades.

Matuana (2008) estudou o efeito das condições de espumação (temperatura e tempo) na fração vazia, na relação de expansão volumétrica, na resistência ao impacto e nas propriedades de tração de filmes de PLA espumados. Nesse trabalho as amostras de PLA foram moldadas por compressão e cortadas em retângulos de 1 x 2 cm. Os pesos originais das amostras foram medidos utilizando uma balança digital de precisão, em seguida colocadas em uma câmara de pressão e saturadas com CO₂ a alta pressão (MPa 5,52 ou 800 psi) à temperatura ambiente por 2 dias e espumadas em banho de glicerina. As morfologias microcelulares desenvolvidas nas amostras de PLA foram fortemente associadas às condições de espumação. Uma redução significativa de ρ , acima de 39 %, e a expansão volumétrica (o dobro em relação ao PLA não espumado) foram alcançados pela criação de estruturas microcelular espumada em amostras PLA, principalmente devido à alta concentração de CO₂ absorvido pelas amostras de PLA.⁹⁵ Estes resultados foram esperados porque o número de bolhas nucleadas, durante a espumação, depende fortemente da concentração do gás dissolvido na matriz de polímero fundido.^{95,96} Da mesma forma, uma grande quantidade de moléculas de gás deve estar disponível no polímero para o crescimento de células atingir uma taxa de expansão de grande volume.

Zhang e Sun (2007) estudaram espumas biodegradáveis de PLA/amido preparadas por extrusão utilizando a água como um agente de expansão e talco como agente de nucleação. As espumas foram obtidas sob as seguintes condições: PLA/amido (40/60 wt%), 15 % água, temperatura de saída na extrusora de 195 °C, orifício de saída de 3 mm, velocidade de rosca de 200 rpm e 2 % de talco. Os pesquisadores observaram que o tamanho e a distribuição celular foram significativamente afetados pelas condições de extrusão e composições de materiais. A ρ permaneceu a mesma na presença de aditivos sólidos inorgânicos (agentes de nucleação) e aumentou ligeiramente na concentração de talco de 3 %.¹⁰¹

Neste estudo a expansão das amostras ocorreu pelo uso de forno ou por banho de glicerina e em ambas rotas o agente de expansão foi o CO₂. Antes da adsorção do gás em autoclave, os materiais foram secos em estufa para diminuir os efeitos da umidade durante o período de permanência e na posterior espumação. As maiores diminuições ocorreram com as amostras originárias do autoclave e do banho de glicerina, respectivamente. Essas diminuições são consistentes com a expansão da matriz de PLA observadas nas imagens de MEV das Figuras 11 e 12. Adicionalmente, outra associação pode ser feita entre os valores de ρ e os da cristalinidade X_c (Tabela 11) das amostras após o banho de glicerina. Tanto os valores de ρ quanto os da X_c nesse processo foram os menores valores obtidos, quando comparados com as demais etapas de processamento. Tal fato pode ter ocorrido devido a melhor transferência térmica, em comparação com o forno, permitindo que a matriz de PLA ficasse menos rígida, o que possibilitou uma maior expansão, conforme o CO₂ era liberado da amostra.

3.3 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

As Tabelas 9 e 10 exibem os valores das temperaturas de T_g e T_m das amostras em diferentes fases de processamento. Adicionalmente, junto aos valores da T_g e T_m para cada composição, encontram-se as médias e desvios padrões dessas, para demonstrar que tanto a T_g (de $59,2 \pm 1,8$ a $62,2 \pm 3,3$ °C) quanto a T_m (de $153,5 \pm 1,2$ a $155,6 \pm 3,3$ °C) apresentaram pequenas alterações nos seus valores em decorrência do processamento e da composição das amostras.

Semelhante a muitos polímeros termoplásticos, o PLA possui ambas, T_g e T_m , acima da T_g (aproximadamente 58,0 °C). O PLA comporta-se como uma borracha, enquanto que abaixo torna-se um material vítreo que ainda é capaz de ser resfriado até a temperatura de transição β (aproximadamente -45 °C), abaixo da qual se comporta como um polímero quebradiço¹¹³. A T_g do PLA é dependente tanto da massa molar quanto da pureza ótica do polímero. A pureza ótica é uma medida do excesso de um enantiômero sobre outro em uma amostra opticamente ativa. Um composto opticamente puro possui 100 % de um enantiômero. Uma mistura racêmica não apresenta pureza ótica, visto que os 50 % de um enantiômero cancela a atividade ótica dos 50 % do outro enantiômero. Por outro lado, uma amostra opticamente ativa que, por exemplo, contenha 75 % de um enantiômero dextrogiro e 25 % do levogiro, será somente 50 % opticamente pura. Assim, 25 % do enantiômero dextrogiro cancelará a atividade ótica dos 25 % de enantiômero levogiro, sobrando 50% do enantiômero dextrogiro, responsável pela rotação do plano de luz polarizada.

Conforme aumenta a massa molar do PLA a T_g alcança os valores máximos de 60,2; 56,4 e 54,6 °C para conteúdo de estereoisômero L de 100, 80 e 50 %, respectivamente.¹¹⁴ A T_m do PLA, estereoisômero puro (L ou D), é também uma função de sua pureza ótica. O maior valor prático obtido foi de 180 °C com entalpia de 40 a 50 J/g. A presença de meso-lactídeos na estrutura do PLA pode diminuir a T_m em 50 °C, dependendo da quantidade de lactídeos D incorporados ao polímero. Valores típicos da T_m para o PLA estão na faixa de 130 a 160 °C.¹⁰²

Tabela 9 – T_g [°C] das amostras em distintas etapas de processamento.

	Extrusão	Injeção	Autoclave	Banho de glicerina	Forno	\bar{x}
PLA	61,9	61,6	57,3	61,7	63,6	61,2 ± 2,3
P10A	61,2	61,3	57,9	62,6	61,3	60,9 ± 1,7
P20A	60,6	57,9	66,6	61,8	64,2	62,2 ± 3,3
P30A	61,0	57,4	57,3	60,9	59,7	59,2 ± 1,8
P10AS	61,2	60,6	59,2	60,6	60,1	60,3 ± 0,7
P20AS	60,4	60,6	63,7	59,7	57,1	60,3 ± 2,3
P30AS	59,5	60,8	67,0	57,6	58,1	60,6 ± 3,8

Tabela 10 – T_m [°C] das amostras em distintas etapas de processamento.

	Extrusão	Injeção	Autoclave	Banho de glicerina	Forno	\bar{x}
PLA	153,0	154,4	154,7	151,8	153,8	153,5 ± 1,2
P10A	153,8	156,3	155,5	154,3	154,7	154,9 ± 1,0
P20A	152,7	155,1	155,2	154,9	155,1	154,6 ± 1,1
P30A	155,0	153,5	154,3	154,3	155,9	154,6 ± 0,9
P10AS	152,4	156,3	155,1	153,9	156,0	154,7 ± 1,6
P20AS	153,9	156,6	155,6	154,7	157,0	155,6 ± 1,3
P30AS	150,2	157,3	157,1	154,9	158,4	155,6 ± 3,3

As Figuras 15 a 21 apresentam as curvas de DSC (1º ciclo) das amostras para os processos de extrusão, injeção, autoclave, espumação por banho de glicerina e espumação por forno, respectivamente. Alterações na X_c e no valor da entalpia das amostras foram observadas nas Figuras de 15 a 21 e na Tabela 11. Na Figura 15, foi possível perceber exclusivamente o efeito da rota de processamento. Nas demais figuras notaram-se os efeitos da etapa de processamento associado com as adições de amido (Figuras 16 a 18) e de SEP (Figuras 19 a 21) na matriz de PLA.

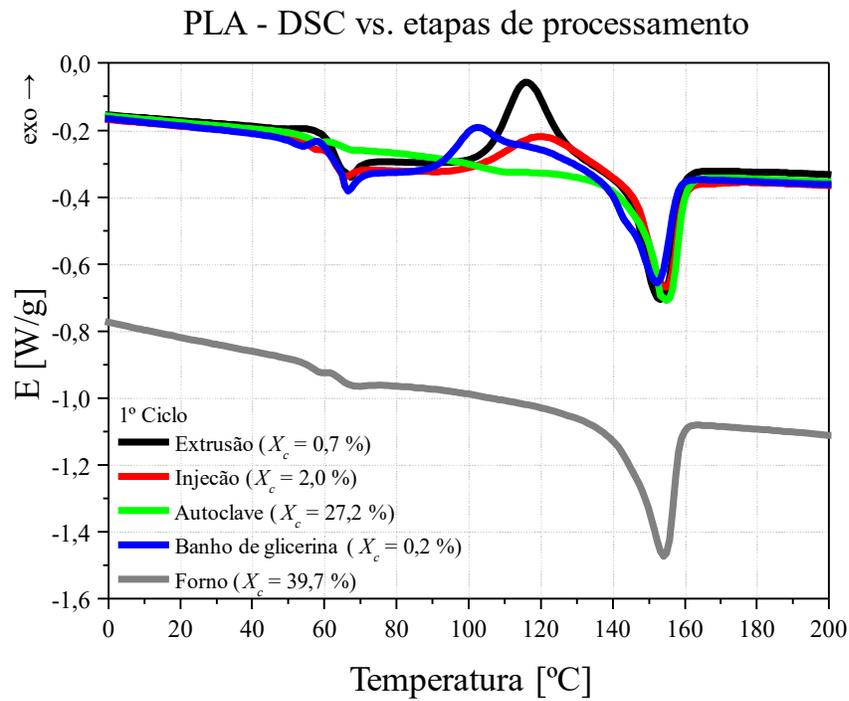


Figura 15 – Curvas de DSC para a amostra de PLA em distintas etapas do processo. X_c = cristalinidade [%] de cada amostra.

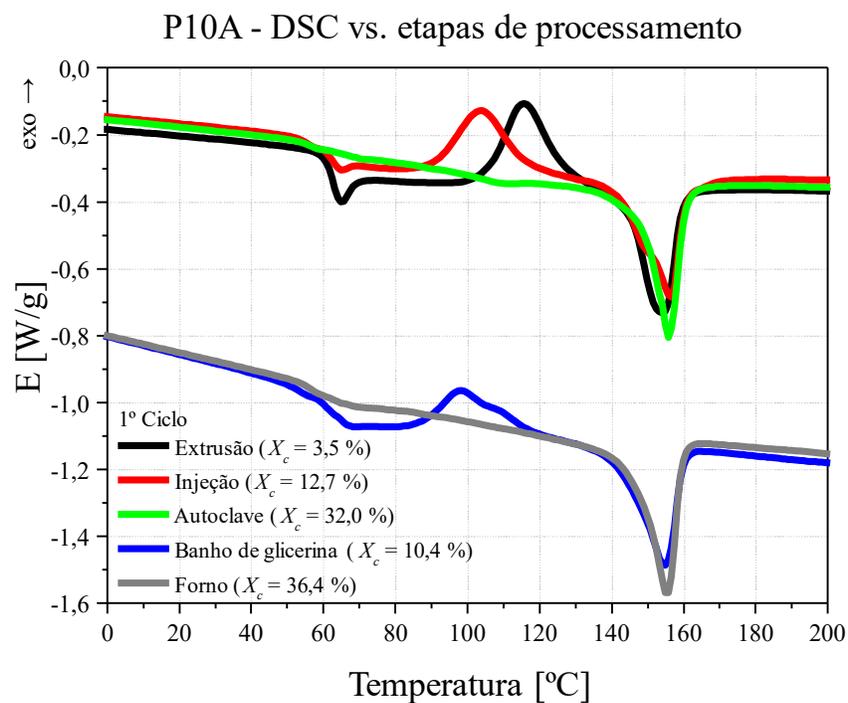


Figura 16 – Curvas de DSC para a amostra de P10A em distintas etapas do processo. X_c = cristalinidade [%] de cada amostra.

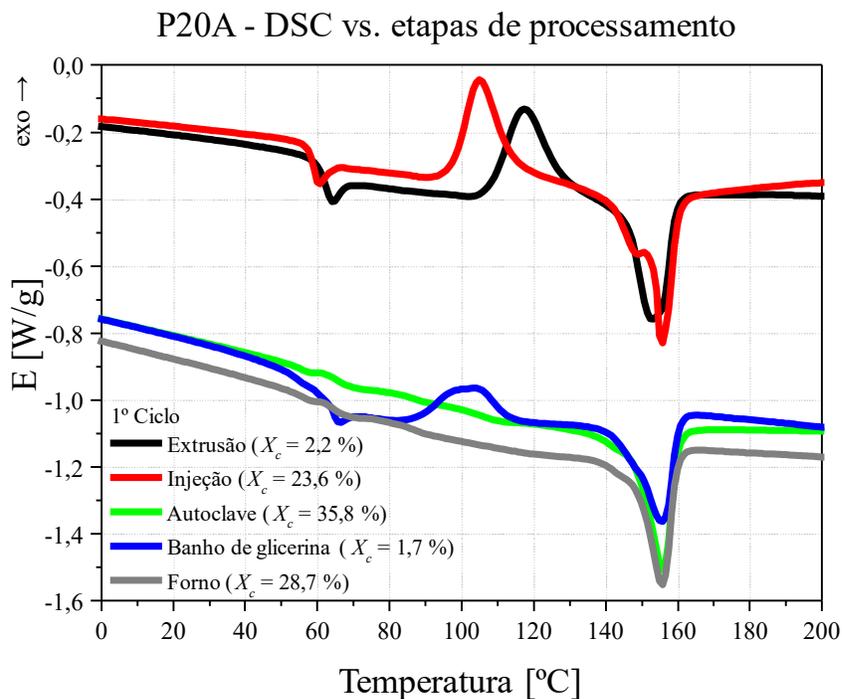


Figura 17 – Curvas de DSC para a amostra de P20A em distintas etapas do processo. X_c = cristalinidade [%] de cada amostra.

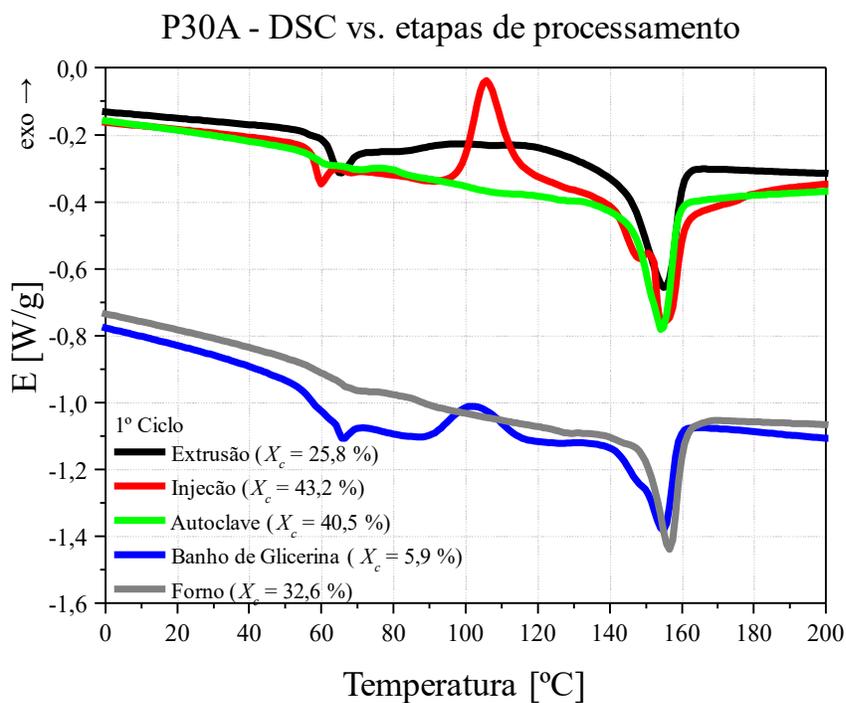


Figura 18 – Curvas de DSC para a amostra de P30A em distintas etapas do processo. X_c = cristalinidade [%] de cada amostra.

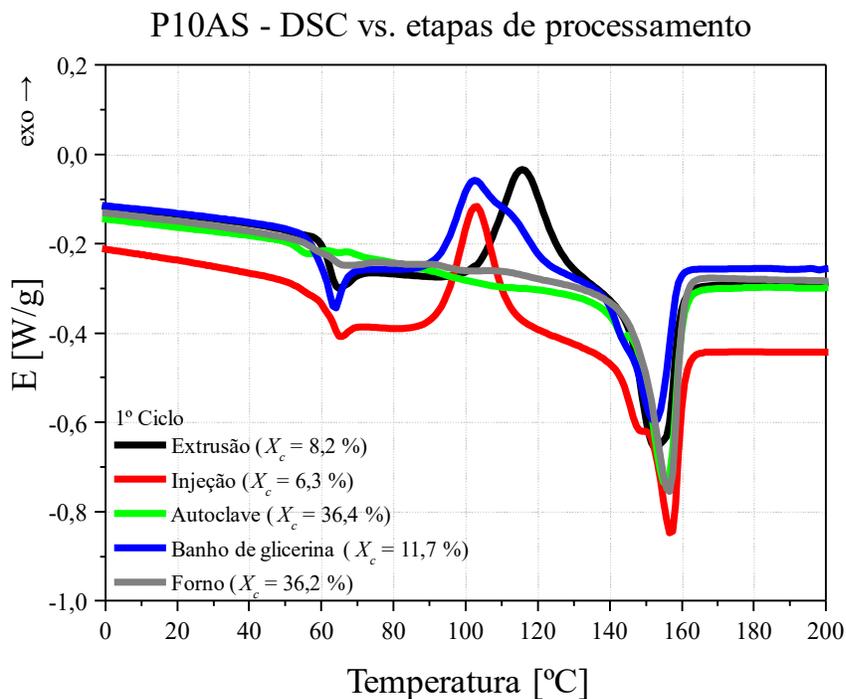


Figura 19 – Curvas de DSC para a amostra de P10AS em distintas etapas do processo. X_c = cristalinidade [%] de cada amostra.

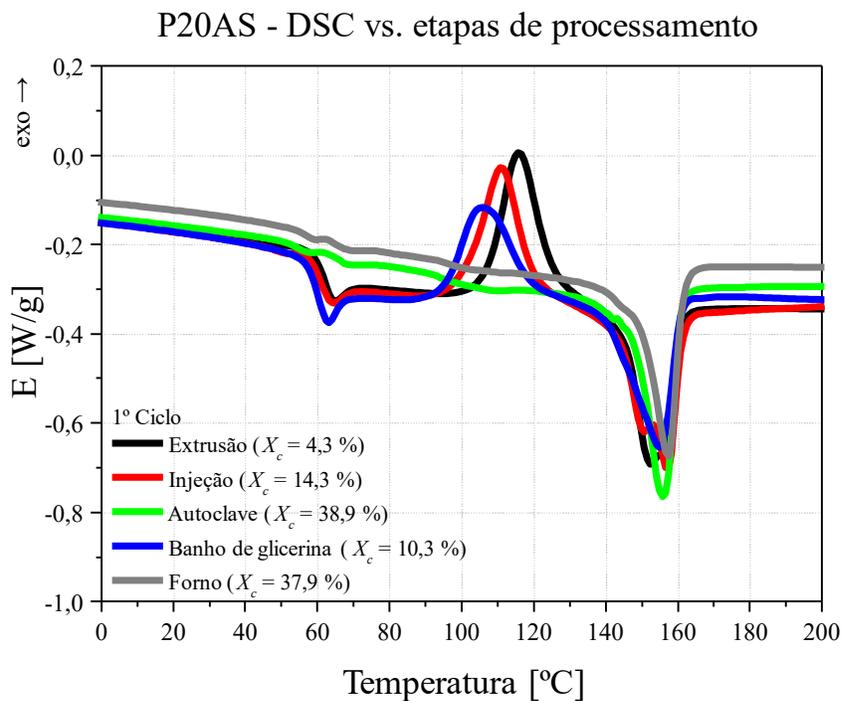


Figura 20 – Curvas de DSC para a amostra de P20AS em distintas etapas do processo. X_c = cristalinidade [%] de cada amostra.

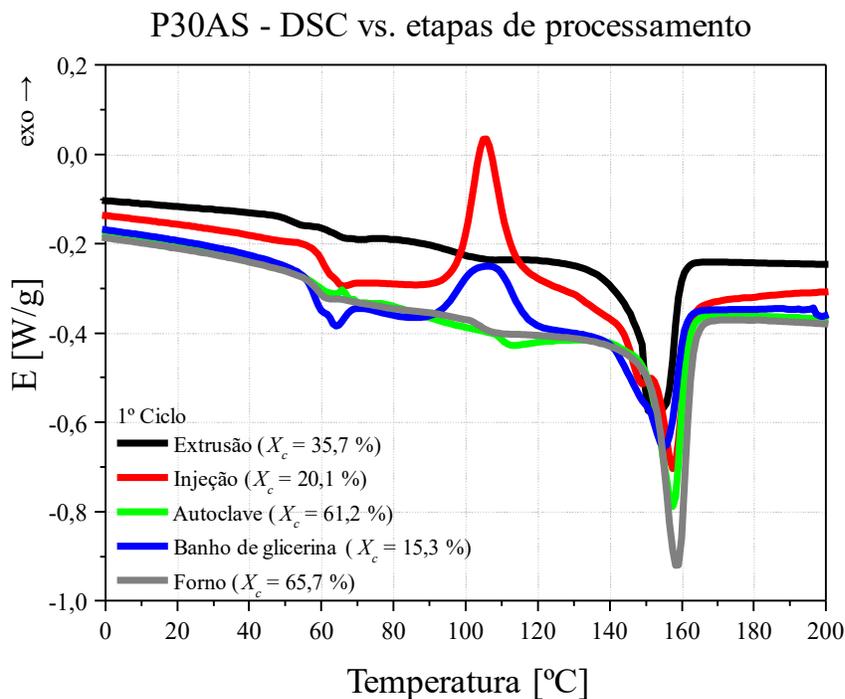


Figura 21 – Curvas de DSC para a amostra de P30AS em distintas etapas do processo. X_c = cristalinidade [%] de cada amostra.

A Tabela 11 expõe os valores das X_c das amostras, qual é calculada a partir da equação¹⁰²:

$$\text{Cristalinidade [\%]} = \frac{\Delta H_m - \Delta H_c}{93,1} \times 100 \quad (I)$$

onde ΔH_m e ΔH_c são o calor de fusão e o calor de cristalização, respectivamente. O valor constante 93,1 J/g é o ΔH_m para os homopolímeros PLLA o PDLA 100 % cristalinos. Adicionalmente, foi realizada a correção do valor X_c para cada composição de amostras e a Tabela 11 apresenta os fatores de correção. A correção das cristalinidades foi realizada dividindo-se os valores de X_c obtidos pela Eq. I, para cada amostra em todas as etapas de processamento, pelos fatores na Tabela 11. As Figuras 15 a 21 apresentam as X_c corrigidas. No que diz respeito às mudanças impostas pela rota de processamento, pelas adições de amido e de SEP, foram observadas grandes alterações.

Tabela 11 – X_c [%] das amostras em distintas etapas de processamento.

	Extrusão	Injeção	Autoclave	Banho de glicerina	Forno
PLA	0,7	2,0	27,2	0,2	39,7
P10A	3,5	12,7	32,0	10,4	36,4
P20A	2,2	23,6	35,8	1,7	28,7
P30A	25,8	43,2	40,5	5,9	32,6
P10AS	8,2	6,3	36,4	11,7	36,2
P20AS	4,3	14,3	38,9	10,3	37,9
P30AS	35,7	20,1	61,2	15,3	65,7

Tabela 12 – Fatores de correção da X_c das amostras

	Fator
P10A	0,90
P20A	0,80
P30A	0,70
P10AS	0,89
P20AS	0,79
P30AS	0,69

No que diz respeito à sequência de processamento utilizado, geralmente após a injeção, as amostras apresentaram um aumento na X_c , exceto para a amostra injetada de P10AS ($X_c = 6,3$ %), menor do que o da amostra extruída ($X_c = 8,2$ %), Figura 21. Ghosh et al. (2007) investigaram a relação entre o processamento, a morfologia e as propriedades mecânicas de PLLA moldado por injeção. Nesse trabalho os parâmetros de processamento foram os seguintes: i) temperaturas de fusão de 165 e 220 °C; ii) temperaturas do molde de 24 e 60 °C; iii) taxas de fluxo de injeção de 7 e 28 cm³ s⁻¹ e; iv) pressões de injeção de 7 e 29 MPa. Nas condições experimentais utilizadas por Ghosh et al. (2007), as medidas DSC do PLLA processado mostraram que a X_c das amostras de PLLA foi pequena, variando entre 1,5 e 6,2 %. Tal fato decorre da cinética de cristalização lenta desse polímero e das taxas rápidas de resfriamento ao longo do processo de injeção.^{103,104}

A cristalização em polímeros durante o processo de moldagem por injeção é um fenômeno complexo que envolve estresse termomecânico, taxas de cisalhamento e de resfriamento.¹¹⁸ Adicionalmente, as medidas DSC (extrusão, injeção e banho de glicerina – Figuras 15 a 21) mostraram a presença dos picos característicos da cristalização fria exotérmica e da fusão endotérmica. A T_g do PLLA variou de 58,1 a 60,9 °C (uma variação de 4,8 %).¹¹⁶ No presente trabalho os valores de X_c (2,0 %) e da T_g (61,6 °C) obtidas das amostras injetadas foram similares ao reportado por Ghosh et al. (2007).¹⁰³

A X_c das amostras de PLA exibiram variações destacadas durante o período de permanência em autoclave, com valores de 27,2 % (Figura 15). O comportamento de crescimento da X_c foi usualmente mantido para as amostras que permaneceram na autoclave, em comparação com as amostras das etapas anteriores de injeção e de extrusão. A exceção foi a amostra P30A, em que a X_c do precursor, 43,2 %, foi maior do que a da amostra em autoclave com o valor de 40,5 % (Figura 18). Adicionalmente, observou-se somente transições de primeira ordem de natureza endotérmica, relativa a fusão (Figura 15 e Tabela 9).

Liao, Nawaby e Whitfield (2010), avaliaram o efeito do CO₂ sobre as propriedades físicas do PLLA e sobre a formação de domínios cristalinos. As amostras foram produzidas por moldagem térmica (190 °C), seguida de resfriamento em água gelada, no formato de folhas de 300 a 400 µm de espessura. As amostras foram submetidas a dois ciclos de saturação em autoclave: no primeiro as condições experimentais foram de: temperatura de 25 °C e pressões de 0,1 a 3,5 MPa; no segundo com uma temperatura de 0 °C e pressão de 2,8 MPa. Em ambos o tempo de permanência dentro do autoclave foi de 24 h e entre os ciclos de saturação ocorreu um intervalo de 7 dias. Após o segundo ciclo de saturação, as amostras foram rapidamente despressurizadas e posteriormente espumadas em temperaturas entre 50 e 100 °C. Os pesquisadores relataram que a presença de CO₂ na matriz polimérica induziu a cristalização no PLA, com a X_c aumentando em conformidade com o crescimento da pressão de CO₂.¹⁰⁵ Os valores da X_c variaram de 12 a 30 %, para as pressões de 0,1 a 3,5 MPa, respectivamente. No presente trabalho para as amostras de PLA em autoclave (P = 8 MPa, T = 40 °C e t = 24 h) o valor da X_c foi de 27,2 % (Figura 15 e Tabela 11).

É sabido que a absorção de CO₂ em um polímero reduz sua T_g , devido ao aumento da fração de volume livre e que melhora a mobilidade das cadeias poliméricas. A absorção de CO₂ resulta em considerável inchaço em polímeros amorfos e cristalização em polímeros semicristalinos, pelo reordenamento das cadeias do polímero em baixas temperaturas.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Porém, somente a presença de CO₂ não provoca alteração na estrutura cristalina do PLA, sendo necessário o aumento da pressão do gás. Devido ao aumento da pressão de CO₂, a fração de volume de CO₂ absorvida aumenta, assim, melhora a mobilidade da cadeia. Portanto, o realinhamento das cadeias para uma estrutura cristalina de baixa energia livre é termodinamicamente favorável, resultando em maior X_c a pressão elevada e, enquanto isso, o pico de cristalização fria desaparece.¹⁰⁵

Na fase de espumação das amostras, em ambos os processos, a temperatura utilizada foi de 170 °C durante um período de 30 s e a X_c expressou dois comportamentos distintos. Nas espumas produzidas em banho de glicerina, a X_c diminuiu comparativamente em relação aos

processos anteriores para todas as composições de material. O maior valor de X_c na espumação em banho de glicerina foi de 15,3 % para a amostra de P30AS (Figura 21 e Tabela 11). As amostras processadas em forno mostraram um comportamento inverso àquelas em banho de glicerina, ou seja, com valores de X_c maiores, ao passo que o menor valor de X_c foi 28,7 % para a amostra P20A (Figura 17 e Tabela 11). Tal distinção no comportamento da X_c ocorreu porque tanto no banho de glicerina quanto no forno de ar forçado verificou-se a formação de cristais. Porém, esses, nas amostras em banho de glicerina, devido a melhor transferência térmica, foram fundidos. Por sua vez, no forno os cristais permanecerem presentes em virtude de uma pior transferência térmica.

Adicionalmente, nas amostras processadas em forno foram observadas somente transições de primeira ordem de natureza endotérmica (Figura 15 e Tabela 9) e tal comportamento ocorre porque as amostras em forno não foram de fato espumadas, pois nessas se deu o processo de *annealing*, que consiste em aquecer um polímero permitindo com que as cadeias desse possam se movimentar mais livremente formando estruturas cristalinas (cristalitos) adicionais. Ao aumentar a temperatura de *annealing* a entalpia de relaxamento é reduzida, e até mesmo desaparece quando as amostras sofrem *annealing* a uma determinada temperatura. A mobilidade segmentar pode causar uma redução do volume livre, portanto, menos energia é necessária para a recuperação segmentar, o que resulta em menor entalpia. Quando a temperatura de *annealing* é alta o suficiente, o movimento das cadeias moleculares se torna mais fácil do que o movimento anteriormente restrito em temperaturas inferiores a T_g .¹⁰⁹

Complementarmente, o conteúdo da fase amorfa do PLA diminui durante o processo de *annealing*, resultando que a T_g possivelmente não seja identificada pela medida de DSC. Além disso, os domínios ordenados favorecem o processo de nucleação devido a uma barreira energética reduzida¹¹⁰ e a X_c apresenta uma tendência de crescimento. A razão deste fenômeno é que a mobilidade das cadeias moleculares é aumentada quando as amostras sofrem *annealing* em temperaturas acima de T_g . Isto é propício para a orientação preferencial das cadeias moleculares, resultando em aumento na X_c . Enquanto isso, o pico de cristalização fria desaparece, como foi demonstrado pelos termogramas de DSC.¹⁰⁹

Em geral, a adição do amido ao PLA implicou no aumento da X_c . Tal efeito pode ser observado nas amostras após todas as etapas de processamento, desde a extrusão até a espumação. A exceção ocorreu nas amostras em forno com uma diminuição da X_c associada ao crescimento da quantidade de amido na amostra. O crescimento da X_c das amostras com a adição do amido sucedeu-se devido a interface entre amido e PLA ser mais energética, fato que

facilita a formação de cristais na matriz de PLA. Os grânulos de amido adicionados a matriz de PLA atuam como agentes de nucleação para a cristalização.¹¹¹⁻¹²⁰

Nas amostras contendo SEP, em geral, maiores valores de X_c foram observados quando comparados com as amostras de PLA/amido, nas mesmas proporções de materiais. Esse comportamento somente não ocorreu nas amostras injetadas (Tabela 11). Wu et al. (2015) no estudo do efeito da SEP (conteúdo variando de 0,5 a 2,0 wt%) na cinética de cristalização de nanocompósitos com o PLA extruídos (extrusora de rosca dupla, operada na faixa de temperaturas de 150 a 160 °C e velocidade de rosca de 60 rpm) seguidos de moldagem por injeção (injetora P = 50 bar e temperaturas de plastificação e de molde de 180 e 50 °C, respectivamente), verificaram que ocorreu um aumento na X_c e nas entalpias de fusão para todos os nanocompósitos, com uma concentração ótima percentual de SEP de 1,0 wt%, valor suficiente para a nucleação. Adicionalmente, com a adição de SEP a T_g permaneceu inalterada e com o valor de 61,3 °C; em contraste a T_m aumentou moderadamente com um valor de 151,5 °C. Esses comportamentos provavelmente estão associados ao efeito da SEP como agente nucleante no PLA, fazendo com que as cristalizações de fusão e de resfriamento do PLA sejam simultaneamente aceleradas e melhoradas, respectivamente.¹²¹

Devido aos parâmetros aplicados à rota de processamento escolhida, ou seja, extrusão seguida de injeção; autoclave e posterior espumação em banho de glicerina ou em forno de ar quente, as energias mecânicas e térmicas no sistema variaram drasticamente, ora aumentando, ora diminuído. Tal fato pode justificar que em algumas etapas do processo, a X_c fosse aumentada e em outras diminuída. Finalmente, a ausência de uma variação da cristalinidade de forma proporcional à quantidade de amido deve-se, em grande parte, à distribuição não homogênea do amido na matriz de PLA, apesar do processo inicial de extrusão.

Distintas técnicas de processamento são usadas na produção de dispositivos para regeneração tecidual provenientes de polímeros. Já foi estabelecido que as técnicas de processamento influenciam nas propriedades mecânica na X_c e dentre outras propriedades desses materiais.¹²²

A X_c de um material afeta não somente as propriedades físico-mecânicas, mas também a biodegradabilidade. No caso de polilactatos cristalinos estéreos complexos tem sido relatado que esses possuem maior estabilidade térmica (útil para processos de esterilização térmica), mas também apresentam fragilidade mecânica.^{123,124} Também é sabido que a taxa de biodegradação é mais lenta em amostras semicristalinas, do que nas amorfas^{125,126}, daí a taxa de biodegradabilidade diminuir com um maior índice de X_c . Além disso, foi reportado que a

biodegradação é reduzida em cristais polilactídeos estéreos complexos, em comparação com os monocristais.^{127,128}

As características da X_c , que derivam da complexa estereoquímica dos polilactatos, podem ser fatores importantes que afetam a viabilidade celular e a aderência quando usados em aplicações de engenharia tecidual.¹²⁹ Deuka et al. (1999) avaliaram pinos de PLLA produzidos com distintos valores de X_c . Esses pinos foram submetidos a testes *in vitro* para investigar os efeitos da degradação nas propriedades mecânicas, térmicas e estruturais, bem como a variação de massa molar. Os pinos foram moldados e imersos em uma solução tampão fosfato (pH = 7,4) por 6 meses. Os resultados mostraram que os pinos com maior X_c perderam suas propriedades mecânicas mais rapidamente, apesar de que um aumento no grau de X_c para ambos os tipos de pinos foi observado ao longo do tempo. Análises estruturais mostraram uma erosão superficial e interna após dois meses de degradação. Os autores concluíram que uma maior retenção das propriedades mecânicas do PLA menos cristalino revelou-se útil na produção de implantes, onde a estimulação de osteossíntese é desejada.¹³⁰ Por sua vez, Areias et al. (2012) produziram substratos de PLLA pela técnica de *electrospinning* com fibras alinhadas e não alinhadas e distintos graus de X_c variando entre 0 e 50 %. Esses dois fatores, o alinhamento da fibra e grau de X_c , afetaram fortemente a hidrofobicidade das amostras, sendo maior para os substratos com fibras alinhadas e para as fibras com um maior grau de X_c . Considerando que o primeiro efeito pode ser associado com uma diminuição do grau de porosidade, o segundo deve estar relacionado com um aumento na rigidez de fibra. A proliferação de condrócitos humanos cultivados em uma monocamada sobre estes substratos foi semelhante nos substratos amorfos alinhados e não-alinhados. A cristalização dos substratos alinhados, por outro lado, quase suprimiu a proliferação e as células produziram quantidades mais elevadas de *agrecanos*, que são proteoglicanos que contêm ácido hialurônico, característico da matriz extracelular da cartilagem hialina.¹³¹ Adicionalmente, Washburn et al. (2009) demonstraram que a X_c pode induzir alterações topográficas e que os osteoblastos se proliferaram melhor em regiões suaves do que em ásperas em função da X_c variada.¹³²

3.4 Análise mecânica

As Figuras 22 a 29 apresentam os resultados obtidos nos ensaios de flexão e tração correspondentes a cinco ensaios realizados em distintas amostras, de cada composição de materiais. Nas Figuras 22 e 23 encontram-se as curvas de deformação percentual. Nas Figuras 24 a 26 estão os valores da resistência e deformação máximas, da tensão e deformação de rupturas e do módulo de elasticidade, respectivamente, no ensaio de flexão. Nas Figuras 23 a 29 estão os valores da resistência e deformação máximas, da tensão e deformação de rupturas e do módulo de elasticidade, respectivamente, no ensaio de tração.

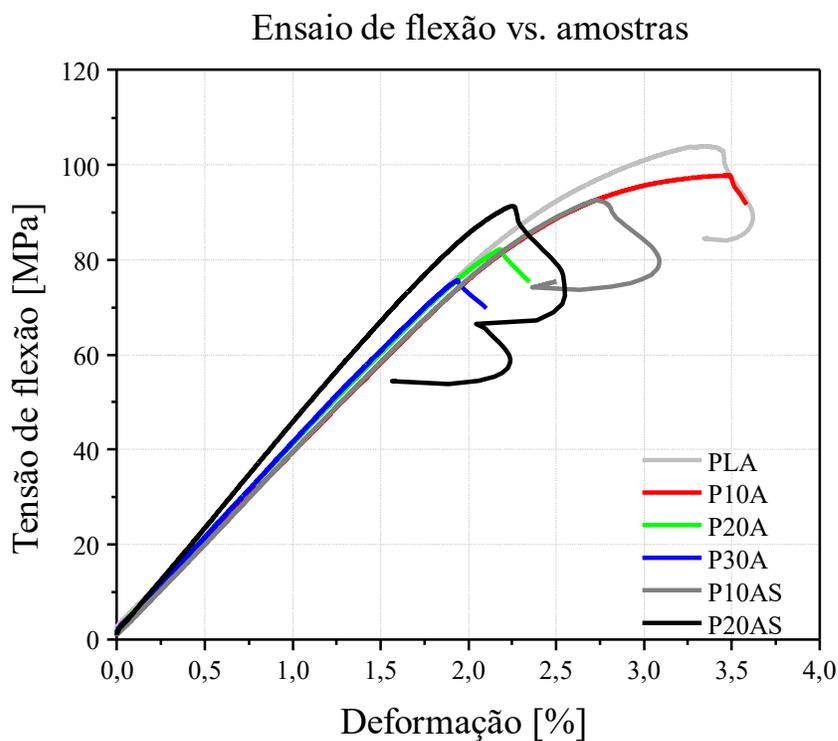


Figura 22 – Curvas de tensão de flexão vs. deformação para distintas composições das amostras.

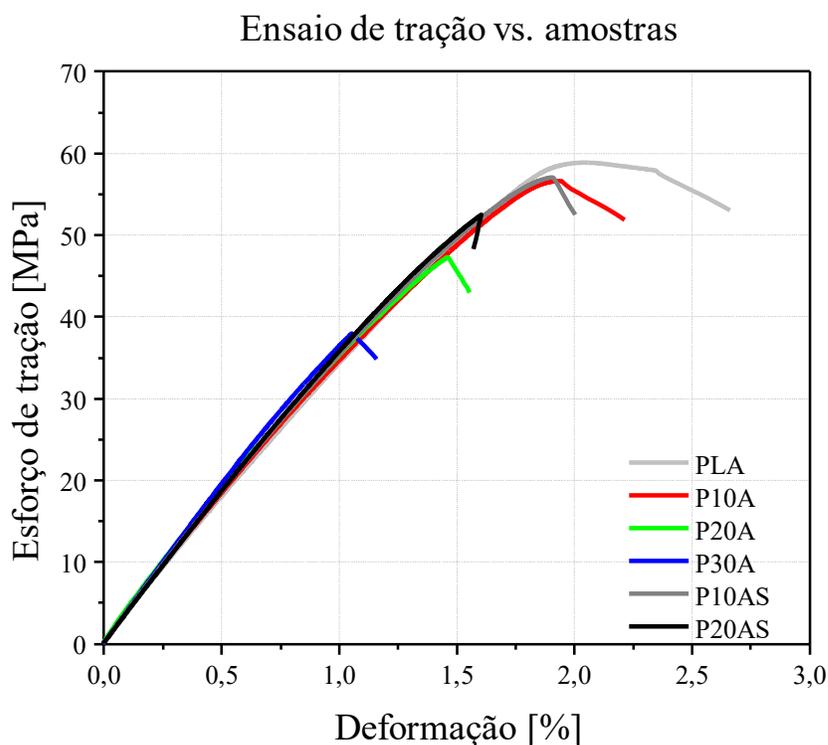


Figura 23 – Curvas de esforço de tração vs. deformação para distintas composições das amostras.

Nas Figuras 22 e 23 a tensão de flexão e o esforço de tração presentes nos eixos das ordenadas possuem definições diferentes. Na Figura 22 a tensão de flexão é o esforço suportado pela amostra durante um teste de flexão¹³⁴; na Figura 23 o esforço de tração é esforço real associado com a secção transversal real da amostra.^{135,136} Adicionalmente, nas Figuras 22 e 23 foi observado o efeito da adição do amido e da SEP na matriz de PLA. Em geral, as tensões de flexão foram maiores do que os esforços de tração. Comparativamente, os valores de tensão, de esforço e da deformação percentual obtidos nos dois ensaios apresentaram uma diminuição em ambas medidas conforme aumentou-se o conteúdo de amido nas amostras. Além disso, nos dois ensaios as amostras com SEP apresentaram ambas medidas com valores maiores do que as amostras P10A e P20A, excetuando-se a medida de flexão das amostras P10A que apresentaram comportamento contrário.

No presente projeto de doutorado as faixas de valores obtidos para a deformação e para o esforço de tração foram de 1,0 a 2,7 % e 35 a 60 MPa, respectivamente. Huneat e Li (2007) no estudo das propriedades e da morfologia de blendas compatibilizadas (anidrido maleico e o iniciador peróxido 2,5-dimetil-2,5-di-(tert-butilperoxi)-hexano, como agentes de compatibilização) de PLA e amido termoplástico TPS (glicerol e água, como plastificantes) extruídas, observaram que para as blendas sem plastificantes e compatibilizantes, as amostras

não se alongaram depois que a tensão máxima foi atingida e o alongamento na ruptura ocorreu na faixa entre 10 e 20 %. Além disso, também perceberam que conforme a quantidade de amido aumentou, o esforço de tensão diminuiu, variando de 60 a 20 MPa. Tais comportamentos ocorreram nas blendas sem modificações porque os grânulos dispersos na matriz de PLA levam a falhas prematuras, ou seja, as partículas dispersas atuam como defeitos que iniciam rachaduras no material.¹³⁷

As Tabelas 13 a 15 exibem os valores (médias e desvios padrões) da resistência e deformação máximas, da tensão e deformação de ruptura e do módulo de elasticidade, respectivamente, no ensaio de flexão.

Tabela 13 – Resistência e deformação máximas obtidas no ensaio de flexão.

	Resistência [MPa]		Deformação [%]	
	\bar{x}	\pm	\bar{x}	\pm
PLA	106,7	2,3	4,0	0,5
P10A	97,9	0,8	3,6	0,1
P20A	83,3	1,9	2,3	0,1
P30A	78,8	4,0	2,1	0,1
P10AS	96,2	4,2	3,2	0,4
P20AS	93,4	5,7	2,4	0,2

Tabela 14 – Tensão e deformação de ruptura obtidas no ensaio de flexão.

	Tensão [MPa]		Deformação [%]	
	\bar{x}	\pm	\bar{x}	\pm
PLA	101,4	2,2	3,4	0,9
P10A	92,3	3,0	2,2	0,1
P20A	82,4	2,3	1,7	0,1
P30A	77,4	3,2	1,3	0,2
P10AS	91,4	4,0	2,1	0,1
P20AS	88,7	5,4	1,7	0,1

Tabela 15 – Módulo de elasticidade obtido no ensaio de flexão.

	Módulo [MPa]	
	\bar{x}	\pm
PLA	3828,4	22,9
P10A	3619,4	55,9
P20A	3832,2	95,9
P30A	3820,2	232,8
P10AS	3786,8	353,4
P20AS	4369,0	577,5

Na Figura 24, a resistência máxima é definida como o maior esforço suportado pela amostra durante o teste e a deformação máxima é a deformação em flexão correspondente à resistência máxima em flexão.¹³⁴ Na Figura 25 a tensão de ruptura é definida como o maior esforço suportado pela amostra durante o teste e a deformação de ruptura é a deformação em flexão correspondente a ruptura da amostra.¹³⁴

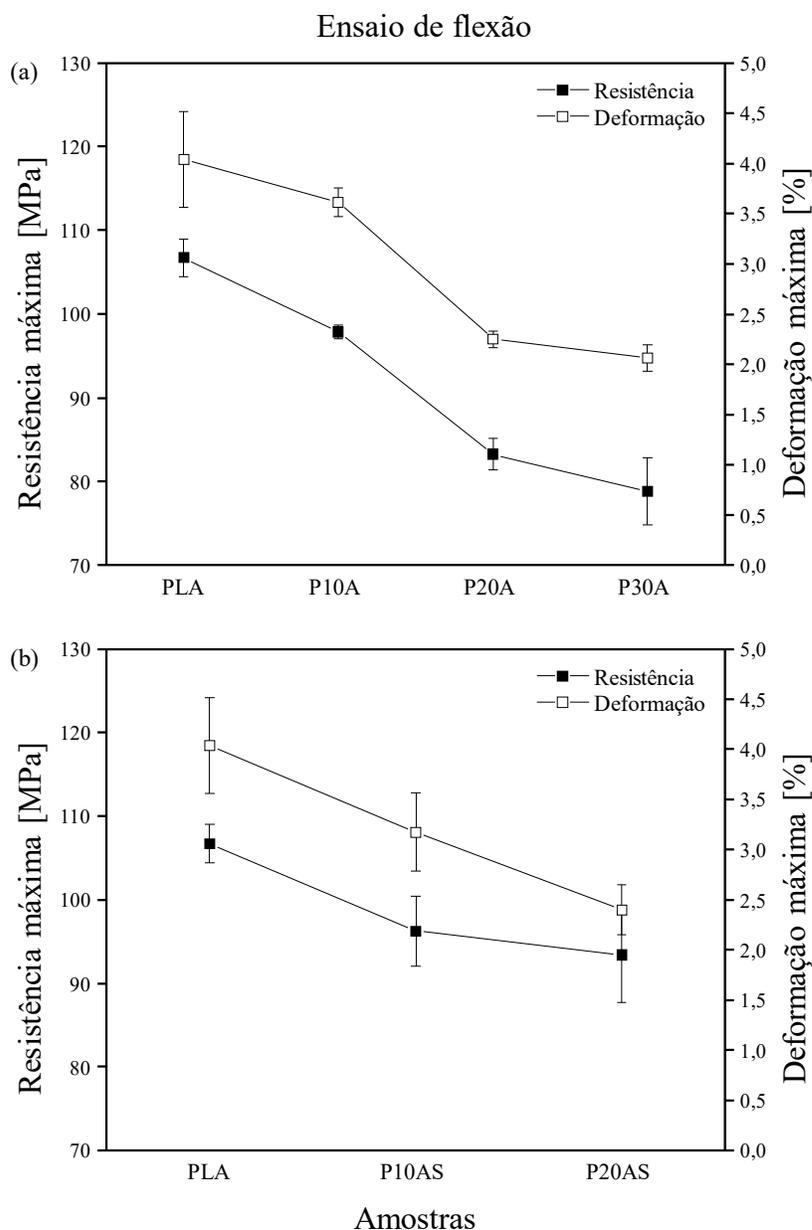


Figura 24 – Resistência e deformação máximas das amostras no ensaio de flexão. Amostras de PLA/amido (a) e PLA/amido/SEP (b).

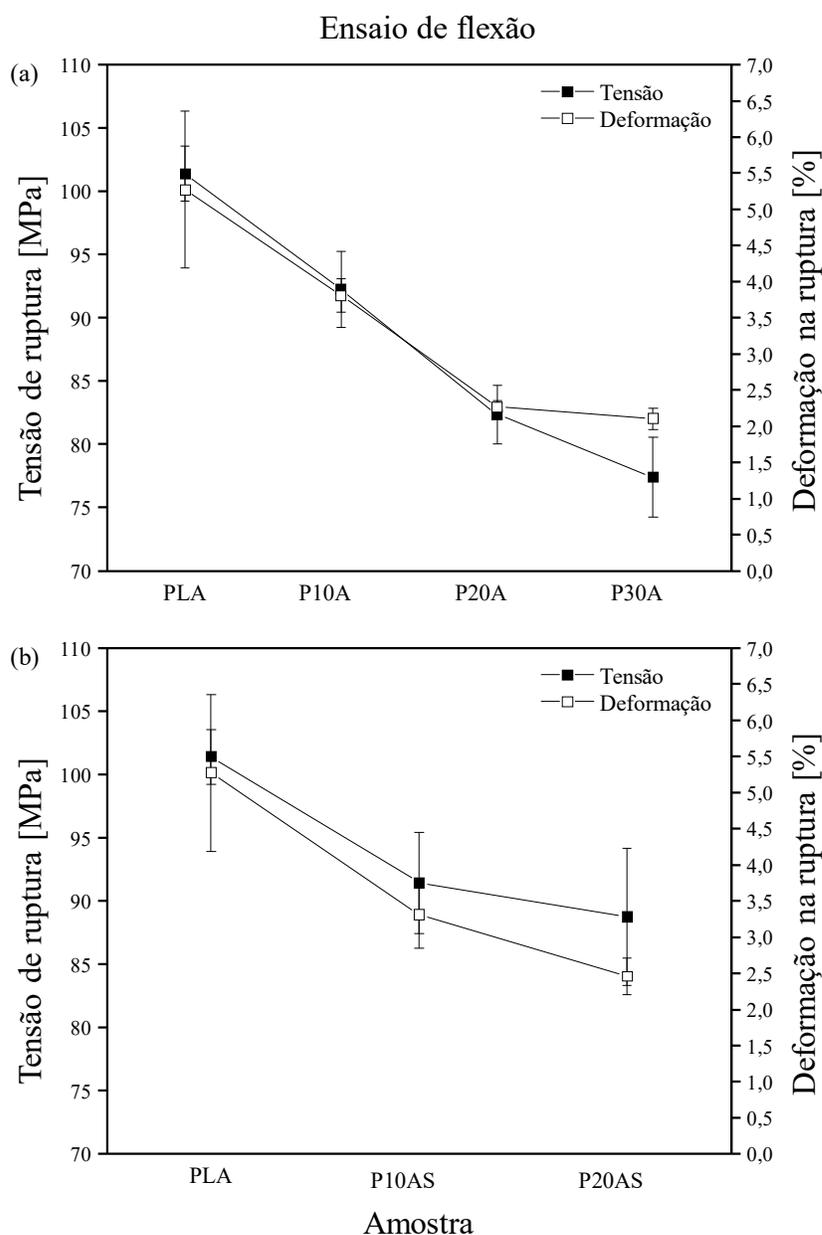


Figura 25 – Tensão e deformação de ruptura das amostras no ensaio de flexão. Amostras de PLA/amido (a) e PLA/amido/SEP (b).

Nas Figuras 24 e 25 e nas Tabelas 13 e 14 a presença de amido e de SEP nas amostras implicou na diminuição da resistência e deformação máximas, bem como da tensão e deformação de ruptura quando comparadas com as amostras de PLA. Sirin, Tuna e Ozkoc (2014) no estudo das propriedades físicas de blendas de PLA e amido termoplástico (TPS) com diferentes composições, produzidas por extrusão e injeção, em função do número de

reciclagem, constataram que ao aumentar a quantidade de amido na blenda, a resistência máxima em flexão diminui.¹³⁸

Além disso, os compósitos com SEP apresentaram valores máximos e de ruptura (Figuras 24 e 25) similares aos das amostras P10A e P20A. As exceções ocorreram para a resistência máxima das amostras P20AS, cujos valores foram aproximadamente 10,8 % maiores do que os das amostras de P20A e para a tensão de ruptura das amostras P20AS, cujos valores foram aproximadamente 7,2 % maiores do que os das amostras de P20A.

A Figura 26 apresenta o valor do módulo de elasticidade alcançado pelas amostras no ensaio de flexão. Para a determinação do módulo, calculam-se as flechas s_1 e s_2 , que correspondem aos valores de deformação em flexão ε_{f1} de 0,0005 % e ε_{f2} de 0,0025 %, utilizando a equação V:¹³⁴

$$s_i = \frac{\varepsilon_{fi} L^2}{6h} \quad (i = 1 \text{ ou } 2) \quad (V)$$

onde s_i é uma das flechas; ε_{fi} é a deformação em flexão correspondente a ε_{f1} e ε_{f2} ; L é a distância entre os apoios (64,0 mm) e h é a espessura da amostra. Tanto s_i quanto L e h são expressos em milímetros.

Em seguida, determina-se o módulo de flexão E_f , expresso em MPa, usando a seguinte equação:¹³⁴

$$E_f = \frac{\sigma_{f2} - \sigma_{f1}}{\varepsilon_{f2} - \varepsilon_{f1}} \quad (VI)$$

em que σ_1 e σ_2 são os esforços de flexão, expressos em MPa, medidos para as flechas s_1 e s_2 , respectivamente.

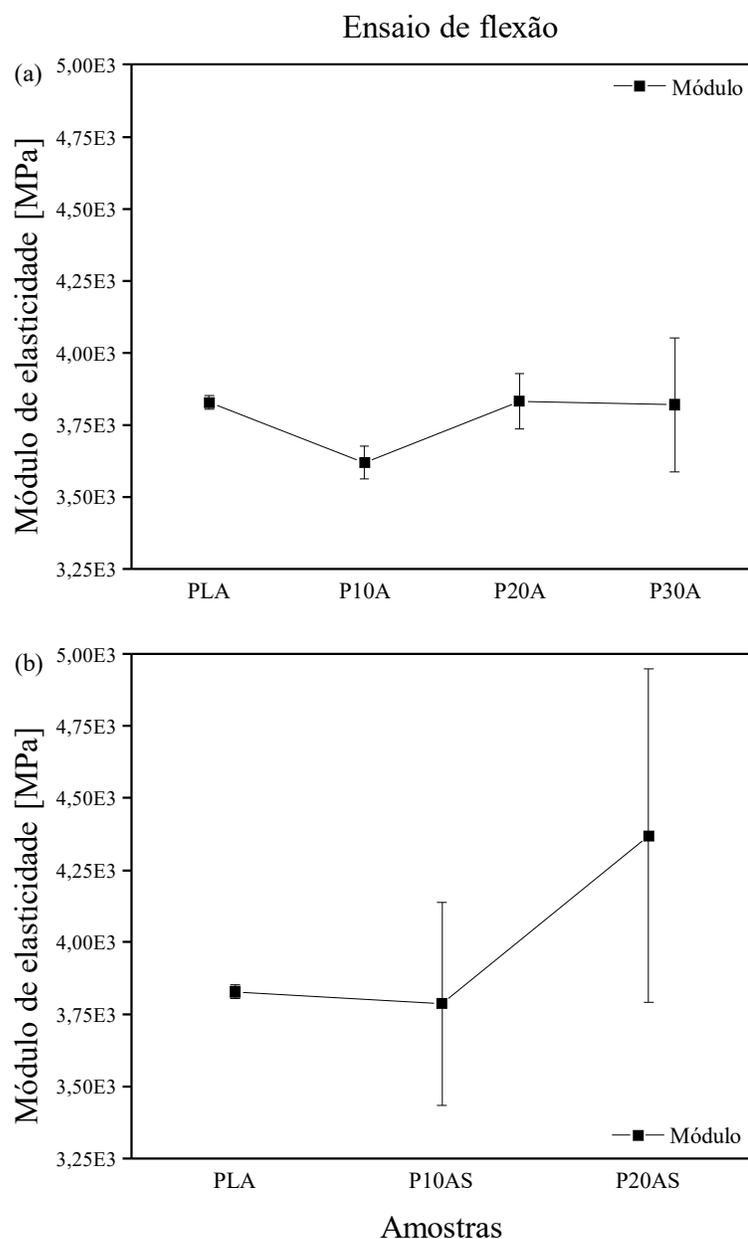


Figura 26 – Módulo de elasticidade das amostras no ensaio de flexão. Amostras de PLA/amido (a) e PLA/amido/SEP (b).

Na Figura 26 e Tabela 15, em geral, ao aumentar a quantidade de amido na matriz de PLA, o E_f não sofreu grandes alterações. As exceções foram as amostras de P10A e P10AS que foram de 5,5 % e 1,1 % inferiores, respectivamente, aos das amostras de PLA. Este comportamento do E_f relativo à adição de amido foi distinto dos encontrados na literatura, por exemplo, Sirin, Tuna e Ozkoc (2014) relatam que a adição de TPS implicou na diminuição do módulo.¹³⁸

As Tabelas 16 a 18 mostram os valores (médias e desvios padrões) da resistência e deformação máximas, da tensão e deformação de ruptura e do módulo de elasticidade, respectivamente, no ensaio de tração.

Tabela 16 – Resistência e deformação máximas obtidas no ensaio de tração.

	Resistência [MPa]		Deformação [%]	
	\bar{x}	\pm	\bar{x}	\pm
PLA	60,6	1,0	2,0	0,0
P10A	59,0	0,5	2,1	0,1
P20A	52,3	0,5	1,7	0,1
P30A	43,8	4,4	1,3	0,2
P10AS	58,7	0,8	2,0	0,1
P20AS	53,9	1,5	1,7	0,1

Tabela 17 – Tensão e deformação de ruptura obtidas no ensaio de tração.

	Tensão [MPa]		Deformação [%]	
	\bar{x}	\pm	\bar{x}	\pm
PLA	54,7	1,5	5,3	1,1
P10A	58,2	0,8	3,8	0,2
P20A	52,2	0,5	2,3	0,1
P30A	43,8	4,4	2,1	0,1
P10AS	58,5	0,9	3,3	0,5
P20AS	53,8	1,4	2,5	0,3

Tabela 18 – Módulo de elasticidade obtido no ensaio de tração.

	Módulo [MPa]	
	\bar{x}	\pm
PLA	3570,0	78,7
P10A	3647,0	104,7
P20A	3688,8	87,4
P30A	3796,6	70,1
P10AS	3729,6	170,8
P20AS	3727,0	87,5

Na Figura 27 a resistência máxima é definida como o esforço no primeiro local de máximo observado durante um ensaio de tração e a deformação máxima é a deformação em tração correspondente à resistência máxima em tração. Na Figura 28 a tensão de ruptura é definida como o esforço em que amostras se rompem durante o teste e a deformação de ruptura é definida como o último ponto registrado antes que o esforço na amostra seja reduzido a um valor igual ou inferior a 10 % da resistência em que ocorre a ruptura antes da fluência.^{135,136}

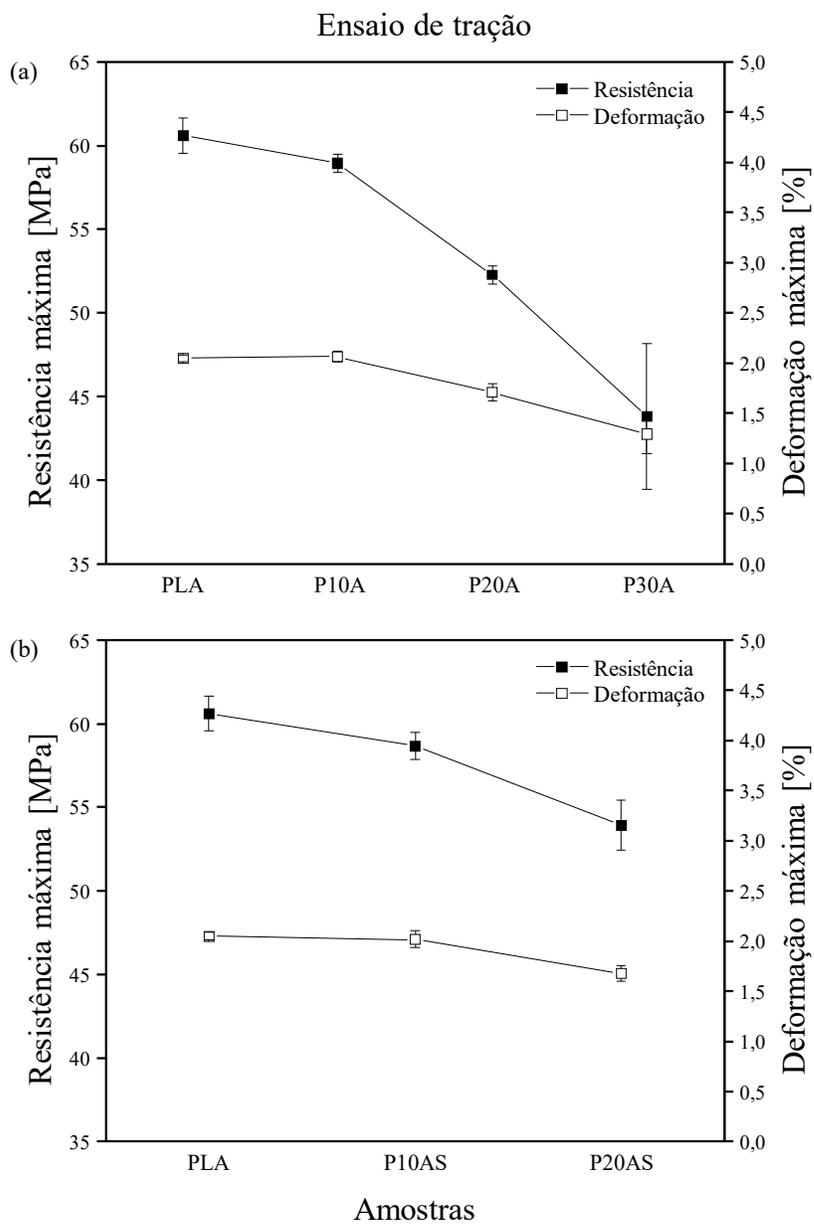


Figura 27 – Resistência e deformação máximas das amostras no ensaio de tração. Amostras de PLA/amido (a) e PLA/amido/SEP (b).

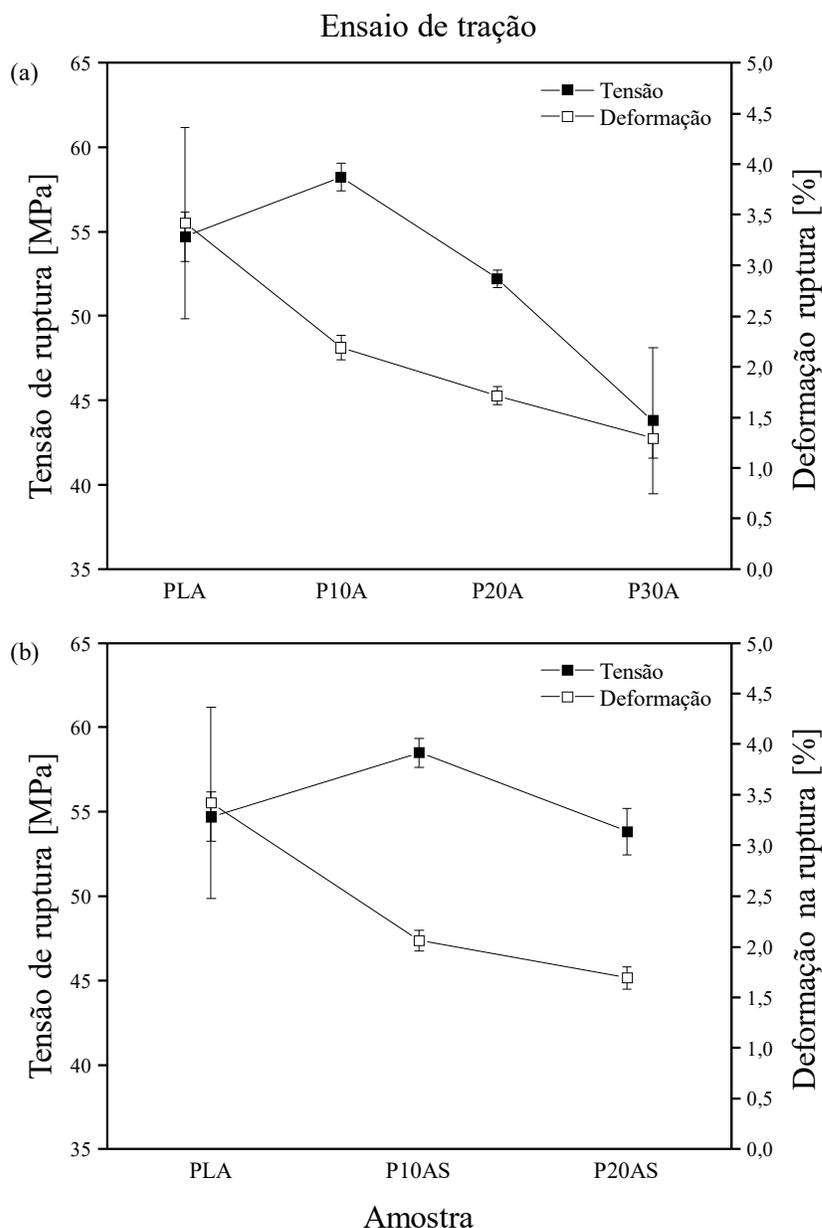


Figura 28 – Tensão e deformação de ruptura das amostras no ensaio de tração. Amostras de PLA/amido (a) e PLA/amido/SEP (b).

Nas Figuras 27 e 28 observou-se uma diminuição para a resistência e deformação máximas, bem como para a tensão e a deformação na ruptura, conforme aumentou-se a quantidade de amido nas amostras (Tabelas 15 e 16). As exceções foram para a tensão de ruptura das amostras P10A e P10AS que apresentaram valores maiores do que o das amostras de PLA.

Ke e Sun (2000) no estudo das propriedades térmicas, mecânicas e morfologia de blendas de PLA e amidos, de milho e trigo, com distintas quantidades de materiais observaram

que a resistência à tração e ao alongamento das blendas diminuíram conforme aumentou o conteúdo dos amidos. O amido agiu como um aditivo na matriz de PLA e com o crescimento do teor de amido, a matriz de PLA tornou-se descontínua e reduziu a área de seção transversal efetiva da fase contínua, resultando em diminuição nos valores da resistência máxima e da tensão de ruptura e alongamento.¹³⁹ Em compósitos de polímero e cerâmicas, o grau de intercalação e esfoliação da cerâmica e a interação entre o polímero e a cerâmica influenciam nas propriedades mecânicas. A adição de cerâmica geralmente reduz a tensão na ruptura.¹⁴⁰ A mesma redução na tensão de ruptura ocorreu nos compósitos P10AS e P20AS.

Na Figura 29 o módulo de elasticidade no ensaio de tração é calculado a partir da equação II:^{135,136}

$$E_t = \frac{\sigma_2 - \sigma_1}{\varepsilon_2 - \varepsilon_1} \quad (II)$$

onde E_t é o módulo de elasticidade em tração e σ_1 e σ_2 são as tensões medidas para os valores de deformação ε_1 de 0,0005 % e ε_2 de 0,0025 %, respectivamente. Tanto o módulo E_t quanto as tensões σ_1 e σ_2 são expressos em MPa. Por sua vez, a deformação é calculada a partir da equação III (e IV em termos %):^{135,136}

$$\varepsilon = \frac{\Delta L_0}{L_0} \quad (III) \text{ e } \varepsilon_{[\%]} = 100 \times \frac{\Delta L_0}{L_0} \quad (IV)$$

onde ε é o parâmetro de deformação em análise, expresso como uma relação adimensional (equação III) ou como um percentual (equação IV); L_0 é o comprimento de referência da amostra e ΔL_0 é a diminuição no comprimento de referência da amostra. Tanto L_0 quanto ΔL_0 são expressos em milímetros.

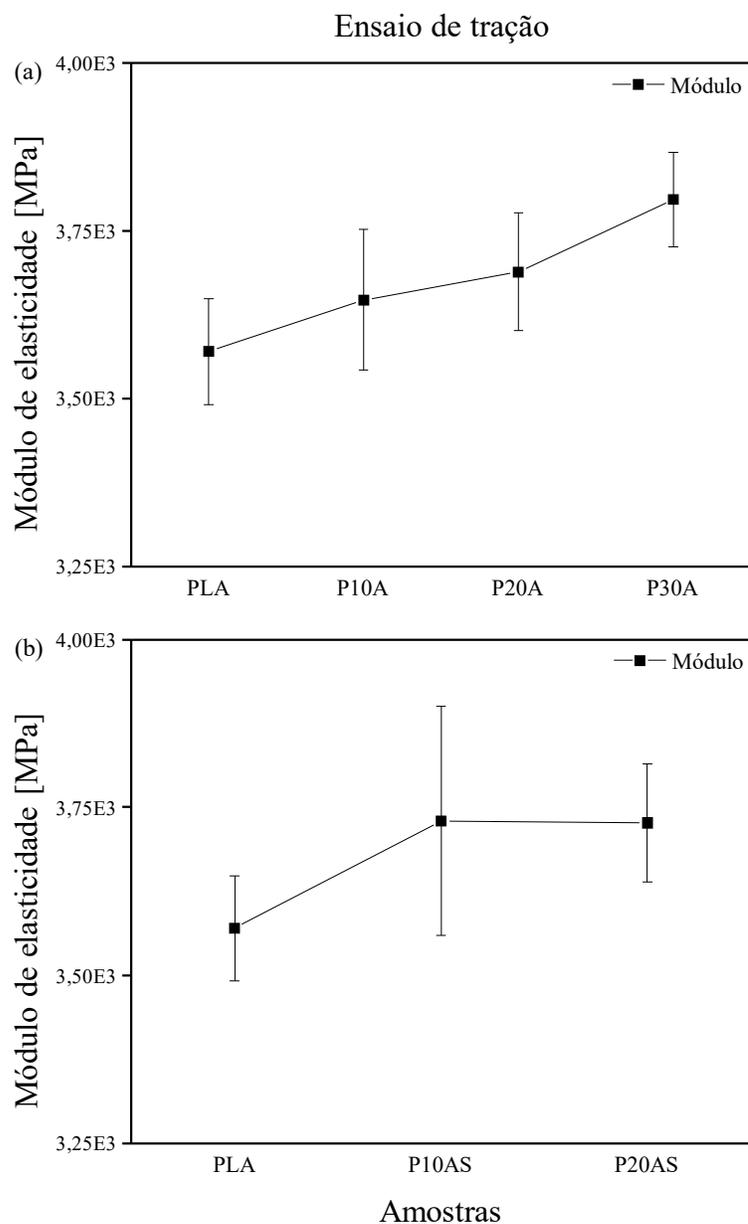


Figura 29 – Módulo de elasticidade das amostras no ensaio de tração. Amostras de PLA/amido (a) e PLA/amido/SEP (b).

Na Figura 29 e Tabela 18, em geral, ao aumentar a quantidade de amido na matriz de PLA, o E_t aumentou proporcionalmente. Os valores de E_t das amostras com SEP, P10AS (2,3 %) e P20AS (1,0 %), foram superiores aos das amostras de P10A e P20A.

O aumento no E_t devido ao amido pode estar associado a força de adesão entre o amido e o PLA causada pela interação polar entre as duas fases, ou seja, a força de ligação de hidrogênio que existe entre o grupo carbonila do PLA e o grupo hidroxila do amido.¹⁴¹ A contribuição relativa a SEP pode estar associado ao fato que na adição de partículas de

cerâmica, quando homogeneamente dispersos em polímero, podem resultar em um aumento no módulo de elasticidade.¹⁴¹ Esse aumento, além de estar relacionado com uma dispersão homogênea, mais precisamente, relaciona-se também com as interações da superfície dos aditivos com as cadeias poliméricas, o que reduz a mobilidade das cadeias e, portanto, aumenta a rigidez macroscópica.^{142,143}

3.5 Análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA)

Nos resultados observados pela técnica de DMTA, em geral, a adição do amido e da SEP diminuíram a rigidez da matriz PLA, ou seja, obtiveram-se valores de E' menores nas amostras, do que no PLA puro. Tal efeito foi observado principalmente nas amostras injetadas. As Figuras 30 e 31 (amostras injetadas) e as Figuras 32 e 33 (amostras em autoclave) exibem as curvas dos módulos de armazenamento (E'), de perda (E'') e da tangente de perda ou o fator de perda ($\tan \delta$) obtidas via DMTA. Nas Figuras 30 e 31 foi possível observar o efeito da adição do amido e da SEP ao PLA e nas Figuras 32 e 33 foi observado o resultado da permanência das amostras no interior do autoclave. As Tabelas 19 e 20 exibem os valores da T_g e da $\tan \delta$ das amostras injetadas e em autoclave, respectivamente.

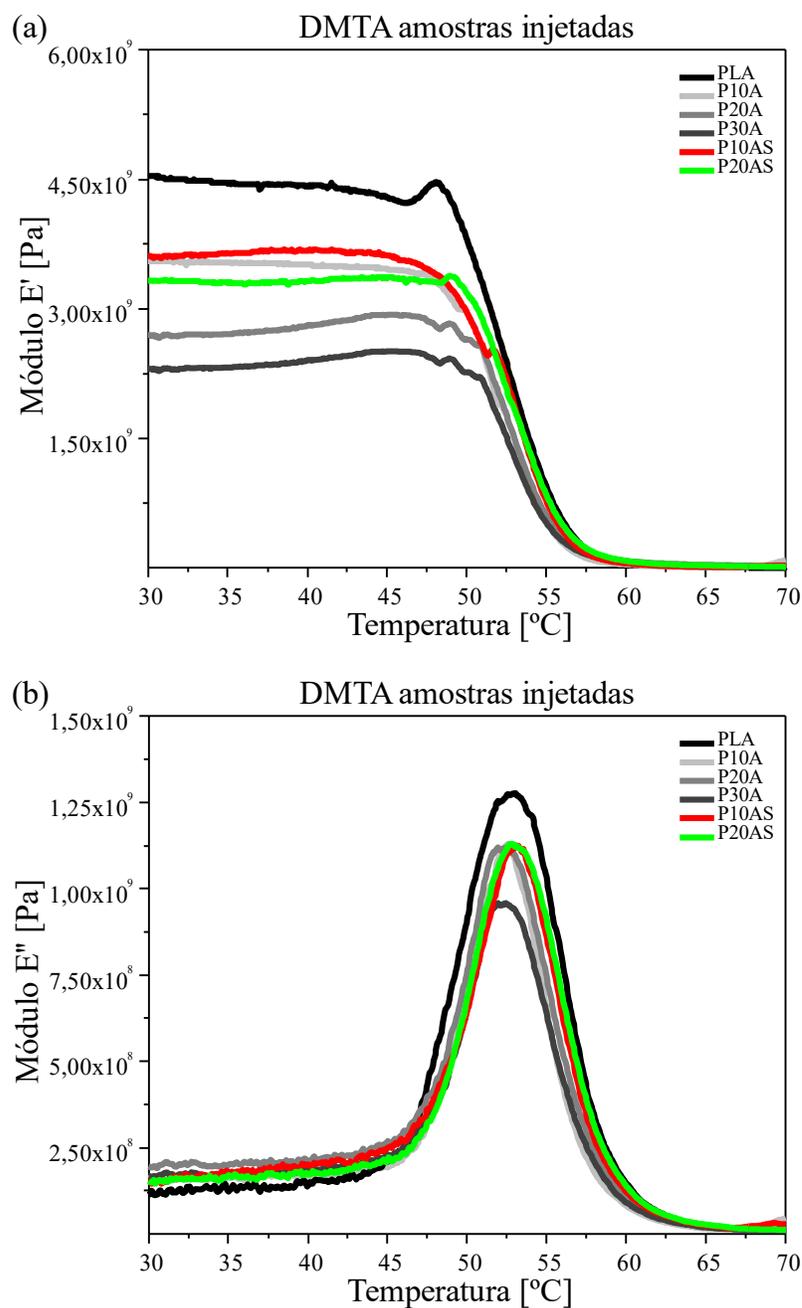


Figura 30 – Curvas de DMTA, módulos E' (a) e E'' (b) das amostras PLA, P(10-30)A e P(10-20)AS injetadas.

A Figura 30 (a-b) exibe as curvas dos módulos E' e E'' no intervalo de 30 a 70 °C. Na Figura 30 (a) com o aumento da quantidade de amido, o módulo E' apresentou uma diminuição no seu valor em temperaturas inferiores a aproximadamente 60 °C, e acima dessa os valores de E' tornaram-se indistinguíveis. Esse padrão de diminuição do módulo E' também foi observado por Zhang et al. (2013) em blendas de PLA/amido.¹⁴⁴ Os compósitos com SEP apresentaram um comportamento similar ao das demais blendas, ou seja, com o valor do módulo E' menor do

que o do PLA. As amostras P(10-20)AS apresentaram valores do módulo E' maiores do que o das amostras P(10-20)A. Ren, Liu e Ren (2007) no estudo de compósitos de PLA/amido/MMT encontraram que para todas as amostras com MMT, o módulo de E' diminuiu em comparação com aqueles sem MMT abaixo da T_g , com a MMT limitando a mobilidade das cadeias moleculares matriz.¹⁴⁵ Yuzay, Auras e Selke (2010) na investigação de compósitos de PLA com zeólita (ZEO), que constituem um grupo numeroso de minerais que possuem uma estrutura porosa similares a SEP, perceberam um aumento no módulo E' com o crescimento do conteúdo de ZEO indicando partículas de ZEO enrijeceram a matriz de PLA.¹⁴⁶

Além disso, quanto maior a quantidade de amido menor foi o valor módulo E'' , porém as amostras P(10-20)A e P(10-20)AS apresentaram valores similares. Adicionalmente para todas as amostras foi observado um ombro nas curvas entre as temperaturas de 47,5 e 50 °C. Dependendo da composição das amostras, tais ombros encontraram-se mais deslocados para maior temperatura e com menor intensidade.

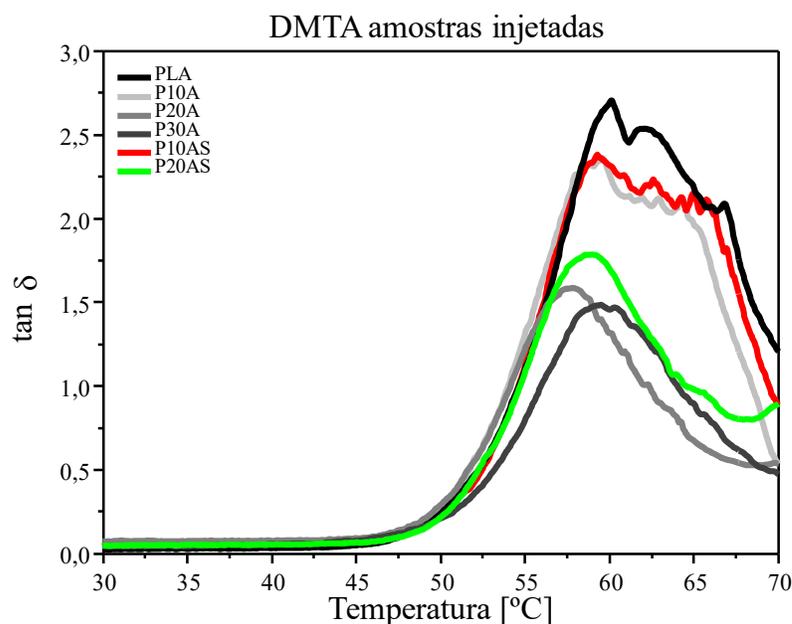


Figura 31 – Curvas de DMTA, $\tan \delta$ das amostras PLA, P(10-30)A e P(10-20)AS injetadas.

A Figura 31 exibe as curvas da $\tan \delta$ das amostras injetadas. Nessa figura com o aumento da quantidade de amido nas amostras, menores valores de $\tan \delta$ foram obtidos. As amostras com SEP apresentaram o mesmo padrão das amostras com amido. Adicionalmente a T_g não sofreu variações consideráveis com a adição dos aditivos nas amostras (Tabela 19). A média das T_g das amostras foi de $59,04 \text{ °C} \pm 0,78$ e da $\tan \delta$ foi de $2,05 \pm 0,5$. Wang, Sun e Seib,

(2002) também observaram que a adição de amido nas blendas não teve efeito sobre a T_g ; com todas as blendas possuindo a mesma T_g do PLA, cerca de 56 °C. Eles também observaram que o valor da $\tan \delta$ nas blendas diminuiu com o aumento da quantidade de amido.¹¹⁵

Tabela 19 – T_g e $\tan \delta$ obtidas pela DMTA das amostras injetadas.

	T_g [°C]	$\tan \delta$
PLA	59,96	2,71
P10A	59,42	2,36
P20A	57,65	1,58
P30A	59,32	1,49
P10AS	59,09	2,38
P20AS	58,78	1,79

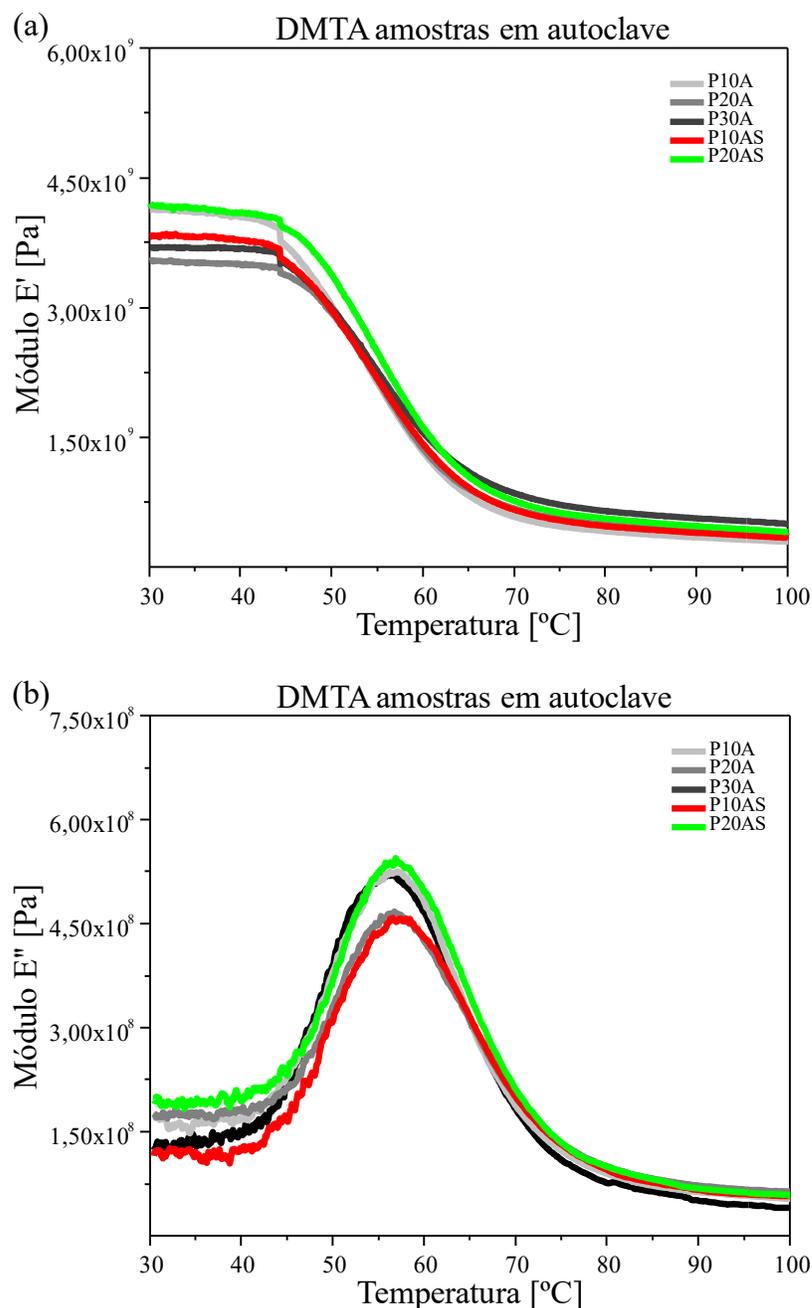


Figura 32 – Curvas de DMTA, módulos de E' (a) e E'' (b) das amostras P(10-30)A e P(10-20)AS em autoclave.

A Figura 32 (a-b) exibe as curvas dos módulos E' e E'' no intervalo de 30 a 100 °C. O efeito do amido e da SEP nas amostras foi menos relevante do que a permanência em autoclave. Porém, na comparação dos módulos das amostras em autoclave com o das amostras injetadas percebeu-se que nas primeiras, ambos os módulos apresentaram valores mais homogêneos. O comportamento dos módulos E' e E'' para as amostras em autoclave pode ser explicado pela associação de três fatores: i) ao adicionar amido ao PLA, em geral aumentou-se a X_c devido a

interface entre amido e PLA ser mais energética, favorecendo a formação de cristais no PLA¹¹¹⁻¹²⁰; ii) a absorção de CO₂ resulta em cristalização em polímeros semicristalinos pelo reordenamento das cadeias do polímero em temperaturas baixas¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ e iii) com o aumento da pressão de CO₂, a fração de volume de CO₂ absorvida aumenta, melhorando a mobilidade da cadeia e o realinhamento das cadeias para uma estrutura mais cristalina.¹⁰⁵ Assim sendo, a adição do amido, a adsorção de CO₂ e a pressão no interior do autoclave, conjuntamente, implicaram em um módulo E' inalterado e um módulo E'' menor.

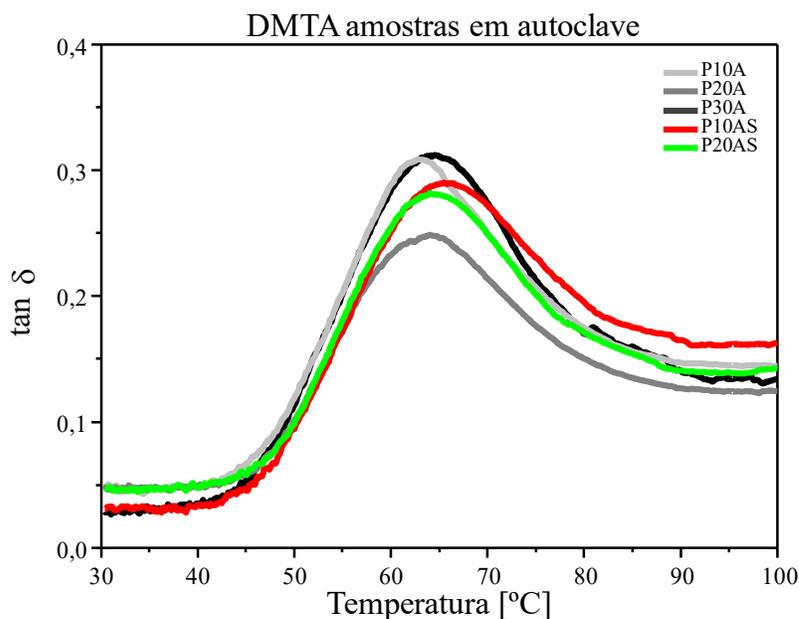


Figura 33 – Curvas de DMTA, $\tan \delta$ das amostras P(10-30)A e P(10-20)AS em autoclave.

A Figura 33 exibe as curvas da $\tan \delta$ das amostras em autoclave. Assim como nos módulos E' e E'', o efeito da influência do amido e da SEP nas amostras foi menos relevante do que a permanência em autoclave. Porém, na comparação dos valores da $\tan \delta$ de todas as amostras em autoclave com o das amostras injetadas percebeu-se que nas primeiras os valores foram 10 vezes menores do que nas amostras injetadas. Tal fato ocorreu devido aos menores valores de E'' das amostras em autoclave. Adicionalmente a T_g não sofreu variações consideráveis com a adição do amido e da SEP nas amostras (Tabela 20). A média das T_g das amostras foi de $64,22 \text{ °C} \pm 0,94$ e da $\tan \delta$ foi de $0,29 \pm 0,03$.

Tabela 20 – T_g e $\tan \delta$ obtidas pela DMTA das amostras em autoclave.

	T_g [°C]	$\tan \delta$
P10A	64,60	0,31
P20A	62,97	0,31
P30A	64,02	0,25
P10AS	65,53	0,29
P20AS	64,00	0,28

CAPÍTULO IV

ESTUDO *IN VIVO*

As informações relativas a estrutura morfológica das amostras pré e pós implante no estudo *in vivo* foram obtidas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). As análises histológicas dos tecidos dos animais foram realizadas pela microscopia ótica (MO).

4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As Figuras 34 a 39 (pré-implante) e as Figuras 40 a 45 (pós-implante) mostram as imagens de MEV das amostras expandidas em banho de glicerina e em forno de PLA, P10A e P10AS. Nas Figuras 34 a 39 e 43 a 45 as imagens apresentam aumentos de 100, 500 e 1000 vezes; nas figuras 40 a 42 as imagens apresentam aumentos de 100, 1000 e 2000 vezes. Nas Figuras 34 a 36 e 40 a 42 as imagens foram feitas da região externa e; nas Figuras 37 a 39 e 43 a 45 foram feitas da região interna das amostras.

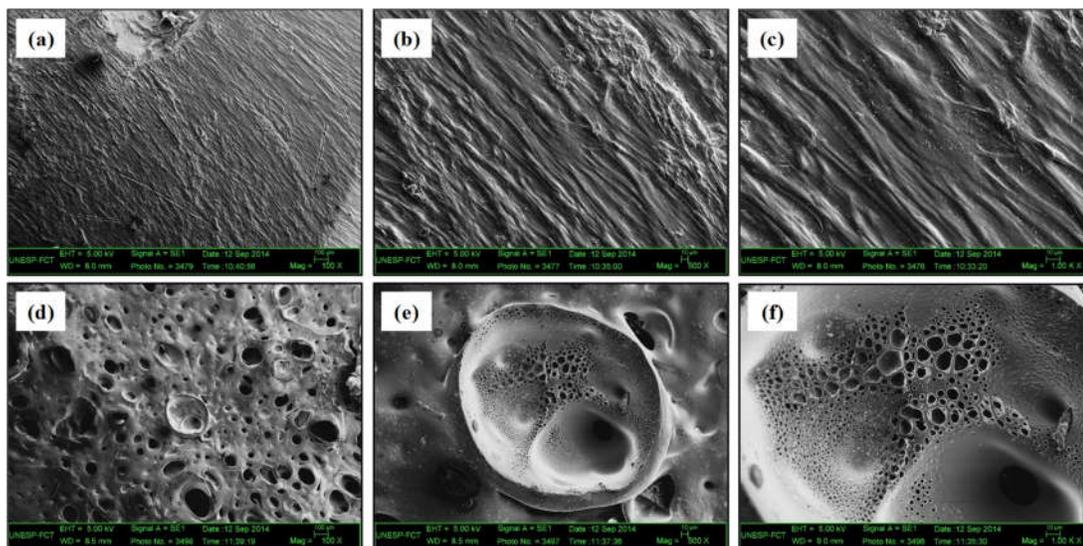


Figura 34 – Imagens de MEV de amostras pré-implante (região externa) de PLA expandidas em forno, imagens (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 100X imagens (a, d), de 500X imagens (b, e) e de 1000X imagens (c, f).

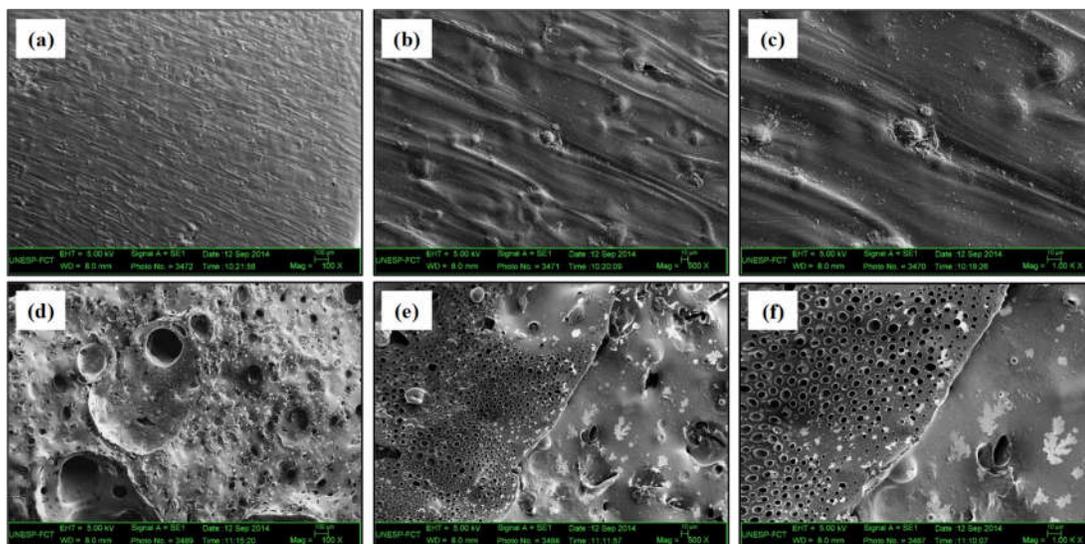


Figura 35 – Imagens de MEV de amostras pré-implante (região externa) de P10A expandidas em forno, imagens (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 100X imagens (a, d), de 500X imagens (b, e) e de 1000X imagens (c, f).

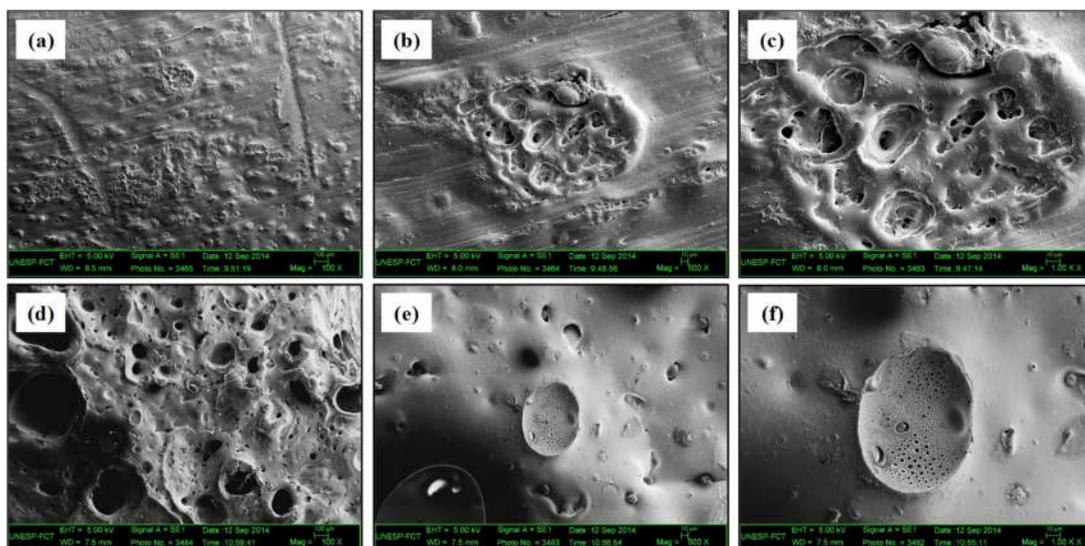


Figura 36 – Imagens de MEV de amostras pré-implante (região externa) de P10AS expandidas em forno, imagens (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 100X imagens (a, d), de 500X imagens (b, e) e de 1000X imagens (c, f).

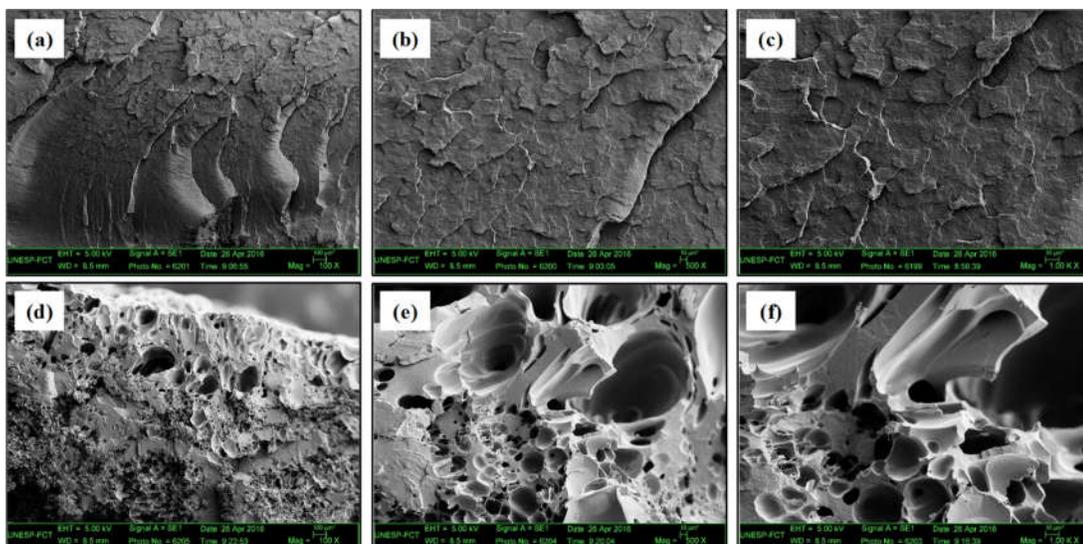


Figura 37 – Imagens de MEV de amostras pré-implante (região interna) de PLA expandidas em forno, imagens (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 100X imagens (a, d), de 500X imagens (b, e) e de 1000X imagens (c, f).

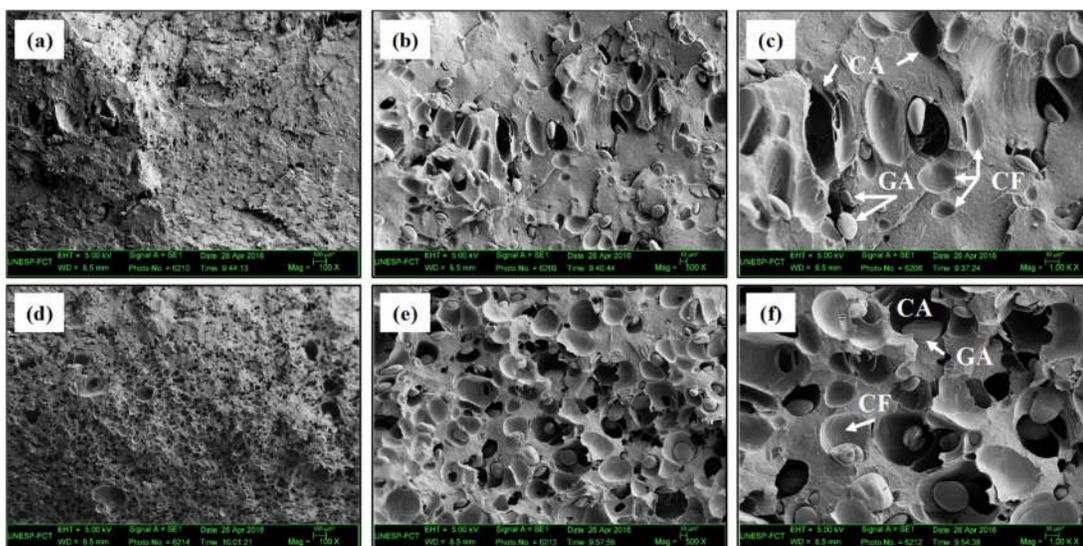


Figura 38 – Imagens de MEV de amostras pré-implante (região interna) de P10A expandidas em forno, imagens (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 100X imagens (a, d), de 500X imagens (b, e) e de 1000X imagens (c, f).

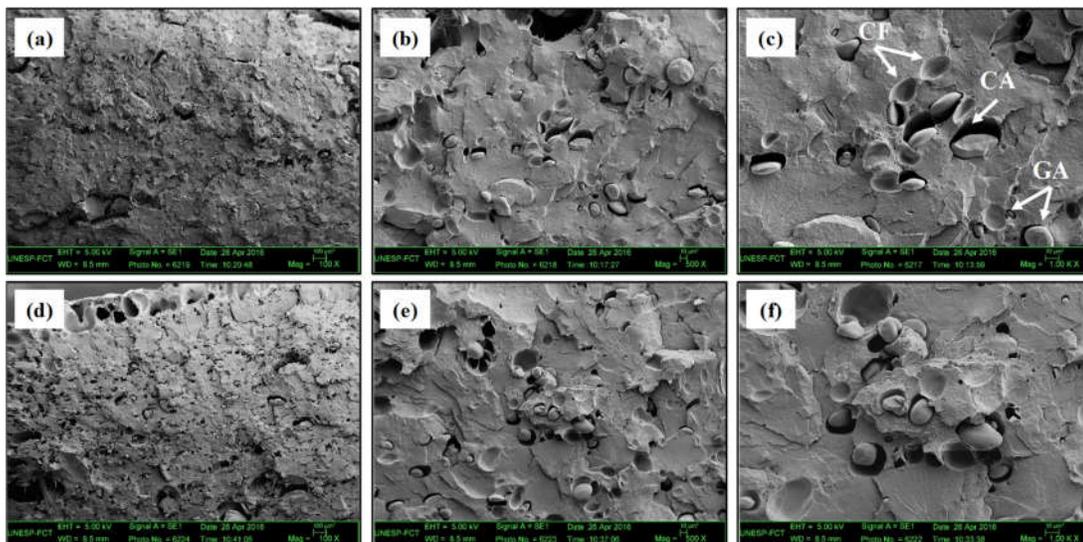


Figura 39 – Imagens de MEV de amostras pré-implante (região interna) de P10AS expandidas em forno, imagens (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 100X imagens (a, d), de 500X imagens (b, e) e de 1000X imagens (c, f).

Nas imagens (a-f) das Figuras 34 a 39 foi possível observar a fase predominante correspondente ao PLA; com grânulos de amido dispersos na matriz, Figuras 35, 36, 38 e 39. Nas imagens (d-f) das Figuras 34 a 39 observou-se uma grande quantidade poros de distintos tamanhos. Tal fato pode ter ocorrido pelos seguintes fatores: i) durante a despressurização do autoclave e ii) devido a maior expansão ocorrida nas amostras em banho de glicerina.

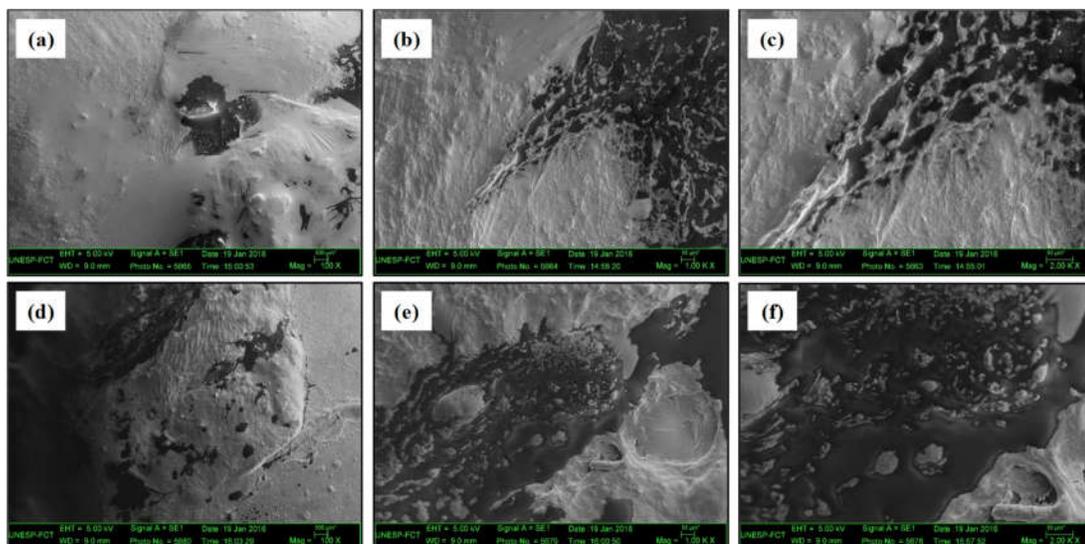


Figura 40 – Imagens de MEV de amostras pós-implante (região externa) de PLA expandidas em forno, imagens (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 100X imagens (a, d), de 1000X imagens (b, e) e de 2000X imagens (c, f).

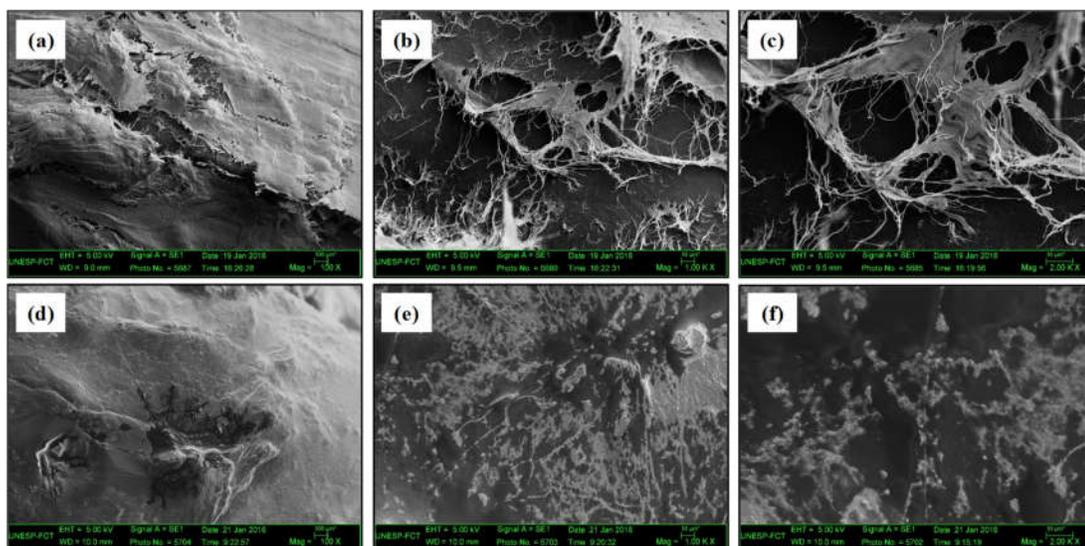


Figura 41 – Imagens de MEV de amostras pós-implante (região externa) de P10A expandidas em forno, imagens de (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 100X imagens (a, d), de 1000X imagens (b, e) e de 2000X imagens (c, f).

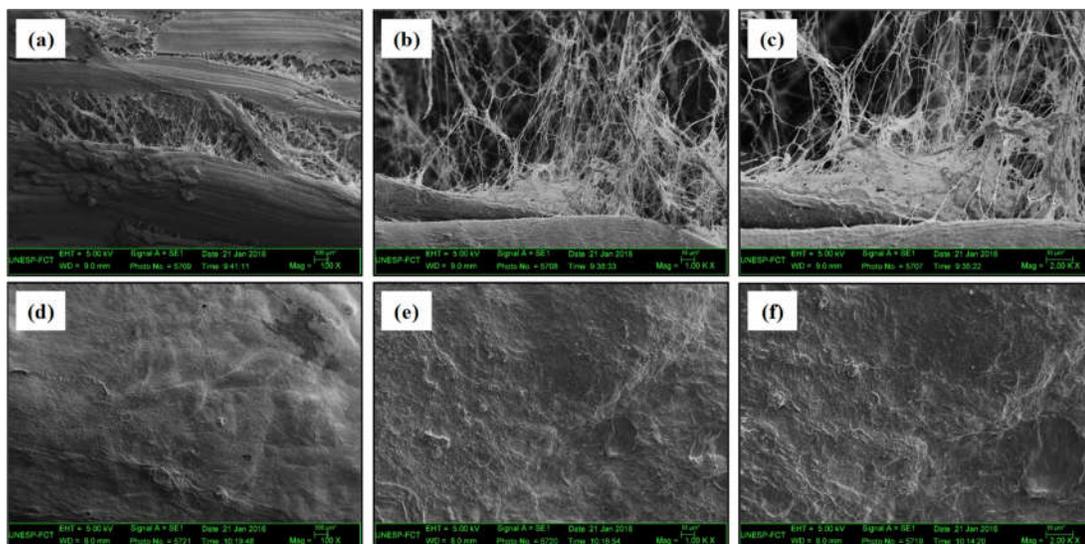


Figura 42 – Imagens de MEV de amostras pós-implante (região externa) de P10AS expandidas em forno, imagens (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 100X imagens (a, d), de 1000X imagens (b, e) e de 2000X imagens (c, f).

As imagens (a-c) expandidas em forno e nas imagens (d-f) expandidas em banho de glicerina, das Figuras 40 a 42 mostram as regiões externas das amostras PLA, P10A e P10AS pós-implante. Nessas imagens não foi observado o mesmo padrão superficial das amostras pré-implante, ou seja, matriz de PLA com os aditivos. As superfícies das amostras pós-implante apresentaram um padrão de recobrimento por tecido biológico com morfologia capsular. Um padrão de recobrimento similar, com células aderindo à superfície porosa de blendas de PLLA/amido, no formato de lâminas, foi observado por Ju et al. (2016)¹⁴⁷ e por Li et al. (2011) no estudo de *in vitro* de copolímeros de aminoácidos preparados por reação de condensação catalisada por ácido.¹⁴⁸ Outros pesquisadores observaram células bem distribuídas sobre as superfícies de compósitos de poli(ϵ -caprolactona), zeína e hidroxiapatita formando uma camada confluyente bem aderida a superfície da amostra.¹⁴⁹

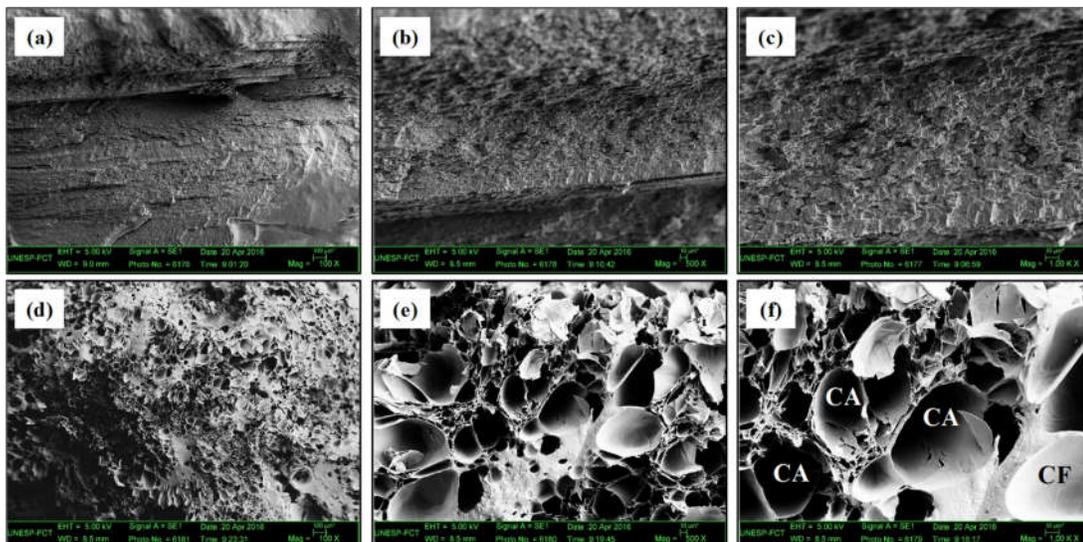


Figura 43 – Imagens de MEV de amostras pós-implante (região interna) de PLA expandidas em forno, imagens (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 500X imagens (a, d), de 1000X imagens (b, e) e de 1000X imagens (c, f).

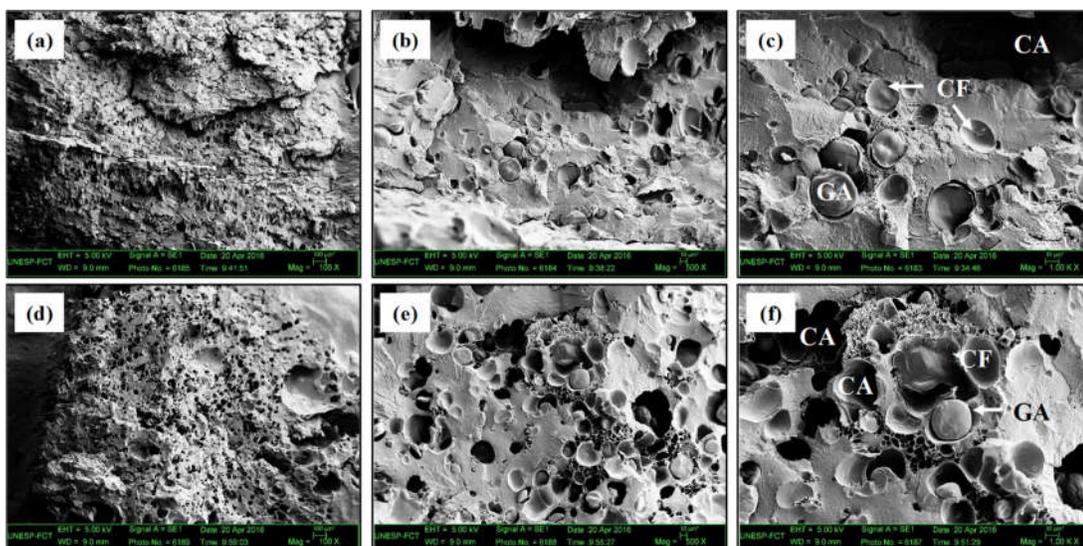


Figura 44 – Imagens de MEV de amostras pós-implante (região interna) de P10A expandidas em forno, imagens (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 100X imagens (a, d), de 500X imagens (b, e) e de 1000X imagens (c, f).

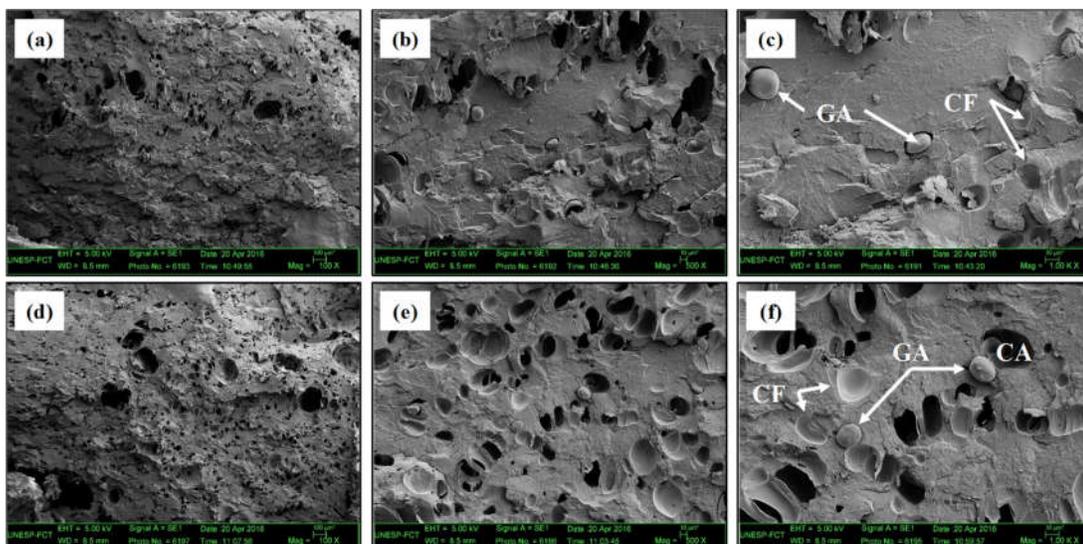


Figura 45 – Imagens de MEV de amostras pós-implante (região interna) de P10AS expandidas em forno, imagens (a-c) e expandidas em banho de glicerina, imagens (d-f). Aumentos de 100X imagens (a, d), de 500X imagens (b, e) e de 1000X imagens (c, f).

Nas imagens (a-f) das Figuras 43 a 45 foi possível observar a fase predominante correspondente ao PLA; com grânulos de amido dispersos na matriz, Figuras 44 e 45. Nas imagens (d-f) das Figuras 43 a 45 observou-se uma grande quantidade poros de distintos tamanhos. Tal fato pode ter ocorrido pelos seguintes fatores: i) durante a despressurização do autoclave e ii) devido a maior expansão ocorrida nas amostras em banho de glicerina.

4.2 Microscopia ótica (MO)

As Figuras 46 a 51 mostram as fotomicrografias do tecido muscular dos animais que tiveram amostras implantadas de PLA, P10A e P10AS, processadas em banho de glicerina ou em forno. Em todas as figuras as fotomicrografias apresentam aumento de 4 e 10 vezes, imagem (a) e imagens (b-d), respectivamente. As fotomicrografias foram feitas de regiões musculares receptoras do material de implante que estiveram em contato com as amostras. Nas análises das fotomicrografia contamos com ajuda de dois especialistas, um em histologia e outro em patologia.

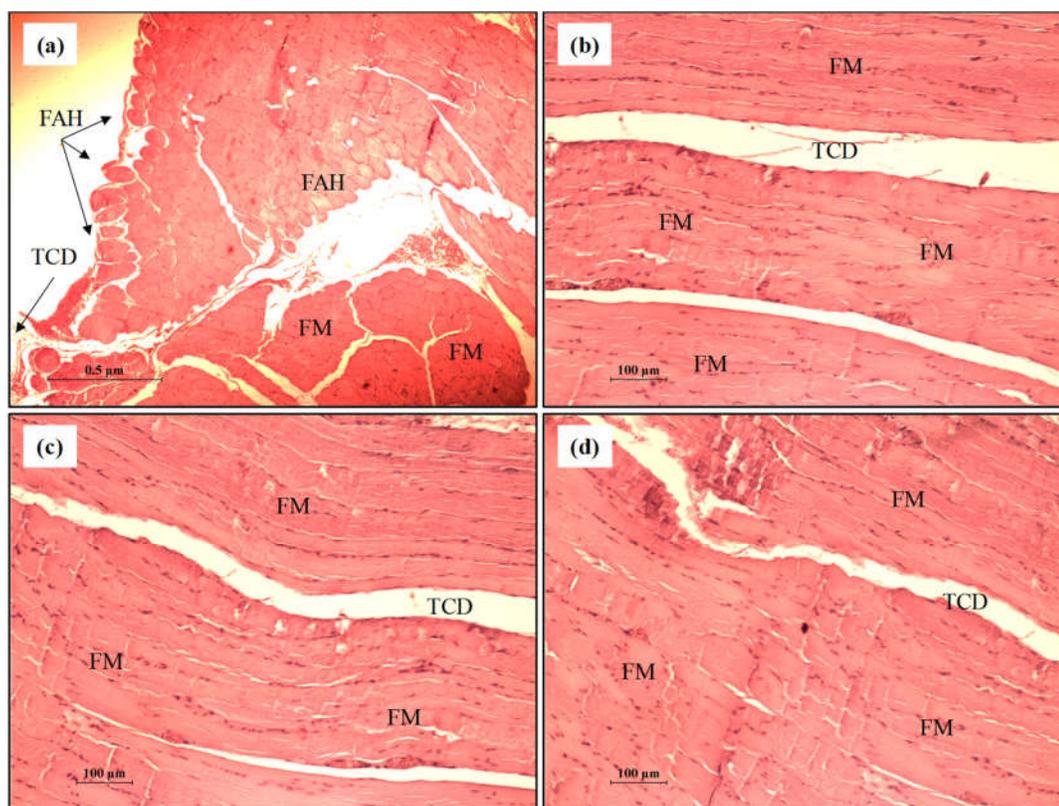


Figura 46 – Fotomicrografias de tecido muscular e regiões adjacentes de animais com implantes de amostras PLA processadas em forno. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE). Aumentos de 4X imagem (a) e 10X imagens (b-d). Legenda: FM = fibras musculares; TCD = tecido conjuntivo denso; TA = tecido adiposo; FAH = fibra muscular arredondada hipertrófica.

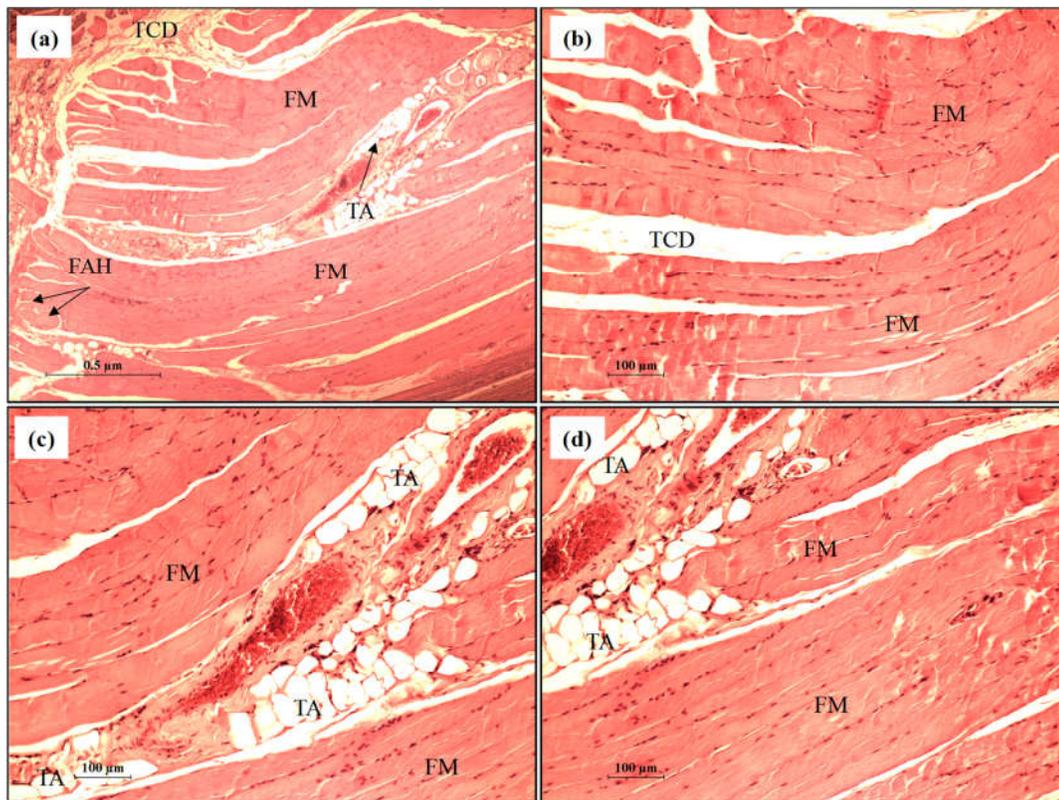


Figura 47 – Fotomicrografias de tecido muscular e regiões adjacentes de animais com implantes de amostras PLA processadas em banho de glicerina. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE). Aumentos de 4X imagem (a) e 10X imagens (b-d). Legenda: FM = fibras musculares; TCD = tecido conjuntivo denso; TA = tecido adiposo; FAH = fibras musculares arredondas hipertróficas.

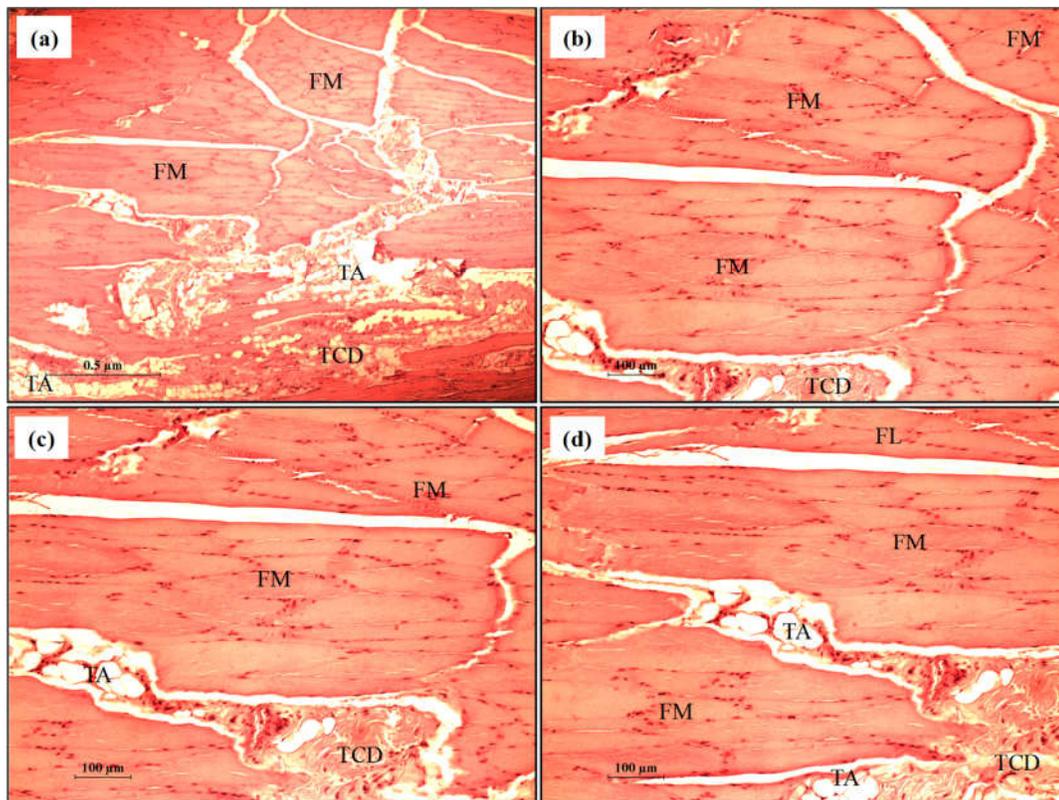


Figura 48 – Fotomicrografias de tecido muscular e regiões adjacentes de animais com implantes de amostras P10A processadas em forno. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE). Aumentos de 4X imagem (a) e 10X imagens (b-d). Legenda: FM = fibras musculares; TCD = tecido conjuntivo denso; TA = tecido adiposo; FAH = fibras musculares arredondas hipertróficas.

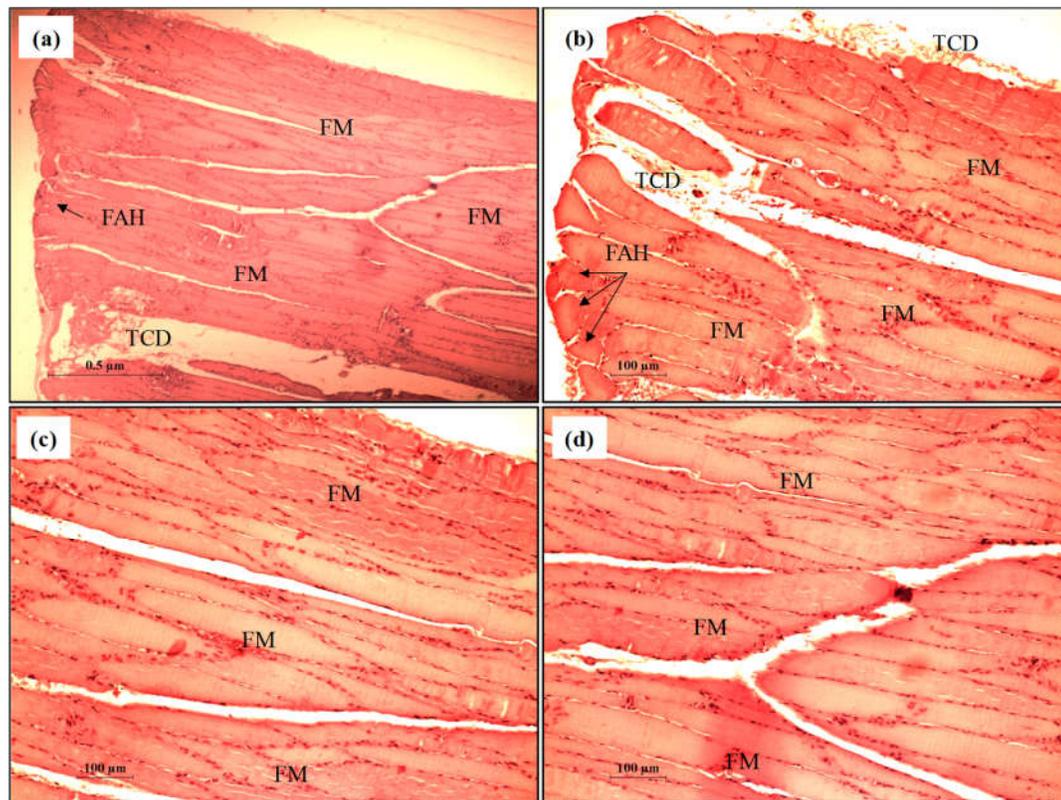


Figura 49 – Fotomicrografias de tecido muscular e regiões adjacentes de animais com implantes de amostras P10A processadas em banho de glicerina. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE). Aumentos de 4X imagem (a) e 10X imagens (b-d). Legenda: FM = fibras musculares; TCD = tecido conjuntivo denso; TA = tecido adiposo; FAH = fibras musculares arredondas hipertróficas.

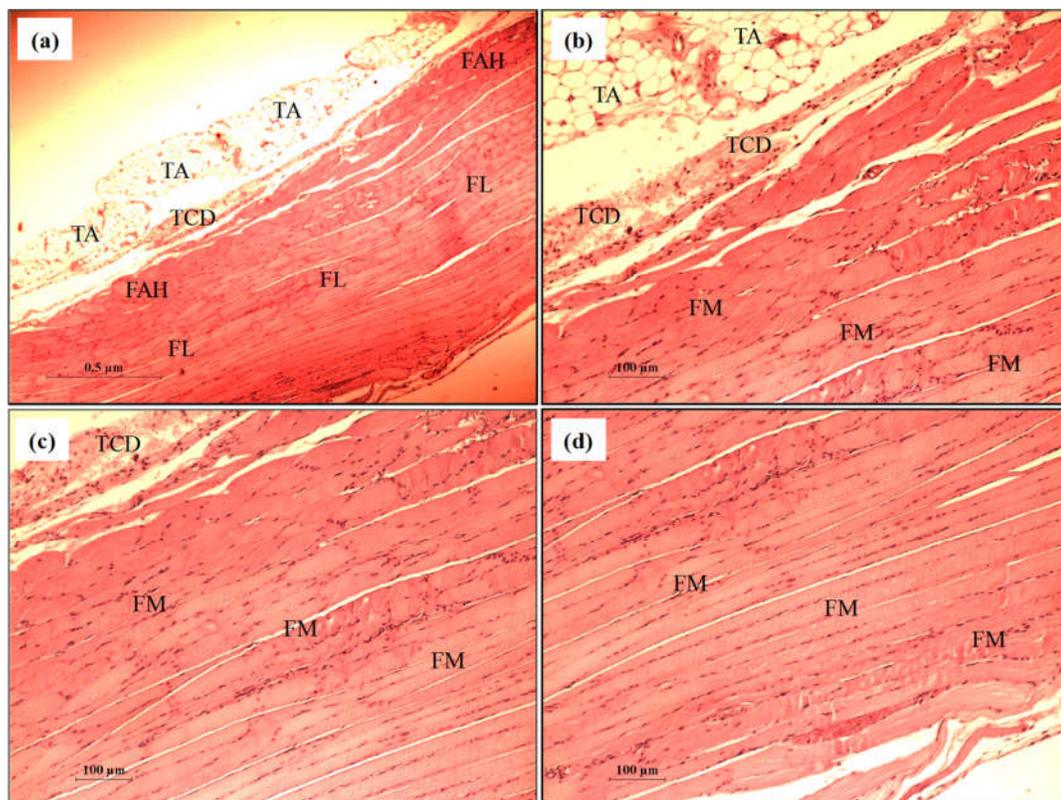


Figura 50 – Fotomicrografias de tecido muscular e regiões adjacentes de animais com implantes de amostras de P10AS processadas em forno. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE). Aumentos de 4X imagem (a) e 10X imagens (b-d). Legenda: FM = fibras musculares; TCD = tecido conjuntivo denso; TA = tecido adiposo; FAH = fibras musculares arredondas hipertróficas.

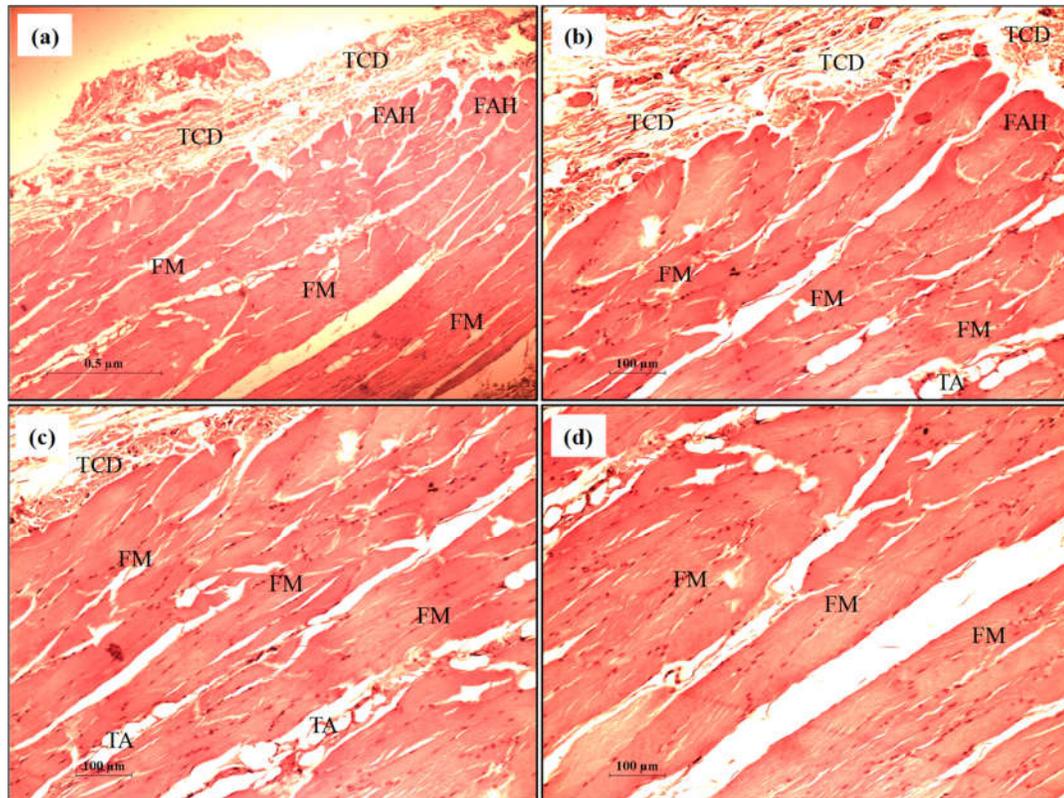


Figura 51 – Fotomicrografias de tecido muscular e regiões adjacentes de animais com implantes de amostras de P10AS processadas em banho de glicerina. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE). Aumentos de 4X imagem (a) e 10X imagens (b-d). Legenda: FM = fibras musculares; TCD = tecido conjuntivo denso; TA = tecido adiposo; FAH = fibras musculares arredondas hipertróficas.

Nas imagens das Figuras 46 a 51 foram observadas estruturas, tais como, fibras musculares (FM) longitudinais e transversais; tecido adiposo (TA) e tecido conjuntivo denso (TCD). No tecido muscular percebeu-se que as fibras se apresentaram mais arredondadas e hipertróficas na sua face periférica (Figuras 46, 47 e 49 a 51). Adicionalmente, em parte dessas fibras foram observados também *splits* centrais e periféricos e algumas fibras com processos de enrodilhamento (Figura 46). Ainda com relação as fibras musculares, tanto nas regiões centrais como nas periféricas, a presença de núcleos (polinucleares) foi uma constante, independentemente do corte ser longitudinal ou transversal. Nas regiões mais centrais das fotomicrografias as fibras musculares apresentaram um padrão histológico em formato de feixes, tanto transversais quanto longitudinais, com a observação do perimísio em padrão normal e apresentando estruturas como artérias, veias, arteríolas, vênulas e fusos musculares (Figuras 43 a 48).

Porém em algumas fibras arredondadas e hipertróficas foram observados núcleos em posição central (Figura 46). Próximo ao tecido muscular foram observadas a presença de TA permeado de TCD, caracterizando um tecido capsular (Figuras 47 e 48). Weir et al. 2013 em estudo da degradação de amostra de PLLA, produzidas por extrusão e termoconformação, *in vitro* e *in vivo* observaram que após 36 semanas o implante subcutâneo em ratos pareceu estimular a produção de uma cápsula de tecido fibroso, na qual a produção de fibras de colágeno tipo I foi extensa.¹⁵⁰ Por sua vez, Ciambelli et al. 2013 relataram a adesão de células; a formação de uma cápsula conjuntiva ao redor do implante; a presença de células epitelioides; a formação de células gigantes de corpo estranho e angiogênese em membranas de PLDLA durante períodos de implantação de 2 a 90 dias.¹⁵¹

Adicionalmente, em algumas fotomicrografias foram identificadas algumas poucas regiões com pontos focais de infiltrado inflamatório, presença de TA, com algumas fibras apresentando processo degenerativo de sarcolema e fagocitose. Nas proximidades das fibras em degeneração outras em processo regenerativo foram observadas, sendo encontrado também células satélites próximas. Tais observações podem estar associadas ao procedimento cirúrgico de implante das amostras, no qual realizou-se um incisão e separação de fibras musculares dos músculos da região de implantação. Outros autores relataram também que a perturbação tecidual durante a cirurgia produz uma resposta inflamatória inicial e que a ausência de células marcando uma resposta inflamatória no período de 36 e 44 semanas sugere que o PLLA estudado foi biocompatível.¹⁵⁰ Assim na presente tese de doutorado a presença de infiltrado inflamatório possivelmente associa-se a reação tecidual a corpo estranho, ao invés de material tóxico, permitindo inferir que o PLA, o amido e a SEP foram tolerados pelos tecidos biológicos.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

Neste projeto de doutorado foi possível obter as seguintes conclusões:

- Processamento: a produção das amostras de PLA/amido e PLA/amido/SEP em diferentes proporções pela via de processamento extrusão → injeção → dissolução CO₂ → espumação (banho de glicerina ou forno de ar) não alterou as propriedades físicas e químicas dos materiais nas blendas.
- MEV: nas imagens das amostras foi percebida a interação física entre o PLA e o amido, se distinguindo duas fases distintas, com a presença de espaços entre as fases. Adicionalmente, ao compararmos com as amostras expandidas, o espaçamento entre as fases aumentou (devido à expansão volumétrica da amostra).
- Medidas de ρ : os valores de ρ das amostras expandidas por banho de glicerina e das amostras em autoclave foram menores do que os das amostras precursoras. Essas diminuições são consistentes com a expansão da matriz de PLA observada nas imagens de MEV das Figuras 14 e 15. Nas amostras em forno, o processo de *annealing* foi dominante quanto à expansão, o que explica os valores de ρ semelhantes aos dos precursores.
- DSC: os aditivos ao PLA (matriz) e a rota de processamento implicaram em pequenas alterações na T_g (de $59,2 \pm 1,8$ a $62,2 \pm 3,3$ °C) bem como na T_m (de $153,5 \pm 1,2$ a $155,6 \pm 3,3$ °C) das amostras. Com relação à X_c das amostras, devido aos parâmetros aplicados à rota de processamento escolhida, as energias mecânica e térmica no sistema variaram drasticamente, ora aumentando, ora diminuído. Tal fato pode justificar porque em algumas etapas do processo a X_c fosse aumentada e em outras diminuída. Finalmente, a ausência de uma variação da X_c de forma proporcional à quantidade de amido deve-se, em grande parte, à distribuição não homogênea do amido na matriz de PLA, apesar do processo inicial de extrusão.
- Ensaio mecânicos: i) no ensaio de flexão, quanto maior o conteúdo de amido nas blendas, menores foram a resistência e a deformação máxima, bem como a tensão e a deformação de ruptura. O mesmo comportamento de diminuição foi mantido para os compósitos com a SEP, no entanto, essas apresentaram medidas com

valores maiores do que as blendas P10A e P20A. O E_f praticamente não sofreu alterações ao compararmos o E_f das amostras PLA e P30A. Por sua vez, a adição de SEP nas amostras fez com que o E' sofresse alterações maiores, uma diferença de 14,1 % ao compararmos o E_f das amostras PLA e P20AS. ii) No ensaio de tração, quanto maior o conteúdo de amido nas blendas menores foram a resistência e a deformação máxima, bem como a tensão e a deformação de ruptura. O mesmo comportamento de diminuição foi mantido para as amostras com a SEP, no entanto, essas amostras apresentaram medidas com valores maiores do que as amostras P10A e P20A. O E_t sofreu pequenas alterações com a adição de amido, uma diferença de 6,3 % ao compararmos o E_t das amostras PLA e P30A. Por sua vez, a adição de SEP nas amostras fez com que o E_t sofresse alterações menores, uma diferença de 4,4 % ao compararmos o E_t das amostras PLA e P20AS.

- DMTA: em geral, os aditivos diminuíram a rigidez da matriz PLA, ou seja, obtiveram-se valores de E' menores nas amostras do que no PLA puro; tal efeito foi observado principalmente nas amostras injetadas. Além disso, quanto maior a quantidade de amido menor foi o valor módulo E'' , porém as amostras P(10-20)A e P(10-20)AS apresentaram valores similares. Adicionalmente, na comparação dos módulos das amostras em autoclave com o das amostras injetadas percebeu-se que nas primeiras, ambos os módulos apresentaram valores mais homogêneos.
- Estudo *in vivo*: pela técnica de MEV percebeu-se que as superfícies das amostras pós-implante apresentaram um padrão de recobrimento por tecido biológico com morfologia capsular. Nas fotomicrografias obtidas via MO, estruturas como fibras musculares, tecidos adiposos (TA) e conjuntivo denso (TCD) foram observados. Além disso, em algumas fotomicrografias foram observados poucos pontos focais de infiltrado inflamatório. Próximo ao tecido muscular foram observadas a presença de TA permeado de TCD, caracterizando um tecido capsular.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Contemplar uma pesquisa visando a implantação de amostras em animais de porte maior (coelhos e cachorros) para observação da resposta no tecido ósseo. Nessa proposta poderão ser utilizados os polímeros PVDF, PLA e amido processados por técnicas distintas das aplicadas no doutorado.

REFERÊNCIAS

- [1] CONSTANTINO, C.J.L.; JOB, A.E.; SIMÕES, R.D.; GIACOMETTI, J.A.; ZUCOLOTTO V.; OLIVEIRA JR. O.N.; GOZZI, G.; CHINAGLIA, D.L. Phase transition in poly(vinylidene fluoride) investigated with micro-Raman spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, v. 59, p. 275-9, 2005.
- [2] SIMÕES, R.D.; RODRIGUEZ-PEREZ, M.A.; DE SAJA, J.A.; CONSTANTINO, C.J.L. Tailoring the Structural Properties of PVDF and P(VDF-TrFE) by Using Natural Polymers as Additives. *Polym Eng Sci.*, v. 49, p. 2150-7, 2009.
- [3] MARQUES, L.; HOLGADO, L.A.; SIMÕES, R.D.; PEREIRA, J.D.A.S.; FLORIANO, J.F.; MOTA, L.S.L.S.; GRAEFF, C.F.O.; CONSTANTINO, C.J.L.; RODRIGUEZ-PEREZ, M.A.; MATSUMOTO, M.; KINOSHITA, A. Subcutaneous tissue reaction and cytotoxicity of polyvinylidene fluoride and polyvinylidene fluoride-trifluoroethylene blends associated with natural polymers. *J Biomed Mater Res Part B.*, v. 101, p. 1284–93, 2013.
- [4] PEREIRA, J. D. A. S.; CAMARGO, R. C. T.; FILHO, J. C. S. C.; ALVES N.; RODRIGUEZ-PEREZ, M. A.; CONSTANTINO, C. J. L. Biomaterials from blends of fluoropolymers and corn starch - implant and structural aspects. *Materials Science and Engineering C.*, v. 36, p. 226–36, 2014.
- [5] YU, L.; CHEN, L. Polymeric Materials from Renewable Resources. In: YU, L. *Biodegradable Polymer Blends and Composites from Renewable Resources*. 1st. Ed. John Wiley & Sons, 2009. p. 4-7.
- [6] ANDERSON, K. S.; SCHRECK, K. M.; HILLMYER, M. A. Toughening polylactide. *Polym Rev.*, v. 48, p. 85-108, 2008.
- [7] LE CORRE, D.; ANGELLIER-COUSSY, H. Preparation and application of starch nanoparticles for nanocomposites: A review. *Reactive & Functional Polymers*, v. 85, p. 97-120, 2014.
- [8] SAITO, Y.; MINAMI, K.; KOBAYASHI, M.; NAKAO, Y.; OMIYA, H.; IMAMURA, H.; SAKAIDA, N.; OKAMURA, A. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v. 123, p. 161-7, 2002.
- [9] WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. *Starch: Chemistry and Technology*, third ed., Elsevier, New York, 2009.

- [10]_____. Sepiolite. ESMA – European Specialty Minerals Association, 2011.
- [11] MANSUR, H. S.; COSTA, H. S. Nanostructured poly(vinyl alcohol)/bioactive glass and poly (vinyl alcohol)/chitosan/bioactive glass hybrid scaffolds for biomedical applications. *Chemical Engineering Journal*, v. 137, p. 72–83, 2008.
- [12] DOBLARÉ, M.; GARCÍA, J. M.; GÓMEZ, M. J. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Eng Fract Mech.*, v. 71, p. 1809–40, 2004.
- [13] CANCEDDA, R.; DOZIN, B.; GIANNONI, P.; QUARTO, R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol.*, v. 22, p. 81–91, 2003.
- [14] ILIZAROV, G. A.; LEDIAEV, V. I.; SHITIN, V. P. The course of compact bone reparative regeneration in distraction osteosynthesis under different conditions of bone fragment fixation (experimental study). *Eksp Khir Anesteziol.*, v.14, p. 3–12, 1969.
- [15] GREEN, S. A.; JACKSON, J. M.; WALL, D. M.; MARINOW, H. ISHKANIAN J. Management of segmental defects by the Ilizarov intercalary bone transport method. *Clin Orthop.*, v. 280, p. 136–42, 1992.
- [16] WIEDEL, J. D. Salvage of infected total knee fusion: the last option. *Clin Orthop.*, v. 404, p.139–42, 2002.
- [17] FINKEMEIER, C. G. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am.* v. 84, p. 454–64, 2002.
- [18] PERRY, C. R. Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clin Orthop.*, v. 360, p. 71–86, 1999.
- [19] KHAN, S. N.; TOMIN, E.; LANE, J. M. Clinical applications of bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am.*, v. 31, p. 389–98, 2000.
- [20] LANE, J. M.; TOMIN, E.; BOSTROM, M. P. Biosynthetic bone grafting. *Clin Orthop Relat Res.*, v. 367, p. S107–17, 1999.
- [21] PUPPI, D.; CHIELLINI, F.; PIRAS, A. M.; CHIELLINI, E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science*, v. 35, p. 403–40, 2010.

- [22] KHAN, Y.; YASZEMSKI, M. J.; MIKOS, A. G.; LAURENCIN, C. T. Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. *JBJS.*, v. 90, p. 36–42, 2008.
- [23] BOSE, S.; ROY, M.; BANDYOPADHYAY, A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol.*, v. 30, p. 546–54, 2012.
- [24] KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, v. 26, p. 5474–91, 2005.
- [25] MURPHY, C.M.; HAUGH, M.G.; O'BRIEN, F. J. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 31, p.461–66, 2010.
- [26] RYAN, G.; PANDIT, A.; APATSIDIS, D.P. Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications. *Biomaterials*, v. 27, p. 2651–70, 2006.
- [27] GALOIS, L.; MAINARD, D. Bone ingrowth into two porous ceramics with different pore sizes: An experimental study. *Acta Orthop. Belg.*, v. 70, p. 598–603, 2004.
- [28] CHANG, B.S.; LEE, C.K.; HONG, K.S.; YOUN, H.J.; RYU, H.S.; CHUNG, S.S.; PARK, K.W. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials*, v. 21, p. 1291–8, 2000.
- [29] BOSE, S.; ROY, M.; BANDYOPADHYAY, A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*, v. 30, p. 546-54, 2012.
- [30] WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. v. 29, p. 2941–53, 2008.
- [31] OLSZTA, M. J.; CHENG, X.; JEE S. S.; KUMAR, R.; KIM, Y-Y.; KAUFMAN, M. J.; DOUGLAS, E. P.; GOWER, L. B. Bone structure and formation: A new perspective. *Mater. Sci. Eng. R: Rep.*, v. 58, p. 77–116, 2007.
- [32] ROUWKEMA, J.; RIVRON, N. C.; VAN BLITTERSWIJK, C. A. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol.*, v. 26, p. 434–41, 2008.
- [33] WOODARD, J. R.; HILLDORE, A. J.; LAN, S. K.; PARK, C. J.; MORGAN, A.W.; EURELL, J. A.; CLARK, S. G.; WHEELER, M. B.; JAMISON, R. D.; JOHNSON, A. J. W.

The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials* v. 28, p. 45–54, 2007.

[34] REZWAN, K.; CHEN, Q.Z.; BLAKER, J. J.; BOCCACCINI, A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 27, p. 3413–31, 2006.

[35] LICHTER, P.; PAPE, H. C.; PUFE, T.; KOBBE, P.; FISCHER, H. Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence. *Injury*, v. 42, p. 569–73, 2011.

[36] OKADA, M. Chemical synthesis of biodegradable polymers. *Prog. Polym. Sci.*, v. 27, p. 87–133, 2002.

[37] WEISZ, P. B. Basic choices and constraints on long-term energy supplies. *Phys. Today*, v. 57, p. 47–52, 2004.

[38] PERFIL. Desempenho da Indústria Brasileira de Transformados Plásticos. São Paulo: ABIPLAST: Associação Brasileira da Indústria do Plástico, 2014. 37 p.

[39] JAMSHIDIAN, M.; TEHRANY, E. A.; IMRAN, M.; JACQUOT, M.; DESOBRY, S. Poly-Lactic Acid: Production, Applications, Nanocomposites, and Release Studies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 9, p. 552-71, 2010.

[40] YUA, L.; DEANA, K.; LI, L. Polymer blends and composites from renewable resources. *Prog. Polym. Sci.*, v. 31, p. 576-602, 2006.

[41] BAJPAI, P. K.; SINGH, I.; MADAAN, J. Development and characterization of PLA-based green composites: A review. *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, v. 27, p. 52-81, 2014.

[42] INKINEN, S.; HAKKARAINEN, M.; ALBERTSSON, A-C.; SÖDERGARD, A. From Lactic Acid to Poly(lactic acid) (PLA): Characterization and Analysis of PLA and Its Precursors. *Biomacromolecules*, v. 12, p. 523-32, 2011.

[43] LEINONEN, S.; SUOKAS, E.; VEIRANTO, M.; TÖRMÄLÄ, P.; WARIS, T.; ASHAM-MAKHI, N. Holding power of bioabsorbable ciprofloxacin-containing self-reinforced poly-L/DL-lactide 70/30 bioactive glass 13 miniscrews in human cadaver bone. *Journal of Craniofacial Surgery*, v. 13, p. 212-218, 2002.

[44] TAYTON, E.; PURCELL, M.; AARVOLD, A.; SMITH, J. O.; BRISCOE, A.; KANCZLER, J. M.; SHAKESHEFF, K. M.; HOWDLE, S. M.; DUNLOP, D. G.; R. OREFFO, O. C. A comparison of polymer and polymer–hydroxyapatite composite tissue engineered scaffolds for use in bone regeneration. An in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res Part A*, v. 102A, p. 2613-24, 2014.

[45] PERSSON, M.; LORITE, G. S.; KOKKONEN, H. E.; CHO, S-W.; LEHENKARI, P. P.; SKRIFVARS, M.; TUUKKANEN, J. Effect of bioactive extruded PLA/HA composite films on focal adhesion formation of preosteoblastic cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 121, p. 409-16, 2014.

[46] RONG, Z.; ZENG, W.; KUANG, Y.; ZHANG, J.; LIU, X.; LU, Y.; CHENG, X. Enhanced Bioactivity of Osteoblast-like Cells on Poly(lactic acid)/Poly(methyl methacrylate)/Nano-hydroxyapatite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Fibers and Polymers*, v.16, p. 245-53, 2015.

[47] YANOSO-SCHOLL, L.; JACOBSON, J. A.; BRADICA, G.; LERNER, A. L.; O'KEEFE, R. J.; SCHWARZ, E. M.; ZUSCIK, M. J.; AWAD, H. A. Evaluation of dense polylactic acid/beta-tricalcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research A*, v. 95A, p. 717-26, 2010.

[48] GUARINO, V.; CAUSA, F.; TADDEI, P.; DI FOGGIA, M.; CIAPETTI, G.; MARTINI, D.; FAGNANO, C.; BALDINI, N.; AMBROSIO, L. Polylactic acid fibre-reinforced polycaprolactone scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 29, p. 3662-70, 2008.

[49] ARAQUE-MONRÓS, M. C.; VIDAURRE, A.; GIL-SANTOS, L.; BERNABÉ, S. G.; MONLEÓN-PRADAS, M.; MÁ-S-ESTELLÉS, J. Study of the degradation of a new PLA braided biomaterial in buffer phosphate saline, basic and acid media, intended for the regeneration of tendons and ligaments. *Polym Degrad Stabil.*, v. 98, p.1563-70, 2013.

[50] DURSELEN, L.; HEHL, G.; SIMNACHER, M.; KINZL, L.; CLAES, L. *Clin. Biomech.*, v. 63, p. 222–28, 2001.

[51] AOKI, M.; MIYAMOTO, S.; OKAMURA, K.; YAMASHITA, T.; IKADA, Y.; MATSUDA, S. *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, v. 71 B, p. 252-9, 2004.

[52] 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.

- [53] KASEEM, M.; HAMAD, K. FAWAZ. D. Thermoplastic Starch Blends: A Review of Recent Works. *Polymer Science, Ser. A*, v. 54, p. 165–76, 2012.
- [54] XIE, F.; POLLET, E.; HALLEY, P. J.; AVÉROUS. L. Starch-based nano-biocomposites. *Progress in Polymer Science*, v. 38 p. 1590–1628, 2013.
- [55] FERREIRA, A. L. Propriedades Vibracionais de Polissacarídeos Naturais. 2008. 78f. Dissertação (Mestrado em Física) – Ciências exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- [56] KIM, H-Y.; PARK, S. S.; LIM, S-T. Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 126, p. 607-20, 2015.
- [57] 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. 607-14, 2010.
- [58] REVEDIN, A.; ARANGUREN, B.; BECATTINI, R.; LONGO, L.; MARCONI, E.; LIPPI, M.M.; SKAKUN, N.; SINITSYN, A.; SPIRIDONOVA, E.; SVOBODAH, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 107, p. 18815-9, 2010.
- [59] HUBER, K. C.; BEMILLER, J. N. Modified starch: chemistry and properties, in: A.C. Bertolini (Ed.), *Starches: Characterization, Properties and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 2010, p. 145–203.
- [60] 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. 981-9, 2010.
- [61] STAGNER, J.; NARAYAN, R. Preparation and Properties of Biodegradable Foams. *J. Polym. Environ.*, v.19, p. 598-606, 2011.
- [62] 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. 302-10, 2012.
- [63] 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, p. 786-92, 1995.

- [64] MARQUES, A. P.; REIS, R. L. HUNT; J. A. The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: in vitro studies. *Biomaterials*, v. 23, p. 1471-8, 2002.
- [65] DUFRESNE, A. Crystalline starch based nanoparticles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 19, p. 397–408, 2014.
- [66] 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. 1617-23, 2008.
- [67] DUARTE, A.R. C.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Enzymatic degradation of 3D scaffolds of starch-poly-(ϵ -caprolactone) prepared by supercritical fluid technology. *Polymer Degradation and Stability*. *Polymer Degradation and Stability*, v. 95, p. 2110-17, 2010.
- [68] SAIKIA, C.; HUSSAIN, A.; RAMTEKE, A.; SHARMA, H. K.; MAJI, T. K. Crosslinked thiolated starch coated Fe_3O_4 magnetic nanoparticles: Effect of montmorillonite and crosslinking density on drug delivery properties. *Starch/Stärke*, v. 66, p. 760-71, 2014.
- [69] 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. 243-52, 2008.
- [70] TUZLAKOĞLU, 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*, v. 92, p. 369-77, 2009.
- [71] SANTOS, T. C.; MARQUES, A. P.; HÖRING, B.; MARTINS, A. R.; TUZLAKOĞLU, 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. 4314-26, 2010.
- [72] YANG, J.; LV, X.; CHEN, S.; LI, Z.; FENG, C.; WANG, H.; XU, Y. In situ fabrication of a microporous bacterial cellulose/potato starch composite scaffold with enhanced cell compatibility. *Cellulose*, v. 21, p. 1823–35, 2014.

[73] 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. 932-42, 2008.

[74] SOUSA, R. A.; KALAY, G.; REIS, R. L.; CUNHA, A. M.; BEVIS, M. J. Injection Molding of a Starch/EVOH Blend Aimed as an Alternative Biomaterial for Temporary Applications. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 77, p. 1303–15, 2000.

[75] ARAMENDIA, M. A.; BORAU, V.; JIMNEZ, C.; MARINAS, J. M.; PORRAS, A.; URBANO, F. J.; VILLAR, L. Sepiolites as supports for Pd catalysts used in organic reduction processes. *Journal of Molecular Catalysis*, v. 94, p. 131-47, 1994.

[76] LI, F.; DAI, Y.; GONG, M.; YU, T.; CHEN, X. Synthesis, characterization of magnetic-sepiolite supported with TiO₂, and the photocatalytic performance over Cr(VI) and 2,4-dichlorophenol co-existed wastewater. *Journal of Alloys and Compounds*, v. 638, p. 435-42, 2015.

[77] LÓPEZ-GALINDO, A.; VISERAS, C.; CERESO, P. Compositional, technical and safety specifications of clays to be used as pharmaceutical and cosmetic products. *Applied Clay Science*, v. 36, p. 51–63, 2007.

[78] DAWSON, J. I.; OREFFO, R. O. C. Clay: New Opportunities for Tissue Regeneration and Biomaterial Design. *Adv. Mater.*, v. 25, p. 4069-86, 2013.

[79] BILOTTI, E.; FISCHER, H. R.; PEIJS, T. Polymer Nanocomposites Based on Needle-like Sepiolite Clays: Effect of Functionalized Polymers on the Dispersion of Nanofiller, Crystallinity, and Mechanical Properties. *Journal of Applied Polymer Science*, v.107, p. 1116-23, 2008.

[80] BELZUNCE, M. J.; MENDIOROZ, S.; HABER, J. Modification of Sepiolite by treatment with fluorides: structural and textural changes. *Clays and Clay Minerals*, v. 46, p. 603-14, 1998.

[81] INAGAKI, S.; FUKUSHIMA, Y.; MIYATA, M. Inclusion Polymerization of Isoprene in the Channels of Sepiolite. *Res. Chem. Intermed.*, v. 21, p. 167-80, 1995.

[82] RUIZ-HITZKY, E. Molecular access to intracrystalline tunnels of sepiolite. *J. Mater. Chem.*, v.11, p. 86-91, 2001.

- [83] DARDER, M.; LÓPEZ-BLANCO, M.; ARANDA, P.; AZNAR, A. J.; BRAVO, J.; RUIZ-HITZKY, E. Microfibrous Chitosan-Sepiolite Nanocomposites. *Chem. Mater.*, v. 18, p. 1602–10, 2006.
- [84] FRYDRYCH, M.; WAN, C.; STENGLER, R.; O'KELLY, K.U.; CHEN, B. Structure and mechanical properties of gelatin/sepiolite nanocomposite foams *J. Mater. Chem.*, v. 21 p. 9103–11, 2011.
- [85] CARRETERO, M. I.; GOMES, C. S. F.; TATEO, F. in *Handbook of Clay Science*, v.1 (Eds: BERGAYA, F.; THENG, B. K. G.; LAGALY, G.), Elsevier, Amsterdam, Netherlands 2006, p. 717.
- [86] CARRETERO, M. I. Clay minerals and their beneficial effects upon human health. A review. *Appl. Clay Sci.*, v. 21, p. 155-63, 2002.
- [87] CARRETERO, M. I.; POZO, M. Clay and non-clay minerals in the pharmaceutical and cosmetic industries Part II. Active ingredients. *Applied Clay Science*, v. 47, p. 171-81, 2010.
- [88] CARRETERO, M. I.; POZO, M. Clay and non-clay minerals in the pharmaceutical industry Part I. Excipients and medical applications *Appl. Clay Sci.*, v. 46, p. 73-80, 2009.
- [89] WAN, C.; CHEN, B. Synthesis and characterization of biomimetic hydroxyapatite/sepiolite nanocomposites. *Nanoscale*, v. 3, p. 693-700, 2011.
- [90] WARHEIT, D. B.; SAYES, C. M.; FRAME, S. R.; REED, K. L. Pulmonary exposures to Sepiolite nanoclay particulates in rats: Resolution following multinucleate giant cell formation *Toxicol. Lett.*, v. 192 p. 286-93, 2010.
- [91] LIZARBE, M. A.; OLMO, N.; GAVILANES, J. G. Outgrowth of fibroblasts on sepiolite-collagen complex. *Biomaterials*, v. 8, p. 35-37, 1987.
- [92] JANET, C. G.; BARBEE, R. W.; BIELITZKI, J. T.; CLAYTON, L. A.; DONOVAN, J. C.; HENDRIKSEN, C. F. M.; KOHN, D. F.; LIPMAN, N. S.; LOCKE, P. A.; MELCHER, J.; QUIMBY, F. W.; TURNER, P.V.; WOOD, G. A.; WÜRBEL, H. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, eighth edition, National Academies Press, Washington DC, 2011.
- [93] HARKWESS, J. E.; WAGNER, J. E. *Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores*. São Paulo: Ed. Roca. p. 238. 1993.

- [94] McMANUS, J. F. A.; MOWRY, R. W. Staining methods: histologic and histochemical medical division. 1st Ed. Harper & Brother. p. 310, 1960.
- [95] MATUANA, L.M. Solid state microcellular foamed poly(lactic acid): Morphology and property characterization. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3643–50, 2008.
- [96] MATUANA, L.M.; PARK, C.B.; BALATINECZ, J.J. Processing and cell morphology relationships for microcellular foamed PVC/cellulosic fiber composites. *Polym. Eng. Sci.* v. 37, p. 1137-47, 1997.
- [97] WOOTHKANOKKHAN, J.; KASEMWANANIMIT, P.; SOMBATSOMPOP, N.; KOSITCHAIYONG, A.; AYUTTHAYA, S. I.; KAABBUATHONG. N. Preparation of Modified Starch-Grafted Poly(lactic acid) and a Study on Compatibilizing Efficacy of the Copolymers in Poly(lactic acid)/Thermoplastic Starch Blends. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 126, p. E389-E396, 2012.
- [98] In: Poly(lactic acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications, edited by AURAS, R.; LIM, L-T.; SELKE, S. E. M.; TSUJI, H.; YU, L.; PETIANAKIS, E.; DEAN, K.; LIU. H. Poly(lactic acid)/Starch blends. 1st. Ed. John Wiley & Sons, p. 219, 2010.
- [99] HAO, A.; GENG, Y.; XU, Q.; LU, Z.; YU, L. Study of Different Effects on Foaming Process of Biodegradable PLA/Starch Composites in Supercritical/Compressed Carbon Dioxide. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 109, p. 2679-86, 2008.
- [100] LEE, S-Y.; HANNA, M. A. Preparation and Characterization of Tapioca Starch Poly(lactic acid)-Cloisite NA1 Nanocomposite Foams. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 110, p. 2337-44, 2008.
- [101] ZHANG, J-F.; SUN, X. Biodegradable Foams of Poly(lactic acid)/Starch. I. Extrusion Condition and Cellular Size Distribution. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 106, p. 857–62, 2007.
- [102] LIM, L.T.; AURAS, R.; RUBINO, M. Processing technologies for poly(lactic acid). *Progress in Polymer Science*, v. 33, p. 820-52, 2008.
- [103] GHOSH, S.; VIANA, J. C.; REIS, R. L.; MANO J. F. Effect of Processing Conditions on Morphology and Mechanical Properties of Injection-Molded Poly(L-lactic acid). *Polym. Eng. Sci.*, v. 47, p.1141-47, 2007.

- [104] MIYATA, T.; MASUKO, T. Crystallization behaviour of poly(L-lactide). *Polymer*, v. 39, p. 5515-21, 1998.
- [105] LIAO, X.; NAWABY, A.V.; WHITFIELD, P. S. Carbon dioxide-induced crystallization in poly(L-lactic acid) and its effect on foam morphologies. *Polym. Int.*, v. 59, p. 1709-18, 2010.
- [106] SCHULTZE, J. D.; ENGELMAN, I. A. D.; BOEHNING, M. J. *Polym. Adv. Technol.*, v. 2, p. 123-6, 1991.
- [107] HANDA, Y. P.; ZHANG, Z.; WONG, B. *Macromolecules*, v. 30, p. 8499-504, 1997.
- [108] HANDA, Y.P.; ZHANG, Z.; ROOVERS, J. J. *Polym. Sci. B: Polym. Phys.*, v. 39, p. 1505-12, 2001.
- [109] LV, S.; GU, J.; CAO, J.; TAN, H.; ZHANG, Y. Effect of annealing on the thermal properties of poly (lactic acid)/starch blends. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 74, p. 297-303, 2015.
- [110] NA, B.; ZOU, S. F.; LV, R. H.; LUO, M. B.; PAN, H. Y.; YIN. Q. Unusual Cold Crystallization Behavior in Physically Aged Poly(l-lactide). *J. Phys. Chem. B.*, v. 115, p. 10844-48, 2011.
- [111] JACOBSEN, S.; FRITZ, H. G. Filling of Poly(Lactic Acid) With Native Starch. *Polymer Eng. Sci.*, v. 36, p. 2799-2804, 1996.
- [112] PARK, J. W.; IM, S. S.; KIM, S. H; KIM, Y. H. Biodegradable polymer blends of poly(L-lactic acid) and gelatinized starch. *Polym Eng Sci.*, v. 40, p. 2539-50, 2000.
- [113] KE, T.; SUN, X. Effects of moisture content and heat treatment on the physical properties of starch and poly(lactic acid) blends. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 81, p. 3069-82, 2001.
- [114] WANG, H.; SUN, X.; SEIB, P. Strengthening blends of poly(lactic acid) and starch with methylenediphenyl diisocyanate. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 82, p. 1761-67, 2001.
- [115] WANG, H.; SUN, X.; SEIB, P. Mechanical properties of poly(lactic acid) and wheat starch blends with methylenediphenyl diisocyanate. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 84, p. 1257-62, 2002.

- [116] KE, T.; SUN, X. S. Thermal and mechanical properties of poly(lactic acid)/starch/methylenediphenyl diisocyanate blending with triethyl citrate. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 88, p. 2947-55, 2003.
- [117] KE, T.; SUN, X. Melting behavior and crystallization kinetics of starch and poly(lactic acid) composites. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 89, p. 1203-10, 2003.
- [118] WANG, H.; SUN, X.; SEIB, P. Properties of poly(lactic acid) blends with various starches as affected by physical aging. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 90, p. 3683-89, 2003.
- [119] ZHANG, J-F.; SUN, X. Mechanical and thermal properties of poly(lactic acid)/starch blends with dioctyl maleate. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 94, p. 1697-704, 2004.
- [120] ZHANG, J-F.; SUN, X. Mechanical Properties of Poly(lactic acid)/Starch Composites Compatibilized by Maleic Anhydride. *Biomacromolecules*, v. 5, p. 1446-51, 2004.
- [121] WU, J.; ZOU, X.; JING, B.; DAI, W. Effect of Sepiolite on the Crystallization Behavior of Biodegradable Poly(lactic acid) as an Efficient Nucleating Agent. *Polym. Eng. Sci.*, v. 55, p. 1104-12, 2015.
- [122] PARK, A.; CIMA, L. G. In vitro cell response to differences in poly-L-lactide crystallinity. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 31, p.117-30, 1996.
- [123] SARASUA, JR.; LÓPEZ-ARRAIZA, A.; BALERDI, P.; MAIZA, I. Crystallization, thermal behaviour of optically pure polylactides,their blends. *J Mater Sci.*, v. 40, p. 1855–62, 2005.
- [124] SARASUA, JR.; LÓPEZ-ARRAIZA, A.; BALERDI, P.; MAIZA, I. Crystallization, mechanical properties of optically pure polylactides, their blends. *Polym Eng Sci.*, v. 45, p. 745–53, 2005.
- [125] LI, S.; McCARTHY, S. Further investigations on the hydrolytic degradation of poly(DL-lactide). *Biomaterials*, v. 201, p. 35–44, 1999.
- [126] TSUJI, H.; MIYAUCHI, S. Poly(L-lactide): VI effects of crystallinity on enzymatic hydrolysis of poly(L-lactide) without free amorphous region. *Polym Degrad Stabil.*, v. 71, p. 415–24, 2001.

- [127] TSUJI, H. In vitro hydrolysis of blends from enantiomeric poly(lactide)s. *Biomaterials*, v. 24, p. 537–47, 2003.
- [128] KARST, D.; YANG, Y. Molecular modelling study of the resistance of PLA to hydrolysis based on the blending of PLLA and PDLA. *Polymer*, v. 47, p. 4845–50, 2006.
- [129] SARASUA, J. R.; LÓPEZ-RODRÍGUEZ, N.; ZUZA, E.; PETISCO, S.; CASTRO, B.; DEL OLMO, M.; PALOMARES, T.; ALONSO-VARONA, A. Crystallinity assessment and in vitro cytotoxicity of polylactide scaffolds for biomedical applications. *J Mater Sci: Mater Med.*, v. 22, p. 2513–23, 2011.
- [130] DUEKA, E. A. R.; ZAVAGLIA, C. A. C.; BELANGERO, W. D. In vitro study of poly(lactic acid) pin degradation. *Polymer*, v. 40, p. 6465–73, 1999.
- [131] AREIAS, A. C.; RIBEIRO, C.; SENCADAS, V.; GARCIA-GIRALT, N.; DIEZ-PEREZ, A.; GÓMEZ RIBELLESDE, J. L.; LANCEROS-MÉNDEZ, S. Influence of crystallinity and fiber orientation on hydrophobicity and biological response of poly(L-lactide) electrospun mats. *Soft Matter*, v. 8, p. 5818-25, 2012.
- [132] WASHBURN, N. R.; YAMADA, K. M.; SIMON JR, C. G.; KENNEDY, S. B.; AMIS, E. J. High-throughput investigation of osteoblast response to polymer crystallinity: influence of nanometer-scale roughness on proliferation. *Biomaterials*, v. 25, p. 1215–24, 2004.
- [134] UNE-EN ISO 178:2011, *Plastics - Determination of flexural properties (ISO 178:2010)*.
- [135] UNE-EN ISO 527-1:2012, *Plastics - Determination of properties in traction part 1: General principles (ISO 527-1:2012)*.
- [136] UNE-EN ISO 527-2:2012, *Plastics - Determination of properties in traction part 2: Plastics for injection molding and extrusion test conditions (ISO 527-2:2012)*.
- [137] HUNEAULT, M. A.; LI, H. Morphology and properties of compatibilized polylactide/thermoplastic starch blends. *Polymer*, v. 48, p. 270-80, 2007.
- [138] SIRIN, H.; TUNA, B.; OZKOC, G. The Effects of thermomechanical cycles on the properties of PLA/TPS blends. *Advances in Polymer Technology*, v. 33, S1, p. 21458 (E1-9), 2014.

- [139] KE, T.; SUN, X. Physical Properties of Poly(Lactic Acid) and Starch Composites with Various Blending Ratios. *Cereal Chem.*, v. 77, p. 761-8, 2000.
- [140] PAUL, D. R.; ROBESON L. M. Polymer nanotechnology: nanocomposites. *Polymer*, v. 49, p. 3187–204, 2008.
- [141] CHAPPLE, S.; ANANDJIWALA, R.; RAY, S. S. Mechanical, thermal, and fire properties of polylactide/starch blend/clay composites. *J Therm Anal Calorim.*, v. 113, p. 703-12, 2013.
- [142] CHIVRAC, F.; GUEGUEN, O.; POLLET, E.; AHZI, S.; MAKRADI, A.; AVEROUS, L. Micromechanical modeling and characterization of the effective properties in starch based nano-biocomposites. *Acta Biomaterialia*, v. 4, p. 1707-14, 2008.
- [143] LUO, J. J.; DANIEL, I. M. Characterization and modeling of mechanical behavior of polymer/clay nanocomposites. *Composites Science and Technology*, v. 63, p. 1607-16, 2003.
- [144] ZHANG, S.; FENG, X.; ZHU, S.; HUAN, Q.; HAN, K.; MA, Y.; YU, M. Novel toughening mechanism for polylactic acid (PLA)/starch blends with layer-like microstructure via pressure-induced flow (PIF) processing. *Materials Letters*, v. 98, p. 238–41, 2013.
- [145] REN, J.; LIU, Z.; REN, T. Mechanical and Thermal Properties of Poly(lactic Acid)/Starch/Montmorillonite Biodegradable Blends. *Polymers & Polymer Composites*, v. 15, p. 633-38, 2007.
- [146] YUZAY, I. E.; AURAS, R.; SELKE, S. Poly(lactic acid) and Zeolite Composites Prepared by Melt Processing: Morphological and Physical–Mechanical Properties. *J. Appl Polym Sci.*, v. 115, p. 2262–70, 2010.
- [147] JU, D.; HAN, L.; LI, Z.; CHEN, Y.; WANG, Q.; BIAN, J.; DONG, L. Porous poly(l-lactic acid) sheet prepared by stretching with starch particles as filler for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, v. 142, p. 222–29, 2016.]
- [148] LI, H.; YAN, Y.; WEI, J.; MA, J.; GONG, M.; LUO, X.; ZHANG, Y. Bone substitute biomedical material of multi-(amino acid) copolymer: in vitro degradation and biocompatibility. *J Mater Sci: Mater Med.*; v. 22, p. 2555–63, 2011.
- [149] SALERNO, A.; ZEPPELELLI, S.; OLIVIERO, M.; BATTISTA, E.; DI MAIO, E.; IANNACE, S.; NETTI, P. A. Microstructure, degradation and in vitro MG63 cells interactions

of a new poly(ϵ -caprolactone), zein, and hydroxyapatite composite for bone tissue engineering. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v.27, p. 210–26, 2012.

[150] WEIR, N. A.; BUCHANAN, F. J.; ORR, J. F.; DICKSON, G. R. Degradation of poly-L-lactide. Part 1: in vitro and in vivo physiological temperature degradation. *Proc. Instn Mech. Engrs. Part H: J. Engineering in Medicine*, v. 218, p. 307-19, 2013.

[151] CIAMBELLI, G. S.; PEREZ, M. O.; SIQUEIRA, G. V.; CANDELLA, M. A.; MOTTA, A. C.; DUARTE, M. A. T.; ALBERTO-RINCON, M. C.; DUEK, E. A. R. Characterization of Poly (L-co-D,L Lactic Acid) and a Study of Polymer-tissue Interaction in Subcutaneous Implants in Wistar Rats. *Materials Research*, v. 16, p. 28-37, 2013.

ANEXO I

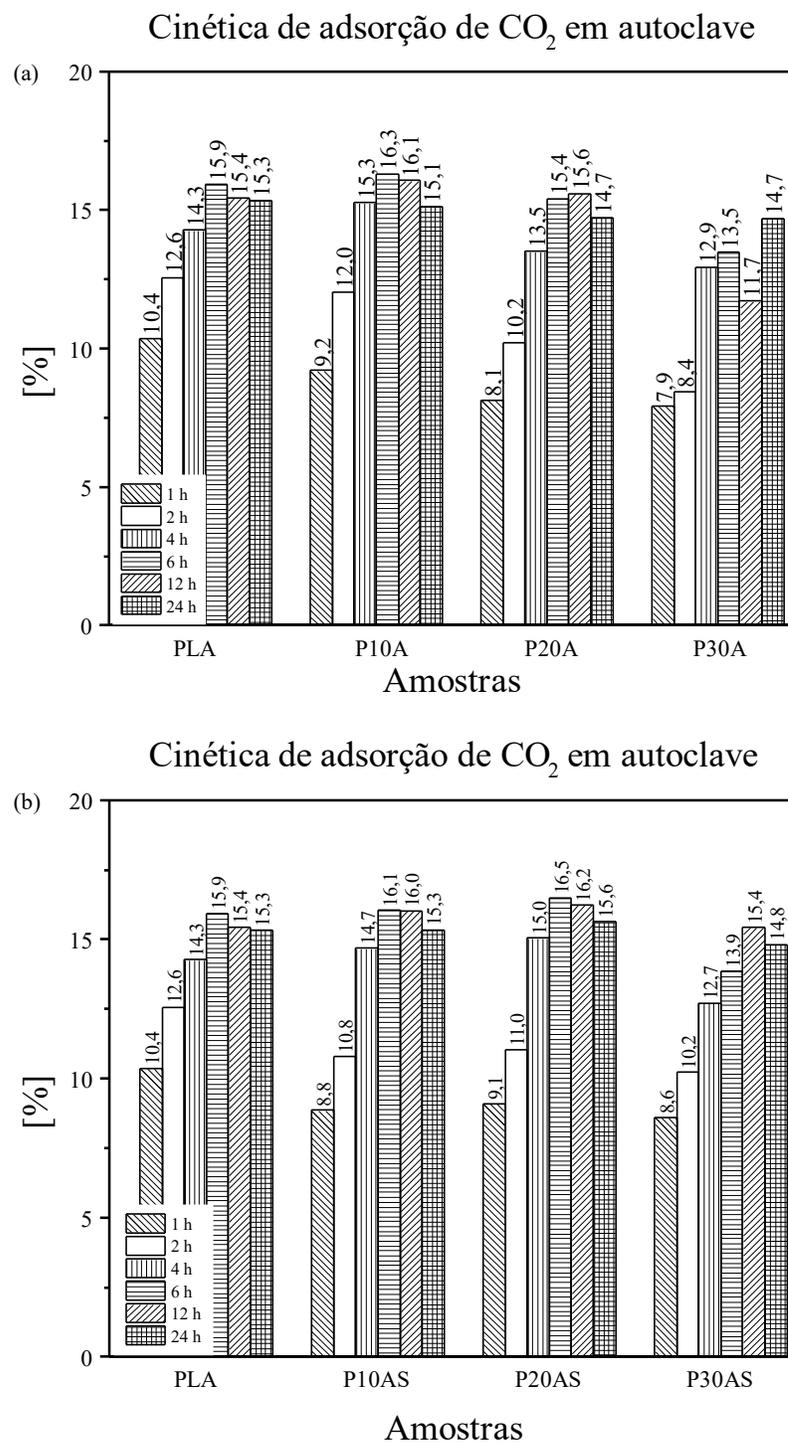
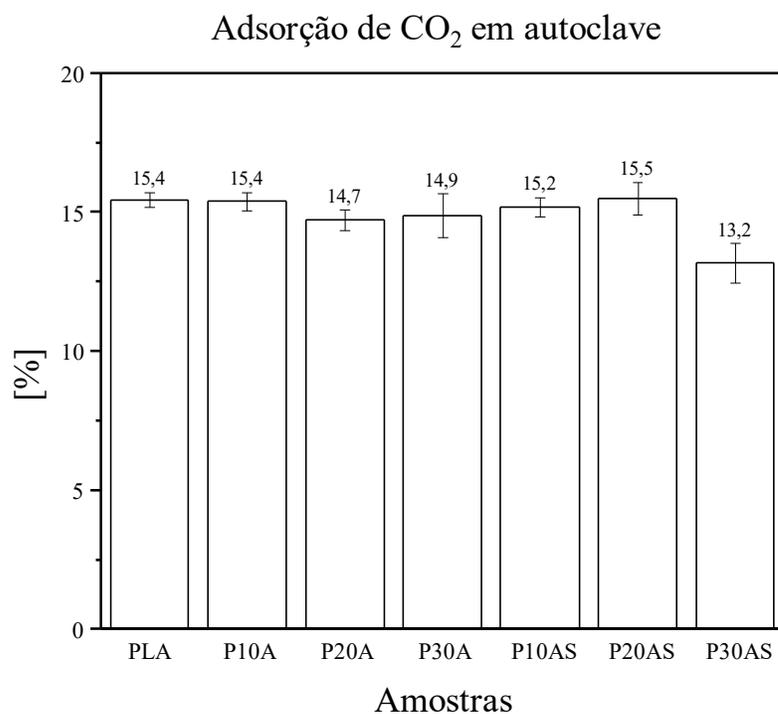


Figura A1 – Cinética de adsorção percentual de CO₂ para os períodos de 1 a 24 h em autoclave, nas amostras precursoras sem SEP (a) e com SEP (b).



Adsorção percentual de CO₂ nas amostras precursoras após o período de 24 h em autoclave.

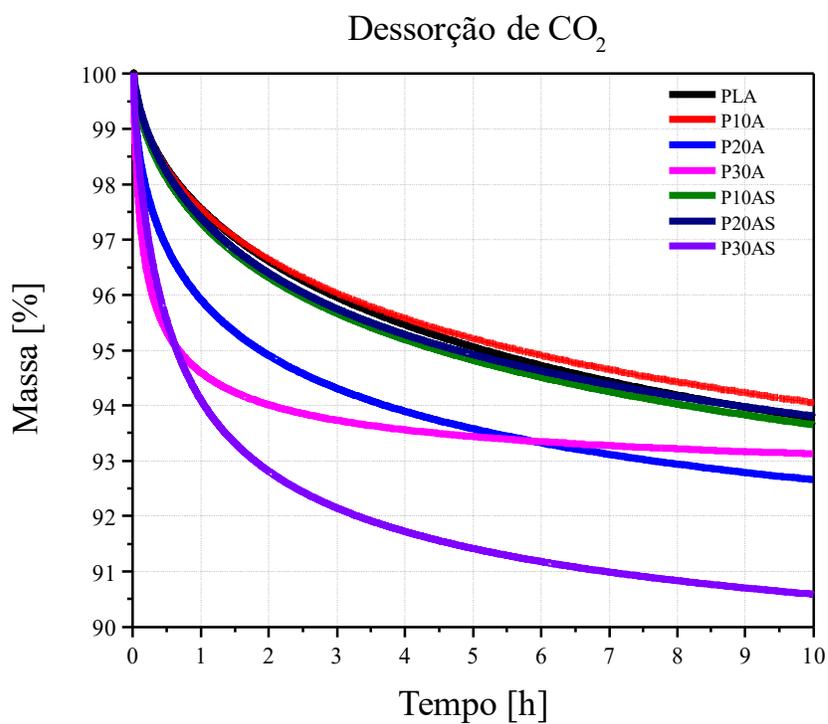


Figura A2 – Dessorção percentual de CO₂ nas amostras precursoras após o período de 24 h em autoclave.

ANEXO II

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Presidente Prudente

Interessado: João Domingos Augusto dos Santos Pereira

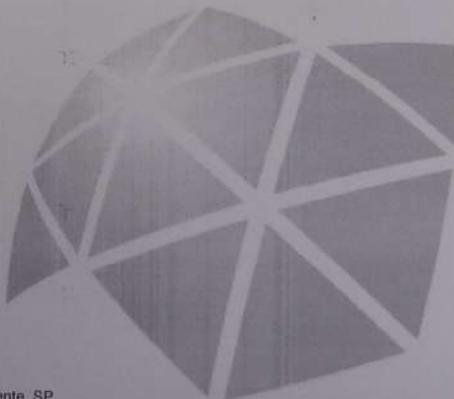
Processo nº. 02/2014

Assunto: Ref. Projeto intitulado: " Desenvolvimento de blendas poliméricas de PLA/amido e PVDF/amido para aplicações como biomateriais sob orientação do Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino

Aprovo *ad-referendum* da Comissão de Ética para utilização de animais a referida pesquisa, com base nas manifestações do relator da CEUA.

Presidente Prudente, 07de novembro de 2014.


Prof. Dr. Raul Antonio Fragoso Neto
Coordenador
Comissão de Ética para Utilização de Animais



Faculdade de Ciências e Tecnologia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Roberto Simonsen, 305 CEP 19060-900 Presidente Prudente SP
Tel 18 3229-5313 fax 18 3229-5343 sta@fct.unesp.br

ANEXO III

ANÁLISE RESIDUAL POR CROMATOGRAFIA GASOSA

A análise residual realizada por cromatografia gasosa consiste em uma técnica qualitativa e quantitativa com a finalidade de detectar resíduos provenientes do processo de esterilização a óxido de etileno. Esses resíduos, óxido de etileno (ETO), etilenocloridrina (ETCH) e etilenoglicol (ETGL), em uma concentração alta são considerados nocivos ao ser humano, por isso é necessário ter um controle rígido desses produtos.

De acordo com a Portaria Interministerial nº 482 de 16 de Abril de 1999, esses resíduos devem ser quantificados e o material só pode ser liberado para uso mediante resultados dentro da tabela que essa norma disponibiliza.

A Oxetil preocupada com o serviço que presta, realiza testes com materiais demonstrando a eficácia do processo de esterilização com relação aos resíduos. Esse teste consiste em submeter as amostras ao ciclo de esterilização, logo após colocá-las em aeração mecânica e de tempo em tempo ir retirando amostras e analisando para saber se há resíduos.

Os testes foram realizados de acordo com a tabela abaixo:

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA	TEMPO DE AERAÇÃO	PRODUTO
1	24 hrs de aeração	PLA BG
2	48 hrs de aeração	PLA 10ASBG
3	3 dias de aeração	PLA H
4	4 dias de aeração	PLA 10AH

CONDIÇÕES DA ANÁLISE

As amostras foram submetidas ao processo de esterilização por óxido de etileno. A partir da finalização do ciclo de esterilização, as amostras foram acondicionadas na sala de aeração e analisadas periodicamente.

Aparelho: Cromatógrafo a Gás G7700 – Intecrom (Calibrado)

Metodologia: Cromatografia Gasosa (ISO 10993-7:1995)

Eluente utilizado para extração dos resíduos: Água deionizada

Temperatura de extração: 37°C (Estufa Calibrada)

Amostras: Amostras testes para pesquisa (PLA BG, PLA 10AS, PLAH e PLA 10AH)

Método: Injeção Direta

Coluna: Capilar Megabore 30M x 0,53MM x 0,5µM

Gases de Arraste: Hidrogênio, Nitrogênio e Ar sintético

Volume da Amostra Analisada: 1 µL

RESULTADOS

1. Padrão (Padrão de cromatografia utilizado para cálculos)

Óxido de Etileno: 101,94 ppm (partes por milhão)

Etilenocloridrina: 101,38 ppm (partes por milhão)

Etilenoglicol: 101,68 ppm (partes por milhão)

2. AMOSTRA 1: 24 hrs de aeração

Resíduos de Óxido de Etileno: < 250 ppm (partes por milhão)

Resíduos de Etilenocloridrina: < 250 ppm (partes por milhão)

Resíduos de Etilenoglicol: < 5000 ppm (partes por milhão)

Material considerado inadequado para uso.

3. AMOSTRA 2: 48 hrs de aeração

Resíduos de Óxido de Etileno: < 250 ppm (partes por milhão)

Resíduos de Etilenocloridrina: < 250 ppm (partes por milhão)

Resíduos de Etilenoglicol: < 5000 ppm (partes por milhão)

Material considerado inadequado para uso.

4. AMOSTRA 3: 03 dias de aeração

Resíduos de Óxido de Etileno: < 250 ppm (partes por milhão)

Resíduos de Etilenocloridrina: < 250 ppm (partes por milhão)

Resíduos de Etilenoglicol: < 5000 ppm (partes por milhão)

Material considerado adequado para uso.

5. AMOSTRA 4: 04 dias de aeração

Resíduos de Óxido de Etileno: < 250 ppm (partes por milhão)

Resíduos de Etilenocloridrina: < 250 ppm (partes por milhão)

Resíduos de Etilenoglicol: < 5000 ppm (partes por milhão)

Material considerado adequado para uso.

Conclusão

Mediante análises residuais por Cromatografia Gasosa realizadas com os materiais, é possível comprovar o decréscimo com relação a resíduos provenientes do processo de esterilização. Amostras foram submetidas ao ciclo de esterilização com a finalidade de demonstrar quantitativamente a volatilização dos resíduos pós-esterilização, e certificar que estão aptos a serem utilizados. Foram utilizadas 04 amostras e demonstrado que após 48 horas de aeração os materiais estão seguro ao uso, pois é ,à partir desse tempo de aeração que obtem-se nos materiais estudados o valor seguro de:

	Título	Código	Página
	Protocolo de Validação	PV-05	1 de 7

Resultados dos Controles Utilizados na Esterilização

Indicadores Biológicos

São utilizados bioindicadores contendo esporos de *Bacillus atrophaeus* (*Bacillus subtilis* Var. Niger) em conformidade com Portaria Interministerial nº 482 de 16 de Abril de 1999.

Para o controle positivo de crescimento microbiano, foi incubado um indicador biológico não esterilizado, de mesma marca e lote, durante o mesmo período que estes e em mesmas condições de temperatura. A finalidade do controle positivo é assegurar:

- condições corretas de incubação;
- viabilidade dos indicadores;
- capacidade do meio de cultura em promover rápido crescimento bacteriano.

Os indicadores biológicos processados e o controle positivo foram monitorados durante a incubação em intervalos regulares de 4 horas, verificando a possibilidade de ocorrência de mudança de cor no meio de cultura de verde para amarelo.

Interpretação

A mudança de cor do meio de cultura do indicador biológico de verde para amarelo (RESULTADO POSITIVO) indica o crescimento bacteriano.

Nenhuma mudança de cor do meio de cultura (RESULTADO NEGATIVO) indica um ciclo de esterilização adequado.

O indicador biológico controle positivo deverá ter obrigatoriamente a cor de seu meio de cultura alterada de verde para amarelo dentro do período de 48 horas.

VERDE = RESULTADO NEGATIVO = ESTERILIZAÇÃO EFICIENTE
 AMARELO = RESULTADO POSITIVO = ESTERILIZAÇÃO INADEQUADA

Fitas Indicativas Químicas

O processo de esterilização por óxido de etileno utilizou-se de fitas indicativas químicas. Nome Comercial Fita Indox, Marca 3M.

Interpretação

Este indicador químico apresenta listas amarelas que deverão mudar de cor após a esterilização (as listas amarelas deverão apresentar-se após a esterilização com um espectro de cor que vai do vermelho vinho ao vermelho tijolo). Esta mudança de cor não indica o grau de concentração do gás atingido no interior da câmara, mas somente se o produto já foi exposto ao gás óxido de etileno, diferenciando-o dos demais que ainda não passaram pelo processo.

MUDANÇA DE COR = SATISFATÓRIO
 PERMANÊNCIA DA COR AMARELA = INSATISFATÓRIO

Integradores

O processo de esterilização por óxido de etileno utilizou-se de integradores químicos. Nome comercial 3M Integrador Químico para ETO Comply.

Interpretação

É um indicador químico interno, do tipo integrador, que possibilita a monitorização das condições de esterilização às misturas de gás óxido de etileno no interior das embalagens. Consiste de uma tinta química sobre uma tira de papel absorvente, acondicionada em uma embalagem composta por papel/ película/ folha laminada selada em toda a sua borda, com exceção de um lado.

	Título	Código	Página
	Protocolo de Validação	PV-05	2 de 7

O gás óxido de etileno e a umidade entram através deste lado não selado do integrador e mudam a coloração da tira de papel, a partir deste ponto, de amarelo para azul. A distância percorrida pela migração da cor azul é influenciada por todos os parâmetros da esterilização por ETO (CONCENTRAÇÃO DE GÁS, UMIDADE RELATIVA, TEMPO E TEMPERATURA). A migração da coloração azul através do papel é visível através das janelas identificadas por "ACCEPT" e "REJECT".

Resultados

	Amostra de validação 01	Amostra de validação 02	Amostra de validação 03	Amostra de validação 04	Amostra de validação 05
Indicador Biológico (Attest 3M) Lote: 2015-04 TF Venc.: 04/2015	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Fita Indicativa Química Lote: 2015-08 BA Venc.: 08/2015	satisfatório	satisfatório	satisfatório	satisfatório	satisfatório
Integrador Químico Lote: 2015-04 EA Venc.: 04/2015	satisfatório	satisfatório	satisfatório	satisfatório	satisfatório

Amostra de validação 06

Indicador Biológico (Attest 3M) Lote: 2015-04 TF Venc.: 04/2015	negativo
Fita Indicativa Química Lote: 2015-08 BA Venc.: 08/2015	satisfatório
Integrador Químico Lote: 2015-04 EA Venc.: 04/2015	satisfatório