

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**BLENDAS DE PHBV E PCL PARA USO EM  
DISPOSITIVOS DE OSTEOSSÍNTESE**

Suzan Aline Casarin

São Carlos – SP  
2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**BLENDAS DE PHBV E PCL PARA USO EM  
DISPOSITIVOS DE OSTEOSSÍNTESE**

**Suzan Aline Casarin**

**Tese apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Engenharia de Materiais  
como requisito parcial à obtenção do  
título de DOUTORA EM CIÊNCIA E  
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

Orientador: Dr. José Augusto Marcondes Agnelli

Co-Orientadora: Dra. Sônia Maria Malmonge

**São Carlos – SP**

**2010**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

C335bp

Casarin, Suzan Aline.

Blendas de PHBV e PCL para uso em dispositivos de osteossíntese / Suzan Aline Casarin. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

158 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Polímeros. 2. Polímeros biodegradáveis. 3. Blendas poliméricas. 4. Poli (Hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) - PHBV. 5. Poli ( $\epsilon$ -Caprolactona). 6. Polímeros biorreabsorvíveis. I. Título.

CDD: 620.192 (20<sup>a</sup>)

## DEDICATÓRIA

A Deus, pela fé que me mantém viva e fiel à vida honesta de trabalho e de estudo.

Aos meus pais, Osvaldo e Deodete, por suas histórias de sucesso na educação dos filhos, diante de todas as dificuldades. Pelo apoio, encorajamento, amor e pelos ensinamentos que formaram os meus alicerces.

Aos meus irmãos Robson e Helbert, por todo apoio, amor, compreensão e pela companhia ao longo da trajetória que me levou à concretização deste sonho.

As minhas irmãs de coração, Ana Paula, Kátia e Kelly, pela amizade e companheirismo, em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

Aos meus verdadeiros amigos que me deram suporte e incentivo durante este percurso.

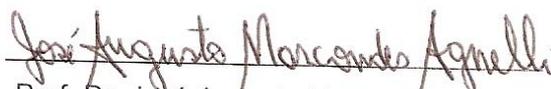
## **VITAE DO CANDIDATO**

Mestre em Ciência e Engenharia dos Materiais pela UFSCar (2005).

Engenheira Química pela UNIMEP (2001).

**MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE**  
**SUZAN ALINE CASARIN**  
APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
ENGENHARIA DE MATERIAIS, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO  
CARLOS, EM 15 DE DEZEMBRO DE 2010.

BANCA EXAMINADORA

  
Prof. Dr. José Augusto Marcondes Agnelli

Orientador  
PPG-CEM – UFSCar



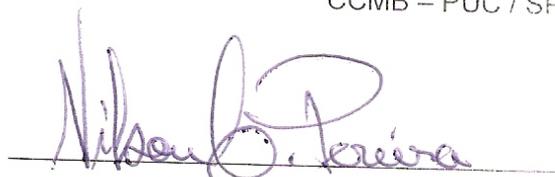
Prof. Dr. José Alexandrino de Sousa  
PPG-CEM – UFSCar



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sílvia Helena Prado Bettini  
DEMa – UFSCar



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Aparecida de Rezende Duek  
CCMB – PUC / SP



Prof. Dr. Nilson Casimiro Pereira  
Universidade Presbiteriana Mackenzie



## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Augusto Marcondes Agnelli, pela orientação, amizade, dedicação e pela transmissão de conhecimentos e convivência acadêmica.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Sônia Maria Malmonge, pela co-orientação, amizade, apoio e incentivo.

Aos grandes amigos do grupo de Polímeros Biodegradáveis, Osvaldo, Elias, Chico, Lauriberto, Tatu e Jeffer, pelas discussões, auxílio, incentivo e pela amizade. Em especial ao Osvaldo e Sr. Elias pelas conversas descontraídas do dia a dia, sempre importantes.

Aos técnicos e amigos do DEMa, principalmente da área de polímeros, pela ajuda.

A Malú por ser sempre prestativa e atenciosa e principalmente pela amizade.

As meninas que moram ou moraram comigo (Karina, Juliana, Koki, Leila, Luana, Márcia e Natalia), pela grande amizade.

A PHB Industrial S.A. pelo fornecimento dos polímeros em estudo.

Ao Laboratório de Polímeros Biodegradáveis.

Ao Julian M. Saga, um amigo especial, pela amizade, companheirismo e todo apoio durante esta jornada.

Aos familiares queridos, pela compreensão e grande incentivo.

A Korth RFID Ltda pela autorização de afastamento parcial nos primeiros anos de doutorado.



## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar blendas poliméricas utilizando os polímeros biodegradáveis e biorreabsorvíveis poli(hidroxibutirato-co-valerato) – PHBV, com 12% de valerato, e poli( $\epsilon$ -caprolactona) - PCL, com a finalidade de tornar o PHBV menos frágil para aplicações tais como dispositivos de osteossíntese. Estudou-se a mistura binária desses polímeros nas composições PHBV/PCL (75/25 e 50/50). As blendas poliméricas foram preparadas de maneira a simular um processo industrial em grande escala, por extrusão seguida de injeção. Os polímeros puros e as blendas poliméricas foram avaliados e caracterizados por: Índice de fluidez (MFI), Análises Térmicas (TG, DSC e DMTA), Microscopia óptica, Microscopia eletrônica de varredura (MEV), Ensaio térmico de temperatura de deflexão ao calor sob carga (HDT), Ensaio mecânicos (impacto, tração e flexão), Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), Análise de degradação *in vitro* e Análise de Citotoxicidade, indireta e direta. Os resultados obtidos através de diversas técnicas indicaram a imiscibilidade das blendas PHBV/PCL. Em termos das propriedades mecânicas, as blendas poliméricas estudadas apresentaram características melhores que o copolímero PHBV, apresentando comportamento menos frágil. No estudo *in vitro*, em solução tampão de fosfato salino com pH 7.3, as amostras de PHBV e de PCL mostraram um comportamento de degradação lenta quando comparados a outros polímeros biorreabsorvíveis. Em função do tempo de degradação os polímeros tornaram-se mais rígidos, aumentando assim os valores dos módulos de elasticidade em tração. Comprovou-se que, em função do tempo de degradação, houve uma redução nos valores das massas molares das amostras estudadas. Através da análise de citotoxicidade constatou-se que os polímeros puros e as blendas estudados não apresentaram toxicidade indireta. Porém, os resultados mostraram toxicidade por contato direto com os polímeros estudados, o que pode estar relacionado às características superficiais dos mesmos.



## BLEND OF PHBV AND PCL FOR USE IN OSTEOSYNTHESIS DEVICES

### ABSTRACT

This study aimed to develop and characterize polymer blends using biodegradable and bioabsorbable polymers poly (hydroxybutyrate-co-valerate) – PHBV with 12% valerate, and poly ( $\epsilon$ -caprolactone) – PCL, in order to make the PHBV less fragile for applications such as osteosynthesis devices. We studied the binary mixture of these polymers in the compositions PHBV / PCL (75/25 and 50/50). The polymer blends were prepared in order to simulate a large-scale industrial process, by extrusion followed by injection. The pure polymers and polymer blends were evaluated and characterized by: Melt Flow Index (MFI), Thermal Analysis (TG, DSC and DMTA), Optical Microscopy, Scanning Electron Microscopy (SEM), Thermal Test of the Heat Deflection Temperature (HDT), Mechanical Tests (impact, tensile and flexural), Size Exclusion Chromatography (SEC), analysis of *in vitro* degradation and Cytotoxicity Analysis, direct and indirect. The results obtained through different techniques indicated the immiscibility of PHBV / PCL blends. In terms of mechanical properties, the polymer blends analyzed indicated better characteristics than copolymer PHBV, presenting a less brittle behavior. In the *in vitro* study, in phosphate buffered saline solution with pH 7.3, the PHBV and PCL samples indicated a slow degradation behavior when compared to other bioabsorbable polymers. Along the degradation period, the polymers became more rigid, increasing the values of the Tensile Modulus of Elasticity. It was verified that, depending on the degradation period, there was a reduction in the values of molar masses of the samples studied. Through the cytotoxicity analysis, it was found that the pure polymers and the blends studied did not indicate indirect toxicity. However, the results indicated toxicity through the direct contact with the polymers studied, which may be related to the superficial characteristics thereof.



## PUBLICAÇÕES

CASARIN, S. A., MALMONGE, S. M., KOBAYASHI, M. & AGNELLI, J. A. M.  
Thermomechanical properties of polymer blends composed of poly  
(hydroxybutyrate-co-valerate) and poly-caprolactone. Carbohydrate  
Polymers. (Submetido).

CASARIN, S. A., MALMONGE, S. M., KOBAYASHI, M. & AGNELLI, J. A. M.  
Study on *in vitro* degradation of bioabsorbable polymers  
poly(hydroxybutyrate-co-valerate) - (PHBV) and poly(caprolactone) - (PCL).  
Polymer Testing. (Submetido).

### **Congressos Nacionais:**

CASARIN, S. A., MALMONGE, S. M. e AGNELLI, J. A. M. Preparação e  
caracterização da blenda biodegradável PHBV/PCL. In: 10º CONGRESSO  
BRASILEIRO DE POLÍMEROS, Foz de Iguaçu – PR, Outubro / 2009.



## SUMÁRIO

BANCA EXAMINADORA	i
AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
PUBLICAÇÕES	ix
SUMÁRIO	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xv
ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
<b>2 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>05</b>
2.1 Terminologia	05
2.2 Poli(hidroxibutirato-co-valerato) – PHBV	06
2.3 Poli( $\epsilon$ -caprolactona) – PCL	13
2.4 Blendas Poliméricas	16
2.4.1 Miscibilidade em Blendas	17
2.4.2 Critérios para avaliar miscibilidade	18
2.4.2.1 Avaliação pela Temperatura de transição vítrea, T <sub>g</sub>	18
2.4.2.2 Avaliação pela Temperatura de fusão cristalina, T <sub>m</sub>	19
2.4.3 Blendas poliméricas com PHB e PHBV	19
2.4.4 Blendas poliméricas com PCL	20
2.4.5 Blendas de PHB ou PHBV com PCL	20
2.5 Polímeros como biomateriais biorreabsorvíveis	21
2.6 Avaliação de Biocompatibilidade	25
2.6.1 Testes <i>in vitro</i>	26
2.6.1.1 Citotoxicidade	26
2.6.1.2 Avaliação da degradação hidrolítica	28
<b>3 – MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
3.1 MATERIAIS	33
3.1.1 Poli(hidroxiburitaro-co-valerato) – PHBV	33

3.1.2 Poli( $\epsilon$ -caprolactona) – (PCL)	33
3.2 Metodologia	34
3.2.1 Processamento dos materiais	34
3.2.1.1 Processamento por Extrusão	35
3.2.1.2 Moldagem por Injeção	36
3.2.2 Índice de Fluidez	37
3.2.3 Análises Térmicas	37
3.2.3.1 Termogravimetria – TG	37
3.2.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC	38
3.2.3.3 Análise Térmica Dinâmico-Mecânica – DMTA	38
3.2.3.4 Temperatura de deflexão ao calor sob carga – HDT	38
3.2.4 Microscopia Óptica	39
3.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	39
3.2.6 Comportamento Mecânico	40
3.2.6.1 Ensaio de Impacto	40
3.2.6.2 Ensaio de Tração	40
3.2.6.3 Ensaio de Flexão	40
3.2.7 Cromatografia de exclusão por tamanho – SEC	41
3.2.8 Degradação <i>in vitro</i>	41
3.2.9 Citotoxicidade	45
3.2.9.1 Citotoxicidade Indireta	45
3.2.9.2 Citotoxicidade Direta	46
3.2.9.3 Investigação da adesão e morfologia das células Vero por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	46
<b>4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>47</b>
4.1 Processabilidade dos sistemas em estudo	47
4.1.1 Processamento por Extrusão	47
4.1.2 Moldagem por Injeção	47
4.2 Índice de Fluidez	48
4.3 Análises Térmicas	48
4.3.1 Termogravimetria – TG	48
4.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC	52

4.3.3	Análise Térmica Dinâmico-Mecânica – DMTA	56
4.3.4	Temperatura de deflexão ao calor sob carga – HDT	59
4.4	Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	60
4.5	Comportamento Mecânico	66
4.5.1	Ensaio de Impacto	66
4.5.2	Ensaio de Tração	67
4.5.3	Ensaio de Flexão	70
4.6	Conclusões Parciais	72
4.7	Degradação <i>in vitro</i>	73
4.7.1	Perda de Massa	73
4.7.2	Massa Molar – Cromatografia de Exclusão por Tamanho	75
4.7.3	Índice de Fluidez	80
4.7.4	Termogravimetria – TG	81
4.7.5	Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC	85
4.7.6	Ensaio Mecânico de Tração	89
4.7.7	Análise de Microscopia Ótica	95
4.7.8	Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	100
4.8	Conclusões Parciais	107
4.9	Citotoxicidade	107
4.9.1	Citotoxicidade Indireta	107
4.9.2	Citotoxicidade Direta	109
4.9.3	Investigação da adesão e morfologia das células Vero por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	110
4.10	Conclusões Parciais	118
<b>5</b>	<b>– CONCLUSÕES</b>	<b>119</b>
<b>6</b>	<b>– SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>121</b>
<b>7</b>	<b>– BIBLIOGRAFIAS</b>	<b>123</b>
<b>8</b>	<b>– ANEXOS</b>	<b>141</b>
	ANEXO A	141
	ANEXO B	143
	ANEXO C	145
	ANEXO D	153



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Propriedades do PHBV em função da quantidade de HV	13
Tabela 3.1 – Propriedades e Características do PHBV FE-133, da PHB Industrial S.A.	33
Tabela 3.2 – Propriedades e Características do PCL CAPA 6500	34
Tabela 3.3 – Condições do processo de extrusão para o polímero PHBV puro	35
Tabela 3.4 – Condições do processo de extrusão para o sistema PHBV/PCL (75/25)	35
Tabela 3.5 – Condições do processo de extrusão para o sistema PHBV/PCL (50/50)	36
Tabela 3.6 – Condições do Processamento por Injeção	36
Tabela 3.7 – Condições da análise por Calorimetria Exploratória Diferencial	38
Tabela 4.1 – Valores de Índice de fluidez do PHBV, PCL e suas blendas (190°C/2.160g)	48
Tabela 4.2 – Valores de $T_g$ , $T_c$ , $\Delta H_c$ , $T_m$ , $\Delta H_m$ e Cristalinidade para o PHBV, PCL e suas blendas (a linha clara representa os valores do 1ºAquecimento e a escura do 2ºAquecimento)	53
Tabela 4.3 – Valores de $T_g$ obtidos através do pico de amortecimento $\text{Tan}(\delta)$ dos polímeros puros e dos polímeros nas blendas PHBV / PCL	59
Tabela 4.4 – Valores da Temperatura de Deflexão ao Calor sob Carga	59
Tabela 4.5 – Valores de Resistência ao Impacto Izod, com entalhe para o PHBV, PCL e suas blendas	66
Tabela 4.6 – Valores de $\sigma_e$ , $\epsilon_e$ , $E$ , $\sigma_r$ e $\epsilon_r$ para o PHBV, PCL e suas blendas sob tração	68
Tabela 4.7 – Valores de Módulo de Elasticidade e Resistência à Flexão do PHBV, PCL e suas blendas, com velocidades de 1,3mm/min e de 5mm/min	71
Tabela 4.8 – Variação percentual da massa das amostras em estudo	

para diferentes tempos de imersão em solução tampão fosfato a 37°C	74
Tabela 4.9 – Variação da Massa Molar do PHBV (puro e nas blendas PHBV/PCL (75/25), PHBV/PCL (50/50)) e do PCL ao longo do tempo em contato com solução tampão fosfato a 37°C	76
Tabela 4.10 – Valores de índice de fluidez das amostras em estudo ao longo do tempo em contato com solução tampão fosfato a 37°C	80
Tabela 4.11 – Valores da Temperatura de perda de massa inicial (Ti) e final (Tf) do PHBV, PCL e suas blendas ao longo do tempo em contato com solução tampão salina	82
Tabela 4.12 – Valores de $T_g$ , $T_c$ , $\Delta H_c$ , $T_m$ , $\Delta H_m$ e Cristalinidade para o PHBV, PCL e suas blendas ao longo do tempo de degradação <i>in vitro</i> (a linha clara representa os valores do 1°Aquecimento e a escura do 2°Aquecimento)	88
Tabela 4.13 – Valores de $\sigma_e$ , $\epsilon_e$ , E, $\sigma_r$ e $\epsilon_r$ para o PHBV sob tração, antes e após o contato com a solução salina	91
Tabela 4.14 – Valores de $\sigma_e$ , $\epsilon_e$ , E, $\sigma_r$ e $\epsilon_r$ para o PHBV/PCL (75/25) sob tração antes e após o contato com a solução salina	92
Tabela 4.15 – Valores de $\sigma_e$ , $\epsilon_e$ , E, $\sigma_r$ e $\epsilon_r$ para o PHBV/PCL (50/50) sob tração antes e após o contato com a solução salina	93
Tabela 4.16 – Valores de $\sigma_e$ , $\epsilon_e$ , E, $\sigma_r$ e $\epsilon_r$ para o PCL sob tração antes e após o contato com a solução salina	94
Tabela B1 – Resultados do ensaio de tração, velocidade de 5mm/min	143
Tabela B2 – Resultados do ensaio de tração para a PCL, variando a velocidade do ensaio	143

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Fórmula estrutural dos comonômeros que formam o poli(hidroxibutirato-co-valerato) – PHBV	07
Figura 2.2 – Microorganismo com inclusões de PHB	08
Figura 2.3 – Estrutura esferulítica do PHBV	11
Figura 2.4 – Micrografia obtida por microscopia ótica de lua polarizada após cristalização isotérmica para o PHB (a) 100°C e (b) 90°C	11
Figura 2.5 – Polimerização da $\epsilon$ -caprolactona	14
Figura 2.6 – Mecanismo de hidrólise de um poliéster	29
Figura 2.7 – Ilustração esquemática da progressão do processo de hidrólise	29
Figura 2.8 – Mecanismo de hidrólise do PHB	30
Figura 3.1 – Perfil de rosca da extrusora	35
Figura 3.2 – Corpo de prova esterilizado e embalado	43
Figura 3.3 – Corpos de prova identificados	43
Figura 4.1 – Curva TG para o PHBV puro	49
Figura 4.2 – Curva TG para o PCL puro	49
Figura 4.3 – Curva TG para a blenda PHBV/PCL (75/25)	50
Figura 4.4 – Curva TG para a blenda PHBV/PCL (50/50)	51
Figura 4.5 – Curvas TG, comparação do comportamento do PHBV, do PCL e das blendas PHBV/PCL	52
Figura 4.6 – Curvas DSC do 1° Aquecimento: comparação dos comportamentos do PHBV, do PCL e das blendas PHBV/PCL	54
Figura 4.7 – Curvas DSC do 2° Aquecimento: comparação do comportamento do PHBV, do PCL e das blendas PHBV/PCL	54
Figura 4.8 – Curva DMTA para o PHBV puro	57
Figura 4.9 – Curva DMTA para a blenda PHBV/PCL (75/25)	57
Figura 4.10 – Curva DMTA para a blenda PHBV/PCL (50/50)	58
Figura 4.11 – Curva DMTA para o PCL puro	58
Figura 4.12 – Micrografias de MEV do PHBV com ampliação (a) 1.000x,	

(b) 5.000x e (c) 10.000x	61
Figura 4.13 – Micrografias de MEV da PCL com ampliação (a) 1.000x, (b) 5.000x e (c) 10.000x	62
Figura 4.14 – Micrografias de MEV da blenda PHBV/PCL (75/25) com ampliação (a) 1.000x, (b) 5.000x e (c) 10.000x	64
Figura 4.15 – Micrografias de MEV da blenda PHBV/PCL (50/50) com ampliação (a) 1.000x, (b) 5.000x e (c) 10.000x	65
Figura 4.16 – Resistência ao Impacto Izod com entalhe: comparação entre os materiais estudados	66
Figura 4.17 – Curvas da Tensão em Tração em função da Deformação: (a) PHBV, (b) PHBV/PCL (75/25), (c) PHBV/PCL (50/50) e (d) PCL	69
Figura 4.18 – Curvas da Tensão em Tração em função da Deformação: comparação entre os materiais estudados	70
Figura 4.19 – Curvas da Tensão em Flexão em função da Deformação: comparação entre os materiais e velocidades	71
Figura 4.20 – Variação percentual da massa das amostras em estudo para diferentes tempos de imersão em solução tampão fosfato a 37°C	74
Figura 4.21 – Variação percentual de perda de massa molar em função do tempo para amostras de PHBV, em contato com solução tampão fosfato a 37°C	77
Figura 4.22 – Variação percentual de perda de massa molar do PHBV em função do tempo para amostras da blenda PHBV/PCL (75/25), em contato com solução tampão fosfato a 37°C	77
Figura 4.23 – Variação percentual de perda de massa molar do PHBV em função do tempo para amostras da blenda PHBV/PCL (50/50), em contato com solução tampão fosfato a 37°C	78
Figura 4.24 – Variação percentual de perda de massa molar em função do tempo para amostras de PCL em contato com solução tampão fosfato a 37°C	78
Figura 4.25 – Curvas TG para o PHBV antes e após 90 e 180 dias em contato com a solução tampão fosfato	83
Figura 4.26 – Curvas TG para a blenda PHBV/PCL (75/25) antes e após	

90 e 180 dias em contato com a solução tampão fosfato	83
Figura 4.27 – Curvas TG para a blenda PHBV/PCL (50/50) antes e após 90 e 180 dias em contato com a solução tampão fosfato	84
Figura 4.28 – Curvas TG para o PCL antes e após 90 e 180 dias em contato com a solução tampão fosfato	84
Figura 4.29 – Curvas DSC para o PHBV antes e após 90 e 180 dias em contato com a solução salina	85
Figura 4.30 – Curvas DSC para a blenda PHBV/PCL (75/25) antes e após 90 e 180 dias em contato com a solução salina	86
Figura 4.31 – Curvas DSC para a blenda PHBV/PCL (50/50) antes e após 90 e 180 dias em contato com a solução salina	86
Figura 4.32 – Curvas DSC para o PCL antes e após 90 e 180 dias em contato com a solução salina	87
Figura 4.33 – Curvas Tensão em Tração em função da Deformação para PHBV puro antes e após diferentes tempos em contato com a solução salina	91
Figura 4.34 – Curvas Tensão em Tração em função da Deformação para a blenda PHBV/PCL (75/25) antes e após diferentes tempos em contato com a solução salina	92
Figura 4.35 – Curvas Tensão em Tração em função da Deformação para a blenda PHBV/PCL (50/50) antes e após diferentes tempos em contato com a solução salina	93
Figura 4.36 – Curvas Tensão em Tração em função da Deformação para a PCL antes e após diferentes tempos em contato com a solução salina	94
Figura 4.37 – Micrografia ótica da superfície dos corpos de prova do PHBV (a) 0 dias (b) 60 dias (c) 90 dias (d) 120 dias (e) 150 dias e (f) 180 dias em contato com a solução tampão fosfato	96
Figura 4.38 – Micrografia ótica da superfície dos corpos de prova da blenda PHBV/PCL (75/25) (a) 0 dias (b) 60 dias (c) 90 dias (d) 120 dias (e) 150 dias e (f) 180 dias em contato com a solução tampão fosfato	97
Figura 4.39 – Micrografia ótica da superfície dos corpos de prova da blenda PHBV/PCL (50/50) (a) 0 dias (b) 60 dias (c) 90 dias (d) 120 dias	

(e) 150 dias e (f) 180 dias em contato com a solução tampão fosfato	98
Figura 4.40 – Micrografia ótica da superfície dos corpos de prova do PCL (a) 0 dias (b) 60 dias (c) 90 dias (d) 120 dias (e) 150 dias e (f) 180 dias em contato com a solução tampão fosfato	99
Figura 4.41 – Resultado da análise de EDS para o PHBV	100
Figura 4.42 – Resultado da análise de EDS para a blenda PHBV/PCL (75/25)	101
Figura 4.43 – Micrografia (a) PHBV 0 dias (b) PHBV 60 dias (c) PHBV 90 dias (d) PHBV 120 dias (e) PHBV 150 dias (f) PHBV 180 dias em contato com solução tampão fosfato	103
Figura 4.44 – Micrografia (a) PHBV/PCL (75/25) 0 dias (b) PHBV/PCL (75/25) 60 dias (c) PHBV/PCL (75/25) 90 dias (d) PHBV/PCL (75/25) 180 dias em contato com solução tampão fosfato	104
Figura 4.45 – Micrografia (a) PHBV/PCL (50/50) 0 dias (b) PHBV/PCL (50/50) 90 dias (c) PHBV/PCL (50/50) 180 dias em contato com solução tampão fosfato	105
Figura 4.46 – Micrografia (a) PCL 0 dias (b) PCL 90 dias (c) PCL 180 dias em contato com solução tampão fosfato	106
Figura 4.47 – Toxicidade indireta dos polímeros avaliados por contagem direta (nível de significância de 0,01)	108
Figura 4.48 – Toxicidade indireta dos polímeros avaliados pelo MTT (nível de significância de 0,01)	109
Figura 4.49 – Toxicidade direta dos polímeros avaliados por contagem direta (nível de significância de 0,01)	109
Figura 4.50 – Microscopia Eletrônica de Varredura das células Vero cultivadas por 24 h sobre o PHBV, (a) e (b) aumento de 500x e (c) e (d) aumento de 2.000x	111
Figura 4.51 – Microscopia Eletrônica de Varredura das células Vero cultivadas por 24 h sobre a PCL, (a) e (b) aumento de 500x e (c) e (d) aumento de 2.000x	112
Figura 4.52 – Microscopia Eletrônica de Varredura das células Vero cultivadas por 24 h sobre a blenda PHBV/PCL (50/50), (a) e (b) aumento	

de 500x e (c) e (d) aumento de 2.000x	113
Figura 4.53 – Microscopia Eletrônica de Varredura das células Vero cultivadas por 24 h sobre a blenda PHBV/PCL (75/25), (a) e (b) aumento de 500x e (c) e (d) aumento de 2.000x	114
Figura 4.54 – Microscopia Eletrônica de Varredura da superfície das lamínulas nas quais células Vero foram cultivadas em contato com o PHBV, (a) aumento de 500x e (b) aumento de 2.000x	115
Figura 4.55 – Microscopia Eletrônica de Varredura da superfície das lamínulas nas quais células Vero foram cultivadas em contato com a PCL, (a) aumento de 500x e (b) aumento de 2.000x	115
Figura 4.56 – Microscopia Eletrônica de Varredura da superfície das lamínulas nas quais células Vero foram cultivadas em contato com a blenda PHBV/PCL (50/50), (a) aumento de 500x e (b) aumento de 2.000x	116
Figura 4.57 – Microscopia Eletrônica de Varredura da superfície das lamínulas nas quais células Vero foram cultivadas em contato com a blenda PHBV/PCL (75/25), (a) aumento de 500x e (b) aumento de 2.000x	116
Figura A1 – Curvas DSC para o PHBV	141
Figura A2 – Curvas DSC para a blenda PHBV/PCL (75/25)	141
Figura A3 – Curvas DSC para a blenda PHBV/PCL (50/50)	142
Figura A4 – Curvas DSC para a PCL	142
Figura C1 – Curva TG para o PHBV	145
Figura C2 – Curva TG para o PHBV após 90 dias de degradação <i>in vitro</i>	146
Figura C3 – Curva TG para o PHBV após 180 dias de degradação <i>in vitro</i>	146
Figura C4 – Curva TG para a blenda PHBV/PCL (75/25)	147
Figura C5 – Curva TG para a blenda PHBV/PCL (75/25) após 90 dias de degradação <i>in vitro</i>	147
Figura C6 – Curva TG para a blenda PHBV/PCL (75/25) após 180 dias de degradação <i>in vitro</i>	148
Figura C7 – Curva TG para a blenda PHBV/PCL (50/50)	148

Figura C8 – Curva TG para a blenda PHBV/PCL (50/50) após 90 dias de degradação <i>in vitro</i>	149
Figura C9 – Curva TG para a blenda PHBV/PCL (50/50) após 180 dias de degradação <i>in vitro</i>	149
Figura C10 – Curva TG para a PCL	150
Figura C11 – Curva TG para a PCL após 90 dias de degradação <i>in vitro</i>	150
Figura C12 – Curva TG para a PCL após 180 dias de degradação <i>in vitro</i>	151
Figura D1 – Curva DSC para o PHBV	153
Figura D2 – Curva DSC para o PHBV após 90 dias de degradação <i>in vitro</i>	153
Figura D3 – Curva DSC para o PHBV após 180 dias de degradação <i>in vitro</i>	154
Figura D4 – Curva DSC para a blenda PHBV/PCL (75/25)	154
Figura D5 – Curva DSC para a blenda PHBV/PCL (75/25) após 90 dias de degradação <i>in vitro</i>	155
Figura D6 – Curva DSC para a blenda PHBV/PCL (75/25) após 180 dias de degradação <i>in vitro</i>	155
Figura D7 – Curva DSC para a blenda PHBV/PCL (50/50)	156
Figura D8 – Curva DSC para a blenda PHBV/PCL (50/50) após 90 dias de degradação <i>in vitro</i>	156
Figura D9 – Curva DSC para a blenda PHBV/PCL (50/50) após 180 dias de degradação <i>in vitro</i>	157
Figura D10 – Curva DSC para a PCL	157
Figura D11 – Curva DSC para a PCL após 90 dias de degradação <i>in vitro</i>	158
Figura D12 – Curva DSC para a PCL após 180 dias de degradação <i>in vitro</i>	158





## 1 – INTRODUÇÃO

O avanço do preço internacional do barril de petróleo, a instabilidade da situação geopolítica das regiões detentoras das grandes reservas mundiais e o consenso mundial sobre a necessidade do desenvolvimento de tecnologias de baixa emissão de gases de efeito estufa, como o CO<sub>2</sub>, têm apontado para a possibilidade real da exploração de matérias-primas como fontes renováveis de insumo para a biossíntese de intermediários e de produtos químicos finais. A experiência da utilização do etanol como combustível e o incentivo atual à produção de biodiesel são exemplos concretos do uso de matérias-primas renováveis em substituição a derivados de petróleo [1].

Além do suprimento de necessidades energéticas, a segunda maior demanda pelo uso de derivados de petróleo como matéria-prima consiste na produção de polímeros. É desnecessário salientar os enormes problemas ambientais e de logística que as alternativas atuais de incineração, aterramento e reciclagem destes polímeros têm causado às sociedades desenvolvidas e em desenvolvimento [1].

Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis têm atraído uma grande atenção no mundo inteiro, tanto no ponto de vista científico como tecnológico. Polihidroxicanoatos (PHAs) são exemplos desses materiais, os quais são poliésteres de ácidos hidroxialcanóicos produzidos por uma grande variedade de microorganismos a partir de fontes de carbono renováveis, na forma de materiais de reserva [2].

Os poliésteres são polímeros biodegradáveis contendo grupos funcionais ésteres em sua estrutura. A principal razão é que as estruturas desses materiais são facilmente atacadas por fungos através de hidrólise. Esses polímeros podem oferecer uma grande variedade de propriedades, desde polímeros rígidos altamente cristalinos a polímeros dúcteis [3].

O poli(3-hidroxiбутирато) (PHB) e os copolímeros do hidroxiбутирато com hidroxiуалерато (HV) estão entre os mais estudados PHAs. Eles são extremamente atrativos na preparação de dispositivos biomédicos devido às

suas adequadas propriedades de compatibilidade biológica, biodegradabilidade e termoprocessabilidade [4].

Embora a maioria dos estudos com polímeros biodegradáveis concentre-se na busca de melhoria de suas propriedades visando o emprego destes polímeros na área de embalagens, agricultura e outras, a área de biomateriais vem sendo alvo de pesquisas com tais polímeros, visando o desenvolvimento de dispositivos implantáveis temporários.

Uma variedade de materiais poliméricos vem sendo usada em aplicações biomédicas, graças às características físico-químicas dos polímeros, bem como sua versatilidade estrutural, que permite adequá-los em termos de propriedades a cada aplicação específica. Dentre os polímeros mais usados, têm-se aqueles de origem natural ou sintética, assim como aqueles que sofrem degradação ou permanecem estáveis quando expostos ao ambiente corpóreo [5].

Alguns polímeros tornaram-se essenciais na prática clínica, sendo utilizados como dispositivos implantáveis, incluindo implantes de quadril, lentes artificiais, enxerto vascular de grande diâmetro, etc. e as pesquisas continuam otimizando o desempenho destes materiais *in vivo*. Devido a grande quantidade de implantes requeridos anualmente no mundo todo, esse tipo de produto está se tornando uma necessidade e um grande atrativo para o mercado.

Polímeros biodegradáveis fazem parte deste campo emergente nas pesquisas e vários deles vêm sendo estudados visando as mais diferentes aplicações. Na área médica, aqueles polímeros que podem ser degradados pela ação dos fluidos corpóreos e cujos produtos da degradação possam ser facilmente eliminados ou reabsorvidos pelo organismo, vêm sendo utilizados como fio de sutura, dispositivos de fixação ortopédica (barras, pinos, parafusos) e outros [6]

Implantes de polímeros biorreabsorvíveis têm sido experimentados em muitos procedimentos cirúrgicos, particularmente na área ortopédica, como dispositivos de osteossíntese, em substituição aos biomateriais metálicos. Dentre as vantagens apresentadas pelos polímeros que justificam a

substituição dos materiais metálicos podem ser citados: a proximidade dos valores de módulo elástico em compressão entre os polímeros e o osso ( $E = 1 - 30$  GPa), enquanto que os metais apresentam valores muito elevados ( $E = 100 - 200$  GPa) [7]; os implantes de polímeros biorreabsorvíveis dispensam a segunda cirurgia, necessária no caso dos implantes metálicos para a remoção do mesmo; os implantes metálicos muitas vezes interferem nos resultados de análises radiográficas ou de ressonância magnética nuclear enquanto que os polímeros devido à sua radiolucência não o fazem [7].

Ocorre, porém, que apesar do avanço observado em função dos inúmeros estudos que estão sendo conduzidos nesta área, o uso dos polímeros biorreabsorvíveis para confecção de dispositivos de osteossíntese limita-se a dispositivos de pequenas dimensões, para uso em situações em que o osso não receba grandes solicitações mecânicas. Muitas das pesquisas atuais na área são voltadas à busca de polímeros biorreabsorvíveis com propriedades mecânicas e taxa de reabsorção adequadas às diversas situações clínicas [6, 8].

Dentre os diferentes polímeros biorreabsorvíveis que podem ser empregados na confecção de dispositivos de osteossíntese encontram-se o poli(hidroxi-butilato) - PHB e o poli(hidroxi-butilato-co-valerato) - PHBV. A partir dos resultados de estudos com tais polímeros, verifica-se que devido ao comportamento frágil apresentado em consequência do elevado grau de cristalinidade normalmente desenvolvido por estes polímeros, os mesmos necessitam sofrer modificações que resultem na adequação de suas propriedades mecânicas para viabilizar o emprego na confecção de dispositivos ortopédicos implantáveis.

Além disso, ainda devido ao elevado grau de cristalinidade, estes polímeros apresentam baixa taxa de degradação hidrolítica em condições de pH e temperatura fisiológicas.

Assim sendo, esta Tese de Doutorado teve como objetivo principal estudar as blendas poliméricas do poli(hidroxi-butilato-co-valerato) - PHBV com a poli( $\epsilon$ -caprolactona) - PCL, visando a sua aplicação na confecção de

dispositivos de osteossíntese. O PCL é um polímero biorreabsorvível já utilizado na área médica e cujas propriedades apresentadas podem viabilizar a melhoria das propriedades do PHBV para aplicações como dispositivos de osteossíntese.

## 2 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Terminologia

Os termos degradável, bioabsorvível, biorreabsorvível, biodegradável, compostável e oxidegradável têm sido usados na literatura para qualificar diferenças nas características ou nos mecanismos de degradação [9, 10]. Na prática, os autores ainda usam estes termos de maneira indiscriminada, criando bastante confusão.

A fim de evitar tal impasse, a Sociedade Européia de Biomateriais em uma Conferência de Consenso definiu alguns destes termos. A seguir são reportadas algumas dessas definições:

**Polímero degradável:** Sofre mudanças deletérias nas propriedades físicas ou na aparência, como resultado de interações químicas, físicas e biológicas entre o meio ambiente vivo ativo e o material. Nesta definição, a escala de tempo não é considerada [9].

**Polímero biodegradável:** A degradação é mediada pelo menos parcialmente por sistema biológico, ou seja, pela ação de microrganismos presentes no ambiente, tais como, bactérias, fungos e algas. Para serem considerados biodegradáveis, 80 a 90% do carbono deve ser convertido em CO<sub>2</sub> no prazo máximo de 180 dias [9].

**Polímero compostável:** É um polímero que ao sofrer o processo de biodegradação produz um composto orgânico, cujo destino final é o solo, ou seja, produz húmus com qualidade de adubo. Esse composto final deve atender as legislações vigentes no país [9].

**Polímero bioabsorvível:** É reservado para materiais poliméricos sólidos ou dispositivos médicos que podem se dissolver nos fluidos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia polimérica ou decréscimo da massa molar [10].

**Polímero biorreabsorvível:** Pode ser assimilado por um sistema biológico, ou seja, é definido para polímeros sólidos que sofrem degradação, principalmente por hidrólise, através da cisão das ligações ésteres, formando

produtos atóxicos, biocompatíveis e que depois são reabsorvidos pelo organismo e eliminados por caminhos naturais após a sua metabolização [10].

**Biomaterial:** Um material não vivo utilizado em um dispositivo médico, com intenção de interagir com sistemas biológicos [10].

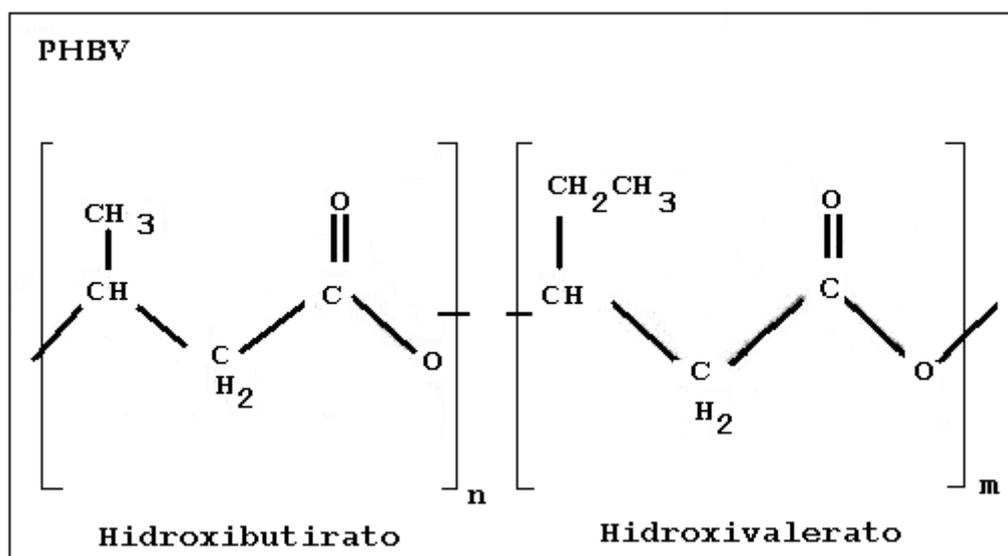
**Biocompatibilidade:** A capacidade de um material induzir uma resposta apropriada do hospedeiro em uma aplicação específica [10].

**Materiais e artigos implantáveis:** São os materiais e artigos de uso médico ou odontológico, destinados a serem introduzidos total ou parcialmente no organismo humano ou em orifício do corpo, ou destinados a substituir uma superfície epitelial ou superfície do olho, através de intervenção médica, permanecendo no corpo após o procedimento por longo prazo, e podendo ser removidos unicamente por intervenção cirúrgica [10].

## 2.2 Poli(hidroxibutirato-co-valerato) – PHBV

A diversidade de polímeros da família dos PHAs (poli(hidroxicanoatos)) e o seu vasto potencial de aplicação dependem da variação do comprimento e da composição das cadeias poliméricas. O poli(hidroxibutirato) – PHB ou P(3HB) é o principal representante dessa família de PHAs e, juntamente com o poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) – PHBV ou poli(3HB-co-3HV), são os mais estudados [11].

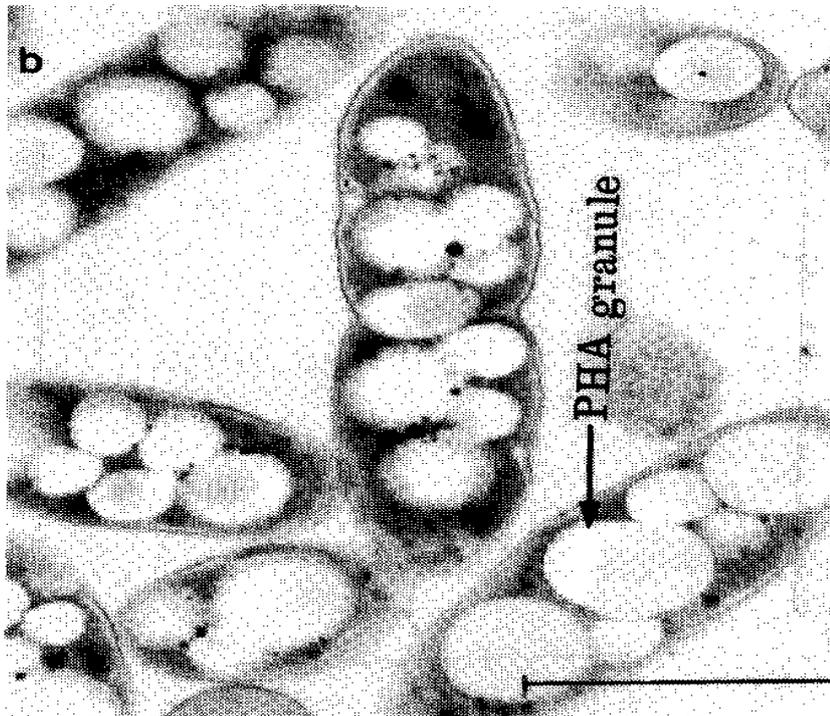
O PHBV, poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato), trata-se de um copolímero semicristalino de cadeia linear, que apresenta unidades hidroxibutirato (HB), em maior proporção, e unidades hidroxivalerato (HV) em menor proporção (Figura 2.1). Assim como os demais PHAs, o PHBV é produzido por um grande número de bactérias [12].



**Figura 2.1 – Fórmula estrutural dos comonômeros que formam o poli(hidroxibutirato-co-valerato) – PHBV**

Há muitos anos o polímero biodegradável PHB está presente no ambiente. Foi identificado primeiro pelo Instituto Pasteur em Paris, em 1925, onde classificou-se suas propriedades físicas e suas características [11]. O pesquisador francês do Instituto observou a formação do polímero em grânulos, como fonte de energia e de estocagem de carbono, no interior de microorganismos como na bactéria *Alcaligenis Euterophus*. A descoberta científica, inicialmente identificada erroneamente como material lipídico permaneceu arquivada como curiosidade científica sem valor prático até o redespertar da biotecnologia para alternativas na produção de plásticos biodegradáveis [11, 13].

A produção do polímero a partir de carboidratos básicos como a glicose e frutose, faz parte do mecanismo acumulador de reservas energéticas promovido pelos microorganismos para garantir a sobrevivência em condições adversas, como carência alimentar. Assim, como os animais armazenam gordura, estas bactérias armazenam o PHB [14]. Na Figura 2.2 é possível observar grânulos de PHB no interior da bactéria.



**Figura 2.2 – Microorganismo com inclusões de PHB [11, 15]**

Atualmente, a fermentação bacteriana é a principal fonte de produção do PHB. O processo constitui-se basicamente de duas etapas: uma etapa fermentativa na qual os microorganismos são alimentados em reatores com ácido butírico ou frutose, onde metabolizam o açúcar disponível e acumulam o PHB no interior da célula como fonte de reserva; e a etapa de extração, onde o polímero acumulado no interior da célula do microorganismo é removido e purificado com solventes adequados até a obtenção do produto final sólido e seco [16, 17, 18].

O PHBV é copolímero do hidroxibutirato com segmentos aleatórios de hidroxivalerato, que é produzido em um processo fermentativo similar ao processo de produção do PHB do qual se difere pela utilização de ácido propiônico, juntamente com a glicose, como fonte de carbono. A quantidade de ácido propiônico na alimentação da bactéria é responsável pela concentração de hidroxivalerato (HV) no copolímero, possibilitando a variação do tempo de degradação e das propriedades térmicas e mecânicas [16].

O aumento na quantidade de unidades HV pode melhorar a flexibilidade e a resistência ao impacto do material [19]. Assim, suas propriedades podem

ser modificadas, alterando-se a composição do copolímero por meio de variações no suprimento fornecido para as bactérias, o que possibilita obter uma larga extensão de propriedades no material, segundo o conteúdo de unidades HV no copolímero [20].

Devido à sua biodegradabilidade, compatibilidade biológica e às semelhanças com os termoplásticos convencionais, o PHBV possui um alto potencial de aplicação na área médica, como matriz de sistemas de liberação controlada de drogas, suturas, suporte para crescimento de tecidos, próteses, na agricultura e na produção de embalagens [12].

A velocidade de degradação do PHBV em meio fisiológico é menor quando comparada a outros polímeros biodegradáveis como o poli(ácido láctico) - PLA e o poli(ácido láctico-co-glicólico) - PLGA, sendo portanto adequado para utilização em implantes que necessitam permanecer maior tempo no organismo [19].

Apesar de apresentar melhores propriedades em relação ao PHB, principalmente com relação à redução da fragilidade, a aplicabilidade do PHBV também é limitada em relação aos polímeros convencionais devido ao seu alto grau de cristalinidade, baixa resistência ao impacto, baixo alongamento, estreita janela de processamento e custo relativamente alto [12].

Muitos estudos estão sendo realizados com o intuito de melhorar as propriedades mecânicas do PHBV e/ou diminuir seu custo, viabilizando assim sua aplicação industrial. Entre muitos trabalhos estão a adição de agentes plastificantes, a produção de blendas, incluindo aqui misturas com outros polímeros, como poli( $\epsilon$ -caprolactona) - PCL, poli(ácido-L-láctico) – PLLA, amido e celulose [12].

A PHB Industrial S/A é a única empresa da América Latina que produz poli(hidroxialcanoatos) de fonte renovável, sendo comercializados com o nome Biocycle<sup>®</sup>. Atualmente, a planta ainda trabalha em uma escala piloto, contudo existe um projeto de uma nova planta comercial com maior capacidade de produção [11, 21].

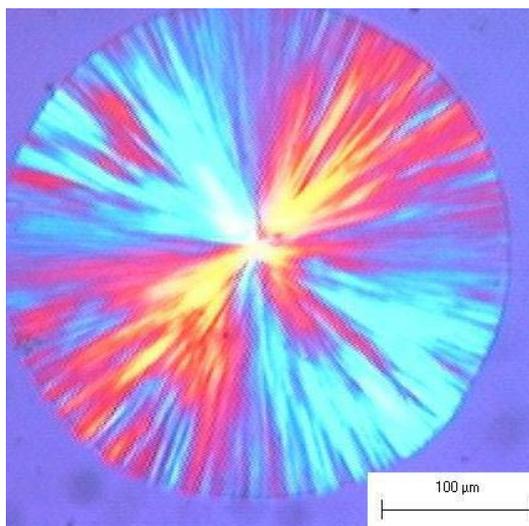
O custo de capital no processo de fermentação e na tecnologia associada à extração, bem como em economia de escala, têm auxiliado na

competitividade do PHB, uma vez que a fonte de carbono é verticalizada através da produção de açúcar e álcool. Os insumos energéticos (energia e vapor) são obtidos através da queima do bagaço da cana-de-açúcar em sistemas de caldeiras, permitindo um grande ganho em custos variáveis. O sistema de extração também utiliza um solvente fabricado pelo próprio produtor do PHB, gerando mais um ganho competitivo [11, 21].

Entre as várias características do PHB, tem-se que: é um material que apresenta compatibilidade biológica; 100% biodegradável, pode ser processado como termoplástico, é hidrofóbico, é 100% estereoespecífico, possui elevada massa molar, é altamente cristalino (55 a 70%), possui boa resistência química e as suas propriedades de barreira propiciam aplicações [22, 23, 24].

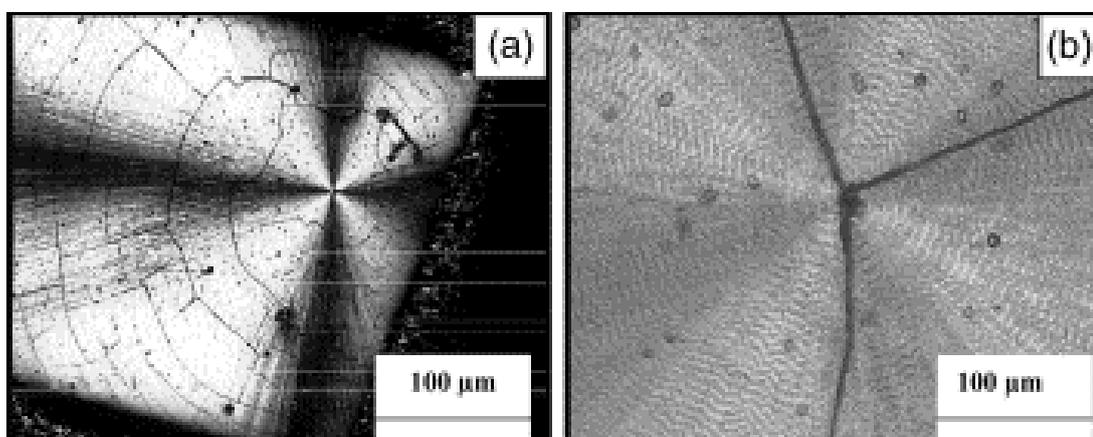
O PHB pode apresentar três configurações moleculares diferentes: isotática, sindiotática e atática, enquanto as demais configurações somente são possíveis em sínteses em escala de laboratório. O meio mais comum de produção do PHB isotático é a fermentação bacteriana estereosseletiva, onde se consegue 100% do PHB produzido na configuração [R]. Esta configuração (isotático forma [R]) é a única que permite ao PHB ser totalmente biodegradável [18].

Por ser um material sintetizado por bactérias, o PHB possui uma estrutura regular, tornando-se cristalino e quebradiço. Além disso, a temperatura de cristalização do PHB é relativamente baixa, fazendo com que o seu grau de cristalinidade aumente após o processamento [25]. No processo de cristalização, o PHB e seu copolímero PHBV formam estrutura esferulítica como mostra a Figura 2.3.



**Figura 2.3 – Estrutura esférica do PHBV [26]**

Quando um polímero tem uma textura esférica, suas propriedades variam com o tamanho e distribuição de tamanhos, e com o número dos esferulitos. Isso significa que as propriedades dependem do resfriamento, uma vez que o resfriamento lento produz esferulitos maiores que um resfriamento rápido [11, 27]. Quanto maiores os esferulitos, mais frágil é o polímero. As micrografias da Figura 2.4 (a) e (b) mostram o PHB com esferulitos grandes e com trincas em torno do centro, que são os responsáveis pelo comportamento mecânico não satisfatório.



**Figura 2.4 – Micrografia obtida por microscopia ótica de lua polarizada após cristalização isotérmica para o PHB (a) 100°C e (b) 90°C [11, 28]**

Estudos mostram um comportamento dúctil do PHB quando este é submetido aos ensaios mecânicos logo após a injeção, porém após 15 dias de estocagem, no resultado do ensaio de tração, como por exemplo, o valor da alongação diminui 75%. Este fenômeno, denominado envelhecimento físico, reflete a fragilidade do material com o passar do tempo [11, 29].

Algumas razões que contribuem para esse envelhecimento físico são: cristalização secundária da fase amorfa na temperatura ambiente; temperatura de transição vítrea próxima à temperatura ambiente, ter baixa densidade de nucleação, o que promove o surgimento de esferulitos “grandes” entre as lamelas provocando rachaduras inter-esferulíticas, bem como confinamentos das regiões amorfas, com conseqüente deterioração das propriedades mecânicas [11, 28, 29].

O PHB homopolímero têm propriedades semelhantes ao polipropileno (PP). Comparativamente a estes, são mais frágeis, e possuem baixa estabilidade térmica e estreita janela de processabilidade, resultando na degradação do fundido durante o processamento [11, 30]. O PHB possui boa estabilidade térmica a temperaturas abaixo de 160°C, mas acima de 170°C a degradação térmica do PHB ocorre rapidamente, através do processo de cisão de cadeia aleatória, com conseqüente diminuição da massa molar [11, 22, 31].

A produção de copolímeros visa diminuir o grau de cristalinidade do PHB através da introdução de meros diferentes ao longo das cadeias poliméricas (HV), permitindo maior flexibilidade e dessa forma ocasionando um aumento na ductilidade e elasticidade comparado com o homopolímero [11].

O PHBV têm como características menor temperatura de fusão cristalina, menor dureza, menor resistência à tração e menor taxa de cristalização que o PHB puro [31]. Suas propriedades físicas e térmicas podem ser modificadas variando o teor de HV, por exemplo, com o aumento de HV a temperatura de fusão cristalina decresce conforme mostrado na Tabela 2.1 [11,18].

**Tabela 2.1 – Propriedades do PHBV em função da quantidade de HV\***

<b>HV (%)</b>	<b>Módulo de elasticidade (GPa)</b>	<b>Resistência à Tração (MPa)</b>	<b>Deformação na Ruptura (%)</b>	<b>Cristalinidade (%)</b>	<b>Temperatura de fusão (°C)</b>
<b>5</b>	1,0	31	8	53,8	173,5
<b>8</b>	0,9	28	15	46,0	166,1
<b>12</b>	0,5	23	35	36,4	165,5

\*Dados fornecidos pela PHB Industrial S/A

Por serem termoplásticos de fonte renovável, biodegradáveis, compostáveis e biocompatíveis, o PHB e PHBV são de grande interesse na utilização para a produção de produtos de uso rápido, como descartáveis e outras aplicações como embalagens para cosméticos, alimentos e defensivos agrícolas, produtos de higiene pessoal, como escova de dente e hastes para cotonetes, materiais para escritório, artefatos médicos de uso humano e veterinário, produtos para indústria automobilística, etc [11, 32].

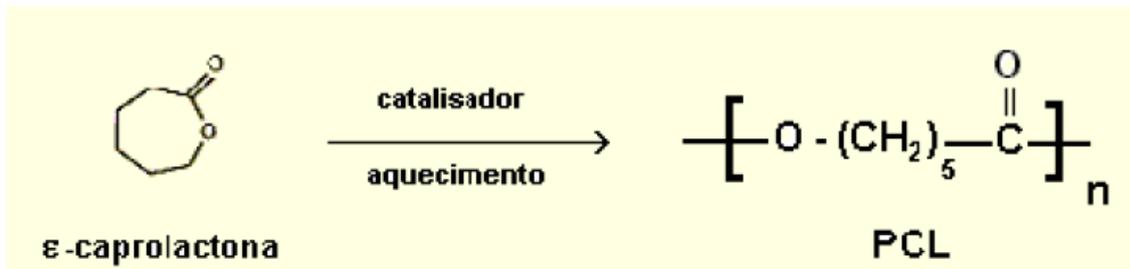
### **2.3 Poli(ε-caprolactona) – PCL**

A poli(ε-caprolactona) ou policaprolactona (PCL) é um polímero termoplástico biodegradável, derivado do petróleo. Embora não seja produzido a partir de materiais naturais renováveis, como o amido, é completamente biodegradável, sendo um polímero que possui inúmeras aplicações. O polímero é comercialmente conhecido principalmente como TONE (The Dow Chemical Company) ou CAPA® (Perstorp UK Limited) [33].

Este tipo de polímero é compatível com uma ampla variedade de técnicas de processamento de termoplásticos, possui propriedades elétricas e termogravimétricas desejáveis, estabilidade à luz UV e, diferente da maioria de outros polímeros comerciais, oferece a propriedade de ser totalmente biodegradável durante a compostagem [33].

A poli(ε-caprolactona) - PCL, é um polímero da classe dos poliésteres alifáticos e destaca-se na família das policaprolactonas. A polimerização por

abertura de anel da  $\epsilon$ -caprolactona (Figura 2.5) fornece um polímero semicristalino com ponto de fusão em torno de  $60^{\circ}\text{C}$ , grau de cristalinidade na ordem de 50% e temperatura de transição vítrea em torno de  $-70^{\circ}\text{C}$  [34].



**Figura 2.5 – Polimerização da  $\epsilon$ -caprolactona [34]**

A lenta taxa de cristalização ocasiona variação na cristalinidade com o decorrer do tempo. Até recentemente o PCL não era usado em quantidades significativas para aplicações de um polímero biodegradável devido ao alto custo. Recentemente estas barreiras de custo foram superadas misturando-se o PCL com polímeros biodegradáveis e outros produtos como o amido, farinha de madeira, etc [35].

A poli( $\epsilon$ -caprolactona), apesar de apresentar vantagens, como facilidade de mistura com outros polímeros e biodegradabilidade, possui uma baixa temperatura de fusão ( $T_m \cong 60^{\circ}\text{C}$ ), o que pode dificultar o seu processamento [34]. Porém, sua facilidade de aumentar a mobilidade molecular de cadeias poliméricas torna possível o seu uso como plastificante. A sua compatibilidade biológica e a sua degradação *in vivo* (muito mais lenta que de outros poliésteres), possibilitam também o seu uso no campo médico em sistemas com longos tempos de uso (1 a 2 anos). Embora não seja produzido de matéria-prima de fontes renováveis, o PCL é completamente biodegradável, puro ou modificado com materiais biodegradáveis. Como o seu ponto de fusão é baixo, faz do material puro ou modificado uma solução para aplicações onde se exige uma temperatura de trabalho menor que  $50^{\circ}\text{C}$  [35].

Pelo fato de possuir baixo ponto de fusão, o PCL tem sido usado na área ortopédica onde oferece excelente conformação no estado fundido e rigidez no

estado sólido. Esta combinação de propriedades faz com que este material seja aplicado na imobilização de áreas do corpo humano ou animal [36].

Vários estudos estão voltados para o PCL, principalmente no contexto de sistemas de liberação de drogas. A blenda polimérica PHBV/PCL permite o uso nas aplicações na área médica, como dispositivo para fixação cirúrgica (clips), sistema de liberação de drogas, onde uma das propriedades mais importantes é a porosidade da matriz, e não as propriedades físicas e degradativas [34]. Devido à sua baixa  $T_g$  e habilidade para aumentar a mobilidade molecular, a PCL tem sido usada como plastificante polimérico [37].

O PCL é biodegradável em vários meios, tais como: águas de rios e lagoas, solo de cultivo e sedimento de tratamento de efluentes. Trabalhos realizados mostram que a massa molar e a cristalinidade são fatores dominantes que afetam a biodegradabilidade do PCL [33]. De acordo com Eldsäter [38], durante a compostagem e degradação em sistemas anaeróbicos, a temperatura tem uma importante influência na degradação. A compostagem a altas temperaturas produz mais  $CO_2$  do que quando ocorre a baixas temperaturas. Uma extensa população de macro e microorganismos existentes podem degradar o PCL, sendo os mais abundantes as bactérias e fungos [33].

A degradação abiótica do PCL tem sido estudada em diferentes pHs e temperaturas. O pH básico e a altas temperaturas favorecem a degradação em meios aquosos [33, 38].

O PCL e outros poliésteres alifáticos podem ser degradados por hidrólise enzimática e/ou química. Ao contrário de outros poliésteres, a massa molar do PCL diminui rapidamente durante a biodegradação. Esta diminuição é também acompanhada por alargamento na distribuição na massa molar e por aparecimento de picos de baixa massa molar [38]. Também foi verificado por Armani e Liu [39], que o material tem uma taxa de biodegradação menor quando comparada a de alguns outros polímeros biodegradáveis (naturais e sintéticos) [33].

## 2.4 Blendas Poliméricas

Blenda polimérica é a mistura física de dois ou mais polímeros, preparada a partir da solução dos polímeros constituintes em solvente comum, seguida da evaporação do solvente, ou a partir da mistura mecânica dos constituintes, seguida da fusão e posterior resfriamento. Normalmente, as propriedades resultantes da mistura são relacionadas com as propriedades dos polímeros puros, e por isso, normalmente o preparo de uma blenda pode atender a diferentes propósitos, tais como associar propriedades apresentadas por diferentes polímeros ou reduzir custo de um material sem alterar de forma crítica as propriedades de interesse para uma determinada aplicação [40].

Do ponto de vista do desenvolvimento e aplicações comerciais, as blendas poliméricas representam um crescente segmento da tecnologia de polímeros. Uma vez que o desenvolvimento de novos polímeros tornou-se um processo dispendioso e, tendo em vista a vasta gama de homopolímeros e copolímeros já existentes, muita atenção tem sido dispensada à preparação de blendas poliméricas como técnica para a modificação de propriedades de materiais poliméricos [40].

Normalmente, a escolha de um par polimérico para a constituição de uma blenda deve obedecer aos critérios de custo, processabilidade e propriedades em questão. Além destes, é importante que sejam analisados aspectos relacionados à estrutura molecular, morfologia, sistema de solventes, condições de mistura, processabilidade, equipamentos e necessidade de aditivos [40].

Blendas poliméricas onde ambos os componentes são semicristalinos são mais complexas e conseqüentemente, abrem um novo caminho para o estudo das relações entre o comportamento das fases e o desenvolvimento da estrutura em misturas poliméricas. De interesse particular é a formação e morfologia do estado semicristalino/semicristalino visto que envolve a cristalização de diferentes polímeros, cada qual em uma temperatura específica [41, 42].

De acordo com Chandra [43], as blendas biodegradáveis podem ser compostas por polímeros inertes como os polietilenos (PE), por exemplo, e biopolímeros, como é o caso da blenda de PE/amido. Outra possibilidade é a formação de blendas à base de termoplásticos não biodegradáveis (polietilenos, poliestireno, poli (cloreto de vinila) - PVC e biodegradáveis (PCL, polihidroxialcanoatos), sendo que a taxa de biodegradação dessas blendas pode variar de acordo com a compatibilidade dos componentes e com as condições do processamento [43].

As blendas à base de polímeros biodegradáveis são desenvolvidas com a finalidade de melhorar as propriedades físicas, químicas, mecânicas e, principalmente, aumentar a taxa de biodegradação. Em algumas formulações obtém-se ainda a redução do custo total do material [44].

Do ponto de vista tecnológico as blendas são normalmente classificadas em compatíveis ou incompatíveis. Diz-se que uma blenda é compatível quando suas propriedades finais apresentam um comportamento favorável em relação ao objetivo que se pretendia atingir. Já um sistema incompatível é aquele que apresenta valores de propriedades inferiores, tratando-se neste caso de efeito antagônico. Uma blenda pode ser imiscível, porém compatível, isto é, apesar de apresentar segregação de fases, as propriedades de interesse apresentam comportamento satisfatório, desejado comercialmente [40].

Quanto ao estado de mistura entre os polímeros envolvidos, as blendas poliméricas podem ser classificadas como: totalmente miscíveis, parcialmente miscíveis ou imiscíveis [40].

#### **2.4.1 Miscibilidade em Blendas**

Para qualquer sistema de multicomponentes a característica mais importante é o grau de miscibilidade. Isto porque todas as outras propriedades do sistema dependem do número de fases, de sua morfologia e da adesão entre elas. O termo miscibilidade está diretamente relacionado com a solubilidade. Polímeros miscíveis significa que eles se dissolvem mutuamente,

portanto, os termos miscíveis e imiscíveis referem-se a um estado termodinâmico [45].

A miscibilidade de uma mistura é influenciada por vários fatores como a temperatura, a pressão, a composição, etc. Misturas de substâncias de baixa massa molar que são heterogêneas à temperatura ambiente apresentam a tendência a se tornarem homogêneas com o aumento da temperatura. Já misturas envolvendo macromoléculas que são homogêneas à temperatura ambiente, quando aquecidas tendem a separar as fases. Dependendo das condições de aquecimento e da temperatura máxima atingida, o mecanismo de separação de fases pode ser diferente: espinodal ou binodal. A separação de fases através destes dois mecanismos origina materiais com diferentes morfologias. O mecanismo binodal em seus primeiros estágios origina uma morfologia em que a fase descontínua está dispersa em uma fase contínua (matriz). Já através do mecanismo espinodal a morfologia resultante é a de duas fases contínuas. A morfologia por sua vez exerce forte influência sobre as propriedades do material [45].

#### **2.4.2 Critérios para avaliar miscibilidade**

Os principais critérios para avaliar miscibilidade são: análises térmicas (Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Análise Térmica Dinâmico-Mecânica (DMTA)), com observação do número e da localização das transições térmicas; comportamento ótico (espalhamento de luz e turbidez) [46].

O critério de avaliação por transições pode ser realizado com base na  $T_g$  (temperatura de transição vítrea) ou na  $T_m$  (temperatura de fusão cristalina).

##### **2.4.2.1 Avaliação pela Temperatura de transição vítrea, $T_g$**

Uma blenda polimérica imiscível usualmente terá duas  $T_{gs}$ , as quais serão idênticas às  $T_{gs}$  dos componentes individuais. Caso o sistema seja miscível, a blenda apresentará uma única  $T_g$  com um valor intermediário às  $T_{gs}$

dos componentes individuais. Um sistema parcialmente miscível também possuirá duas  $T_{gs}$ , mas com valores compreendidos entre as  $T_{gs}$  dos componentes puros [47, 48].

Faz-se necessário ressaltar que esta técnica é de aplicação prática importante, desde que as transições vítreas de ambos os polímeros não sejam muito próximas, pois neste caso, não poderão ser adequadamente distinguidas. Também, polímeros altamente cristalinos podem ter a mudança de linha base da  $T_g$  reduzida tornando difícil detectar esta transição [48].

#### **2.4.2.2 Avaliação pela Temperatura de fusão cristalina, $T_m$**

A temperatura de fusão cristalina ( $T_m$ ) também fornece indícios sobre a miscibilidade do sistema. Quando a mistura de polímeros cristalinos e amorfos exibe miscibilidade no estado fundido, a  $T_m$  do componente cristalino é reduzida em relação à  $T_m$  do mesmo puro. Isto porque, a presença da segunda fase pode dificultar ou mesmo inibir a cristalização do componente cristalino. Assim, quando é possível observar uma depressão na  $T_m$  com a composição, tem-se um indício de miscibilidade no estado fundido [46, 48].

#### **2.4.3 Blendas poliméricas com PHB e PHBV**

Como o PHB e seu copolímero PHBV puros têm seu processamento industrial restrito, devido as suas propriedades físicas, encontra-se nas misturas destes biopolímeros com outros polímeros uma solução para a melhoria de suas características de processo e de desempenho. Na literatura encontra-se estudos de blendas de PHB com poli(óxido de etileno) (PHB/PEO) [49], blendas de PHB/PVAc (poli-acetato de vinila) [50], estudos de PHB com poli(fluoreto de vinilideno) – PHB/PVDF [51], blendas de PHB/EPR (borracha de etileno-propileno) [52], misturas de PHB com poliepicloridrina [53], blendas de poli(hidroxibutirato) com polipropileno (PHB/PP) [54], blendas de PHB com copoliésteres Ecoflex<sup>®</sup> e Estar Bio<sup>®</sup> [55], estudo de blendas com polidioxanona [56], blendas de PHB/amido [16], estudo de PHB/PLA [18, 22], blendas de

PHBV com aditivos [11], estudo da biodegradação, degradação hidrolítica e cinética de cristalização do PHBV e PHB [26], blendas de PHBV com diversos materiais para aplicação médica [57, 58, 59, 60], estudo da biodegradação de PHBV com hidroxiapatita [61] entre outros.

#### **2.4.4 Blendas poliméricas com PCL**

Os polímeros biorreabsorvíveis como implantes temporários ganharam uma importância crescente na área médica e odontológica sendo utilizados em um amplo número de aplicações no corpo humano [62]. Dentre os principais são citados o polímero policaprolactona - PCL e blendas com a participação do PCL. Na literatura encontram-se hoje vários estudos utilizando o PCL e blendas com o mesmo para aplicação biomédica [62, 63, 64, 65, 66]. Para outras aplicações encontra-se estudo de blendas de PCL com poli(n-vinilpirolidona) [67], blenda de PCL/PEO [68] e blendas de PCL/PMMA [69].

#### **2.4.5 Blendas de PHB ou PHBV com PCL**

Estudos estão sendo realizados associando o PCL ao PHB e PHBV, com intuito de melhorar o desempenho e viabilizar a aplicação destes materiais na área médica, particularmente como dispositivos de osteossíntese.

As misturas poliméricas de PHB com PCL apresentam propriedades características que tornam este par polimérico uma interessante alternativa industrial. Gada e colaboradores [70] estudaram a utilização do PCL como plastificante do PHB e de seu copolímero com hidroxivalerato (PHBV), obtendo como resultado materiais com menor rigidez e maior taxa de biodegradação. Blendas de PHB/PCL foram estudadas também por Rosa et al. [71], Cara e colaboradores [72], Duarte et al. [73], Suave et al. [74], entre outros. Blendas dos polímeros PHBV/PCL foram estudadas por Chun & Kim [75], Simioni et al. [4], por Qiu e colaboradores [76], Berenice & Fermín [77] entre outros autores.

O estudo da miscibilidade de filmes de P(3HB)/PCL preparadas por evaporação de solventes foi investigada utilizando P(3HB) de baixa [78] e alta

massa molar [79] visando aplicações em embalagens agrícolas no transporte de pequenas mudas. As blendas foram analisadas através das técnicas de DSC, MEV e Microscopia óptica com luz polarizada, os autores concluíram que as blendas com baixa massa molar mostraram-se completamente imiscíveis. Em contrapartida, as blendas com alta massa molar apresentaram miscibilidade parcial. Com o acréscimo de PCL à blenda ocorre uma diminuição gradual da  $T_m$  do P(3HB), sendo que com 20% de PCL esta variação foi de 10°C [34].

## 2.5 Polímeros como biomateriais biorreabsorvíveis

A utilização dos biomateriais só se tornou efetiva após o conhecimento de técnicas cirúrgicas assépticas, desenvolvidas por Lister nos anos 1860 [80]. Em procedimentos cirúrgicos mais adiantados, os biomateriais geralmente eram mal sucedidos em consequência de infecções. A infecção tende a ser agravada na presença dos biomateriais, desde que o implante possa fornecer uma região inacessível às células competentes do sistema imunológico do corpo [81].

Estudos básicos sobre biomateriais foram iniciados recentemente. Um dos primeiros estudos foi proposto e patrocinado pelo Instituto Nacional do Coração e Pulmão (EUA) na década de 60, com o intuito de obter um material polimérico compatível com o sangue para ser empregado em coração artificial. A partir daí muitas propostas foram feitas a fim de conseguir materiais para serem utilizados em cirurgias cardiovasculares e membranas de hemodiálise entre outras aplicações [81, 82].

Polímeros biorreabsorvíveis são materiais capazes de degradar *in vivo* pela ação de fluidos corpóreos. São empregados para situações onde se deseja que o implante permaneça no local durante um tempo pré-determinado, de modo a cumprir uma função particular. Seus principais requisitos são a degradação seguida de reabsorção e a biocompatibilidade [83]. Tais requisitos reduzem em muito o número de polímeros candidatos potenciais para aplicações biomédicas. O conceito de biocompatibilidade hoje adotado é

baseado nas interações entre o material e o meio biológico, ou seja, as interações celulares que caracterizam uma resposta inflamatória, mas também considera o desempenho do material na função a qual se destina [10], conforme já apresentado no item 2.1.

A hidrólise de grupamentos químicos hidroliticamente instáveis é o mecanismo prevaiente na degradação dos polímeros biorreabsorvíveis [81, 84]. Em consequência da degradação, ocorre a perda de resistência mecânica devido ao decréscimo da massa molar. As cadeias poliméricas tornam-se solúveis no fluido extracelular quando atinge-se baixos valores de massa molar (em geral abaixo de 7.000 Daltons) e, neste momento o material possui resistência mecânica muito baixa, iniciando o processo de fragmentação devido à tensão mecânica local [81, 85].

Para polímeros semicristalinos a degradação ocorre em duas fases. Na primeira fase, a água penetra a superfície do dispositivo, atacando preferencialmente as cadeias químicas da fase amorfa e convertendo longas cadeias poliméricas em cadeias menores, e finalmente em fragmentos solúveis. Devido a isso, ocorre inicialmente uma redução na massa molar da fase amorfa sem a perda das propriedades físicas. Em seguida inicia-se a perda das propriedades físicas e a água começa a fragmentar o material. Na segunda fase, ocorre o ataque enzimático aos fragmentos. A metabolização dos fragmentos resulta em uma rápida perda de massa molar polimérica [81, 84].

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

de cristalinidade e taticidade podem ser controladas e avaliadas antes da implantação ou do teste de degradação em solução tampão [81, 86].

Os fatores que influenciam na degradação e que não podem ser controlados, mas que certamente causam diferenças entre a degradação *in vitro* e *in vivo*, são as respostas do hospedeiro ao material implantado. Num implante ósseo, por exemplo, as habilidades de cicatrização de um implante individual e a capacidade de tamponamento do hospedeiro são dois dos muitos fatores que influenciam os resultados da osteossíntese usando implantes biodegradáveis. Além disso, a biocompatibilidade do fixador da fratura implantado está relacionada ao tamanho do implante e ao sistema imunológico do hospedeiro. Estes mecanismos de defesa diferem em cada espécie e ainda em cada indivíduo de uma mesma espécie [81, 86].

Algumas questões têm levado pesquisadores a investir em estudos para verificar a viabilidade do uso de materiais poliméricos para a confecção de dispositivos ortopédicos. Uma das vantagens dos materiais poliméricos é que estes são os que apresentam valores de módulo elástico em compressão mais próximos aos valores apresentados pelos ossos. Porém, ainda hoje existe pouca informação disponível sobre comportamento mecânico dos polímeros *in vivo*, sendo necessária a realização de pesquisas para verificar a viabilidade de tal uso [87].

Em particular, é grande o interesse pelos polímeros biorreabsorvíveis para uso na confecção de dispositivos ortopédicos, já que estes são degradados ao longo do tempo dentro do organismo e os produtos resultantes da degradação são assimilados metabolicamente pelo organismo. No caso dos dispositivos de osteossíntese, o uso de polímeros biorreabsorvíveis apresenta a grande vantagem de dispensar a segunda cirurgia, necessária para a remoção do dispositivo após a reparação óssea. Para tanto, é necessário que o material apresente biocompatibilidade e desempenho biológico adequados, isto é, não induza reação inflamatória crônica nos tecidos vizinhos ao implante e apresente um comportamento biomecânico adequado ao processo de reparo do osso fraturado [6, 8].

O desempenho biomecânico adequado significa apresentar resistência mecânica necessária à estabilização do osso fraturado e sustentar a carga aplicada durante os primeiros estágios do processo de reparo. À medida que o calo ósseo vai sendo formado, ele necessita receber estímulo mecânico e, para tanto o polímero que já teve iniciado o seu processo de degradação já não é capaz de sustentar a carga total aplicada durante os movimentos e assim permite a estimulação óssea. Ao longo do tempo o dispositivo polimérico deve desaparecer completamente não sendo necessária a segunda cirurgia para a retirada do dispositivo.

Para o desenvolvimento de polímeros que atendam a esta condição, é muito importante o conhecimento da relação entre a estrutura e o comportamento mecânico, visto que a estabilidade e o comportamento mecânico definem a funcionalidade e a durabilidade do material em aplicações específicas que desempenham função mecânica de grande importância para o organismo [88]. Assim, o desenvolvimento de um biomaterial adequado pressupõe o conhecimento das alterações morfológicas e mecânicas que o material sofre ao longo do tempo de degradação. Uma avaliação preliminar de tais efeitos pode ser feita através de estudos realizados *in vitro*, onde o material é colocado em condições que simulem a condição que encontrará *in vivo*.

Assim sendo, dentre os critérios gerais para selecionar um polímero para uso como biomaterial biorreabsorvível estão suas propriedades mecânicas e o tempo de degradação/reabsorção na condição de uso. Um polímero ideal para uma dada aplicação tem que possuir as seguintes propriedades: não provocar uma resposta inflamatória ou tóxica, ser metabolizado no corpo depois de realizado seu propósito, não deixando nenhum rastro; ser processado facilmente na forma de produto final; ter vida de prateleira aceitável; ser facilmente esterilizado; apresentar baixo custo.

## 2.6 Avaliação de Biocompatibilidade

Por aproximadamente dez anos o Comitê Técnico 194 da International Organization for Standardization (ISO) e vários outros grupos desenvolveram um documento conhecido como ISO 10993, o qual é composto por uma série de normas e padrões que regulamentam a avaliação biológica de dispositivos médicos. Esta é dividida em 16 partes, observando-se sua interação, desde a fabricação, esterilização, caracterização e sua resposta biológica e sistêmica [89].

O conceito de biocompatibilidade [10] se alterou bastante nas últimas décadas. Inicialmente, biocompatível era considerado aquele material totalmente inerte ao corpo humano. Ou seja, o organismo não responderia de nenhuma maneira à presença do implante. Dessa forma, o implante seria tão bem “recebido” pelo organismo que se poderia imaginar a existência, para o organismo, de um tecido complementemente homogêneo composto do próprio tecido mais o biomaterial [3].

Esse conceito de inerticidade de um biomaterial foi deixado de lado a partir do momento em que se percebeu que qualquer tipo de material sempre provoca uma resposta do tecido vizinho. Além disso, visualizou-se que, para certas aplicações, havia a necessidade de alguma forma de interação entre o tecido e o material. Assim, para determinados casos, uma integração tecido-material seria mais importante para a maximização do desempenho do biomaterial do que um total desconhecimento deste pelo meio vizinho. Contudo, além de classificar um material como biocompatível ou não, percebeu-se que um mesmo material poderia se mostrar biocompatível para uma aplicação ou para um tipo de paciente e incompatível para outra aplicação biomédica ou para pacientes de diferentes origens, faixas etárias, sexo, estado geral de saúde etc. [3].

Dessa forma, ficou claro que a biocompatibilidade de um determinado material só poderia ser definida através de um entendimento global sobre as várias formas de interação do organismo com o material, dando-se ênfase especial à interface tecido hospedeiro - biomaterial. Pode-se citar quatro

aspectos mais importantes com relação às interações entre biomateriais e tecidos, que definem assim a biocompatibilidade [3]:

- Fenômenos físico-químicos de interface relacionados com os primeiros instantes de contato entre biomaterial, tecido e ambiente de implantação.
- Resposta dos tecidos e meio orgânico à presença do material.
- Mudanças ocorridas nos materiais como resultado da ação do meio (tecido, fluidos orgânicos) sobre o material: degradação e corrosão.
- Reação de alguma parte do organismo, não diretamente em contato com o implante.

A biocompatibilidade de um implante depende de vários fatores, especialmente do tipo de tecido que será exposto ao material e da duração da exposição. É preciso considerar as variações entre espécies animais, suas semelhanças e diferenças com o ser humano. A avaliação da biocompatibilidade deve, sobretudo, documentar uma descrição geral do produto, seu uso pretendido, o grau de contato com o tecido, a natureza química do material, a revisão dos dados de toxicidade e biocompatibilidade de cada componente químico. A seleção dos testes depende do uso final do biomaterial [3].

## **2.6.1 Testes *in vitro***

### **2.6.1.1 Citotoxicidade**

A toxicidade de um biomaterial é definida por sua capacidade de liberar substâncias que possam causar danos ou morte celular, direta ou indiretamente, através da inibição de vias metabólicas [3].

Os testes de citotoxicidade representam a fase inicial do teste de biocompatibilidade de um material com potencial para aplicações médicas, sendo utilizados em uma pré-seleção para detectar se o material em questão provoca morte das células ou outros efeitos negativos nas funções celulares. Diferentes métodos têm sido desenvolvidos e padronizados, porém

dependendo da especificidade do material, algumas adaptações devem ser feitas para que se possa tirar bons resultados da aplicação do teste [90].

Utilizam-se técnicas *in vitro* para identificar efeitos adversos que biomateriais ou dispositivos médicos em potencial possam acarretar à células, de maneira a torná-los impróprios para o uso como tal. Para ser aprovado num teste de citotoxicidade *in vitro*, um material não deve causar a morte das células, nem afetar suas funções celulares. Assim sendo, com o uso de técnicas de cultura de células, os testes podem detectar se ocorre a lise das células, a inibição do crescimento celular e outros efeitos que possam ser causados nas células pelo material e / ou extrato do material [90].

Existem dois tipos de testes *in vitro*: métodos de contato direto e métodos de contato indireto. No primeiro, as células são colocadas em contato com o material em teste, sendo normalmente semeadas na forma de uma suspensão celular sobre o material. Já os métodos de contato indireto podem ser divididos em dois tipos: aqueles em que o material a ser testado é separado das células por uma barreira de difusão (ágar ou agarose) e o segundo tipo no qual substâncias são extraídas do material a ser testado, através de um solvente e colocada em contato com as células [90]

A avaliação da citotoxicidade pode ser feita através da análise da morfologia celular, da integridade da membrana celular (pela utilização de métodos com corantes vitais ou não), da proliferação celular, de atividade biossintética, etc [91].

Existem diferentes protocolos padronizados já estabelecidos para os testes de citotoxicidade, dentre ao quais podem ser citados [90]:

- ASTM F-813-83 – Método de contato direto para avaliação de materiais dispositivos médicos frente à cultura de células;

- ASTM F-895-84 - Método de difusão em ágar de cultura de células para seleção de materiais por citotoxicidade;

- ISO 10993-5 - Avaliação biológica de dispositivos médicos - Parte 5: testes para citotoxicidade: métodos *in vitro*.

Além de aspectos referentes ao procedimento, os padrões normalmente especificam a linhagem celular, o meio de cultura e as técnicas para avaliação

da citotoxicidade. Além disso, todos os protocolos padronizados prevêm a utilização e especificam materiais a serem utilizados como controle positivo e negativo. Controle positivo é uma substância que apresenta efeito citotóxico de maneira reprodutível e controle negativo é o material ou substância que não produza efeito citotóxico [90].

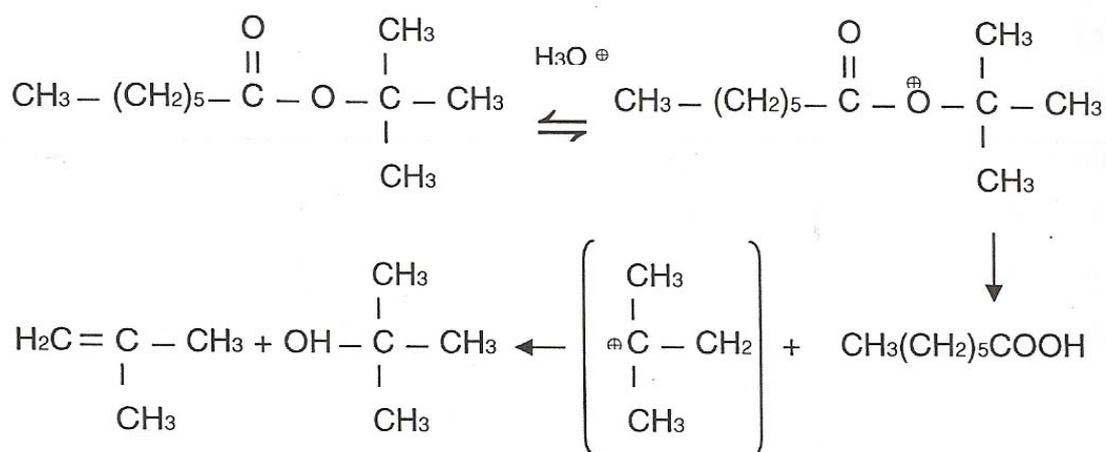
Os resultados de estudos toxicológicos do poli(3HB-co-3HV) em culturas de células de animais *in vitro* e em testes *in vivo* em animais mostram que eles podem ter reações inflamatórias de diferentes intensidades, dependendo do conteúdo de hidroxivalerato no PHA. Porém, esta reação das células e tecidos com os PHAs depende não somente da composição química do material, mas também do grau de pureza, métodos de processamento e molde do produto, propriedades da superfície e métodos de tratamento [3].

### 2.6.1.2 Avaliação da degradação hidrolítica

A hidrólise de ésteres é bastante conhecida na química orgânica, como ilustrado na equação 2.1 [92]:



Os produtos desta reação podem atuar como catalisadores, acelerando a hidrólise. Além destes produtos, ácidos e bases também são capazes de catalisar essa reação. A hidrólise de ésteres catalisada por ácidos é o processo inverso da esterificação de Fisher, onde ocorre a reação de um ácido carboxílico com um álcool, na presença de um ácido mineral como catalisador. Se a proporção alcoólica na degradação de um poliéster é capaz de formar um íon carbônio estável, podem ocorrer dois mecanismos de hidrólise: substituição nucleofílica ( $\text{S}_{\text{N}}1$ ) e eliminação ( $\text{E}1$ ), como mostra a Figura 2.6 [92, 93].



**Figura 2.6 – Mecanismo de hidrólise de um poliéster [92]**

Este mecanismo de degradação pode ser dividido em 5 etapas, conforme ilustra Figura 2.7 [92].



**Figura 2.7 – Ilustração esquemática da progressão do processo de hidrólise [92]**

Etapa 1: Amostra polimérica homogênea [92, 93];

Etapa 2: Difusão de água (representado pelos buracos brancos) para o interior do polímero, promovendo a quebra das ligações de éster por hidrólise.

A degradação pode ser mais rápida na superfície do que no interior do polímero [92, 93];

Etapa 3: Migração reversa do gradiente de acidez; a degradação se torna mais rápida no interior do polímero que em sua superfície, ocorrendo a migração das espécies ácidas geradas da hidrólise para a superfície do polímero [92, 93].

Na medida em que o mecanismo alcança a etapa 3, ocorre uma aceleração da reação de hidrólise, onde o polímero assume as características ilustradas nas etapas 4 e 5, onde há uma redução na massa molar do polímero [92, 93].

A hidrólise diminui tanto o tempo de vida de poliésteres sintéticos como dos naturais. A Figura 2.8 mostra a hidrólise alcalina do poli( $\beta$ -hidroxibutirato) – PHB. O produto da reação é frequentemente o ácido  $\beta$ -hidroxibutírico. O PHB é justamente com outros compostos, o combustível para a respiração e quantitativamente uma importante fonte de energia [13, 92].

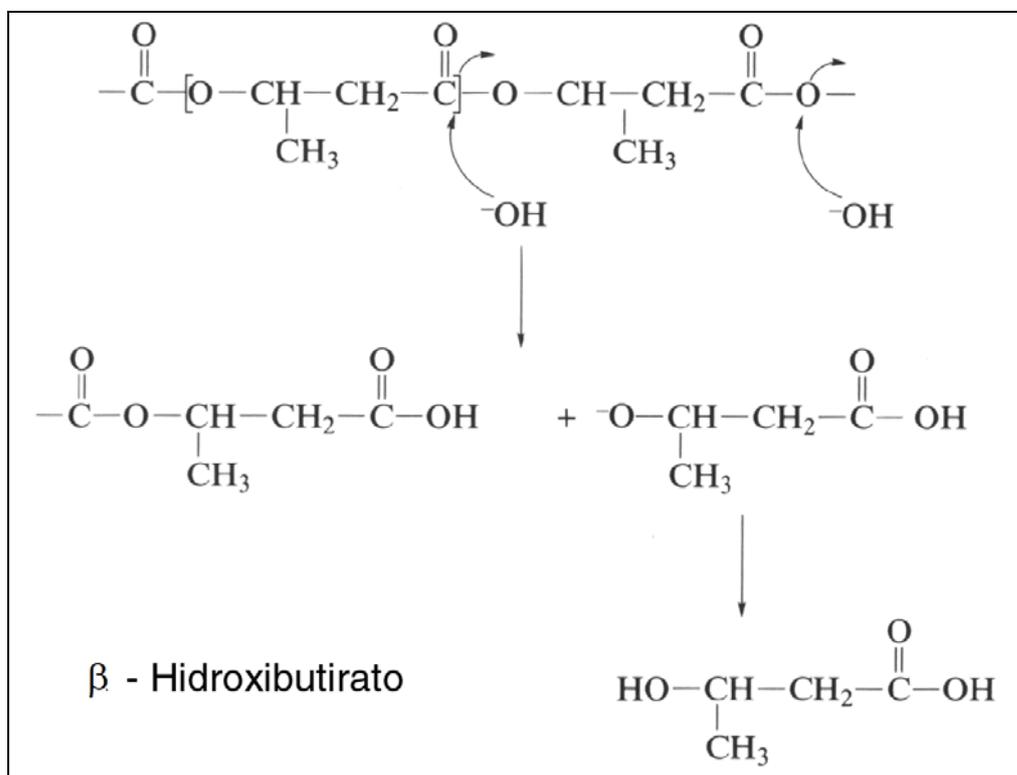


Figura 2.8 – Mecanismo de hidrólise do PHB [13, 26, 35, 92]

Nos sistemas *in vitro*, em que processos hidrolíticos abióticos são estudados, geralmente são baseados em condições fisiológicas, ou seja, tampão fosfato isomolar a pH 7,4 e 37°C, enquanto que em sistemas microbianos essas condições são tanto mais variadas quanto as naturezas do inóculo. Alguns dados para a taxa de hidrólise de diferentes poliésteres biodegradáveis sob condições fisiológicas são apresentados na literatura e mostram que a biorreabsorção do PHBV é mais lenta quando comparada ao PLLA e seus copolímeros [3].

Poliésteres, como PLA, PLGA, etc. hidrolisam muito mais rapidamente que PHAs por um mecanismo de hidrólise praticamente abiótica devido ao seu caráter mais hidrofílico, sendo a taxa de hidrólise abiótica principalmente controlada pela massa molar, embora tenha sido relatado que a taxa de qualquer hidrólise enzimática de poliésteres é principalmente determinada pela cristalinidade [3].

O processo de biodegradação e bioreabsorção dos poli( $\alpha$ -hidróxi ácidos) é descrito na literatura como sendo uma sucessão de eventos. Exposto aos fluidos aquosos do corpo, inicialmente o material sofre hidratação. Com a presença das moléculas de água, o processo de degradação dá-se através da hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de oligômeros (ou monômeros) solúveis e não tóxicos. A degradação prossegue por um processo biologicamente ativo (por enzimas) ou pela clivagem hidrolítica passiva, sendo caracterizada pela perda de massa, diminuição de massa molar ponderal média ( $\overline{M}_w$ ) e pela perda das suas propriedades mecânicas [92, 93].

O mecanismo da degradação e erosão *in vitro* dos polímeros biorreabsorvíveis tem sido avaliado desde a década de 1980 e demonstra ser um processo heterogêneo na extensão do material. A degradação / erosão é classificada em dois grupos, denominados de bioerosão superficial (*surface erosion*) e bioerosão interna (*bulk erosion*) [94]. Na busca por um modelo teórico para a degradação / erosão *in vitro*, o grupo de pesquisa em polímeros biorreabsorvíveis da Universidade de Regensburg, Alemanha, descreve que o processo depende fundamentalmente da capacidade de difusão da água no

material, da concentração de ligações ésteres hidrolisáveis, da velocidade de hidrólise e também da geometria e morfologia do material [95].

A hidrólise das ligações ésteres produz terminais ácidos que podem, ou não, serem difundidos para o meio de degradação. Inicialmente o processo de degradação é considerado homogêneo, gerando oligômeros solúveis em água em toda a extensão do material. Se a difusão e solubilização desses produtos forem efetivas, o material sofrerá, preferencialmente, uma erosão superficial. Se a taxa de difusão dos produtos e subprodutos ácidos presentes na matriz é baixa, há um acúmulo de ácidos, fazendo com que estruturas densas tenham uma erosão inicial na superfície, mas apresentando uma degradação mais acentuada no centro [94, 95]. É o chamado efeito autocatalítico [96].

### 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

##### 3.1.1 Poli(hidroxiburitaro-co-valerato) – PHBV

O PHBV da Fermentação 133 (FE-133), utilizado na Tese de Doutorado, foi produzido pela PHB Industrial S/A, sendo que as suas propriedades e características encontram-se na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1 – Propriedades e Características do PHBV FE-133, da PHB Industrial S.A.**

<b>Propriedades/ Características</b>	<b>Valores</b>	<b>Propriedades/ Características</b>	<b>Valores</b>
Massa molar ponderal média	232.750Da	Temperatura de fusão cristalina, $T_m$	165,5°C
Pureza*	> 98,3%	Temperatura de transição vítrea, $T_g$ *	1-5°C
Umidade*	< 0,3%	Temperatura de decomposição	250°C
Teor de Nitrogênio*	< 0,1%	Grau de Cristalinidade	36,4%
Teor de Cinzas	1,1%	Cor	Âmbar - branco
Solvente residual*	< 2ppm	Resistência ao impacto Izod, com entalhe	24J/m
Densidade	1,22 g/cm <sup>3</sup>	Módulo de elasticidade em tração	1,3GPa
Condutividade térmica*	0,156 W/m°C	Resistência à tração na ruptura	25MPa
Calor específico (30°C) *	1,420 J/Kg°C	Alongamento na ruptura	4,5%
Teor nominal de valerato*	12%	Índice de fluidez (190°C / 2.160g)	18g/10min.

\*dados fornecidos pelo fabricante; os outros resultados foram obtidos neste trabalho

##### 3.1.2 Poli( $\epsilon$ -caprolactona) - PCL

O PCL tipo CAPA 6500, da Perstorp Caprolactones (Perstorp UK Limited), foi utilizado no desenvolvimento da Tese de Doutorado. As propriedades e características do PCL CAPA 6500, fornecidas pelo fabricante, encontram-se na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2 – Propriedades e Características do PCL CAPA 6500**  
(dados fornecidos pelo fabricante)

<b>Propriedades/Características</b>	<b>Valores</b>
Densidade (ASTM D 792)	1,15g/cm <sup>3</sup>
Índice de fluidez (MFI, 2.160g a 190°C)	28g/10min.
Temperatura de fusão cristalina, T <sub>m</sub>	58 – 60°C
Temperatura de Transição Vítreia, T <sub>g</sub>	-60°C
Grau de Cristalinidade	56 %
Alongamento na Ruptura	800%
Massa molar ponderal média	84.500Da

## 3.2 Metodologia

### 3.2.1 Processamento dos materiais

Para os polímeros em estudo e suas respectivas blendas, os processos de transformação mais indicados são extrusão e moldagem por injeção, que foram utilizados nesta Tese de Doutorado.

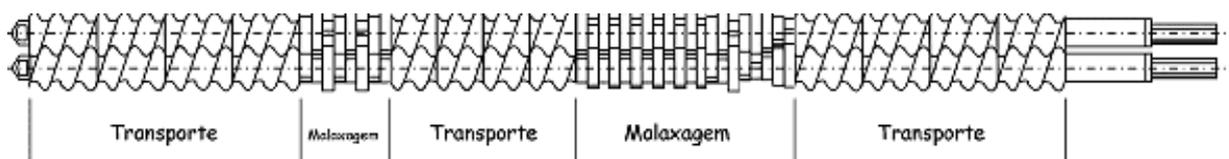
Foram preparadas blendas poliméricas com os polímeros biodegradáveis PHBV/PCL, nas seguintes composições (100/0, 75/25, 50/50, 0/100).

A pré-mistura dos polímeros em péletes foi feita manualmente em sacos plásticos, antes da extrusão.

A preparação inicial dos grânulos das blendas poliméricas foi feita por extrusão. A moldagem de corpos de prova foi realizada através da moldagem por injeção.

### 3.2.1.1 Processamento por Extrusão

O PHBV puro em pó foi processado inicialmente em uma extrusora dupla rosca co-rotacional da Extrusão Brasil, com L/D = 40, e perfil mostrado na Figura 3.1. As condições de extrusão estão apresentadas na Tabela 3.3.



**Figura 3.1 – Perfil de rosca da extrusora**

**Tabela 3.3 – Condições do processo de extrusão para o polímero PHBV puro**

Varáveis do processamento	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4	Zona 5	Zona 6	Zona 7	Zona 8	Zona 9	Zona 10	Zona 11	Zona 12
Temperaturas no painel (°C)	90	89	121	139	118	119	115	125	123	124	155	28
Temperaturas reais - na massa (°C)	108	108	140	150	130	128	125	123	120	120	155	20
Torque Motor Extrusora	37											
Rotação extrusora	139											
Rotação Dosador 1	2,56											

Para a extrusão das blendas, primeiro foi realizada uma pré-mistura mecânica dos polímeros nas porcentagens de PHBV/PCL (75/25) e PHBV/PCL (50/50). Após a mistura os materiais foram processados na mesma extrusora mencionada anteriormente e as condições de processamento para os dois sistemas estão apresentadas nas Tabelas 3.4 e 3.5.

**Tabela 3.4 – Condições do processo de extrusão para o sistema PHBV/PCL (75/25)**

Varáveis do processamento	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4	Zona 5	Zona 6	Zona 7	Zona 8	Zona 9	Zona 10	Zona 11	Zona 12
Temperaturas no painel (°C)	94	100	161	180	170	170	114	110	105	100	165	20
Temperaturas reais - na massa (°C)	86	101	157	174	169	169	119	105	81	98	164	21
Torque Motor Extrusora	44											
Rotação extrusora	153											
Rotação Dosador 1	2,66											

**Tabela 3.5 – Condições do processo de extrusão para o sistema PHBV/PCL  
(50/50)**

Varáveis do processamento	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4	Zona 5	Zona 6	Zona 7	Zona 8	Zona 9	Zona 10	Zona 11	Zona 12
Temperaturas no painel (°C)	94	100	161	180	170	170	135	131	126	130	159	20
Temperaturas reais - na massa (°C)	90	102	161	169	171	167	128	121	113	105	154	22
Torque Motor Extrusora	37											
Rotação extrusora	139											
Rotação Dosador 1	2,56											

### 3.2.1.2 Moldagem por Injeção

Na injeção dos polímeros puros e suas blendas utilizou-se uma injetora Arburg Allrounder modelo 270V/300-120, completamente automatizada, com capacidade de injeção de 54cm<sup>3</sup> e diâmetro de rosca de 25mm.

As condições para a injeção dos corpos de prova dos materiais em estudo, utilizando o molde para os ensaios de tração e impacto segundo as normas ASTM, estão apresentadas na Tabela 3.6.

**Tabela 3.6 – Condições do Processamento por Injeção**

Condições	PHBV					PHBV/PCL (75/25)					PHBV/PCL (50/50)					PCL				
	152	154	158	160	158	152	154	158	160	158	152	154	158	160	158	90	100	105	110	110
Perfil de temperatura (°C)																				
Pressão de Injeção (bar)	620					640					570					550				
Velocidade de Injeção (cm/s)	10					10					10					27				
Comutação (bar)	3,5					3,5					3,5					4				
"Holding" (empacotamento / bar)	450					250					250					250				
Tempo de "Holding" (seg)	8					6					6					6				
Velocidade de dosagem (m/min)	12					12					12					12				
Contra-pressão (bar)	40					40					40					40				
Tempo de resfriamento (seg)	30					50					60					50				
Temperatura do molde (°C)	30					30					30					16				

### **3.2.2 Índice de Fluides**

A medida do índice de fluides foi efetuada no aparelho DSM na condição (190°C/2.160g) sugerida para o polietileno segundo a norma ASTM D 1238-01 [97], com o seguinte procedimento: preenchimento do polímero ou da blenda no barril do Plastômetro de Extrusão à 190°C; após esse preenchimento, coloca-se a haste e o peso normalizado, sendo que ambos fornecem a massa total de 2.160g; aguarda-se o escoamento do material até que a haste atinja a região recomendada para os cortes; em seguida, utiliza-se o tempo de 10 segundos para efetuar os cortes. Espera-se resfriar e pesa-se. Os resultados de cada medida foram obtidos da média de 10 cortes.

Para o PCL puro foi pesada a massa entre as marcas da haste, região recomendada pela norma, e marcado o tempo total, devido à alta fluides do mesmo.

A medida de índice de fluides foi realizada para os polímeros puros e para as blendas estudadas, onde foi utilizado o material extrudado em péletes. A medida foi realizada também com os materiais que sofreram degradação hidrolítica durante 90 e 180 dias. Nesse caso foi utilizada uma parte do corpo de prova fragmentado. Para fim de comparação também foi realizada a análise com os corpos de prova fragmentados dos materiais que não sofreram degradação.

### **3.2.3 Análises Térmicas**

#### **3.2.3.1 Termogravimetria – TG**

As análises termogravimétricas nas amostras foram realizadas utilizando um equipamento modelo Q-50 da marca TA, nas condições de temperatura ambiente até 1000°C com uma taxa de aquecimento de 20°C/min, em atmosfera de nitrogênio com uma vazão de 40mL/min para se obter uma atmosfera inerte, sendo que essas condições foram seguidas para todos materiais.

### 3.2.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC

As análises por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foram realizadas utilizando um equipamento modelo DSC Q100 marca TA, tendo como referência uma panelinha tampada vazia, com uma atmosfera de nitrogênio. A Tabela 3.7 apresenta as condições de análise e os materiais submetidos a esta caracterização.

**Tabela 3.7 – Condições da análise por Calorimetria Exploratória Diferencial**

<b>Material</b>	<b>Faixa de Temperatura</b>	<b>Taxa de Aquecimento</b>	<b>Atmosfera 50mL/min</b>
PHBV, PHBV/PCL (75/25) e PHBV/PCL (50/50)	- 30 a 200°C	10°C/min	nitrogênio
PCL	- 80 a 150°C	10°C/min	nitrogênio

### 3.2.3.3 Análise Térmica Dinâmico-Mecânica – DMTA

As análises térmicas dinâmico-mecânicas foram realizadas no equipamento Dynamic Mechanical Thermal Analyzer Polymer Laboratories. Os ensaios foram realizados com corpos de prova injetados, com dimensões especificadas segundo a norma ASTM D 256-02 [98] para ensaios de impacto. As análises foram realizadas seguindo a norma ASTM D 4065-95 [99] com uma faixa de temperatura de -50 à 120°C, com uma frequência de 1Hz e taxa de aquecimento de 3°C/min.

A análise foi utilizada para caracterizar as blendas PHBV/PCL (75/25) e PHBV/PCL (50/50), e para os polímeros puros.

### 3.2.3.4 Temperatura de deflexão ao calor sob carga – HDT

Os ensaios de HDT foram realizados de acordo com a norma ASTM D 648-01 [100] com uma tensão aplicada de 0,45MPa, taxa de aquecimento de

120°C/h, com início a 25°C e com término do ensaio para a leitura do HDT, a uma deflexão de 0,25mm, ou em uma temperatura máxima de 190°C. Os ensaios foram realizados usando o equipamento CEAST, modelo HDT6VICAT P/N6921000.

Esta análise foi realizada para os polímeros PHBV e PCL puros e para as blendas em estudo, sendo que foram ensaiados três corpos de prova para cada material. Os corpos de prova foram injetados seguindo as dimensões descritas na norma ASTM D 648-01 [100].

### **3.2.4 Microscopia Óptica**

As análises por microscopia óptica foram realizadas utilizando-se um Microscópio Ótico Olympus BXSIM, lente ocular de 10x. Foram feitas imagens das amostras analisadas pelo software Infinity Capture da Lumenera Corporation, com aumentos de 50x.

Esta análise foi realizada para todos os materiais após o ensaio de degradação *in vitro* com o objetivo de pré-selecionar regiões para posteriormente realizar a análise por Microscopia Eletrônica de Varredura.

### **3.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV**

Esta análise foi realizada no LCE (Laboratório de Caracterização Estrutural / DEMa-UFSCar), utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura Philips XL 30 FEG. Para a análise microscópica da fratura, as amostras foram fraturadas criogenicamente em nitrogênio líquido e foram metalizadas com ouro.

A análise foi utilizada para caracterizar a fratura dos polímeros puros e das blendas PHBV/PCL (75/25), PHBV/PCL (50/50). Foi realizada também análise da superfície do corpo de prova das amostras submetidas ao teste de degradação *in vitro*. Nesse caso a análise foi feita nos corpos de prova injetados que não foram submetidos ao ensaio de degradação, para depois realizar uma comparação entre os materiais, e nas amostras degradadas com

90 e 180 dias. Algumas amostras pré-selecionadas através da análise de Microscopia Ótica também foram analisadas por esta técnica.

Durante a análise por MEV, para algumas amostras, foi realizada uma microanálise por EDS (Espectroscopia por energia dispersiva de raios X).

### **3.2.6 Comportamento Mecânico**

#### **3.2.6.1 Ensaio de Impacto**

Os ensaios de impacto foram realizados para corpos de prova com entalhe na Máquina de Ensaio de Impacto Izod Ceast code 6545100, com um pêndulo de 2,0J, seguindo a norma ASTM D 256-02 [98]. Foram medidos dez valores de resistência ao impacto de cada amostra, obtendo o resultado da média destes valores. Os ensaios foram realizados em corpos de prova injetados para todos os polímeros e blendas estudadas, com dimensões especificadas segundo a norma ASTM D 256-02 [98].

#### **3.2.6.2 Ensaio de Tração**

Os ensaios de tração foram realizados em uma Máquina Universal de Ensaio Instron 5500R, segundo a norma ASTM D 638-02 [101], com uma distância entre as garras de 115mm, velocidade de 50mm/min e uma célula de carga de 50KN. Esses ensaios foram realizados em corpos de prova injetados com dimensões especificadas na norma ASTM D 638-02 para corpo de prova tipo I [101], e foram realizados com todos os polímeros e blendas em estudo, antes e após o ensaio de degradação hidrolítica.

#### **3.2.6.3 Ensaio de Flexão**

Os ensaios de flexão foram realizados em uma Máquina Universal de Ensaio Instron 5500R segundo a norma ASTM D 790 M-02 [102], com uma distância entre apoios (flexão em três pontos) de 50mm, velocidade de

1,3mm/min e uma carga de 12,5N. Os ensaios foram realizados com corpos de prova injetados com dimensões especificadas na norma ASTM D 790 M-02 [102]. Foram ensaiados todos os materiais em estudos, puros e as blendas. Para todos os ensaios foi fixada uma deformação máxima de 5%.

### **3.2.7 Cromatografia de exclusão por tamanho – SEC**

A distribuição de massa molar foi realizada pela PHB Industrial S.A. para os polímeros puros PHBV e PCL e para as blendas estudadas, antes e após o ensaio de degradação hidrolítica. Para a realização da análise utilizou-se um Cromatógrafo de Exclusão por Tamanho (SEC), com sistema de cromatografia líquida de alta eficiência e bomba isocrática da marca Waters, modelo 1515 com detector de índice de refração Waters, modelo 2414.

Para tal determinação, primeiramente foram feitos filmes prensados dos materiais e posteriormente esses filmes foram dissolvidos, utilizando-se como solvente o clorofórmio.

### **3.2.8 Degradação *in vitro***

A análise de degradação *in vitro*, foi realizada seguindo a norma ASTM F1635 – 04a [103]. Para a análise utilizou-se solução tampão de fosfato salino com pH 7.3, proveniente da Cromoline Química Lina Ltda, adquirida na Cial Artigos para Laboratório, tubos de ensaio de vidro, tampas de plástico para os tubos e suporte de tubos de ensaio. Durante o ensaio os corpos de prova em solução foram mantidos em uma estufa à 37°C.

Esta análise foi realizada para os polímeros puros e para as blendas PHBV/PCL (75/25) e PHBV/PCL (50/50).

Foram preparados seis sistemas diferentes, para 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias, sendo que cada sistema continha 6 amostras de cada composição especificada anteriormente. Foi utilizado o corpo de prova injetado para ensaios de tração seguindo as especificações da norma ASTM D 638-02 [101].

Estas amostras primeiramente foram esterilizadas, na Empresa Acecil, por Óxido de Etileno (ETO), e posteriormente foram pesadas ainda na embalagem, como ilustra a Figura 3.2. Em seguida foram pesadas as embalagens vazias para obter a massa real da amostra antes do ensaio.

Antes de iniciar o ensaio, os tubos e as tampas foram lavados com detergente neutro, enxaguados com água cinco vezes com agitação e três vezes com água destilada. Depois foram colocados tampados dentro de um béquer, o mesmo foi selado com papel cartão e elástico e foram autoclavados durante 1 hora e 30 minutos, em uma temperatura de 121°C e pressão de 1atm, para total esterilização dos tubos.

Os corpos de prova esterilizados e embalados individualmente (Figura 3.2) só foram abertos dentro da capela de fluxo laminar e foram retirados da embalagem por uma pinça também esterilizada. Os mesmos foram colocados dentro do tubo de ensaio, após ser esterilizado na autoclave, e a solução tampão de fosfato salino foi adicionada. Os tubos foram fechados e identificados, conforme ilustra a Figura 3.3, e posteriormente foram colocados na estufa à 37°C.

A capela de fluxo laminar utilizada foi submetida à limpeza com álcool e ficou ligada durante 1 hora com o fluxo e a lâmpada de U.V. ligada, para total esterilização do ambiente.



Figura 3.2 – Corpo de prova esterilizado e embalado



Figura 3.3 – Corpos de prova identificados

Após cada um dos tempos de seguimento (30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias), os corpos de provas de cada amostra eram retirados do tubo de ensaio, e submetidos à quantificação da perda de massa por gravimetria, verificação de alteração nos valores de massa molar, por Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC), análise morfológica por Microscopia ótica e Ensaio mecânico de tração. Para os tempos de seguimento de 90 e 180 dias, além das análises citadas, foram verificados também alterações na fluidez através das técnicas de Índice de fluidez, morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), propriedades térmicas por Termogravimetria (TG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

Para o cálculo de perda de massa, as amostras foram pesadas antes do início e após o ensaio. O cálculo foi feito utilizando a massa final do corpo de prova seco, da seguinte maneira:

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

Para avaliar se houve alguma alteração nas massas molares médias dos polímeros e suas misturas foram realizadas medidas de índice de fluidez (conforme procedimento descrito no item 3.2.2 deste texto) e caracterização por Cromatografia de Exclusão por Tamanho, conforme procedimento descrito no item 3.2.7.

Para verificar alguma alteração nas propriedades mecânicas, foram realizados ensaios de tração seguindo o procedimento descrito no item 3.2.6.2.

Para analisar a morfologia das blendas após o teste, primeiramente os corpos de prova foram analisados através de Microscopia Ótica, para pré-selecionar regiões para realizar a análise por Microscopia Eletrônica de Varredura na superfície do mesmo, seguindo o procedimento descrito no item 3.2.5.

### **3.2.9 Citotoxicidade**

As análises de citotoxicidade foram realizadas no LABIMO – Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP (financiamento CNPq 2007:485870/2007-0), para os polímeros puros e para as blendas estudadas.

As amostras foram submetidas aos testes recomendados pelas normas internacionais vigentes (ISO-10993, 1997 [104] e NBRISO-ABNT 10993 (1999) [105]), utilizando-se células Vero, recomendadas pela ASTM F813-83 [106] como padrão para avaliação da citotoxicidade de biomateriais, na presença dos polímeros estudados. Utilizou-se células do tipo fibroblasto da linhagem Vero como modelo experimental. A avaliação da toxicidade dos materiais foram avaliadas de modo indireto e direto.

#### **3.2.9.1 Citotoxicidade Indireta**

O teste de citotoxicidade indireta bem como a obtenção dos extratos foram feitas de acordo com as recomendações internacionais (ISO-10993). Os extratos dos materiais foram obtidos através da incubação destes em meio de cultura Ham F-12 com 10% SFB a 37°C por 48 horas sem agitação. O meio de cultura foi então recolhido, permitindo desta forma, avaliar o possível efeito tóxico de substâncias liberadas pelos diferentes materiais. Como controle positivo, foi utilizada uma solução de Fenol 1% em meio de cultura. As células foram inoculadas a uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL em placas de 24 poços em meio Ham F-12 com 10% SFB e após 24 horas, tempo suficiente para a adesão celular. O meio de cultura foi trocado pelos extratos e respectivos controles, e mantidos nas condições de cultura por 24 horas. Também foi feito o método da contagem direta de células, onde 6 campos foram escolhidos aleatoriamente para cada poço e as células foram contadas. Também foi avaliada a toxicidade pelo método do MTT [107]. Uma suspensão de 100µL com  $1 \times 10^5$  células/mL foi inoculada em placas de cultura de 96 poços. Após 24 horas, os meios de cultura foram removidos e os extratos

adicionados. Após outras 24 horas, as placas foram lavadas em PBS 0,1M (PBS) em pH 7.4, e receberam 100 $\mu$ L de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo tetrazolium (MTT, Sigma). Após 4 horas foi adicionado DMSO e as amostras foram lidas em leitor de microplacas Multiskan Bichromatic Version 1.06 no comprimento de onda 540nm.

### **3.2.9.2 Citotoxicidade Direta**

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos diferentes materiais foi efetuada através da utilização do teste de viabilidade celular pelo método da contagem direta de células, onde 6 campos foram escolhidos aleatoriamente para cada poço e as células foram contadas.

### **3.2.9.3 Investigação da adesão e morfologia das células Vero por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Após a análise da citotoxicidade as amostras foram avaliadas por MEV, onde  $2 \times 10^5$  células/ml foram inoculadas nos diferentes materiais em meio de cultura Ham F-10 (Sigma) com 10% SFB (Nutricell). Após 24 horas de incubação, as amostras foram fixadas em Paraformaldeído 4% / Glutaraldeído 2.5% (Sigma) em tampão fosfato 0.1M em pH 7.2 por 2 horas, pós fixadas com OsO<sub>4</sub> 1% (Sigma) por 15 minutos a 4°C. As amostras foram desidratadas em série crescente de etanol e levadas a ponto crítico (Balzers CDT 030) e então recobertas com ouro em *sputter* (Balzers CDT 050). As imagens foram obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL 300.

## **4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1 Processabilidade dos sistemas em estudo**

#### **4.1.1 Processamento por Extrusão**

Durante o processo de extrusão do PHBV puro, constatou-se que houve uma alteração na coloração do polímero, passando da cor amarelada para um castanho escuro. Segundo Scott e Sharma [108,16] este escurecimento pode ser resultado de resíduos bacteriais ou de solventes de extração. Porém, alguns estudos indicam que os polímeros PHB e PHBV, mesmo purificados e com remoção total de solventes orgânicos, apresentam escurecimento. Assim, sugere-se que este comportamento possa ser resultante de um processo termodegradativo do polímero, sendo a intensidade de escurecimento proporcional ao grau de degradação, relacionado diretamente com a severidade das condições de processamento [18, 35].

O processamento das blendas PHBV/PCL (75/25) e PHBV/PCL (50/50), apresentou homogeneidade, produzindo um material com coloração castanha, sendo um pouco mais clara no caso da blenda PHBV/PCL (50/50). Nos dois casos houve variação nas condições de processamento, conforme apresentado nas Tabelas 3.4 e 3.5, porém bem similares ao perfil do processamento do PHBV puro (Tabela 3.3).

#### **4.1.2 Moldagem por Injeção**

A injeção dos corpos de prova dos polímeros puros e de suas misturas foram satisfatórias, apresentando corpos de prova como um material homogêneo e com um acabamento superficial excelente.

Após a injeção os corpos de prova foram condicionados por no mínimo 72 horas, antes da realização das caracterizações. Este procedimento é necessário devido aos processos secundários de cristalização [26].

## 4.2 Índice de Fluidez

Os ensaios de índice de fluidez, de um modo indireto e superficial, permitem uma análise da massa molar de um polímero sem aditivos. Para blendas poliméricas e para sistemas poliméricos com aditivos é possível utilizar o ensaio de índice de fluidez como um indicativo de processabilidade [22].

Foram realizadas medidas de índice de fluidez para os polímeros puros, PHBV e PCL, e suas respectivas blendas, PHBV/PCL (75/25) e PHBV/PCL (50/50). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1 – Valores de Índice de fluidez do PHBV, PCL e suas blendas (190°C/2.160g)**

<b>Materiais</b>	<b>Índice de Fluidez (g/10min)</b>
PHBV	19,5 ± 0,1
PHBV/PCL (75/25)	20,3 ± 0,1
PHBV/PCL (50/50)	24,7 ± 0,1
PCL	35,1 ± 1,4

Observa-se inicialmente que os valores obtidos para as blendas foram intermediários aos valores dos polímeros puros, obtendo-se um aumento do valor de índice fluidez conforme aumenta-se a quantidade de PCL na blenda.

## 4.3 Análises Térmicas

### 4.3.1 Termogravimetria – TG

A análise por Termogravimetria foi realizada com o objetivo de verificar quantitativamente as composições das blendas estudadas.

Através da Figura 4.1, pode-se notar que o PHBV começa a perder massa por volta dos 290°C, e na Figura 4.2 observa-se que a PCL tem um início de perda de massa próximo a 390°C. Para os dois polímeros, os valores de perda de massa obtidos estão próximos dos valores encontrados na literatura [73, 35].

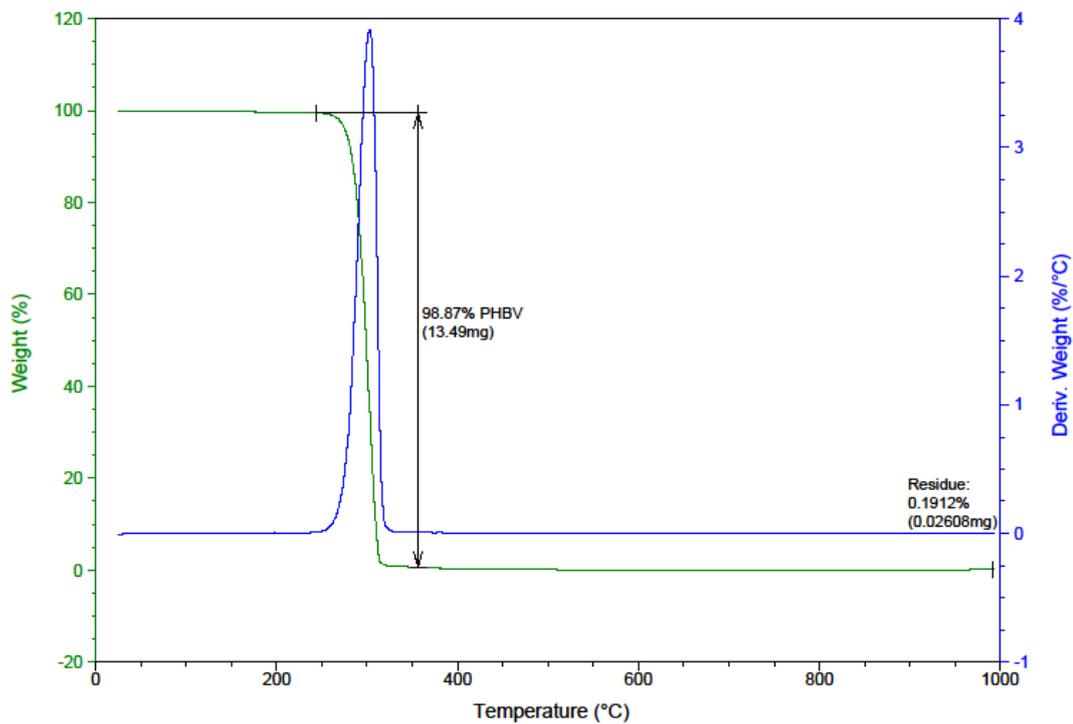


Figura 4.1 – Curva TG para o PHBV puro

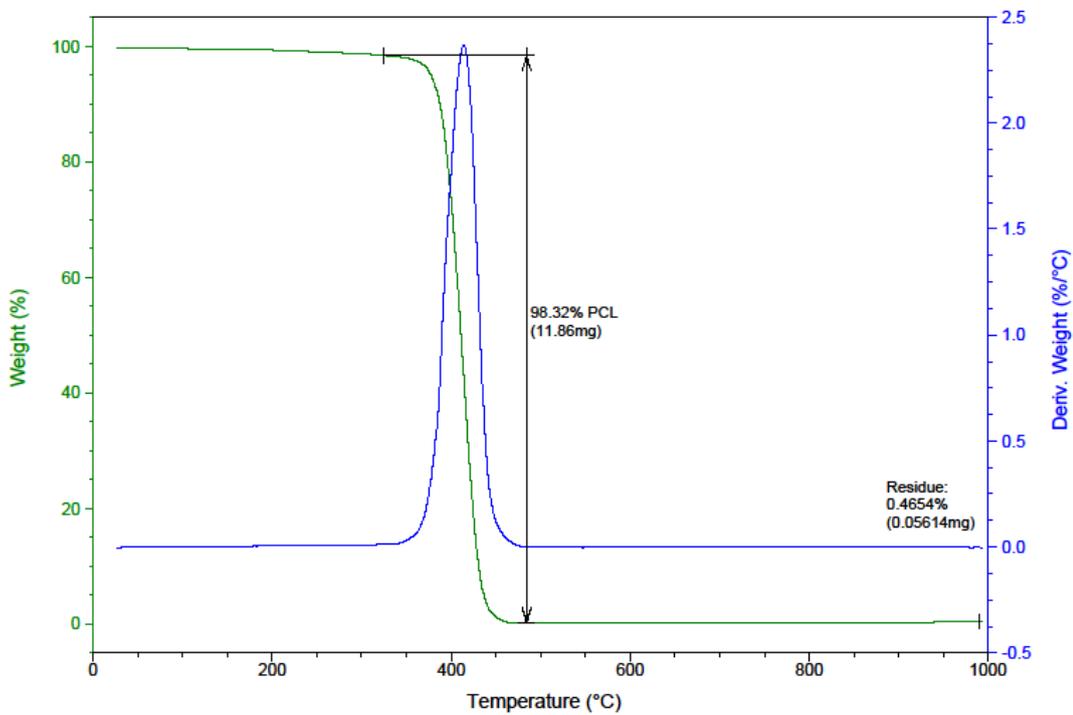
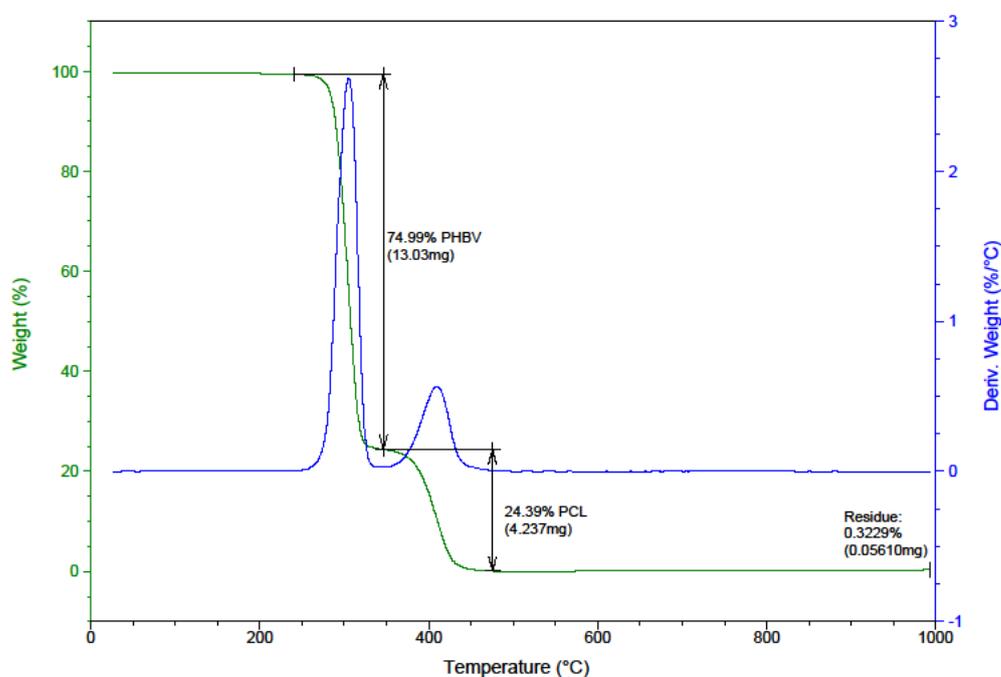


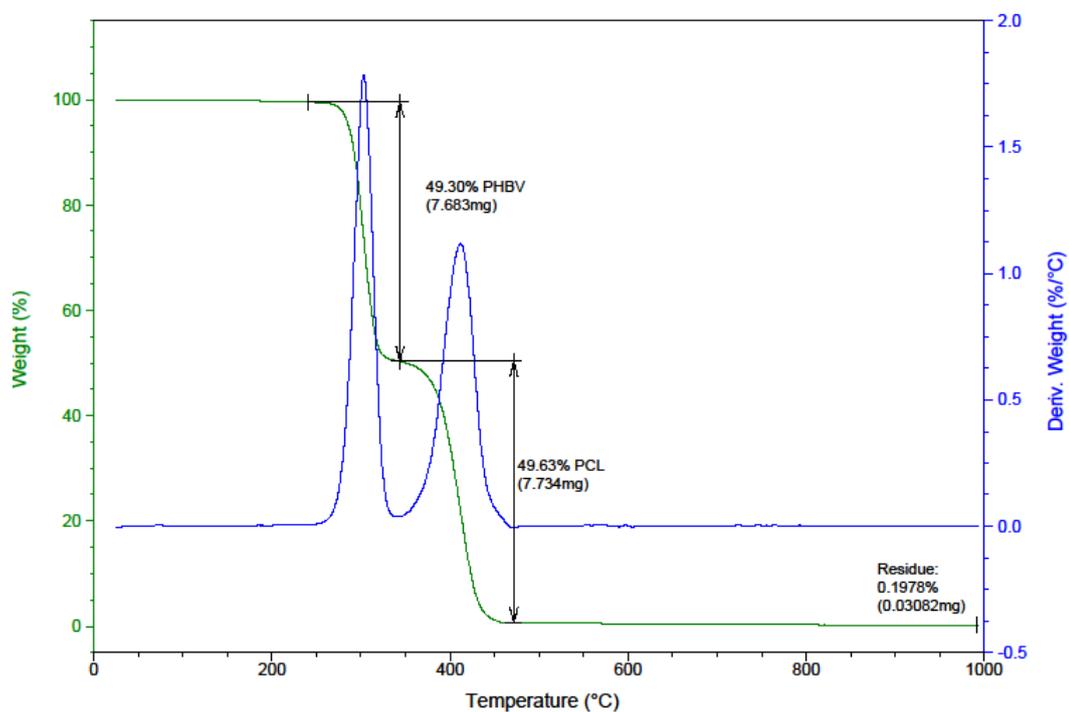
Figura 4.2 – Curva TG para o PCL puro

Através da caracterização por Termogravimetria realizada para a blenda PHBV/PCL (75/25), representada na Figura 4.3, e para a blenda PHBV/PCL (50/50), representada na Figura 4.4, pode-se observar que ocorreu uma primeira perda de massa a aproximadamente 290°C, causada pela decomposição do PHBV, e em torno de 390°C ocorreu uma segunda perda de massa proveniente do PCL. De acordo com esses resultados constatou-se que as blendas apresentaram comportamento imiscível. Esta imiscibilidade foi confirmada também através das análises de DSC e DMTA. Nota-se também que os polímeros não sofreram reações de transesterificação, pois perderam massa de forma idêntica como se estivessem puros. Isto é, não houve formação de um copolímero que poderia atuar como compatibilizante para esta blenda polimérica.

Segundo WANG [109], as reações de transesterificação de poliésteres são freqüentemente associadas com a deterioração das propriedades da blenda polimérica devido à diminuição da massa molar e à ampliação da distribuição de massa molar.



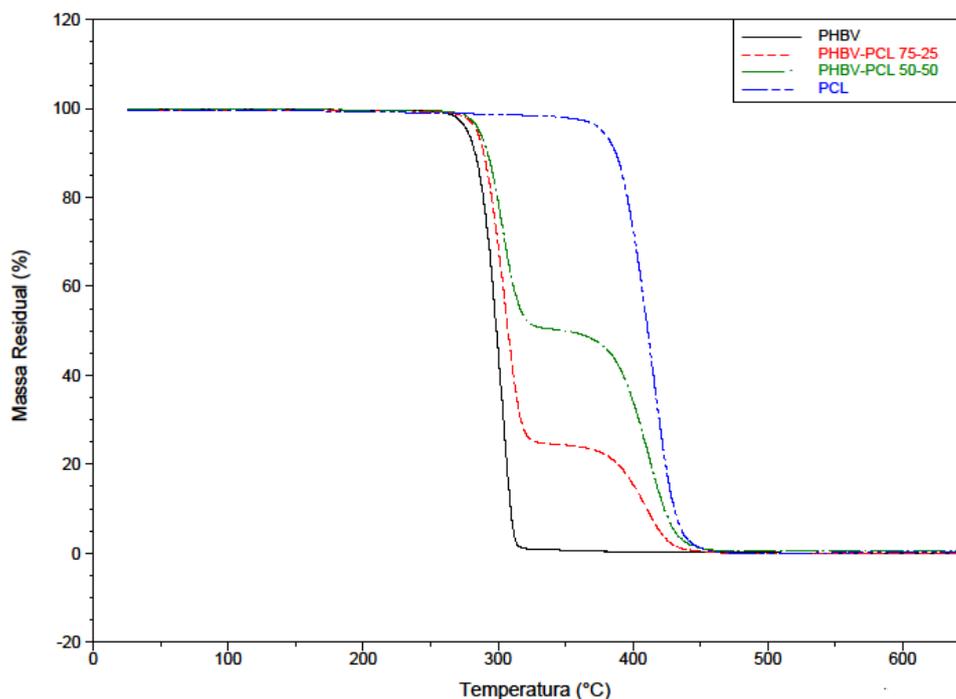
**Figura 4.3 – Curva TG para a blenda PHBV/PCL (75/25)**



**Figura 4.4 – Curva TG para a blenda PHBV/PCL (50/50)**

Através das curvas obtidas foi possível concluir que, para ambas as blendas, através dos dados da perda de massa de seus componentes, que a porcentagem real dos componentes nas blendas foi muito próxima da composição nominal.

Na Figura 4.5 pode-se visualizar de maneira comparativa, o comportamento de decomposição das blendas em relação ao comportamento dos polímeros puros.



**Figura 4.5 – Curvas TG, comparação do comportamento do PHBV, do PCL e das blendas PHBV/PCL**

#### 4.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC

A Calorimetria Exploratória Diferencial é uma técnica útil para a quantificação de propriedades térmicas dos materiais. Usualmente, a técnica permite acompanhar transições associadas aos processos exotérmicos e endotérmicos, como as entalpias de fusão, de cristalização e de vaporização, como também a temperatura de transição vítrea, temperatura de cristalização e temperatura de fusão. Aplicadas aos polímeros, a técnica permite também determinar o grau de cristalinidade do material, influência de aditivos, reações de polimerização e degradações oxidativa ou térmica [110].

Foram avaliados nesse trabalho os valores das temperaturas de fusão ( $T_m$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ) e temperatura de transição vítrea dos polímeros ( $T_g$ ), além da entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ) e da entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ) e o grau de cristalinidade (%C) para o PHBV e para o PCL puros, e para estes polímeros nas blendas poliméricas estudadas. Para o polímero PCL puro

não foi possível obter o valor da temperatura de transição vítrea através desta técnica.

Para polímeros semicristalinos calcula-se o grau de cristalinidade (%C) com o valor de  $\Delta H_m$  da amostra, desde que seja conhecida a  $\Delta H_{m100\%}$  teórico do polímero hipoteticamente 100% cristalino. Para o cálculo do grau de cristalinidade das amostras estudadas, utilizou-se a equação 4.1 [110], sendo que os valores de  $\Delta H_m$  e  $\Delta H_c$  foram obtidos através da curva do 2º Aquecimento, na qual W é a fração em massa do PHBV ou PCL na mistura. Para o PHBV o valor de  $\Delta H_{m100\%}$  utilizado foi de 146 J/g [11] e para o PCL foi 136J/g [111].

$$\text{Grau de Cristalinidade (\%C)} = \frac{\Delta H_m - \Delta H_c}{\Delta H_{100\%} \times W} \times 100\% \quad \text{equação 4.1}$$

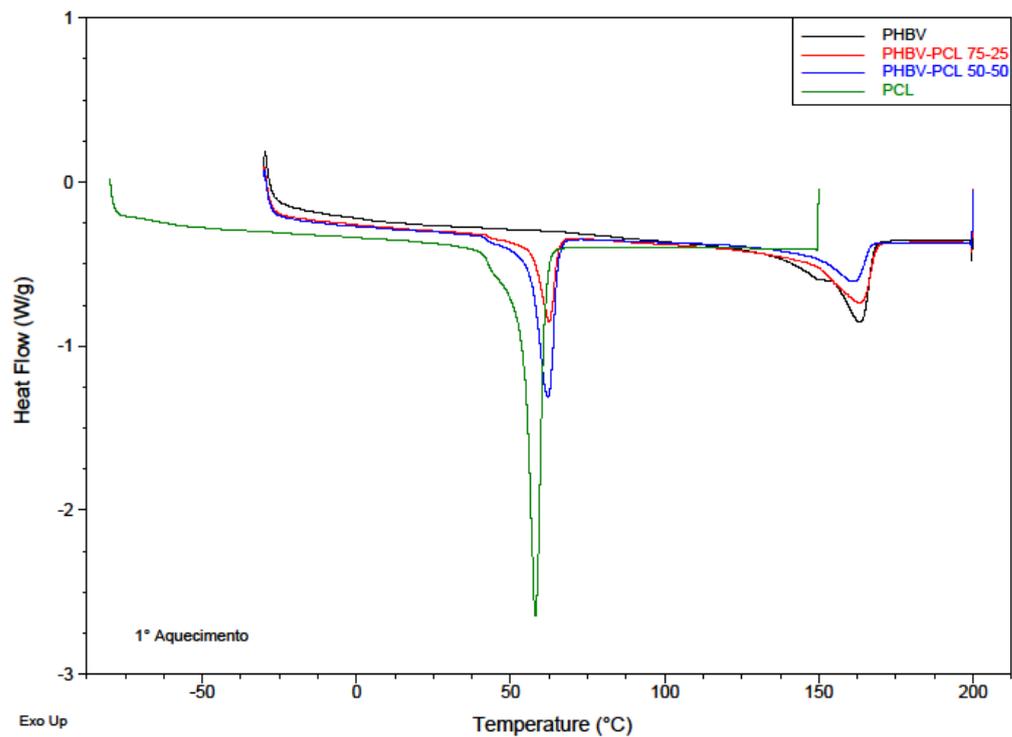
Para o cálculo do grau de cristalinidade através dos dados obtidos na curva do 1ºaquecimento das amostras foi utilizado a equação 4.2.

$$\text{Grau de Cristalinidade (\%C)} = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_{100\%} \times W} \times 100\% \quad \text{equação 4.2}$$

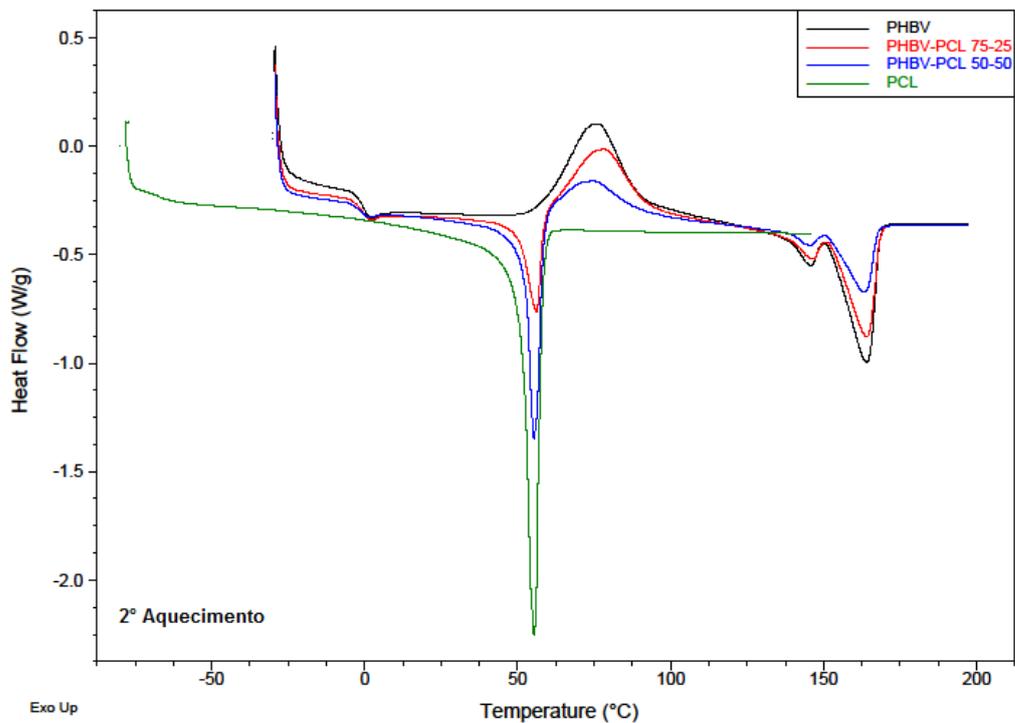
**Tabela 4.2 – Valores de T<sub>g</sub>, T<sub>c</sub>,  $\Delta H_c$ , T<sub>m</sub>,  $\Delta H_m$  e Cristalinidade para o PHBV, PCL e suas blendas (a linha clara representa os valores do 1ºAquecimento e a escura do 2ºAquecimento)**

Materiais	PHBV						PCL		
	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)	T <sub>m</sub> (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)	%C*	T <sub>m</sub> (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)	%C*
PHBV	-	-	-	163,5	58,8	40,7	-	-	-
	-0,2	75,8	45,2	164,1	54,2	6,2	-	-	-
PHBV/PCL (75/25)	-	-	-	163,7	27,6	25,9	62,6	20,7	62,4
	-0,5	78,8	24,1	164,1	43,2	17,9	56,2	19,3	58,0
PHBV/PCL (50/50)	-	-	-	161,9	16,1	22,9	62,1	42,4	62,8
	-1,5	74,9	12,1	163,5	23,5	16,2	55,3	33,5	49,6
PCL	-	-	-	-	-	-	58,0	82,9	62,0
	-	-	-	-	-	-	55,3	68,3	51,1

\* grau ou índice de cristalinidade dos polímeros puros ou dos polímeros nas blendas (normalizados pelos teores experimentais de PHBV e PCL nas blendas poliméricas).



**Figura 4.6 – Curvas DSC do 1° Aquecimento: comparação dos comportamentos do PHBV, do PCL e das blends PHBV/PCL**



**Figura 4.7 – Curvas DSC do 2° Aquecimento: comparação dos comportamentos do PHBV, do PCL e das blends PHBV/PCL**

As curvas DSC obtidas para as amostras estudadas são características de um polímero semicristalino, mostrando picos de fusão, temperatura de transição vítrea e pico de cristalização, sendo que para o PHBV puro, o pico de cristalização aparece no segundo aquecimento em função das condições de resfriamento, sugerindo que a taxa de resfriamento ( $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) permitiu uma nucleação lenta e consequente formação de cristais do material, Figura 4.7. O mesmo comportamento foi observado nas blendas PHBV/PCL (75/25) e PHBV/PCL (50/50) na fase referente ao PHBV.

Através dos resultados obtidos demonstrados na Tabela 4.2 e nas Figuras 4.6 e 4.7, pode-se notar que as blendas apresentaram dois picos de fusão distintos, um pico em torno de  $164^{\circ}\text{C}$  referente à fase do PHBV na blenda e outro em torno de  $55^{\circ}\text{C}$ , característico do PCL. A presença de dois picos nestas temperaturas demonstra uma imiscibilidade entre os polímeros, confirmando os resultados obtidos através da técnica de TG.

Nas curvas obtidas para o polímero puro PHBV pode-se observar que o material apresentou dois picos de fusão. Picos de fusão duplos ou múltiplos podem ser decorrentes de: fusão parcial, recristalização e refusão durante o aquecimento; polimorfismo; existência de morfologias cristalinas diferentes (espessura, distribuição, perfeição ou estabilidade lamelar); envelhecimento físico e/ou relaxação da fase amorfa rígida; espécies com massa molar diferentes, etc [112]. Para o polímero PHBV com porcentagem de Valerato acima de 5%, a distribuição do mesmo nas cadeias poliméricas não é homogênea, ocorrendo uma variação na massa molar.

Nota-se também que conforme aumenta-se a quantidade de PCL na blenda o valor da temperatura de fusão dos polímeros puros na mistura praticamente não se altera, tanto no primeiro aquecimento, quanto no segundo.

Em relação à cristalinidade observa-se que no primeiro aquecimento a cristalinidade do PHBV na blenda PHBV/PCL (75/25) reduziu aproximadamente 36% e na blenda PHBV/PCL (50/50) uma redução de aproximadamente 44%. Ao analisar a cristalinidade no segundo aquecimento nota-se que para a blenda PHBV/PCL (75/25) houve um aumento de 65% na cristalinidade do PHBV e para a blenda PHBV/PCL (50/50) um aumento de aproximadamente 62%. A

diferença entre os valores obtidos no primeiro aquecimento e no segundo aquecimento pode ser explicada pelo fato do resfriamento ter sido controlado e pelo fato do primeiro aquecimento ter apagado a história térmica do material.

Em relação à temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do PHBV observa-se que ocorre uma diminuição nos valores conforme aumenta-se a porcentagem de PCL na blenda, sendo que essa redução é mais significativa na blenda PHBV/PCL (50/50).

Através da curva do segundo aquecimento observa-se que o valor da temperatura de cristalização ( $T_c$ ) do PHBV aumentou para a blenda rica em PHBV (PHBV/PCL (75/25)) e diminuiu no caso da blenda PHBV/PCL (50/50), porém essas variações nos valores de  $T_c$  foram pequenas.

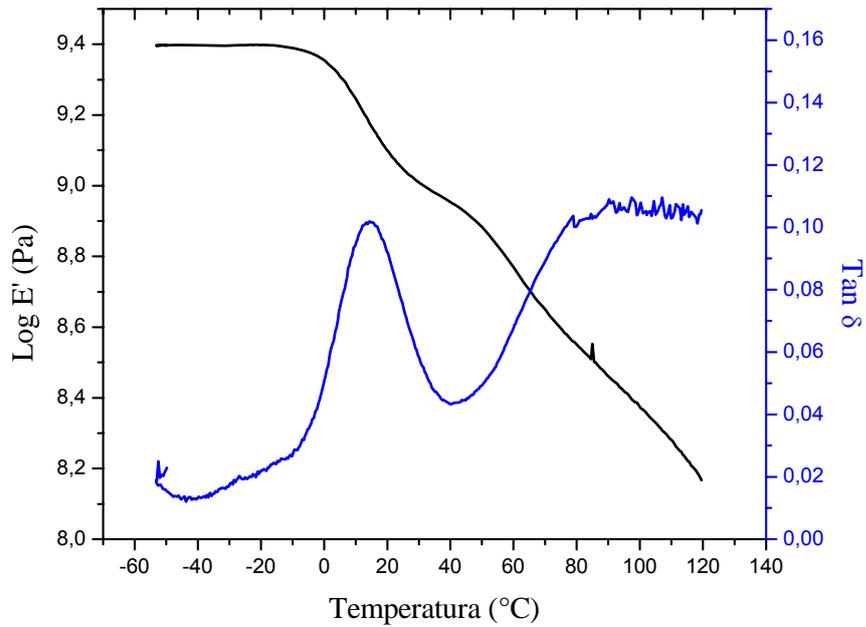
As curvas DSC, separadas individualmente para os materiais estudados, contendo o 1º Aquecimento, o Resfriamento e o 2º Aquecimento, podem ser visualizadas no Anexo A.

#### **4.3.3 Análise Térmica Dinâmico-Mecânica – DMTA**

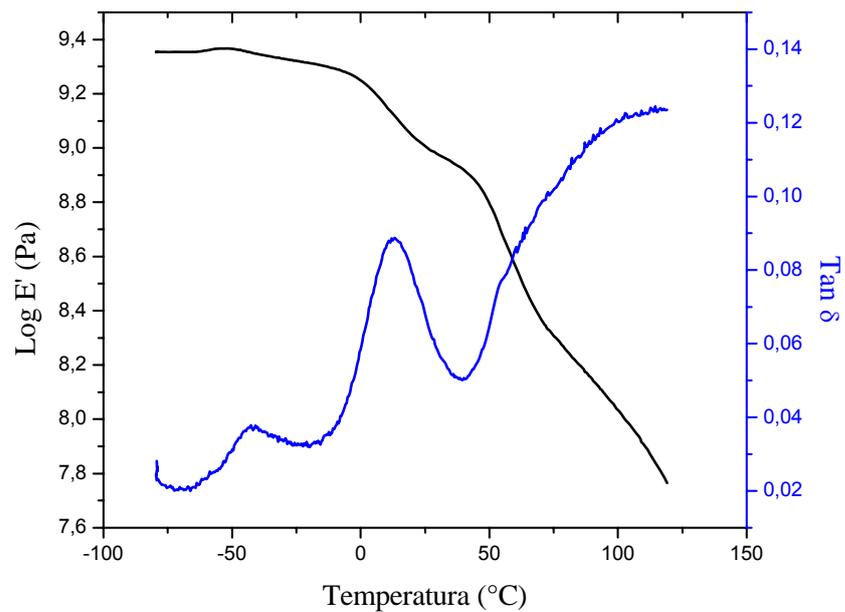
Em relação ao DSC, a técnica DMTA é mais sensível para a determinação das transições térmicas apresentadas pelos polímeros, uma vez que a amostra além de ser aquecida é solicitada mecanicamente. Através desta técnica foi possível verificar os valores da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) para as amostras em estudo.

Na literatura, ainda não há um consenso sobre qual variável usar e de que forma determinar a temperatura de transição vítrea, encontrando-se até cinco métodos possíveis: a temperatura do início da queda em  $E'$ , do início ou do pico nas curvas de  $E''$  ou  $\tan(\delta)$  [113], sendo  $E'$  o módulo de armazenamento elástico e  $E''$  o módulo de dissipação viscosa ou módulo de perda. Neste trabalho foi utilizada a temperatura no pico da curva de  $\tan(\delta)$  para definir a transição vítrea. Esta escolha se deve à constância do valor da temperatura de transição vítrea definido por esta variável, sendo ela obtida através da relação entre os módulos de elasticidade  $(E''/E') = \tan(\delta)$ , denominado amortecimento mecânico ou atrito interno.

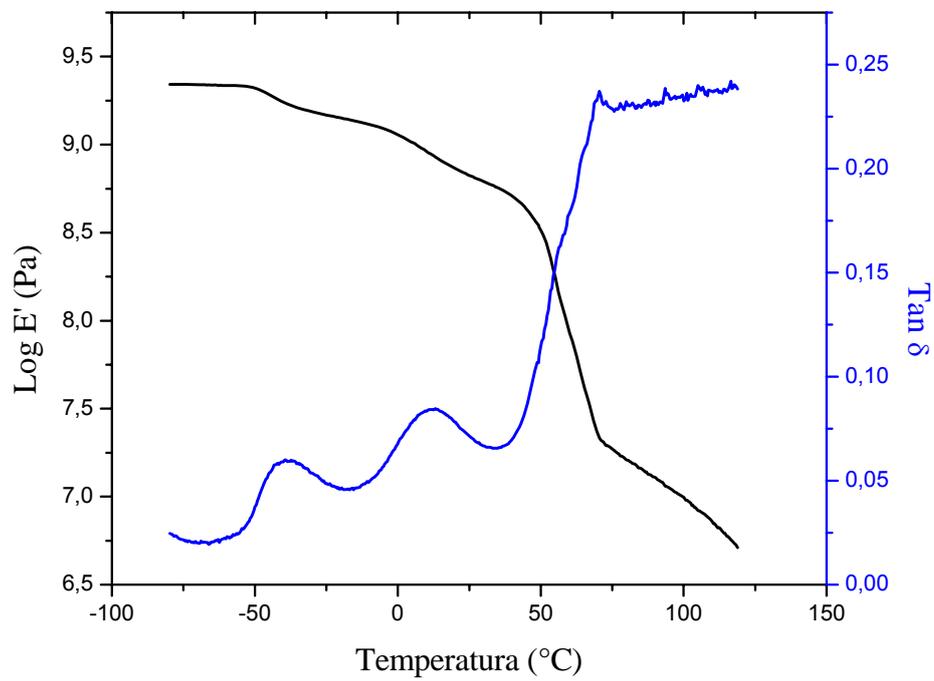
Para a realização da análise por DMTA foi utilizado o método de solitação mecânica de flexão em três pontos, representado pelas curvas das Figuras 4.8, 4.9, 4.10 e 4.11.



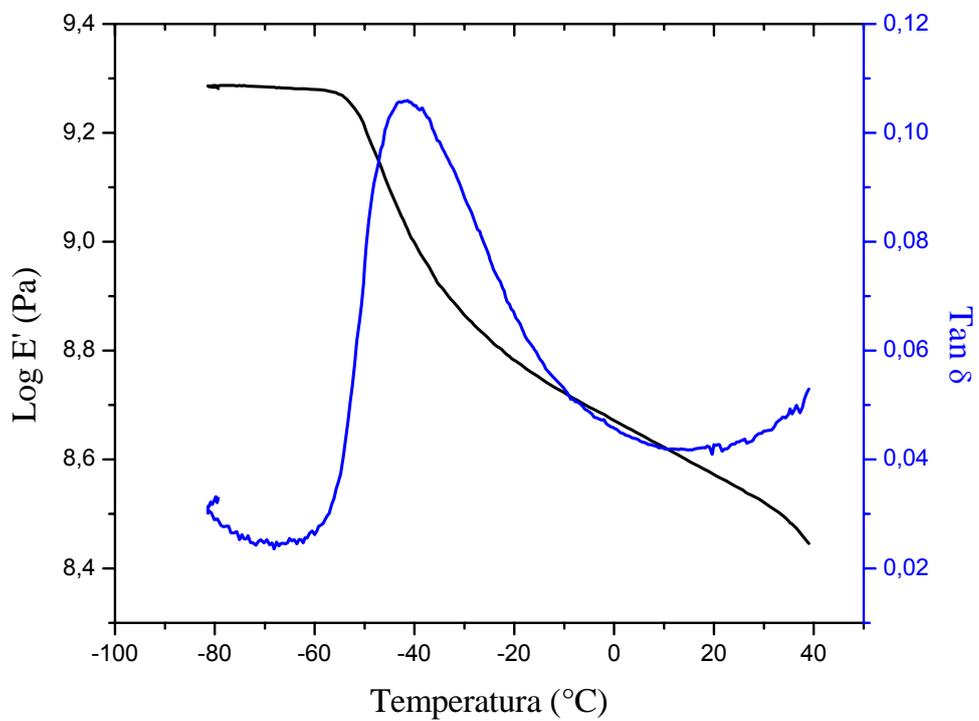
**Figura 4.8 – Curva DMTA para o PHBV puro**



**Figura 4.9 – Curva DMTA para a blenda PHBV/PCL (75/25)**



**Figura 4.10 – Curva DMTA para a blenda PHBV/PCL (50/50)**



**Figura 4.11 – Curva DMTA para o PCL puro**

Para os dois polímeros puros foram encontrados valores de temperatura de transição vítrea próximos a valores encontrados na literatura, sendo para o PHBV um valor de Tg de aproximadamente 14°C [73, 74] e para o PCL um valor de Tg igual a -42°C [73, 74]. No caso das blendas, foram detectadas duas Tg's, correspondentes ao PHBV e ao PCL, próximas aos valores obtidos para os polímeros puros, o que caracteriza a imiscibilidade dos polímeros nas blendas, assim como verificado através das análises de TG e DSC. Os valores das temperaturas de transição vítrea estão apresentados na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3 – Valores de Tg obtidos através do pico de amortecimento Tan( $\delta$ ) dos polímeros puros e dos polímeros nas blendas PHBV / PCL**

Materials	Tg (PHBV)	Tg (PCL)
PHBV	14°C	-
PHBV/PCL (75/25)	12°C	- 43°C
PHBV/PCL (50/50)	12°C	- 40°C
PCL	-	- 42°C

#### 4.3.4 Temperatura de deflexão ao calor sob carga – HDT

Na Tabela 4.4 estão representados os resultados dos ensaios de temperatura de deflexão ao calor sob carga (HDT) para o polímero PHBV puro e para as blendas poliméricas.

**Tabela 4.4 – Valores da Temperatura de Deflexão ao Calor sob Carga**

Materiais	T <sub>1</sub> (°C)	T <sub>2</sub> (°C)	T <sub>3</sub> (°C)	T <sub>Média</sub> (°C)
PHBV	118,4	119,7	107,6	<b>115,2 ± 6,6</b>
PHBV/PCL (75/25)	78,3	83,6	77,3	<b>79,7 ± 3,4</b>
PHBV/PCL (50/50)	58,3	59,3	58,2	<b>58,6 ± 0,6</b>

Através dos resultados foi possível observar que o PHBV apresenta um valor elevado de HDT. Nota-se que conforme aumenta-se a quantidade de PCL na blenda diminui-se o valor de HDT. Estes resultados já eram esperados, pois

um dos objetivos em formar blendas do PHBV com PCL foi de diminuir a cristalinidade do PHBV e torná-lo mais flexível, gerando uma perda no comportamento avaliado por HDT.

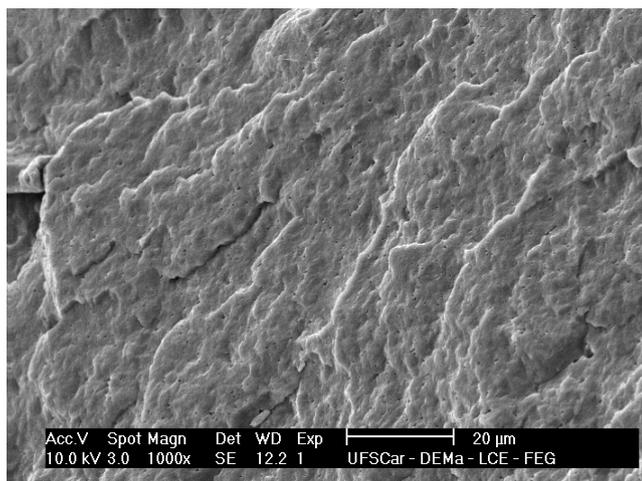
#### **4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV**

Segundo Freitas [33], na pesquisa com blendas poliméricas é essencial o estudo morfológico do produto final, já que a maioria de suas propriedades, especialmente as propriedades mecânicas, dependem da morfologia resultante do processo de desenvolvimento das blendas poliméricas. A morfologia de uma blenda polimérica é controlada por parâmetros como: a natureza dos polímeros (energia interfacial e razão de viscosidades); a composição da blenda; tempo de residência; intensidade do cisalhamento, bem como das outras variáveis de processamento [33].

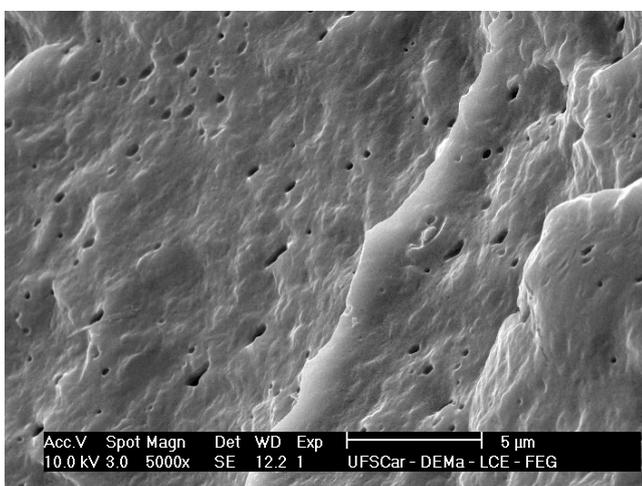
Através da Microscopia Eletrônica de Varredura foram obtidas micrografias do PHBV, do PCL e das duas blendas estudadas. Esta avaliação se voltou para a fratura criogênica dos materiais, com o objetivo de avaliar os aspectos morfológicos gerais dos sistemas poliméricos estudados.

As Figuras 4.12 (a), (b) e (c) apresentam as micrografias do PHBV, com uma ampliação de 1.000x, 5.000x e 10.000x, respectivamente. As Figuras 4.13 (a), (b) e (c) apresentam as micrografias do PCL, com aumentos de (a) 1.000x, (b) 5.000x e (c) 10.000x.

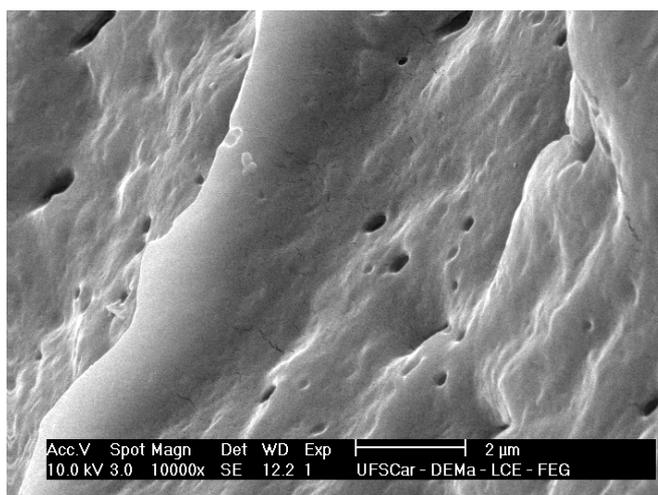
Nas Figuras 4.12 (a), (b) e (c) observa-se que o PHBV apresenta uma fase única contínua, com a presença de microporos distribuídos homogeneamente e mais visíveis a partir da ampliação de 5.000x. Segundo Pachekoski [18] estes microporos têm origem na evaporação de líquidos residuais (água, resíduos de solvente), que foram eliminados durante o processo de injeção.



(a)



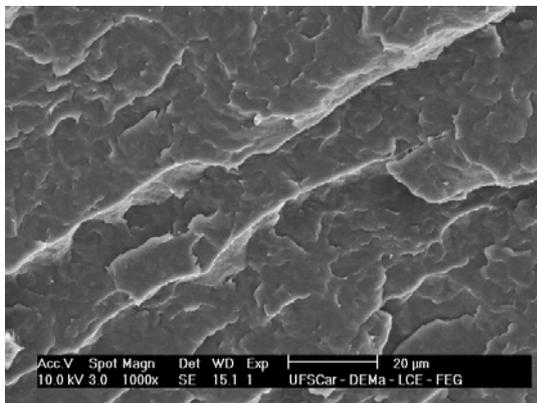
(b)



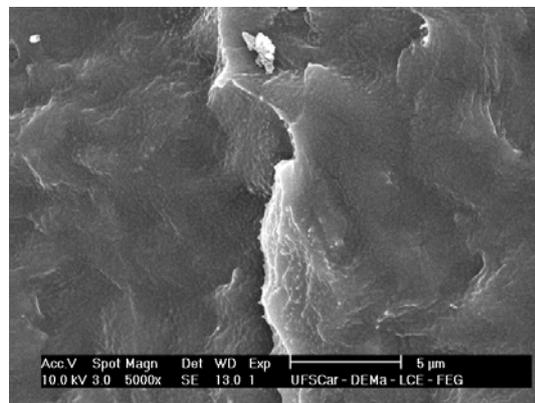
(c)

**Figura 4.12 – Micrografias de MEV do PHBV com ampliação (a) 1.000x, (b) 5.000x e (c) 10.000x**

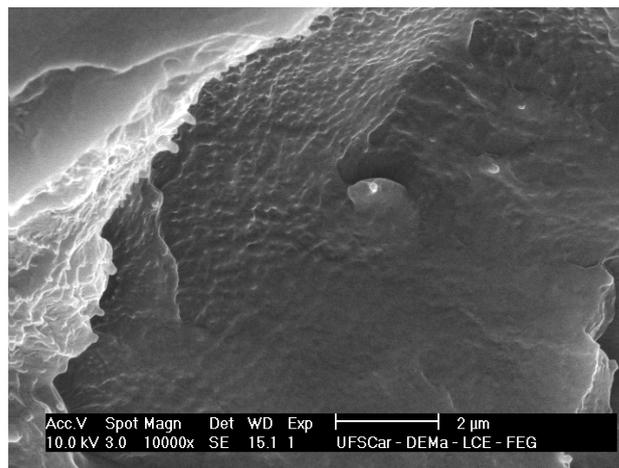
Nas Figuras 4.13 (a), (b) e (c) nota-se que o PCL apresenta uma fase contínua, com superfície regular, sem microtrincas, fissuras ou microporos.



(a)



(b)



(c)

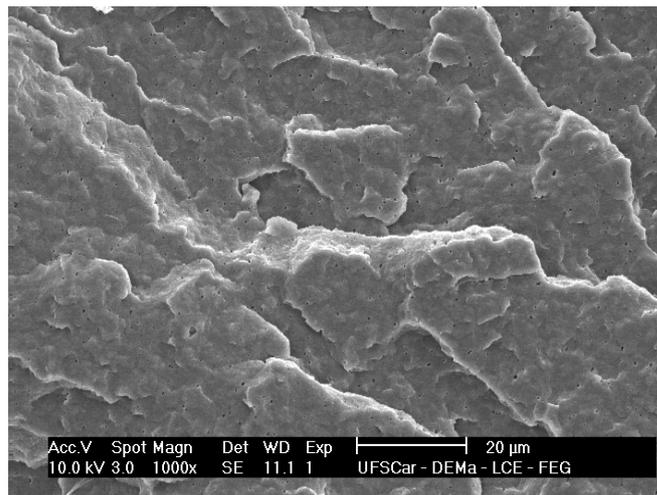
**Figura 4.13 – Micrografias de MEV da PCL com ampliação (a) 1.000x, (b) 5.000x e (c) 10.000x**

As Figuras 4.14 (a), (b) e (c) apresentam as micrografias da blenda PHBV/PCL (75/25), com uma ampliação de 1.000x, 5.000x e 10.000x, respectivamente. As Figuras 4.15 (a), (b) e (c) apresentam as micrografias da blenda PHBV/PCL (50/50), com uma ampliação de (a) 1.000x, (b) 5.000x e (c) 10.000x.

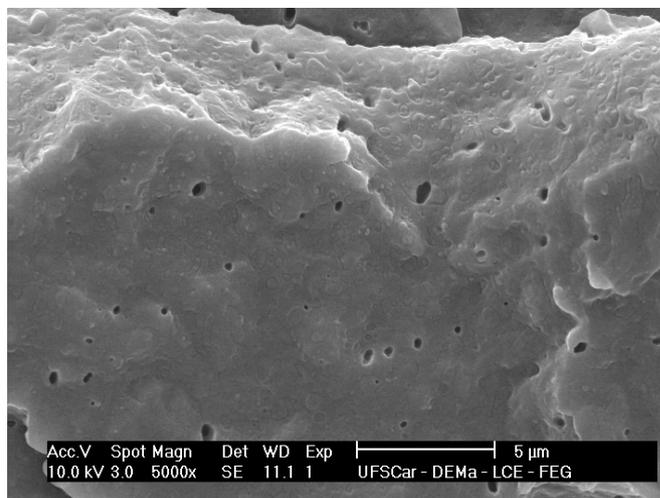
Para a blenda PHBV/PCL (75/25) observa-se uma morfologia de menor interação entre os polímeros PHBV e PCL, caracterizada pelo formato de gota das partículas da PCL. É possível visualizar os microporos característicos do polímero PHBV, porém em menor quantidade.

Para a blenda PHBV/PCL (50/50) os microporos característicos do polímero PHBV só são visualizados com ampliações de 10.000x, mas em quantidades bem reduzidas. É possível observar uma interação maior entre os dois polímeros puros, sinalizando que a fase contínua é rica em PHBV.

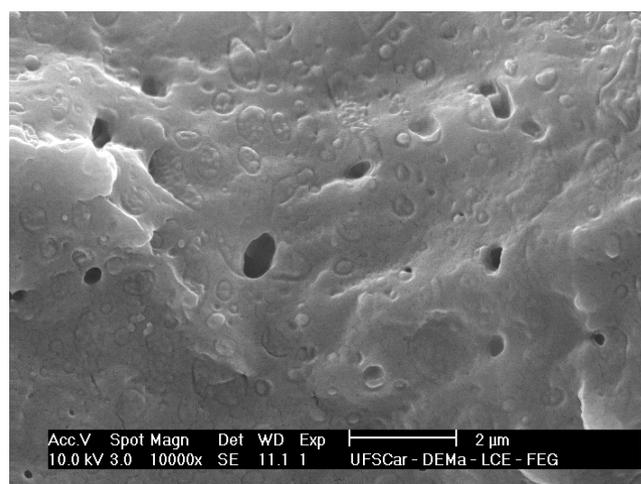
Através da análise por Microscopia Eletrônica de Varredura, foi possível confirmar o resultado obtido através das análises térmicas de TG, DSC e DMTA, em relação à imiscibilidade entre os dois polímeros estudados, PHBV e PCL.



(a)

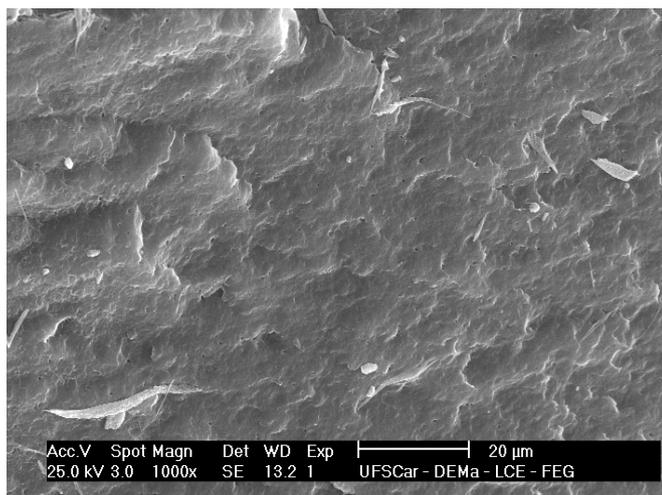


(b)

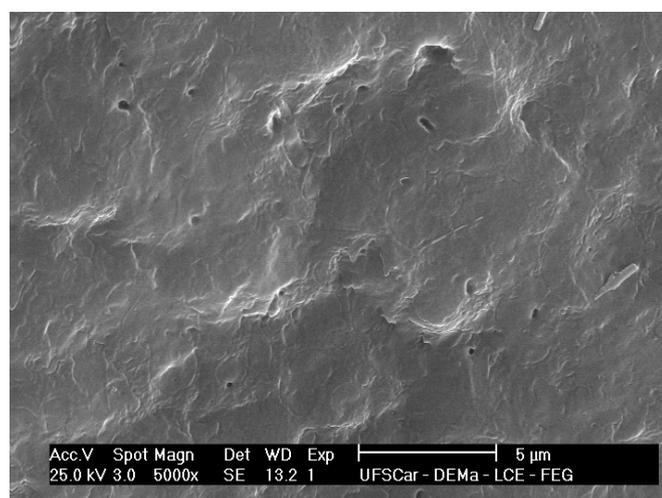


(c)

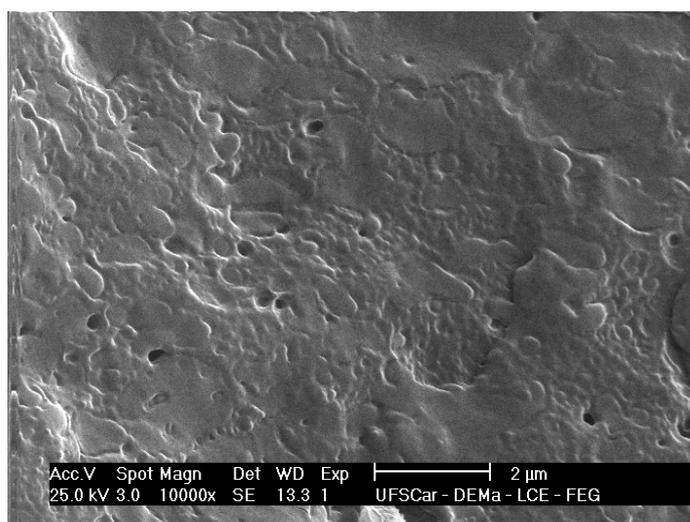
**Figura 4.14 – Micrografias de MEV da blenda PHBV/PCL (75/25) com ampliação (a) 1.000x, (b) 5.000x e (c) 10.000x**



(a)



(b)



(c)

**Figura 4.15 – Micrografias de MEV da blenda PHBV/PCL (50/50) com ampliação (a) 1.000x, (b) 5.000x e (c) 10.000x**

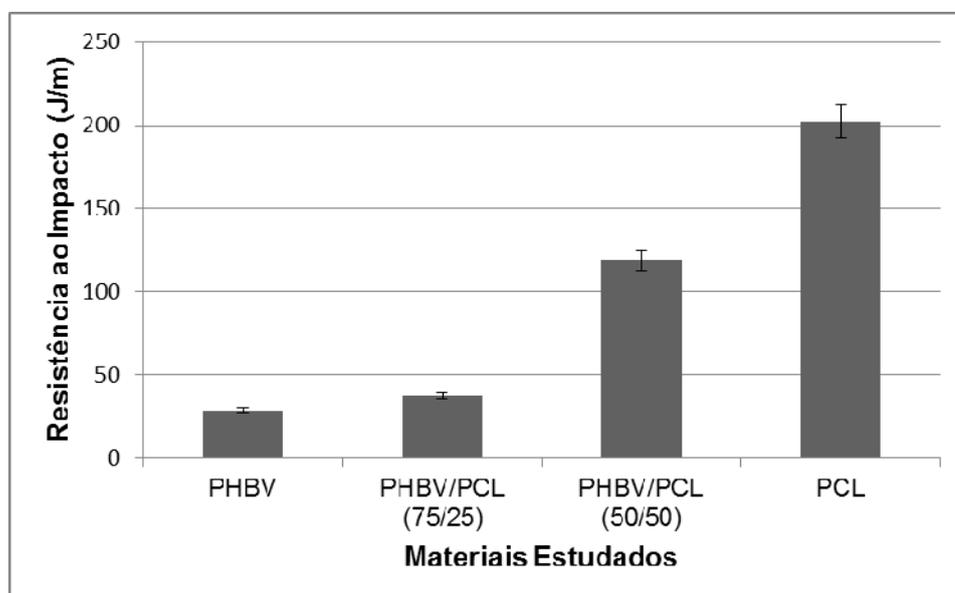
## 4.5 Comportamento Mecânico

### 4.5.1 Ensaio de Impacto

Foram realizados ensaios de impacto para os polímeros puros, PHBV e PCL, assim como para suas misturas PHBV/PCL (75/25) e PHBV/PCL (50/50). Os resultados são apresentados na Tabela 4.5 e na Figura 4.16.

**Tabela 4.5 – Valores de Resistência ao Impacto Izod, com entalhe para o PHBV, PCL e suas blendas**

Materiais	Média (J/m)	Desvio-Padrão (%)
PHBV	28,6	2,0
PHBV/PCL (75/25)	37,4	2,8
PHBV/PCL (50/50)	119,0	3,1
PCL	202,4	4,9



**Figura 4.16 – Resistência ao Impacto Izod com entalhe: comparação entre os materiais estudados**

De acordo com os resultados apresentados, observa-se que o valor de Resistência ao impacto Izod com entalhe do polímero PHBV puro é muito inferior ao PCL puro. Considerando que a Tg do PCL é aproximadamente 73 graus abaixo da temperatura ambiente, a sua fase amorfa é totalmente borrachosa, tornando o material muito flexível e com alta resistência ao impacto.

Para as blendas estudadas nota-se que a blenda PHBV/PCL (75/25) obteve um valor de resistência ao impacto mais próximo do valor do PHBV puro, com um aumento de aproximadamente 30%.

Para a mistura PHBV/PCL (50/50) encontrou-se um resultado próximo a média aritmética dos valores encontrados para o PHBV e PCL.

#### **4.5.2 Ensaio de Tração**

Foram realizados ensaios mecânicos de tração para os polímeros puros PHBV e PCL, e para as blendas estudadas PHBV/PCL (75/25) e PHBV/PCL (50/50).

A velocidade do ensaio de tração define a taxa de deformação que será aplicada ao polímero. A velocidade deve ser escolhida dentro de um intervalo de valores fornecidos pelas normas técnicas, de acordo com o comportamento mecânico do polímero (rígido, semi-rígido ou flexível) e da geometria do corpo de prova a ser ensaiado. A norma ASTM D-638 [101] recomenda que, se a velocidade de ensaio para um determinado polímero não estiver especificada, deve-se utilizar uma velocidade de maneira que o corpo de prova rompa dentro de um intervalo de tempo de meio e cinco minutos de teste [114].

Para a escolha da velocidade ideal para a realização dos ensaios de tração dos materiais estudados, foram testadas as velocidades de 5 e 50mm/min para todos os materiais, e para o polímero PCL foram testadas também as velocidades de 100 e 200mm/min.

Devido à diferença de comportamento mecânico entre os dois polímeros puros, sendo o PHBV um material muito rígido e o PCL um material altamente flexível, a velocidade ideal de ensaio encontrada para cada um deles foi

diferente, sendo que para o PHBV a velocidade ideal encontrada foi de 5mm/min e para o PCL 200mm/min. Como o objetivo do trabalho é comparar os resultados mecânicos das blendas dos dois polímeros, optou-se em utilizar uma velocidade única e intermediária para a realização dos ensaios, portanto a velocidade utilizada em todos os ensaio de tração foi 50mm/min.

No Anexo B encontram-se os resultados obtidos dos ensaios de tração realizados com diferentes velocidades.

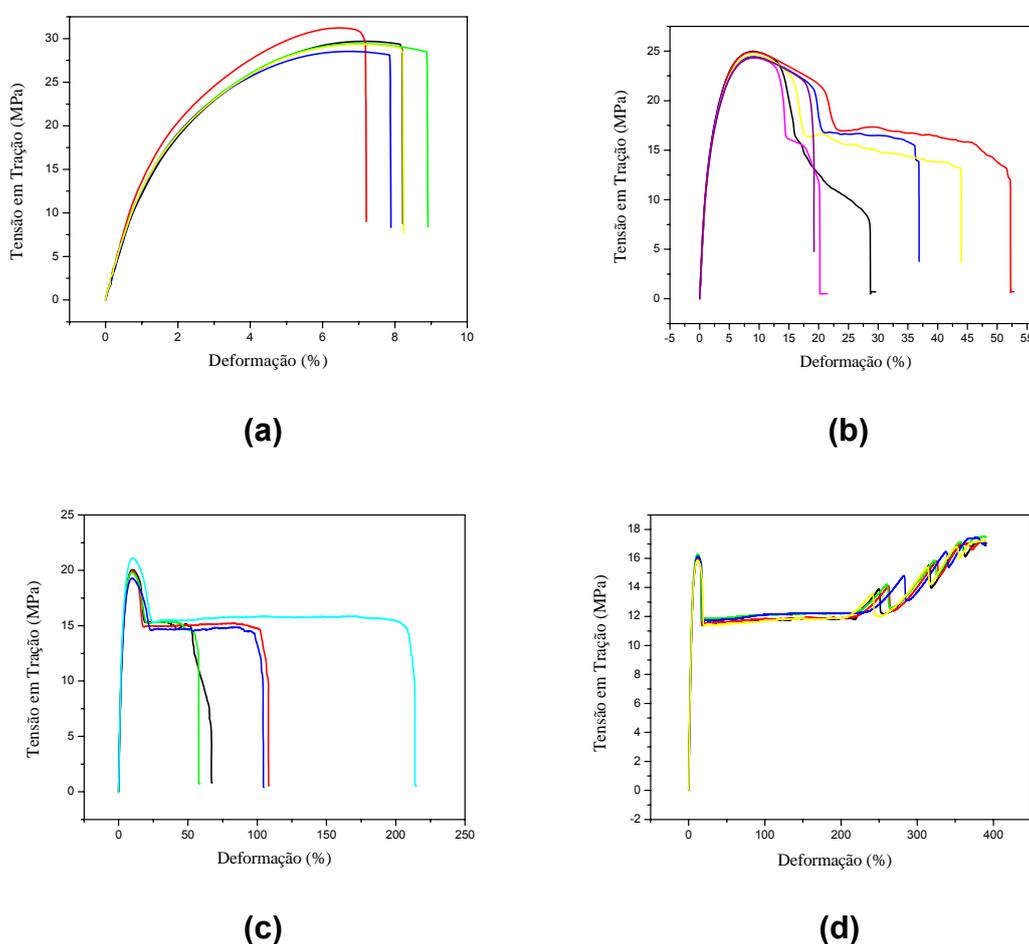
A Tabela 4.6 apresenta os resultados obtidos e a Figura 4.17 (a), (b), (c) e (d) apresenta os gráficos com as curvas tensão de tração em função da deformação, de cada ensaio, para os quatro materiais estudados.

**Tabela 4.6 – Valores de  $\sigma_e$ ,  $\epsilon_e$ , E,  $\sigma_r$  e  $\epsilon_r$  para o PHBV, PCL e suas blendas sob tração**

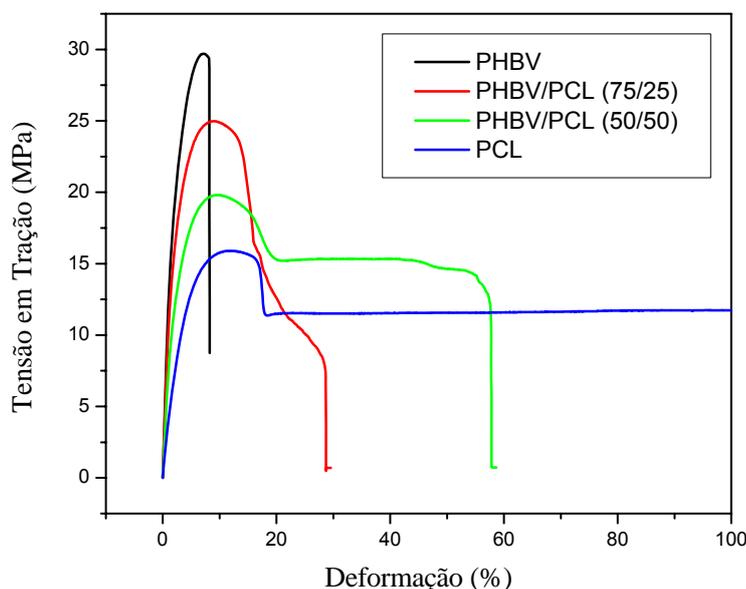
<b>Materiais</b>	<b>Tensão no escoamento (MPa)</b>	<b>Deformação no escoamento (%)</b>	<b>Módulo de Elasticidade (GPa)</b>	<b>Tensão na ruptura em tração (MPa)</b>	<b>Deformação na ruptura em tração (%)</b>
PHBV	29,7 ± 0,1	6,9 ± 0,3	1,2 ± 0,1	29,1 ± 1,1	7,9 ± 0,7
PHBV/PCL (75/25)	25,0 ± 1,0	9,0 ± 0,4	0,9 ± 0,1	11,7 ± 6,6	28,3 ± 17,3
PHBV/PCL (50/50)	20,1 ± 0,7	9,6 ± 0,5	0,6 ± 0,1	15,8 ± 2,8	62,1 ± 38,1
PCL	17,3 ± 0,2	384,2 ± 4,8	0,3 ± 0,0	17,2 ± 0,2	386,5 ± 4,2

Nos ensaios de tração foram avaliados os parâmetros módulo de elasticidade, resistência à tração no escoamento, tensão na ruptura e alongamentos no escoamento e na ruptura. Observa-se que os comportamentos mecânicos dos polímeros puros são bem diferentes. O PHBV apresenta alta rigidez e fragilidade, caracterizado pela sua baixa deformação, repentina ruptura e alto módulo elástico. Por outro lado o polímero PCL demonstrou um comportamento bem flexível, o material não rompeu ao longo do ensaio e apresentou um valor baixo de módulo elástico. Esta diferença de comportamento pode ser visualizada também na Figura 4.18, que apresenta um gráfico comparativo com uma curva representativa de cada material estudado.

A blenda estudada com 25% de PCL apresentou um comportamento mecânico mais próximo do PHBV puro, enquanto que a blenda com 50% de PCL apresentou um comportamento mais próximo do PCL. Nota-se que conforme aumenta-se a porcentagem de PCL na blenda ocorre uma diminuição no módulo de elasticidade, na tensão na ruptura e na resistência à tração no escoamento, enquanto que os valores de deformação tanto no escoamento quanto na ruptura se elevam, ficando evidente que a presença do PCL na blenda reduziu a rigidez do PHBV tornando-o mais flexível.



**Figura 4.17 – Curvas da Tensão em Tração em função da Deformação:  
(a) PHBV, (b) PHBV/PCL (75/25), (c) PHBV/PCL (50/50) e (d) PCL**



**Figura 4.18 – Curvas da Tensão em Tração em função da Deformação: comparação entre os materiais estudados**

#### 4.5.3 Ensaio de Flexão

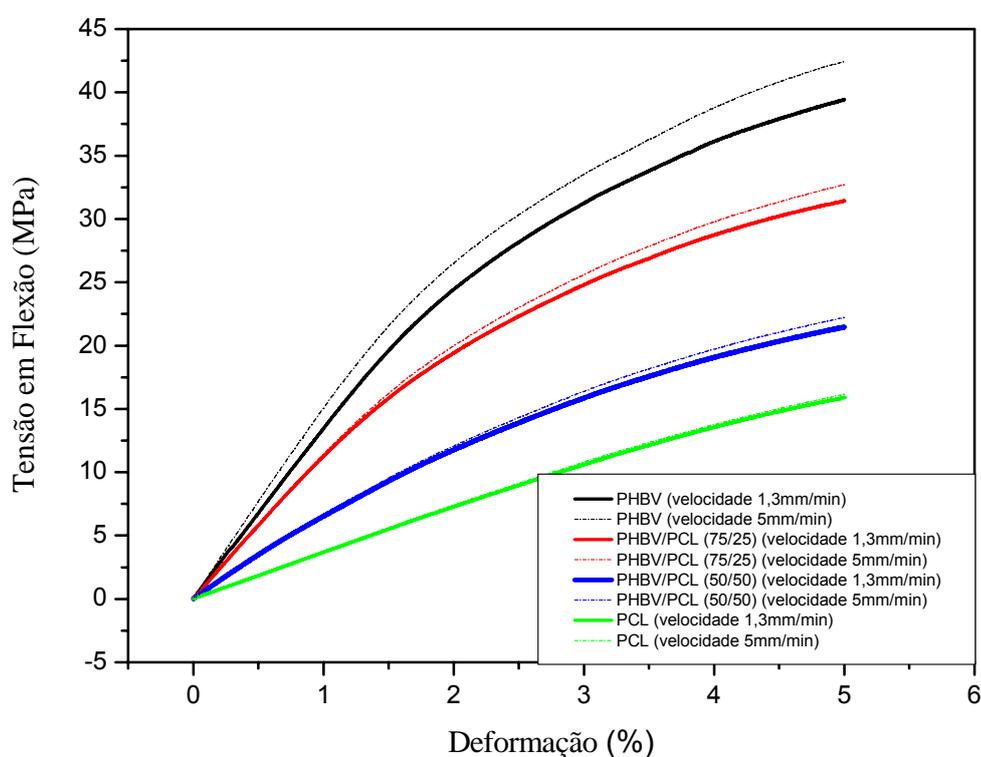
Nos ensaios de flexão foram avaliados os parâmetros de resistência à flexão na ruptura e o módulo de elasticidade em flexão. Para a realização dos ensaios foi estipulada uma deformação máxima de 5%. Foram realizados cinco ensaios para cada um dos polímeros e para as blendas. Com os valores obtidos foram calculadas as médias aritméticas e o desvio-padrão.

Para todos os materiais estudados o ensaio de flexão foi realizado em duas velocidades diferentes, com o objetivo de comparar o comportamento mecânico dos materiais em baixa velocidade (1,3mm/min) e em alta velocidade (5mm/min).

A Tabela 4.7 apresenta os resultados obtidos nas duas velocidades estudadas. A Figura 4.19 apresenta um gráfico comparativo com uma curva representativa de cada material, nas duas velocidades utilizadas.

**Tabela 4.7 – Valores de Módulo de Elasticidade e Resistência à flexão do PHBV, PCL e suas blendas, com velocidades de 1,3mm/min e de 5mm/min**

<b>Materiais</b>	<b>Módulo de Elasticidade em Flexão (GPa)</b>	<b>Resistência à Flexão (MPa)</b>
PHBV - (1,3mm/min)	1,4 ± 0,1	40,0 ± 1,0
PHBV - (5mm/min)	1,5 ± 0,0	42,2 ± 0,9
PHBV/PCL (75/25) - (1,3mm/min)	1,1 ± 0,0	31,2 ± 0,3
PHBV/PCL (75/25) - (5mm/min)	1,2 ± 0,0	33,2 ± 1,1
PHBV/PCL (50/50) - (1,3mm/min)	0,7 ± 0,0	21,9 ± 0,8
PHBV/PCL (50/50) - (5mm/min)	0,7 ± 0,0	22,5 ± 0,3
PCL - (1,3mm/min)	0,4 ± 0,0	15,8 ± 0,2
PCL - (5mm/min)	0,4 ± 0,0	16,3 ± 0,1



**Figura 4.19 – Curvas da Tensão em Flexão em função da Deformação: comparação entre os materiais e velocidades**

Analisando os resultados obtidos através dos ensaios de flexão, observa-se uma semelhança entre os resultados obtidos pelo ensaio de tração. Novamente foi observada a diferença entre os comportamentos dos polímeros PHBV e PCL, sendo que o polímero PHBV apresentou um comportamento rígido e frágil e o PCL um comportamento flexível. A blenda PHBV/PCL (75/25) apresentou um comportamento semelhante ao PHBV puro, enquanto que a blenda PHBV/PCL (50/50) apresentou valores mais próximos do polímero PCL puro.

Ao comparar as duas velocidades estudadas constata-se que o módulo elástico em flexão não se alterou com a velocidade. Esse resultado foi o mesmo para todos os materiais estudados. Em relação aos valores da resistência à flexão, considerando-se o desvio-padrão, observa-se que os valores encontrados para cada material são praticamente os mesmos nas duas velocidades.

Através da Figura 4.19, nota-se uma diferença na inclinação das curvas ao comparar a curva do mesmo material, em velocidade diferente. A diferença na inclinação é observada para o PHBV puro e para as duas blendas estudadas, sendo a diferença mais nítida para o PHBV. Segundo Canto [114] este comportamento é resultado da influência do tempo na resposta do polímero à solicitação mecânica a ele imposta [114].

Através dos ensaios mecânicos de impacto, de tração e de flexão, foi possível observar que nas blendas estudadas o polímero PCL tornou o PHBV mais flexível, ou seja, o PCL agiu como um modificador de impacto para o PHBV.

#### **4.6 Conclusões Parciais**

Através do estudo realizado, verificou-se a viabilidade do processamento, através de extrusão e injeção, dos polímeros puros e das blendas poliméricas desenvolvidas. Concluiu-se através das análises térmicas e da caracterização morfológica que as mesmas são imiscíveis.

Conclui-se que o objetivo de desenvolver blendas de PHBV com PCL com a finalidade de tornar o PHBV mais flexível, foi atingido, e nesse caso o PCL age como um modificador de impacto para o PHBV.

#### **4.7 Degradação *in vitro***

Tendo em vista a aplicação potencial dos polímeros puros e blendas em estudo para a confecção de dispositivos de osteossíntese, foi avaliado o comportamento dos mesmos frente à degradação *in vitro*, analisando as alterações sofridas em relação à massa, massa molar, bem como alterações morfológicas e de comportamento mecânico dos polímeros em função do tempo de contato com solução tampão fosfato a 37°C. Tais parâmetros foram avaliados para tempos de experimento variando entre zero e 180 dias.

##### **4.7.1 Perda de Massa**

A variação da massa é comumente utilizada na caracterização da degradação de polímeros biorreabsorvíveis [115, 62].

Para avaliação da variação de massa dos polímeros em estudo, os corpos de prova de cada amostra, após 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias em contato com a solução tampão foram recuperados para análise. Após serem retirados da solução tampão os corpos de prova foram lavados com bastante água destilada, colocados em uma bandeja e secados durante 168 horas na temperatura ambiente.

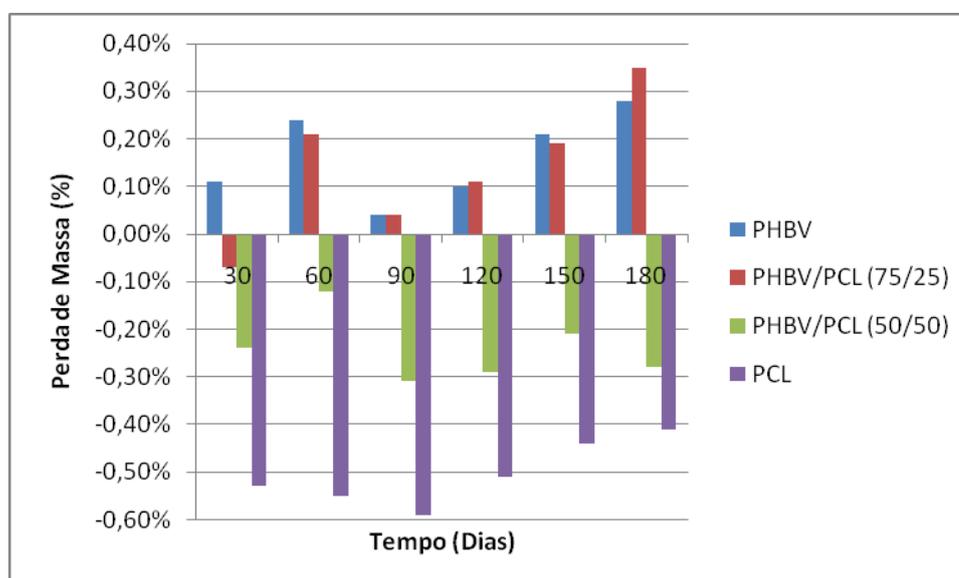
Depois de secados os mesmos foram pesados e o valor percentual da perda de massa foi calculado conforme descrito no item 3.2.8 deste texto. A Tabela 4.8 e a Figura 4.20 ilustram os resultados obtidos.

A variação da perda de massa (massa normalizada) em função do tempo de imersão em solução tampão mostrou uma tendência de comportamento distinto entre os dois polímeros estudados, sendo que os dois polímeros demonstraram serem mais estáveis à degradação hidrolítica quando

comparados à outros polímeros biorreabsorvíveis como PLLA [116] e PLGA 50 [62].

**Tabela 4.8 – Variação percentual da massa das amostras em estudo para diferentes tempos de imersão em solução tampão fosfato a 37°C**

	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias
<b>PHBV</b>	+0,11 ± 0,04	+0,24 ± 0,04	+0,04 ± 0,03	+0,10 ± 0,04	+0,21 ± 0,02	+0,28 ± 0,03
<b>PHBV/PCL (75/25)</b>	-0,07 ± 0,02	+0,21 ± 0,10	+0,04 ± 0,01	+0,11 ± 0,02	+0,19 ± 0,08	+0,35 ± 0,02
<b>PHBV/PCL (50/50)</b>	-0,24 ± 0,02	-0,12 ± 0,02	-0,31 ± 0,02	-0,29 ± 0,02	-0,21 ± 0,01	-0,28 ± 0,02
<b>PCL</b>	-0,53 ± 0,03	-0,55 ± 0,03	-0,59 ± 0,08	-0,51 ± 0,07	-0,44 ± 0,04	-0,41 ± 0,07



**Figura 4.20 – Variação percentual da massa das amostras em estudo para diferentes tempos de imersão em solução tampão fosfato a 37°C**

Na Tabela 4.8 e na Figura 4.20 os valores de variação de massa negativos indicam diminuição da massa e valores positivos indicam ganho de massa.

Assim, através dos resultados obtidos foi observado que as amostras do polímero PHBV puro ganharam massa durante o tempo de contato com a solução salina, provavelmente por absorverem água e não sofrerem degradação com perda significativa de massa ao longo do tempo em estudo.

No caso do polímero PCL puro, foi observado que até 90 dias houve uma queda gradativa na massa, que atingiu um máximo para 90 dias e para

tempos maiores embora tenha ocorrido redução na massa das amostras em relação à massa inicial, os percentuais foram inferiores ao valor atingido para o tempo de 90 dias.

Para as blendas foi observado que a blenda PHBV/PCL (75/25) teve um comportamento semelhante ao do polímero PHBV puro, enquanto a blenda PHBV/PCL (50/50) teve um comportamento semelhante ao polímero PCL.

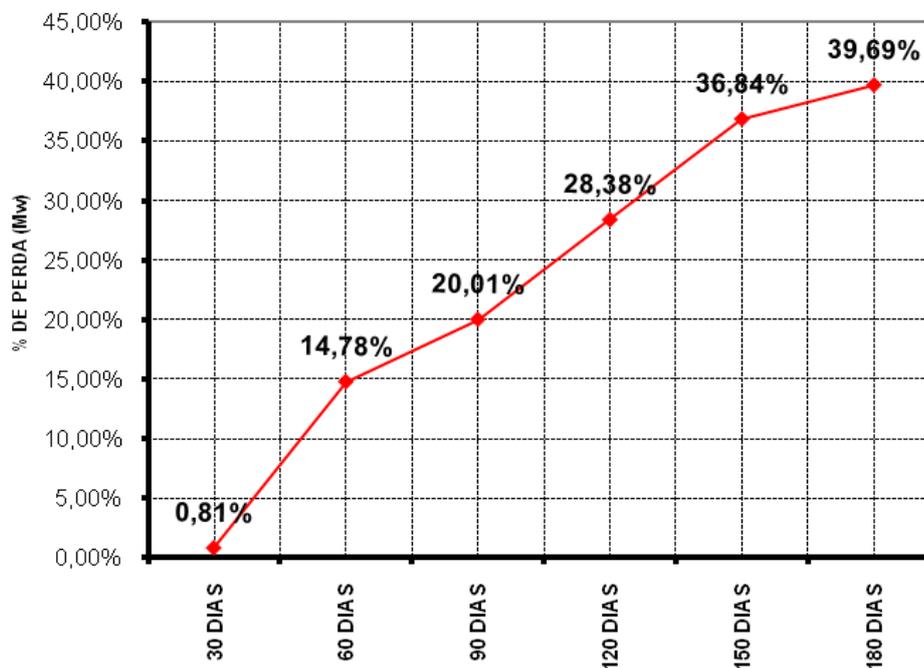
#### **4.7.2 Massa Molar – Cromatografia de Exclusão por Tamanho**

A avaliação da variação da massa molar das amostras em estudo foi acompanhada através da análise por Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.9. As Figuras 4.21, 4.22 e 4.23 ilustram gráficos da porcentagem da perda de massa molar ponderal média ( $\overline{M}_w$ ) do PHBV ao longo do tempo em contato com a solução salina, para os materiais PHBV, PHBV/PCL (75/25), PHBV/PCL (50/50), respectivamente. A Figura 4.24 apresenta este resultado para o PCL.

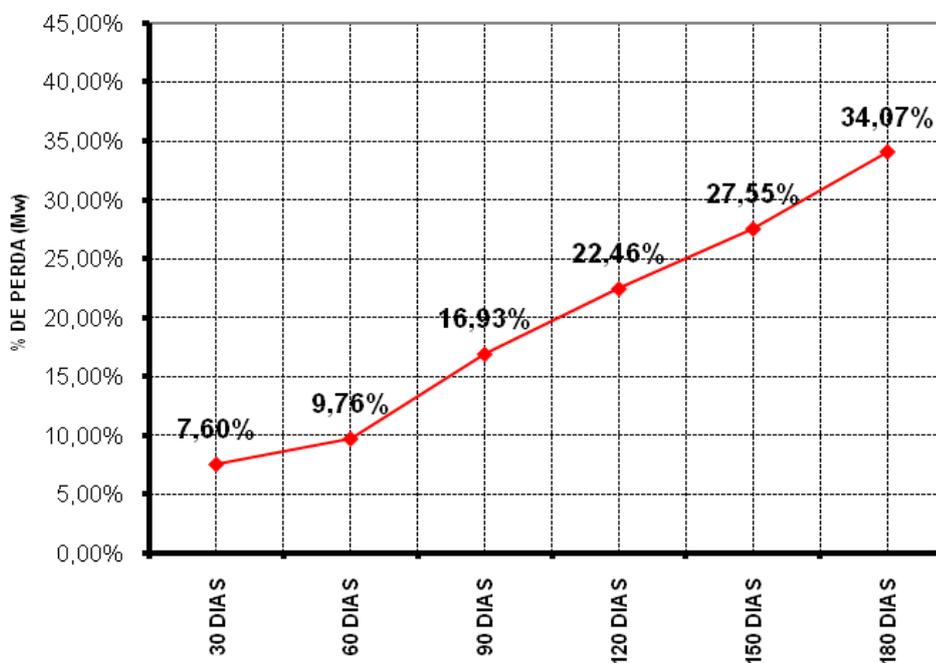
Através dos resultados obtidos foi observada uma redução significativa na massa molar do PHBV puro e do PHBV nas blendas. Para o PCL puro a massa molar permaneceu constante ao longo do tempo do teste de degradação *in vitro* (hidrolítica).

**Tabela 4.9 – Variação da Massa Molar do PHBV (puro e nas blendas PHBV/PCL (75/25), PHBV/PCL (50/50)) e do PCL ao longo do tempo em contato com solução tampão fosfato a 37°C**

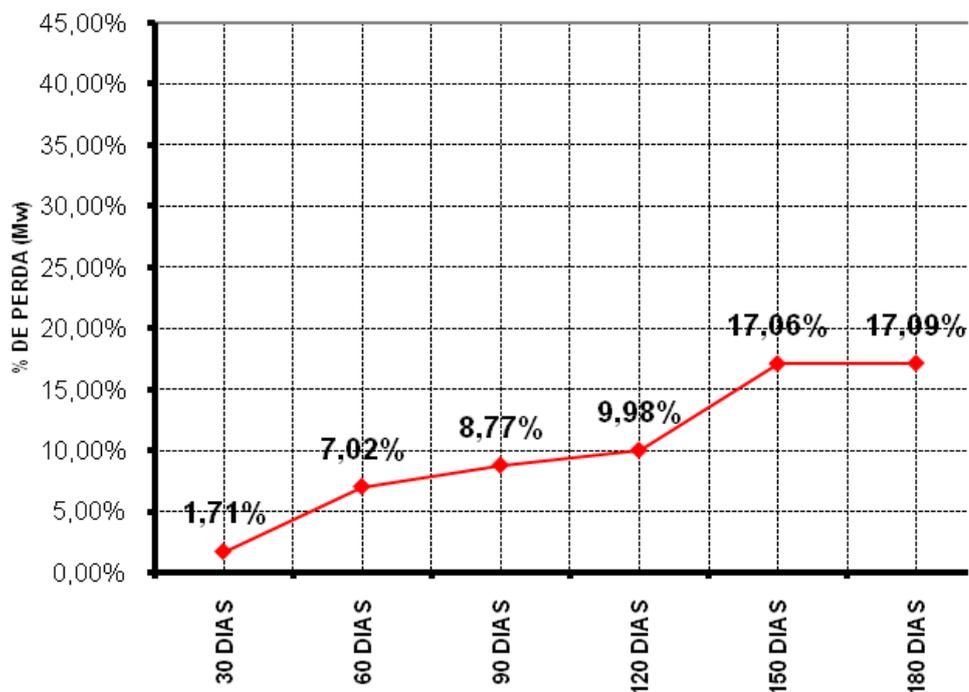
IDENTIFICAÇÃO	(Mw/Mn)	Médias da Massa Molar (Daltons)				
	Polidispersão	Mv	Mn	Mw	MP	Mz
PHBV - 0 DIAS	1,85	219.416	125.794	232.750	203.166	374.879
PHBV - 30 DIAS	1,83	217.254	126.037	230.862	186.316	384.094
PHBV - 60 DIAS	1,81	187.153	109.243	198.355	168.692	318.924
PHBV - 90 DIAS	1,95	174.755	95.138	186.174	157.752	310.418
PHBV - 120 DIAS	1,75	157.816	95.210	166.694	145.509	260.563
PHBV - 150 DIAS	2,14	137.847	68.386	147.015	128.234	243.490
PHBV - 180 DIAS	2,38	131.141	58.977	140.377	127.471	238.466
PHBV/PCL (75/25) 30 DIAS	2,19	157.207	77.663	170.441	91.858	322.208
PHBV/PCL (75/25) 60 DIAS	2,32	152.881	71.693	166.449	86.973	326.949
PHBV/PCL (75/25) 90 DIAS	2,20	141.273	69.540	153.227	88.494	293.590
PHBV/PCL (75/25) 120 DIAS	2,23	131.950	64.101	143.023	85.387	270.032
PHBV/PCL (75/25) 150 DIAS	2,43	122.964	54.868	133.639	80.399	255.685
PHBV/PCL (75/25) 180 DIAS	2,23	112.537	54.485	121.606	85.431	222.114
PHBV/PCL (50/50) 30 DIAS	1,94	132.674	73.903	143.721	85.621	289.159
PHBV/PCL (50/50) 60 DIAS	2,30	124.202	59.005	135.962	82.809	294.301
PHBV/PCL (50/50) 90 DIAS	2,31	121.706	57.563	133.404	81.220	290.504
PHBV/PCL (50/50) 120 DIAS	2,27	119.167	57.919	131.623	76.039	321.484
PHBV/PCL (50/50) 150 DIAS	2,12	111.321	57.133	121.282	75.401	254.374
PHBV/PCL (50/50) 180 DIAS	2,03	111.407	59.644	121.236	73.386	252.602
PCL - 0 DIAS	1,42	92.572	67.261	95.882	87.721	129.419
PCL - 30 DIAS	1,46	92.942	65.741	96.399	89.781	131.029
PCL - 60 DIAS	1,47	93.423	65.726	96.826	89.165	130.544
PCL - 90 DIAS	1,48	92.034	64.375	95.568	88.152	131.346
PCL - 120 DIAS	1,42	92.516	66.996	95.746	89.333	127.737
PCL - 150 DIAS	1,43	93.621	67.481	96.995	90.276	130.867
PCL - 180 DIAS	1,45	93.548	66.854	96.957	89.291	131.250



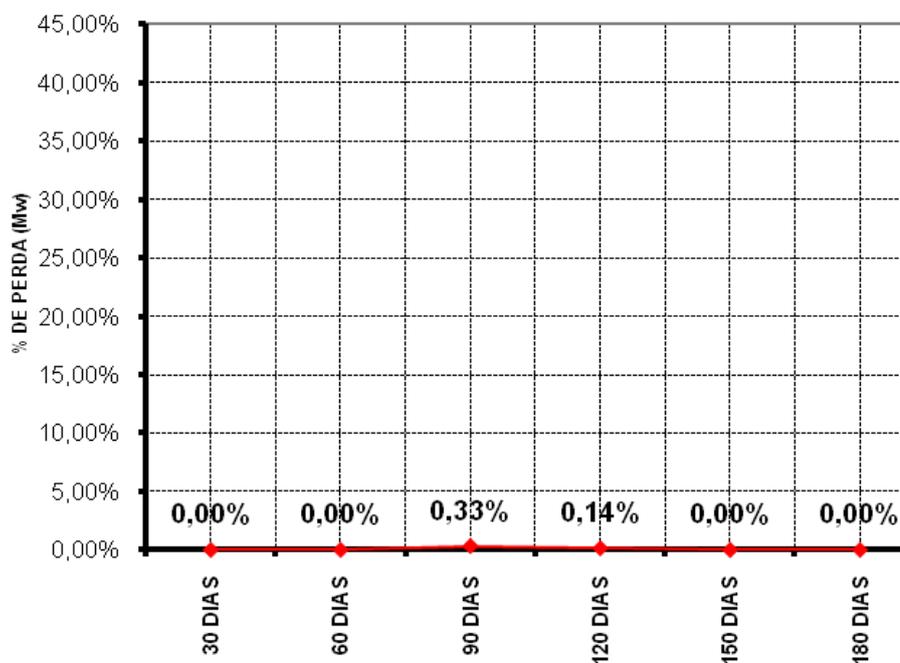
**Figura 4.21 – Variação percentual de perda de massa molar em função do tempo para amostras de PHBV, em contato com solução tampão fosfato a 37°C**



**Figura 4.22 – Variação percentual de perda de massa molar do PHBV em função do tempo para amostras da blenda PHBV/PCL (75/25), em contato com solução tampão fosfato a 37°C**



**Figura 4.23 – Variação percentual de perda de massa molar do PHBV em função do tempo para amostras da blenda PHBV/PCL (50/50), em contato com solução tampão fosfato a 37°C**



**Figura 4.24 – Variação percentual de perda de massa molar em função do tempo para amostras de PCL em contato com solução tampão fosfato a 37°C**

Comparando os resultados referentes à perda de massa com os resultados referentes à variação na massa molar, nota-se que o polímero PHBV não perde massa ao longo da degradação hidrolítica, porém apresenta redução de cerca de 40% em sua massa molar ponderal média, o que pode ser explicado pelo fato do PHBV absorver água durante o contato com a solução salina, o que favorece a cisão hidrolítica das macromoléculas do polímero, resultando na redução do valor da massa molar ponderal média. No caso do polímero PCL puro ocorreu o inverso, sendo que há uma pequena redução na massa das amostras e o polímero não apresenta redução de massa molar ponderal média, o que pode ser um indicativo de que a degradação ocorra na superfície da amostra e, por não haver absorção significativa de água pelo polímero, a cisão das cadeias poliméricas no interior da amostra não ocorre. Vale a pena ressaltar que para a realização da análise SEC foi coletada uma pequena porção do corpo de prova representativo do “bulk” e superfície da amostra em questão. Não foram encontrados dados na literatura para estes polímeros, analisados nestas condições.

Uma maneira simples de se conhecer quão larga ou estreita é a curva de distribuição de massas molares é através da polidispersão, definida pela relação  $(\overline{Mw}/\overline{Mn})$ . Este valor é sempre maior ou igual a um. Quando  $\overline{Mw} = \overline{Mn}$ , tem-se um polímero monodisperso ideal, ou seja, todas as cadeias têm o mesmo comprimento [113].

Comparando os valores de polidispersão obtidos por SEC para os materiais estudados observa-se que o polímero PHBV possui uma cadeia com tamanhos de moléculas mais variados que o polímero PCL. Essa diferença se deve basicamente às diferenças no processo de obtenção de ambos os materiais e as características intrínsecas de cada polímero. Observa-se também que os valores de polidispersão variam ao longo da degradação *in vitro* (hidrolítica) para todos os materiais estudados.

### 4.7.3 Índice de Fluidez

Além do mencionado no item 4.2, as variações nos valores do índice de fluidez em função das condições de processamento ou das variáveis em experimentos de envelhecimento fornecem dados tecnológicos que possibilitam avaliações da degradação e da estabilização de polímeros [22].

Neste estudo, para realizar as medidas de índice de fluidez das amostras após cada tempo de seguimento do ensaio de degradação hidrolítica, foi coletada uma pequena porção do corpo de prova representativo do “bulk” e superfície da amostra em questão, com massa de 2 gramas. Devido ao fato do polímero PHBV ser altamente susceptível à degradação térmica, para comparar os resultados obtidos após a degradação hidrolítica, foi realizada a medida de índice de fluidez nos corpos de prova injetados dos materiais estudados que não foram submetidos ao contato com a solução salina, seguindo o mesmo procedimento. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.10.

**Tabela 4.10 – Valores de índice de fluidez das amostras em estudo ao longo do tempo em contato com solução tampão fosfato a 37°C**

<b>Materiais</b>	<b>MFI (g/10min)</b>
PHBV - CP	37,4
PHBV – CP 90 dias	54,9
PHBV – CP 180 dias	> 60,0
PHBV/PCL (75/25) – CP	41,1
PHBV/PCL (75/25) – CP 90 dias	62,2
PHBV/PCL (75/25) – CP 180 dias	114,2
PHBV/PCL (50/50) – CP	48,9
PHBV/PCL (50/50) – CP 90 dias	67,5
PHBV/PCL (50/50) – CP 180 dias	68,9
PCL – CP	44,3
PCL – CP 90 dias	37,4
PCL – CP 180 dias	39,0

Tais resultados confirmam a ocorrência de degradação hidrolítica no caso do polímero PHBV, uma vez que este apresentou aumentos nos valores de índice de fluidez ao longo do tempo de contato com a solução salina. Uma vez que estes materiais apresentaram redução nos valores de massa molar ponderal média era esperado que apresentassem aumento do índice de fluidez. O comportamento do PHBV foi determinante nos resultados de índice de fluidez apresentados pelas blendas PHBV/PCL (75/25) e PHBV/PCL (50/50).

No caso do polímero PCL não foram observados aumentos nos valores de índice de fluidez, o que não significa que o material não degradou, pois conforme discutido no item anterior, a degradação provavelmente não ocorre de forma homogênea no corpo de prova, mas sim apenas na superfície deste. Assim, como a análise empregou uma porção representativa do corpo de prova incluindo “bulk” e superfície, não foi possível constatar alterações significativas nos valores do índice de fluidez. Neste caso o indício da degradação sofrida foi verificado pela redução na massa dos corpos de prova e, para confirmar o comportamento observado foram realizadas outras análises térmicas, ensaio mecânico de tração e MEV, cujos resultados são descritos a seguir.

#### **4.7.4 Termogravimetria – TG**

A Termogravimetria (TG) permite verificar a estabilidade térmica de materiais poliméricos, bem como a composição de blendas poliméricas. Assim sendo, a análise foi realizada com as amostras que foram submetidas ao teste de degradação *in vitro*, para constatar alterações sofridas pelas amostras poliméricas após diferentes tempos em contato com solução tampão fosfato, o que pode auxiliar na compreensão dos mecanismos de degradação envolvidos quando isto ocorre.

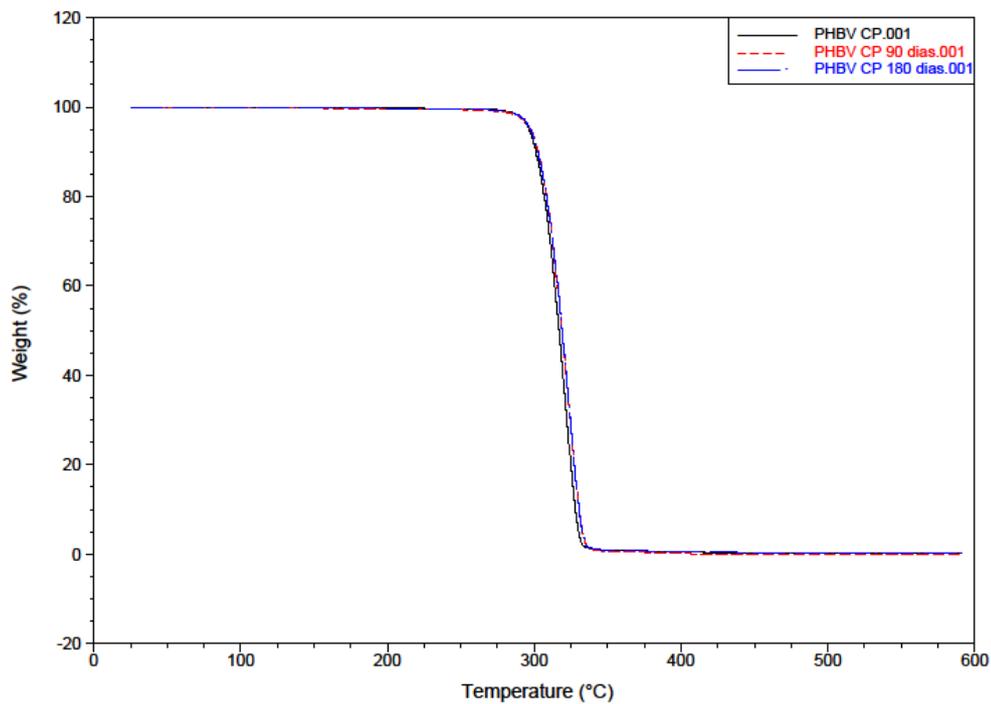
As curvas obtidas pelas análises de TG para as amostras em estudo antes e após 90 e 180 dias em solução tampão são mostradas nas Figuras 4.25, 4.26, 4.27 e 4.28. A Tabela 4.11 apresenta os valores das temperaturas iniciais e finais de decomposição dos materiais estudados.

Verifica-se através da análise dos resultados obtidos que não houve para nenhum dos materiais estudados, alterações significativas nos valores das temperaturas iniciais e finais de decomposição.

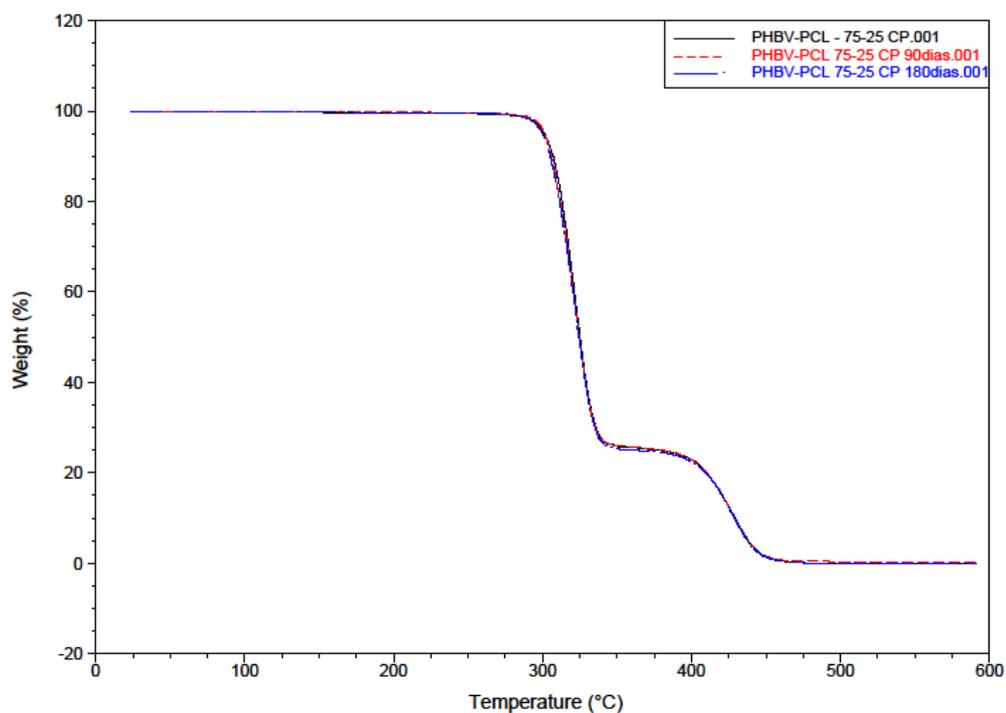
Os gráficos com as curvas individuais de cada material antes e após 90 e 180 dias em contato com a solução salina encontram-se no Anexo C.

**Tabela 4.11 – Valores da Temperatura de perda de massa inicial (Ti) e final (Tf) do PHBV, PCL e suas blendas ao longo do tempo em contato com solução tampão salina**

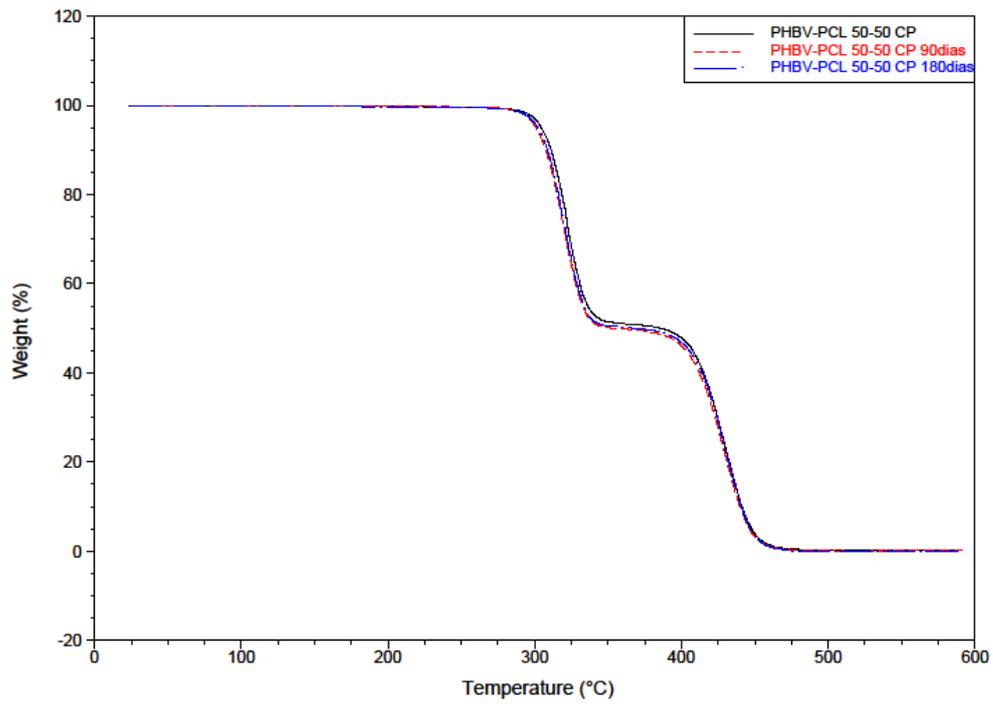
Material	Temperatura de Perda de Massa (°C)			
	PHBV		PCL	
	Ti	Tf	Ti	Tf
PHBV CP	304	330	-	-
PHBV CP - 90d	306	332	-	-
PHBV CP - 180d	306	332	-	-
PHBV/PCL (75/25) CP	307	334	406	444
PHBV/PCL (75/25) CP - 90d	305	334	406	444
PHBV/PCL (75/25) CP - 180d	305	334	406	445
PHBV/PCL (50/50) CP	309	333	409	448
PHBV/PCL (50/50) CP - 90d	304	333	408	446
PHBV/PCL (50/50) CP - 180d	305	333	410	447
PCL CP	-	-	412	451
PCL CP - 90d	-	-	412	451
PCL CP - 180d	-	-	411	449



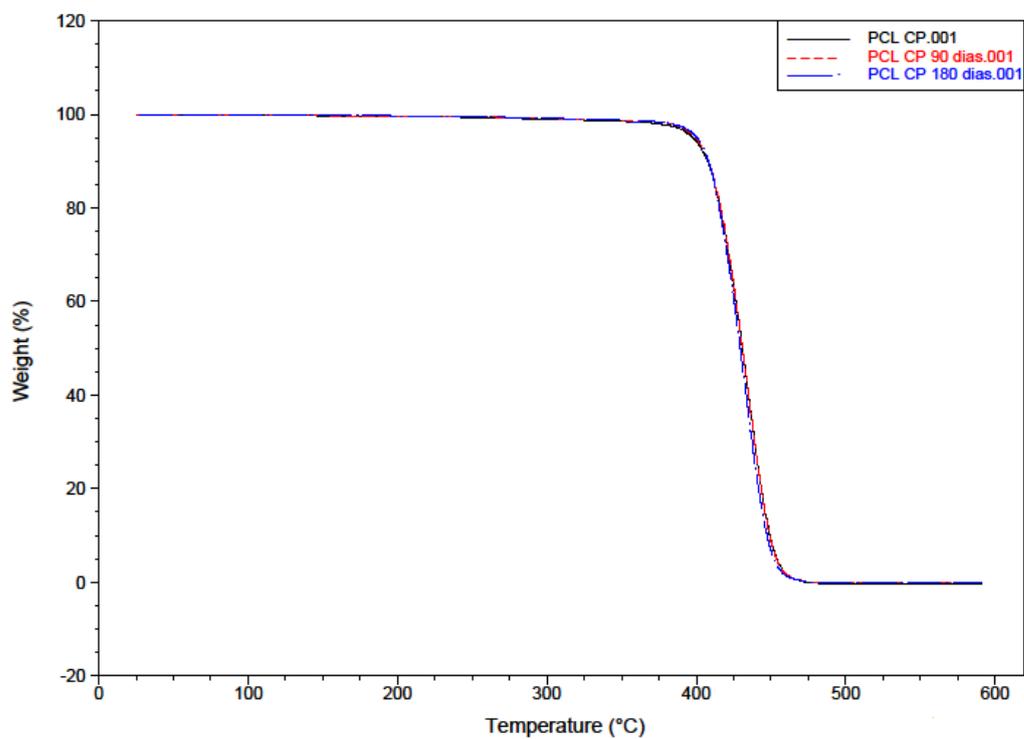
**Figura 4.25 – Curvas TG para o PHBV antes e após 90 e 180 dias em contato com a solução tampão fosfato**



**Figura 4.26 – Curvas TG para a blenda PHBV/PCL (75/25) antes e após 90 e 180 dias em contato com a solução tampão fosfato**



**Figura 4.27 – Curvas TG para a blenda PHBV/PCL (50/50) antes e após 90 e 180 dias em contato com a solução tampão fosfato**



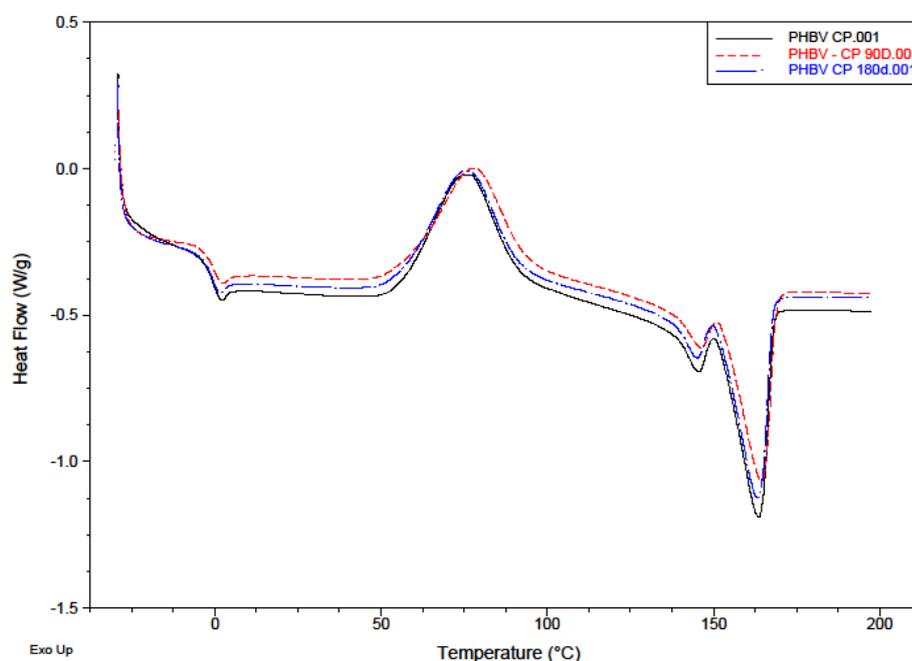
**Figura 4.28 – Curvas TG para o PCL antes e após 90 e 180 dias em contato com a solução tampão fosfato.**

#### 4.7.5 Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC

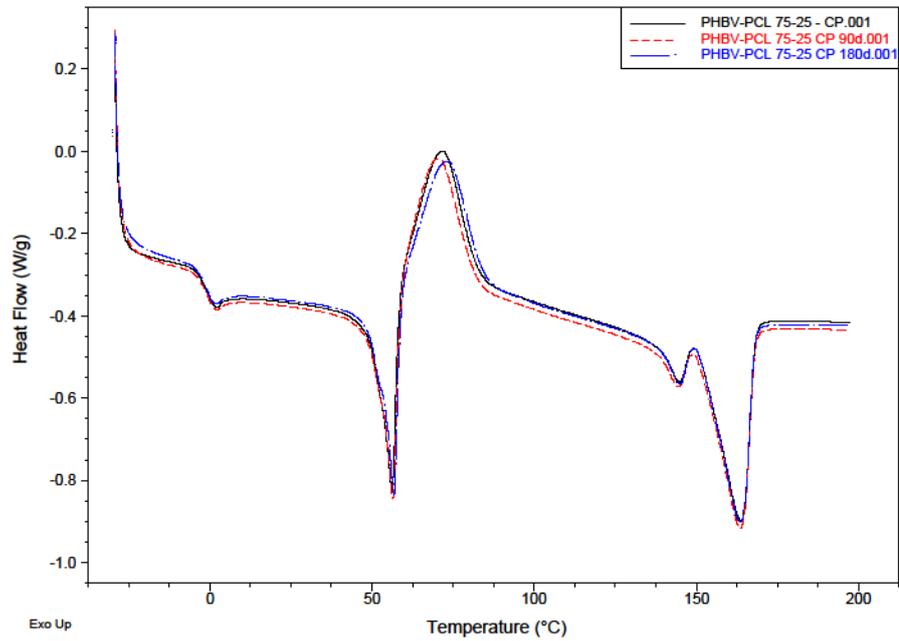
Parâmetros relacionados ao comportamento térmico de polímeros podem ser associados à sua morfologia e, desta forma a análise foi utilizada para constatar possíveis alterações morfológicas sofridas pelos polímeros submetidos ao teste de degradação *in vitro*.

As Figuras 4.29, 4.30, 4.31 e 4.32 mostram as curvas obtidas por DSC das amostras antes e após 90 e 180 dias em solução tampão. Na Tabela 4.12 é possível observar os valores de  $T_g$ ,  $T_c$ ,  $\Delta H_c$ ,  $T_m$ ,  $\Delta H_m$  e a porcentagem de cristalinidade do PHBV e do PCL nas amostras estudadas. As porcentagens de cristalinidade dos polímeros foram calculadas da mesma maneira descrita no item 4.3.2.

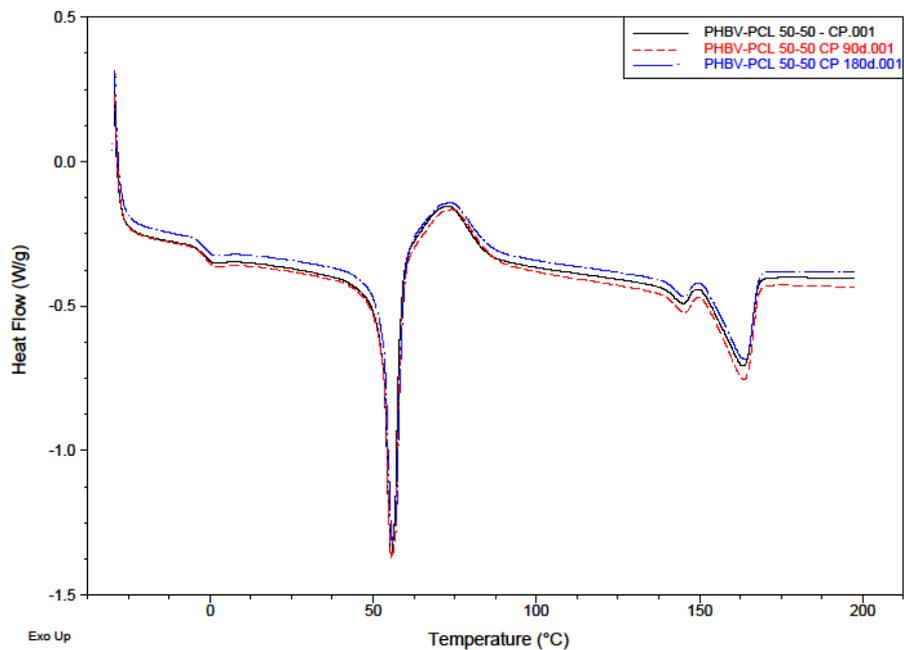
Os gráficos com as curvas individuais do resfriamento e do segundo aquecimento de cada material, antes e após 90 e 180 dias em contato com a solução salina, encontram-se no Anexo D.



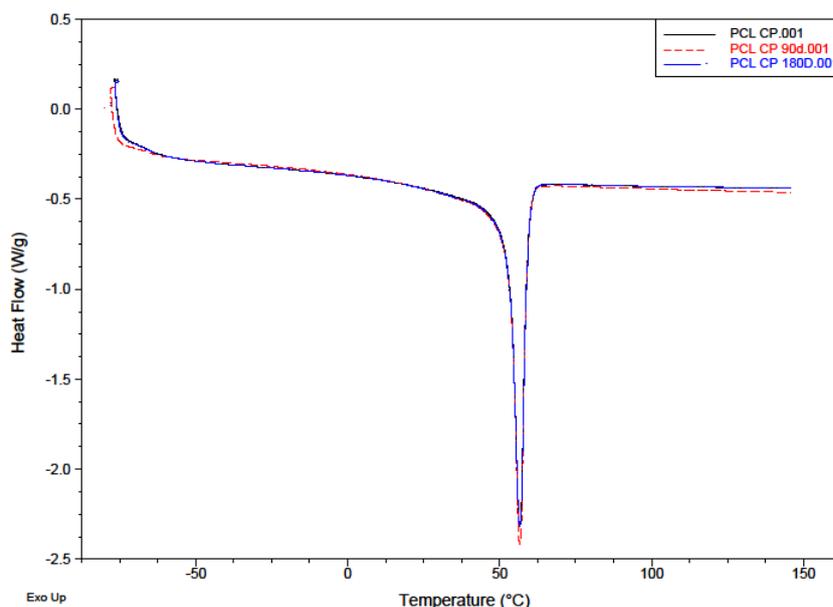
**Figura 4.29 – Curvas DSC para o PHBV antes e após 90 e 180 dias em contato com a solução salina**



**Figura 4.30 – Curvas DSC para a blenda PHBV/PCL (75/25) antes e após 90 e 180 dias em contato com a solução salina**



**Figura 4.31 – Curvas DSC para a blenda PHBV/PCL (50/50) antes e após 90 e 180 dias em contato com a solução salina**



**Figura 4.32 – Curvas DSC para o PCL antes e após 90 e 180 dias em contato com a solução salina**

Através dos resultados obtidos percebeu-se algumas variações nos resultados ao longo do tempo de degradação *in vitro*, porém não houve, para nenhum dos materiais estudados, alterações significativas nos valores da  $T_m$  no primeiro aquecimento. Analisando-se o segundo aquecimento também foi observado que os valores de  $T_m$  praticamente não se alteraram.

Em relação à  $T_g$  observou-se uma redução mínima nos valores do polímero PHBV puro e do mesmo na blenda PHBV/PCL (75/25). Para a blenda PHBV/PCL (50/50) não foram observadas variações ao longo do tempo de degradação.

Para o polímero PHBV puro foi observado um pequeno aumento no valor da temperatura de cristalização ao comparar a amostra degradada por 90 dias com a amostra que não foi degradada. Porém a amostra que permaneceu 180 dias em contato com a solução apresentou valor de  $T_c$  igual à amostra não degradada. Para a blenda PHBV/PCL (75/25) observou-se que a  $T_c$  teve uma pequena redução para a amostra degradada por 90 dias e apresentou um aumento para a amostra degradada por 180 dias. Para a blenda PHBV/PCL (50/50) notou-se um pequeno aumento de  $T_c$  da amostra não degradada para

a amostra de 90 dias, sem alteração posterior para a amostra degradada por 180 dias.

**Tabela 4.12 – Valores de  $T_g$ ,  $T_c$ ,  $\Delta H_c$ ,  $T_m$ ,  $\Delta H_m$  e Cristalinidade para o PHBV, PCL e suas blendas ao longo do tempo de degradação *in vitro* (a linha clara representa os valores do 1º Aquecimento e a escura do 2º Aquecimento)**

Materiais	PHBV						PCL		
	$T_g$ (°C)	$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)	%C	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)	%C
PHBV - CP	-	-	-	163,2	58,8	40,9	-	-	-
	-0,3	76,1	51,9	163,6	57,0	3,5	-	-	-
PHBV - CP - 90 dias	-	-	-	164,0	65,2	45,3	-	-	-
	-0,2	78,2	49,7	164,3	54,3	3,2	-	-	-
PHBV - CP - 180 dias	-	-	-	164,2	56,2	39,0	-	-	-
	-0,5	76,0	50,4	163,2	57,8	5,1	-	-	-
PHBV/PCL (75/25) - CP	-	-	-	162,3	30,8	28,9	59,7	20,9	59,2
	-0,4	72,7	17,6	163,7	40,9	21,8	56,2	23,0	65,1
PHBV/PCL (75/25) - CP - 90 dias	-	-	-	162,6	40,3	37,8	59,1	21,2	60,1
	-0,5	71,5	20,1	163,6	41,0	19,6	56,4	25,0	70,6
PHBV/PCL (75/25) - CP - 180 dias	-	-	-	164,0	46,5	43,6	60,3	21,1	59,7
	-0,8	74,1	24,6	163,6	39,0	13,6	56,8	20,5	58,0
PHBV/PCL (50/50) - CP	-	-	-	160,1	29,6	42,0	60,5	42,7	61,7
	-1,4	74,0	13,4	163,6	23,8	14,8	55,5	28,4	41,0
PHBV/PCL (50/50) - CP - 90 dias	-	-	-	162,4	24,6	34,8	61,9	43,9	63,4
	-1,3	75,2	14,1	163,7	25,6	16,3	55,6	34,8	50,2
PHBV/PCL (50/50) - CP - 180 dias	-	-	-	162,6	23,2	32,9	60,6	42,5	61,4
	-1,3	75,0	10,1	163,8	24,2	20,0	55,8	35,0	50,6
PCL - CP	-	-	-	-	-	-	56,5	55,1	41,1
	-	-	-	-	-	-	56,6	55,2	41,2
PCL - CP - 90 dias	-	-	-	-	-	-	56,6	60,4	45,0
	-	-	-	-	-	-	56,6	55,1	41,1
PCL - CP - 180 dias	-	-	-	-	-	-	56,6	58,5	43,7
	-	-	-	-	-	-	56,6	56,3	42,0

\* grau ou índice de cristalinidade dos polímeros puros ou dos polímeros nas blendas (normalizados pelos teores experimentais de PHBV e PCL nas blendas poliméricas).

Segundo a literatura pode ocorrer um aumento na cristalinidade dos materiais biorreabsorvíveis semicristalinos durante o processo de degradação hidrolítica [41, 62]. Para o PHBV puro foi observado comportamentos diferentes entre o primeiro e o segundo aquecimento, sendo que no 1º aquecimento a porcentagem de cristalinidade da amostra degradada por 90 dias apresentou

um aumento em relação à amostra não degradada, porém a amostra degradada por 180 dias apresentou um valor de %C inferior ao valor da amostra não degradada. No segundo aquecimento ocorreu o inverso, a amostra degradada por 90 dias apresentou valor menor do que a amostra não degradada, enquanto que a amostra de 180 dias apresentou um aumento. Para as blendas também foram observados resultados inversos, a blenda PHBV/PCL (75/25) apresentou um aumento no valor de %C no primeiro aquecimento e uma redução de %C no segundo aquecimento. Ao contrário da blenda 75/25 a blenda PHBV/PCL (50/50) apresentou uma redução no valor de %C no primeiro aquecimento e um aumento de %C no segundo aquecimento. Para o PCL puro observou-se que não houve alteração no valor de %C ao longo de 180 dias de degradação, sendo este resultado semelhante ao que foi relatado por Barbanti [62].

Os resultados obtidos indicam que a cinética de cristalização das blendas muda conforme se altera as porcentagens dos polímeros puros na mistura. Em relação ao tempo de degradação hidrolítica, nota-se que ocorre uma mudança na cinética após 90 dias em contato com a solução salina.

Mais uma vez vale a pena ressaltar que para a realização das análises térmicas (TG e DSC) nas amostras submetidas ao teste de degradação hidrolítica, foram utilizados pequenos pedaços ( $\pm 8$ mg) dos corpos de prova, e, como a degradação provavelmente não ocorre de forma homogênea no corpo de prova, não é possível avaliar a degradação somente através destas análises térmicas.

#### **4.7.6 Ensaio Mecânico de Tração**

O comportamento mecânico de materiais poliméricos é significativamente influenciado pela massa molar média, distribuição de massa molar, bem como pela morfologia do material. Assim sendo, ensaios mecânicos têm sido empregados para avaliação indireta da degradação sofrida por materiais poliméricos [26].

Neste estudo foram empregados os diagramas tensão de tração x deformação sob tração para verificar possíveis alterações no comportamento mecânico das amostras submetidas ao teste de degradação *in vitro*.

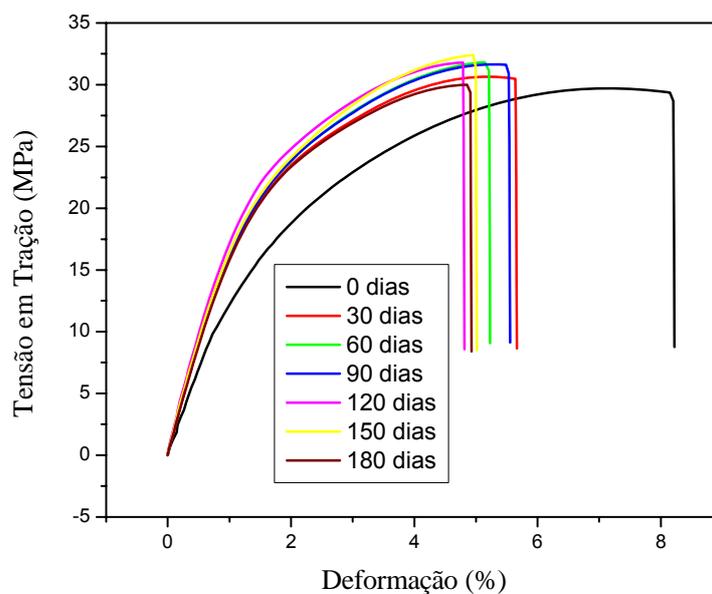
Após os corpos de prova serem removidos da solução salina e secados, foram submetidos ao ensaio mecânico de tração e os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 4.13, 4.14, 4.15 e 4.16. As Figuras 4.33, 4.34, 4.35 e 4.36 mostram as curvas de tensão de tração em função da deformação para os materiais PHBV, PHBV/PCL (75/25), PHBV/PCL (50/50) e PCL, respectivamente, através de uma curva representativa de cada tempo de experimento do teste de degradação *in vitro*.

Através dos resultados obtidos pode-se observar que ao comparar os valores obtidos de Módulo de Elasticidade em Tração dos polímeros estudados e de suas blendas, antes e após contato com a solução salina, verifica-se um aumento no Módulo de Elasticidade em tração ao longo do tempo. Observa-se também que houve um aumento na tensão na ruptura em tração para o PHBV puro e para as blendas. Na análise do PCL nota-se que os valores praticamente não se alteraram. Em relação à deformação na ruptura houve uma diminuição nos valores, no caso do PHBV chegando a uma redução de 44% nas amostras degradadas por 180 dias.

Os resultados obtidos são coerentes com os resultados fornecidos por SEC, sendo que conforme ocorre à diminuição das massas molares o polímero PHBV se torna mais rígido, aumentando assim os valores de módulo e da tensão na ruptura e diminuindo o valor de deformação.

**Tabela 4.13 – Valores de  $\sigma_e$ ,  $\epsilon_e$ , E,  $\sigma_r$  e  $\epsilon_r$  para o PHBV sob tração, antes e após o contato com a solução salina**

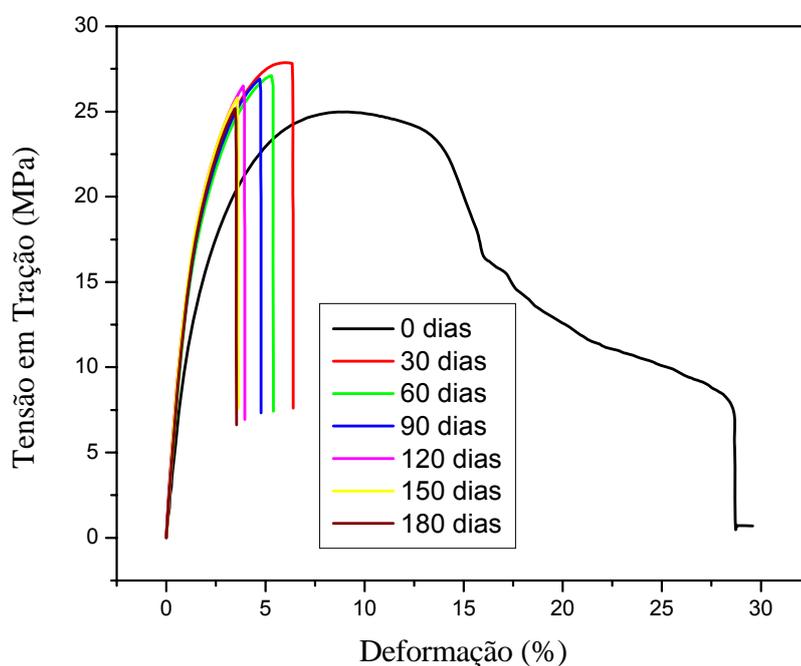
Material	Tensão no escoamento (Mpa)	Deformação no escoamento (%)	Módulo de Elasticidade (Gpa)	Tensão na ruptura em tração (MPa)	Deformação na ruptura em tração (%)
PHBV - 0 dias	29,7 ± 1,0	6,9 ± 0,3	1,2 ± 0,1	29,1 ± 1,1	7,9 ± 0,7
PHBV - 30 dias	31,1 ± 0,6	5,1 ± 0,5	1,7 ± 0,1	31,0 ± 0,6	5,3 ± 0,7
PHBV - 60 dias	31,5 ± 0,7	5,1 ± 0,5	1,7 ± 0,0	31,1 ± 0,9	5,2 ± 0,6
PHBV - 90 dias	31,5 ± 0,7	5,2 ± 0,3	1,7 ± 0,1	31,4 ± 0,7	5,2 ± 0,4
PHBV - 120 dias	31,9 ± 0,7	4,8 ± 0,4	1,8 ± 0,1	31,8 ± 0,7	4,8 ± 0,5
PHBV - 150 dias	32,2 ± 0,4	4,8 ± 0,3	1,7 ± 0,0	32,1 ± 0,4	4,9 ± 0,5
PHBV - 180 dias	29,8 ± 1,5	4,5 ± 0,7	1,7 ± 0,1	29,7 ± 1,5	4,4 ± 0,7



**Figura 4.33 – Curvas Tensão em Tração em função da Deformação para PHBV puro antes e após diferentes tempos em contato com a solução salina**

**Tabela 4.14 – Valores de  $\sigma_e$ ,  $\epsilon_e$ , E,  $\sigma_r$  e  $\epsilon_r$  para o PHBV/PCL (75/25) sob tração antes e após o contato com a solução salina**

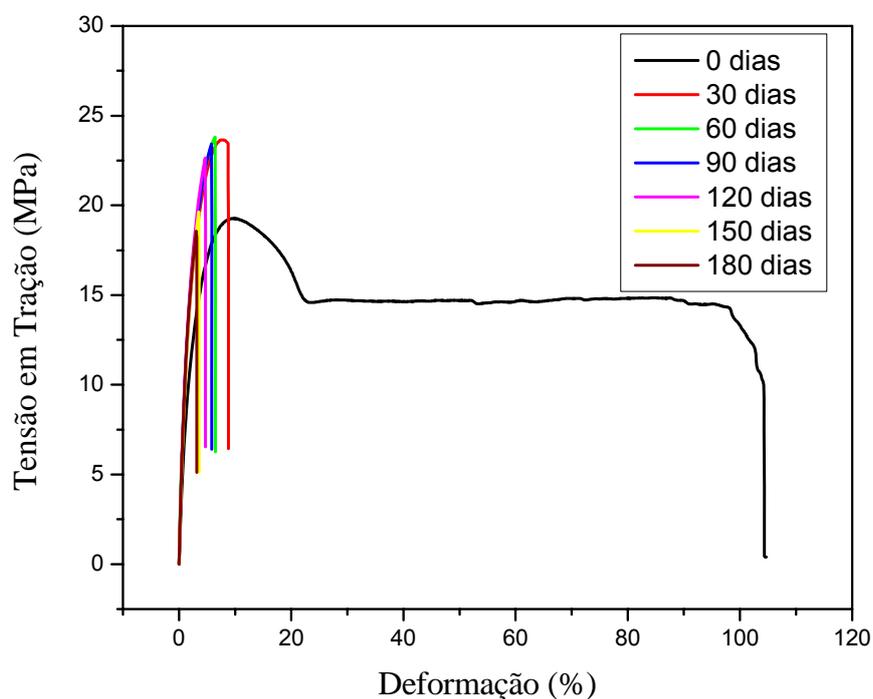
Materiais	Tensão no escoamento (Mpa)	Deformação no escoamento (%)	Módulo de Elasticidade (GPa)	Tensão na ruptura em tração (MPa)	Deformação na ruptura em tração (%)
PHBV/PCL (75/25) - 0 dias	25,0 ± 1,0	9,0 ± 0,4	0,9 ± 0,1	11,7 ± 6,6	28,3 ± 17,3
PHBV/PCL (75/25) - 30 dias	27,8 ± 0,5	5,8 ± 0,4	1,4 ± 0,0	27,7 ± 0,6	5,9 ± 0,6
PHBV/PCL (75/25) - 60 dias	27,1 ± 1,0	5,2 ± 0,6	1,4 ± 0,1	27,1 ± 1,0	5,1 ± 0,6
PHBV/PCL (75/25) - 90 dias	26,9 ± 0,3	4,7 ± 0,5	1,4 ± 0,1	26,8 ± 0,3	4,6 ± 0,4
PHBV/PCL (75/25) - 120 dias	26,8 ± 0,5	3,9 ± 0,3	1,5 ± 0,0	26,7 ± 0,5	3,9 ± 0,3
PHBV/PCL (75/25) - 150 dias	25,2 ± 0,9	3,5 ± 0,2	1,5 ± 0,1	25,1 ± 0,9	3,4 ± 0,2
PHBV/PCL (75/25) - 180 dias	25,4 ± 0,8	3,5 ± 0,3	1,6 ± 0,1	25,3 ± 0,8	3,4 ± 0,3



**Figura 4.34 – Curvas Tensão em Tração em função da Deformação para a blenda PHBV/PCL (75/25) antes e após diferentes tempos em contato com a solução salina**

**Tabela 4.15 – Valores de  $\sigma_e$ ,  $\epsilon_e$ , E,  $\sigma_r$  e  $\epsilon_r$  para o PHBV/PCL (50/50) sob tração antes e após o contato com a solução salina.**

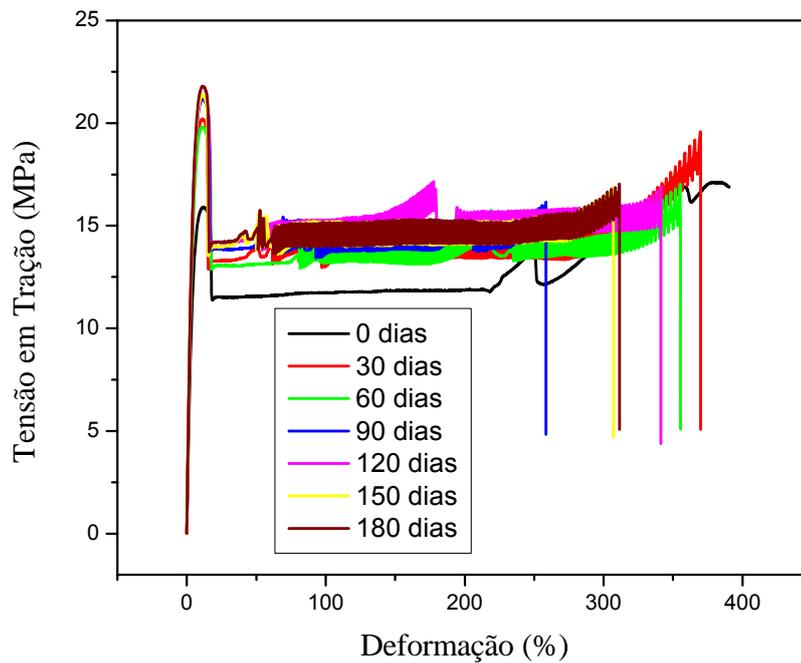
<b>Materiais</b>	<b>Tensão no escoamento (MPa)</b>	<b>Deformação no escoamento (%)</b>	<b>Módulo de Elasticidade (GPa)</b>	<b>Tensão na ruptura em tração (MPa)</b>	<b>Deformação na ruptura em tração (%)</b>
PHBV/PCL (50/50) - 0 dias	20,1 ± 0,7	9,6 ± 0,5	0,6 ± 0,1	15,8 ± 2,8	62,1 ± 38,1
PHBV/PCL (50/50) - 30 dias	23,8 ± 0,5	7,6 ± 0,6	0,8 ± 0,0	23,7 ± 0,5	8,1 ± 1,1
PHBV/PCL (50/50) - 60 dias	23,5 ± 0,5	6,3 ± 0,5	0,9 ± 0,0	23,4 ± 0,5	6,1 ± 0,4
PHBV/PCL (50/50) - 90 dias	22,7 ± 0,8	5,4 ± 0,6	1,0 ± 0,0	22,6 ± 0,8	5,4 ± 0,5
PHBV/PCL (50/50) - 120 dias	22,4 ± 1,8	4,6 ± 0,9	1,0 ± 0,1	22,3 ± 1,8	4,6 ± 0,9
PHBV/PCL (50/50) - 150 dias	19,5 ± 1,0	3,5 ± 0,4	1,1 ± 0,0	19,4 ± 1,1	3,5 ± 0,5
PHBV/PCL (50/50) - 180 dias	18,5 ± 0,7	3,2 ± 0,3	1,1 ± 0,0	18,4 ± 0,6	3,2 ± 0,3



**Figura 4.35 – Curvas Tensão em Tração em função da Deformação para a blenda PHBV/PCL (50/50) antes e após diferentes tempos em contato com a solução salina**

**Tabela 4.16 – Valores de  $\sigma_e$ ,  $\epsilon_e$ , E,  $\sigma_r$  e  $\epsilon_r$  para o PCL sob tração antes e após o contato com a solução salina**

Materiais	Tensão no escoamento (MPa)	Deformação no escoamento (%)	Módulo de Elasticidade (GPa)	Tensão na ruptura em tração (MPa)	Deformação na ruptura em tração (%)
PCL - 0 dias	17,3 ± 0,2	384,2 ± 4,8	0,3 ± 0,0	17,2 ± 0,2	386,5 ± 4,2
PCL - 30 dias	20,0 ± 0,1	11,2 ± 0,2	0,4 ± 0,0	17,3 ± 1,5	366,1 ± 16,3
PCL - 60 dias	20,1 ± 0,2	11,2 ± 0,3	0,4 ± 0,0	16,8 ± 1,5	364,4 ± 29,8
PCL - 90 dias	21,0 ± 0,4	11,2 ± 0,4	0,4 ± 0,0	15,9 ± 0,3	230,8 ± 70,4
PCL - 120 dias	21,2 ± 0,1	11,2 ± 0,2	0,5 ± 0,0	17,2 ± 1,2	296,5 ± 87,6
PCL - 150 dias	21,5 ± 0,1	11,5 ± 0,2	0,5 ± 0,0	16,4 ± 0,4	300,6 ± 10,9
PCL - 180 dias	21,7 ± 0,1	11,5 ± 0,2	0,5 ± 0,0	16,3 ± 0,7	289,6 ± 74,6



**Figura 4.36 – Curvas Tensão em Tração em função da Deformação para a PCL ao antes e após diferentes tempos em contato com a solução salina**

#### 4.7.7 Análise de Microscopia Ótica

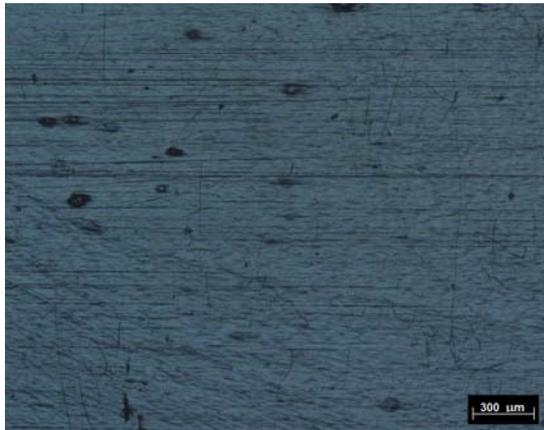
A análise de microscopia ótica foi realizada com o objetivo de pré-selecionar amostras para a realização da análise de microscopia eletrônica de varredura. Para isso a superfície de todos os corpos de prova após a remoção da solução salina, lavagem e secagem, foi analisada para comparação com a superfície dos corpos de prova injetados que não foram submetidos ao teste de degradação.

De uma maneira geral a superfície dos corpos de prova dos materiais estudados estavam semelhantes. Foi observado que todos os corpos de prova apresentavam riscos superficiais, provenientes do processo de injeção dos mesmos.

Nas Figuras 4.37, 4.38, 4.39 e 4.40, estão ilustradas algumas micrografias obtidas durante a realização da análise por microscopia ótica.

Em alguns dos corpos de prova foi notada a presença de algumas manchas com pontos brilhantes, provavelmente resíduos da solução utilizada no teste de degradação *in vitro*. Durante a realização da análise por MEV foi realizada uma análise de EDS, que confirmou a presença dos elementos de Na e K, provenientes da solução.

Não foi possível observar nenhum ponto de início de degradação, erosões ou micro-trincas, pela análise de microscopia ótica.



(a)



(b)



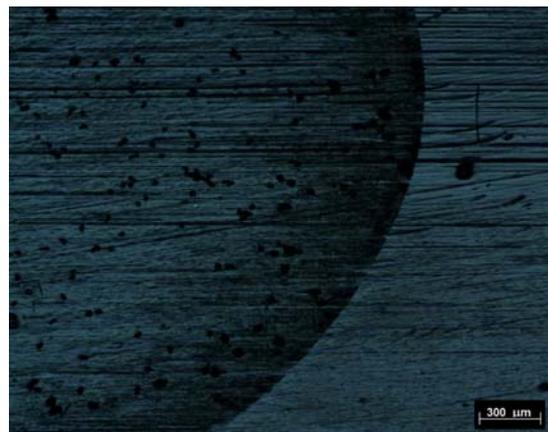
(c)



(d)

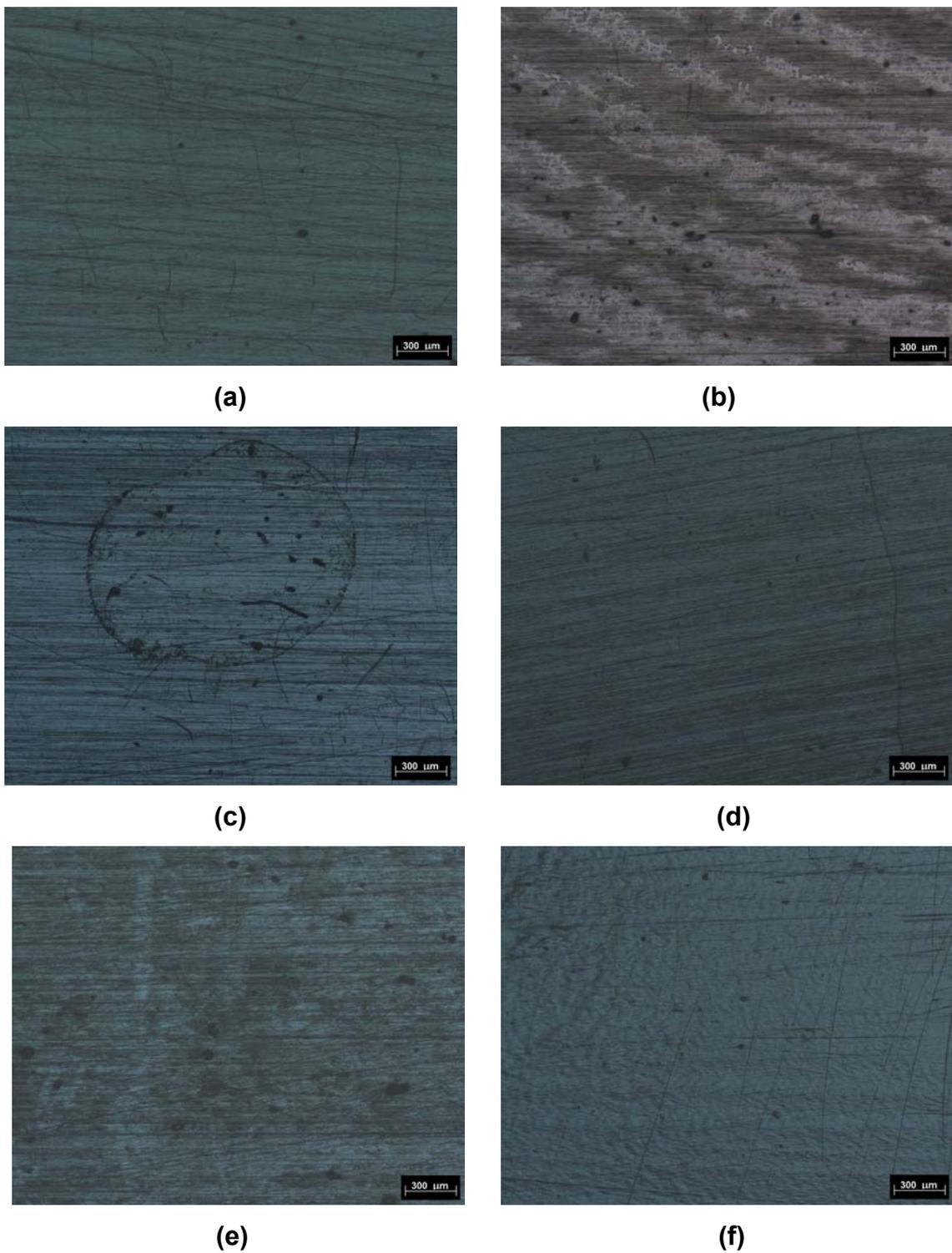


(e)

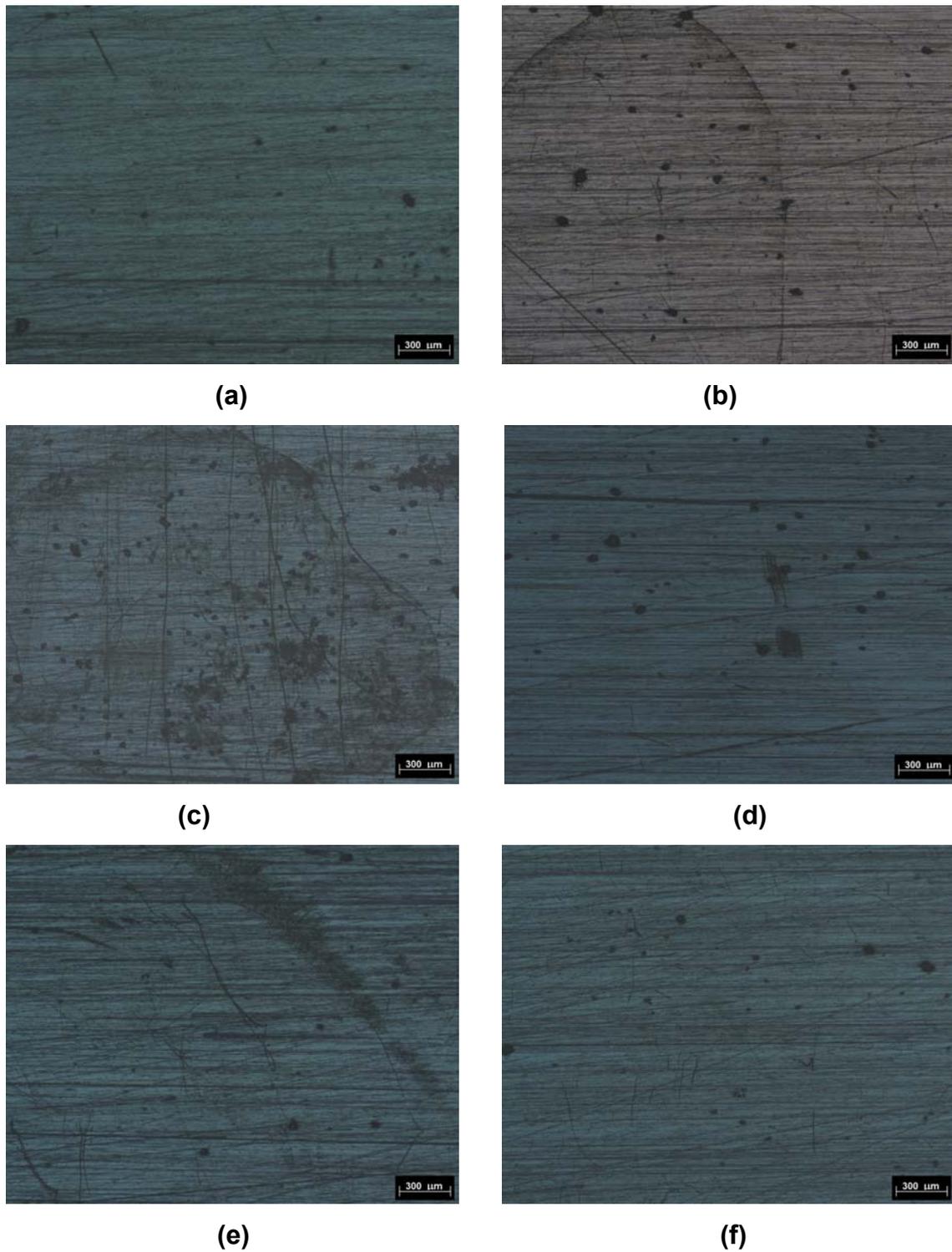


(f)

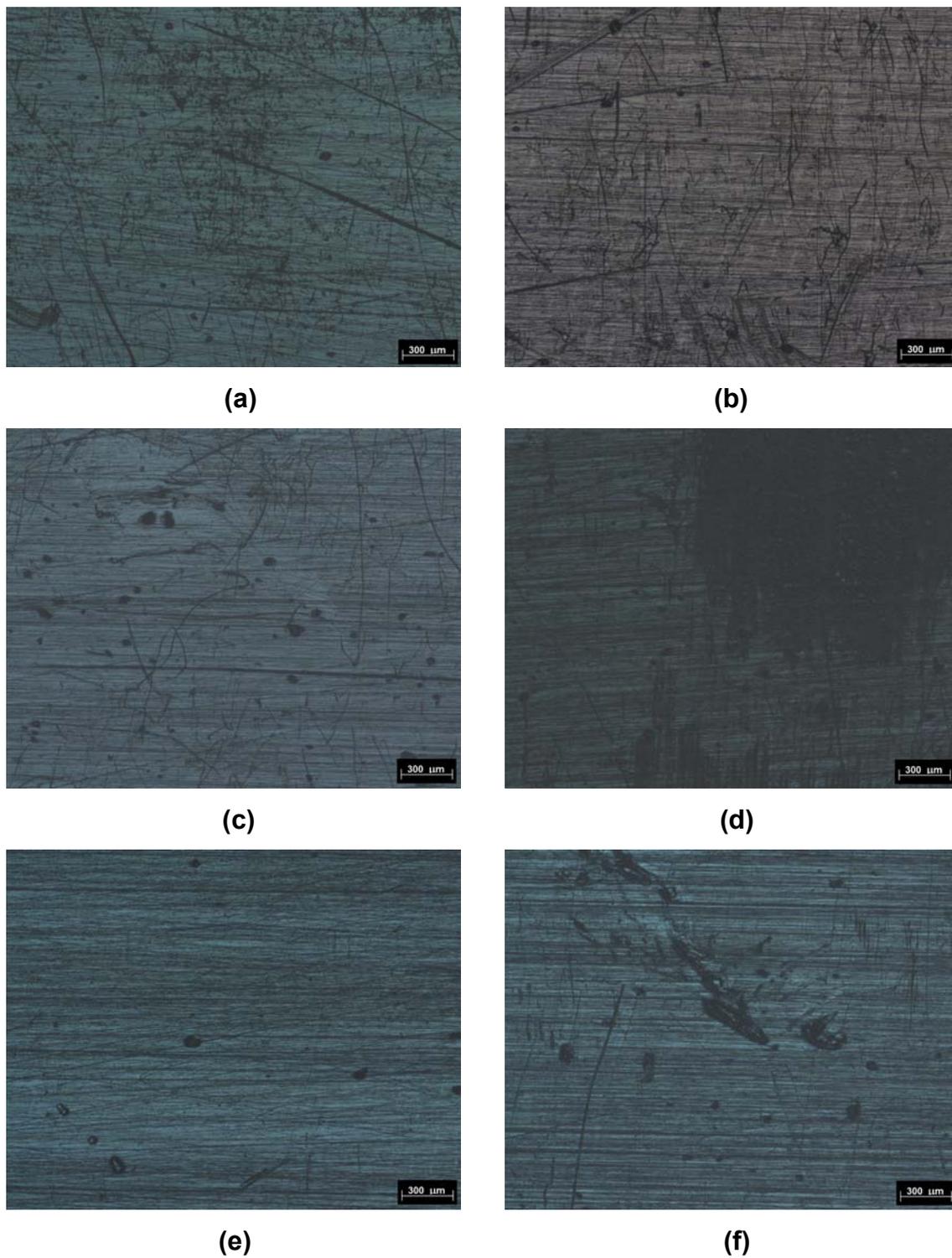
**Figura 4.37 – Micrografia ótica da superfície dos corpos de prova do PHBV (a) 0 dias (b) 60 dias (c) 90 dias (d) 120 dias (e) 150 dias e (f) 180 dias em contato com a solução tampão fosfato**



**Figura 4.38 – Micrografia ótica da superfície dos corpos de prova da blenda PHBV/PCL (75/25) (a) 0 dias (b) 60 dias (c) 90 dias (d) 120 dias (e) 150 dias e (f) 180 dias em contato com a solução tampão fosfato**



**Figura 4.39 – Micrografia ótica da superfície dos corpos de prova da blenda PHBV/PCL (50/50) (a) 0 dias (b) 60 dias (c) 90 dias (d) 120 dias (e) 150 dias e (f) 180 dias em contato com a solução tampão fosfato**



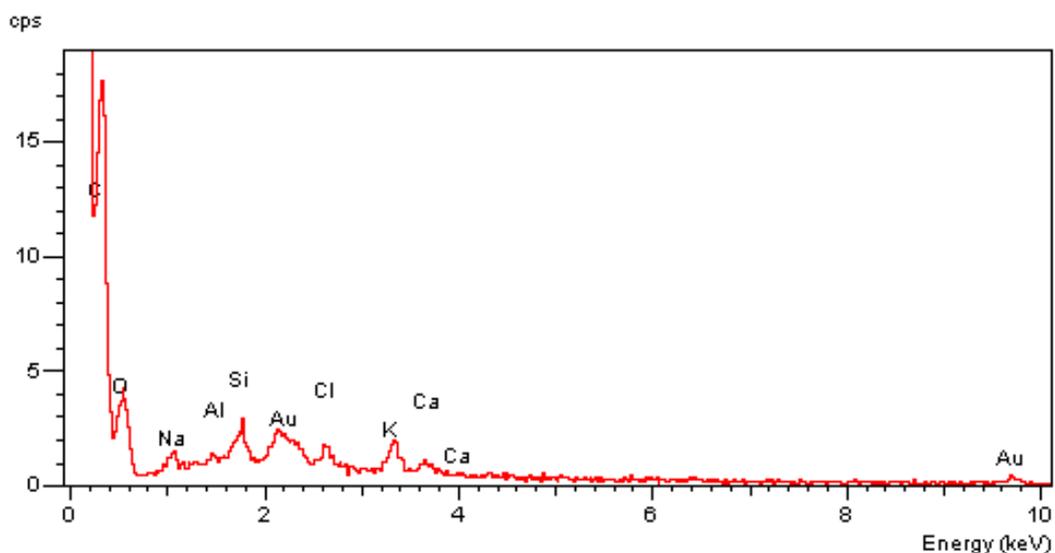
**Figura 4.40 – Micrografia ótica da superfície dos corpos de prova do PCL (a) 0 dias (b) 60 dias (c) 90 dias (d) 120 dias (e) 150 dias e (f) 180 dias em contato com a solução tampão fosfato**

#### 4.7.8 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

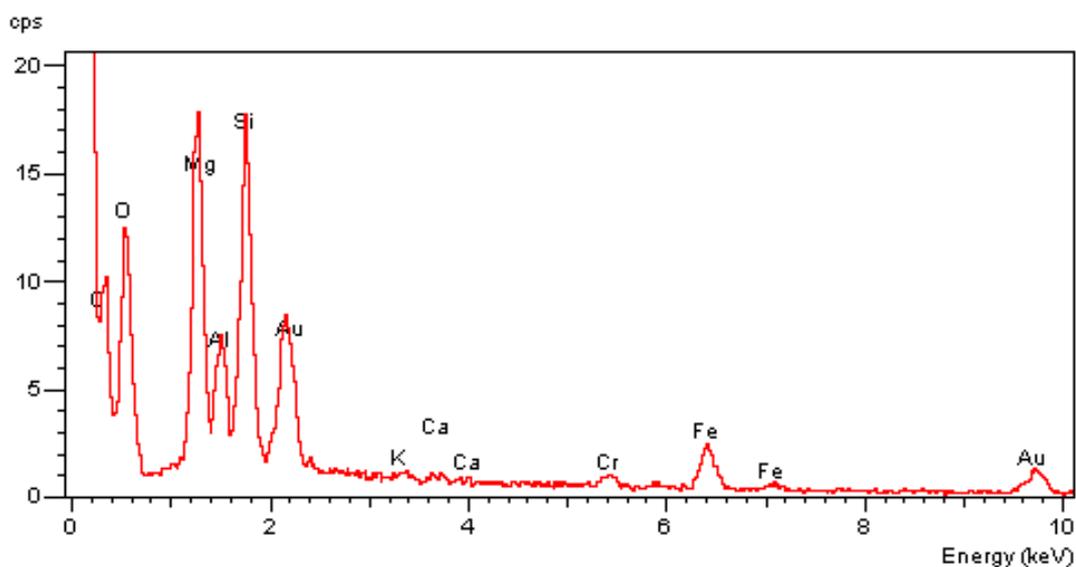
Análises da superfície dos corpos de prova dos materiais estudados foram realizadas por MEV. Foram analisadas amostras que não foram submetidas ao teste e aquelas que permaneceram 90 e 180 dias em contato com a solução salina. Foram também analisados alguns corpos de provas de outros períodos do ensaio de degradação *in vitro*, que foram pré-selecionados através da análise de microscopia ótica.

Durante a realização da análise de MEV foi também realizada análise por EDS (Espectroscopia por energia dispersiva de raios X) em um corpo de prova de cada material em estudo. As Figuras 4.41 e 4.42 mostram os gráficos obtidos para o polímero PHBV e para a blenda PHBV/PCL (75/25). Os resultados obtidos para a blenda PHBV/PCL (50/50) e o polímero PCL foram semelhantes ao da blenda PHBV/PCL (75/25).

Através dos gráficos ilustrados nas Figuras 4.41 e 4.42 nota-se a presença de Silício, proveniente do desmoldante utilizado durante o processo de injeção. Observa-se também a presença dos elementos potássio e sódio, que são provenientes da solução tampão fosfato utilizada durante o ensaio de degradação *in vitro*.



**Figura 4.41 – Resultado da análise de EDS para o PHBV**



**Figura 4.42 – Resultado da análise de EDS para a blenda PHBV/PCL (75/25)**

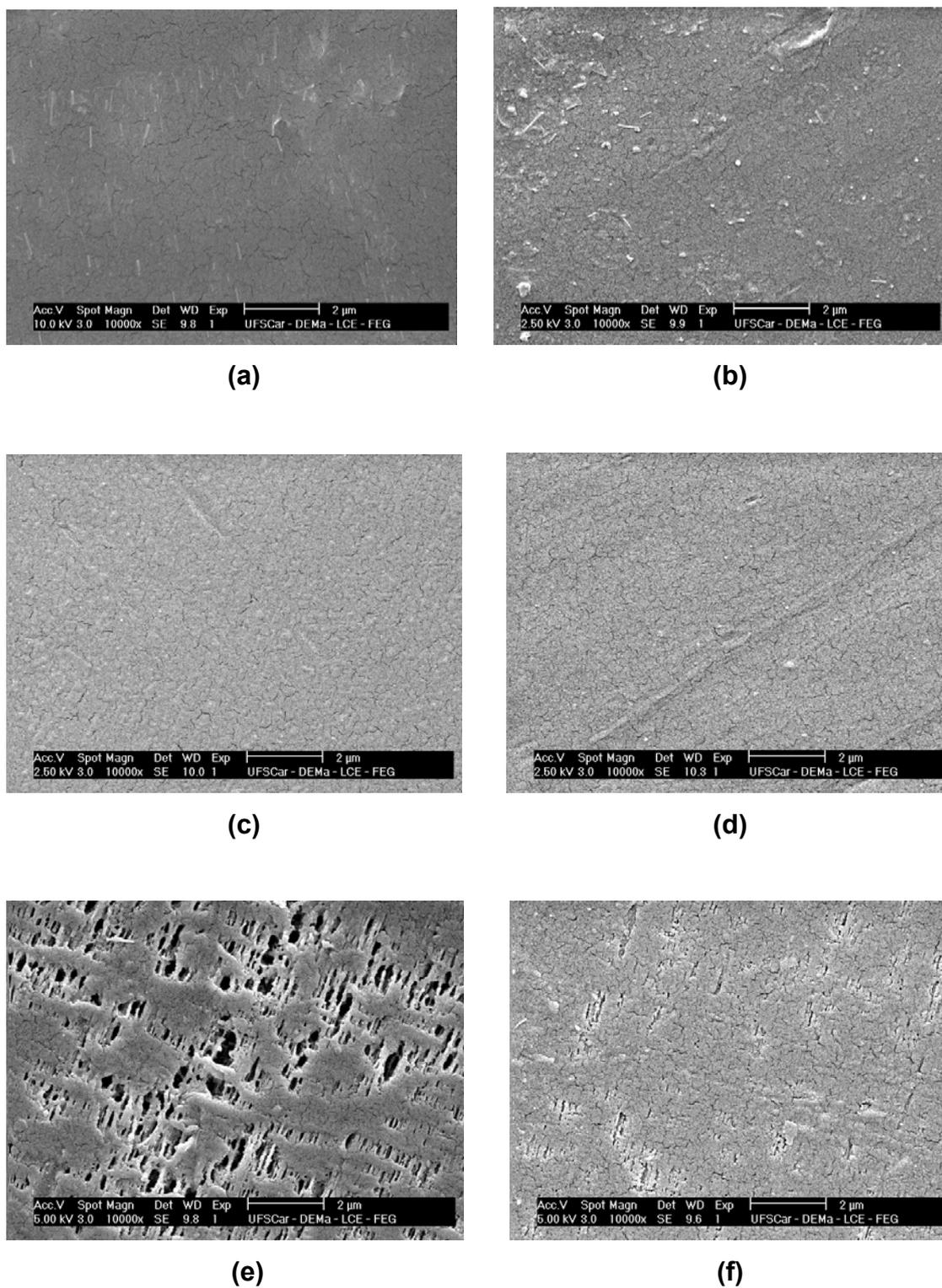
As Figuras 4.43, 4.44, 4.45 e 4.46 ilustram as micrografias obtidas através da análise por Microscopia Eletrônica de Varredura realizada na superfície dos corpos de prova para os materiais PHBV, PHBV/PCL (75/25), PHBV/PCL (50/50) e PCL, respectivamente.

Na Figura 4.43 pode-se observar alterações ao longo do tempo no caso do polímero PHBV puro. Comparando as amostras resultantes do tempo de seguimento 60 e 90 dias (Figura 4.43 (b) e (c)) com as que não foram submetidas ao teste (Figura 4.43 (a)) observa-se uma superfície com erosões, que se intensifica na amostra resultante do seguimento de 180 dias (Figura 4.43(f)). Observa-se na amostra de 150 dias (Figura 4.43 (e)) uma região bastante degradada.

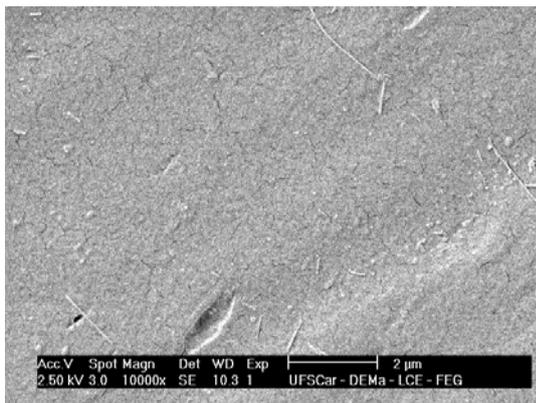
Na blenda PHBV/PCL (75/25) observou-se que a superfície da amostra resultante do tempo de seguimento 90 dias (Figura 4.44 (c)) apresenta mais erosões do que as amostras não submetidas ao teste (Figura 4.44 (a)) e resultante do tempo de seguimento 180 dias (Figura 4.44 (d)). Como a análise foi realizada somente em uma pequena amostra coletada de um dos corpos de prova de cada material estudado, pode-se concluir que a degradação não ocorreu de forma homogênea e, segundo Barbanti e colaboradores [62] o

mecanismo da degradação *in vitro* dos polímeros biorreabsorvíveis tem sido avaliado nos últimos anos e demonstra ser um processo heterogêneo ao longo da extensão superficial do material.

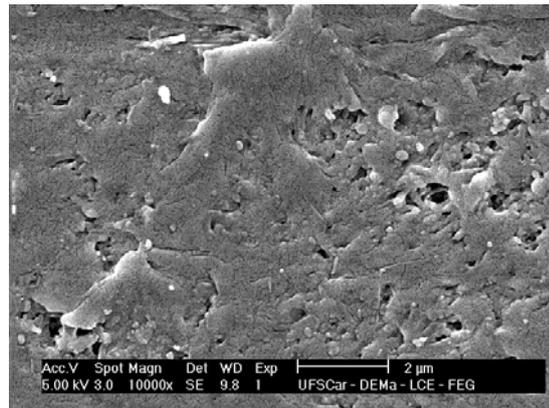
Através da morfologia da superfície da blenda PHBV/PCL (50/50) verificada por MEV e ilustrada nas Figuras 4.45 (a), (b) e (c), observa-se que não há muita diferença na superfície entre as amostras resultantes do tempo de seguimento 90 dias (Figura 4.45 (b)) e a amostra resultante do tempo de seguimento 180 dias (Figura 4.45 (c)). Esse comportamento foi semelhante ao observado nas amostras do polímero PCL puro, ilustrado nas Figuras 4.46 (a), (b) e (c).



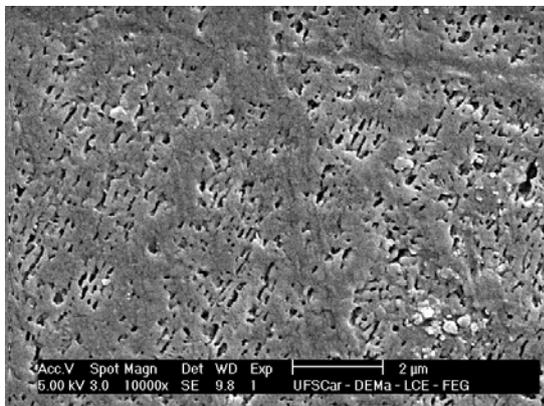
**Figura 4.43 – Micrografia (a) PHBV 0 dias (b) PHBV 60 dias (c) PHBV 90 dias (d) PHBV 120 dias (e) PHBV 150 dias (f) PHBV 180 dias em contato com solução tampão fosfato**



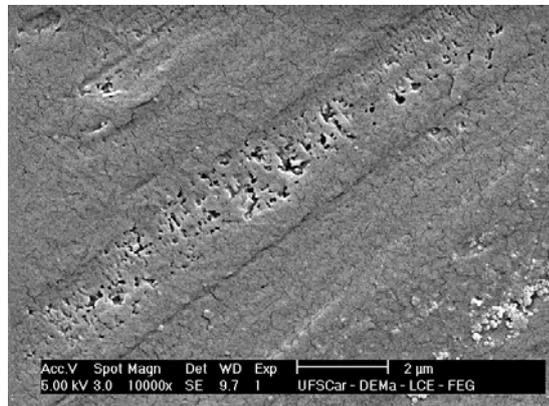
(a)



(b)

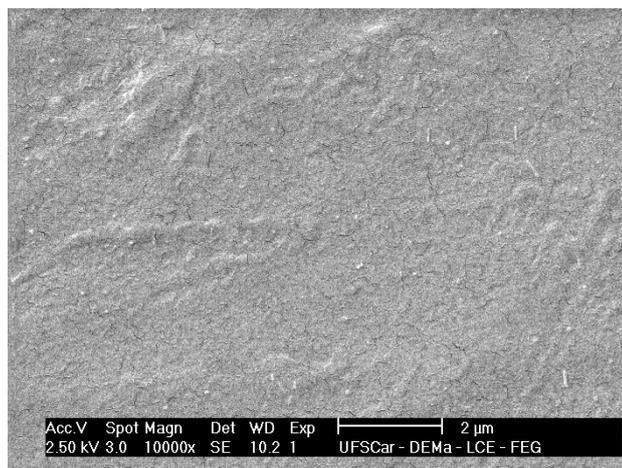


(c)

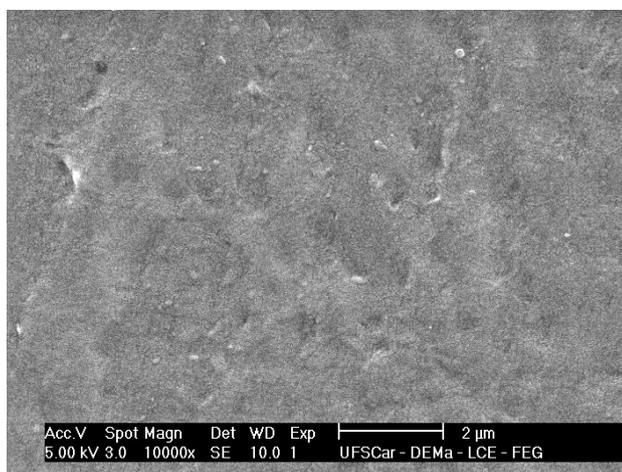


(d)

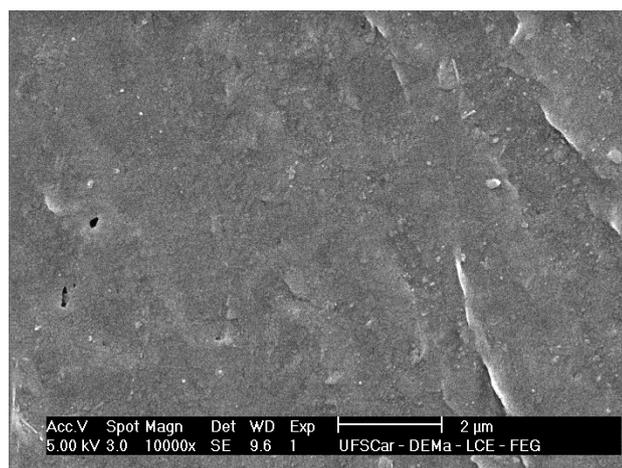
**Figura 4.44 – Micrografia (a) PHBV/PCL (75/25) 0 dias (b) PHBV/PCL (75/25) 60 dias (c) PHBV/PCL (75/25) 90 dias (d) PHBV/PCL (75/25) 180 dias em contato com solução tampão fosfato**



(a)

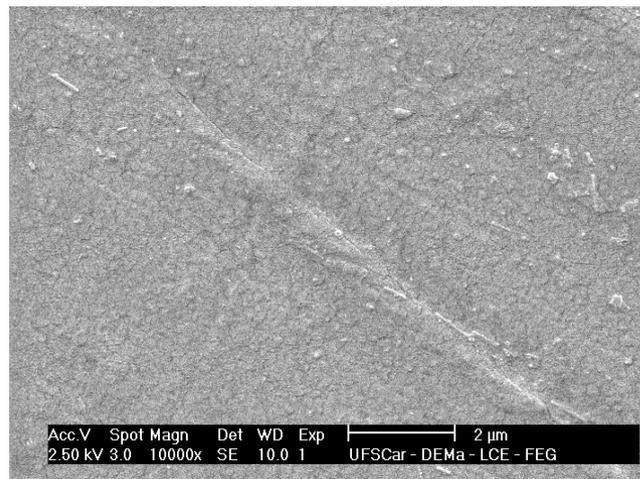


(b)

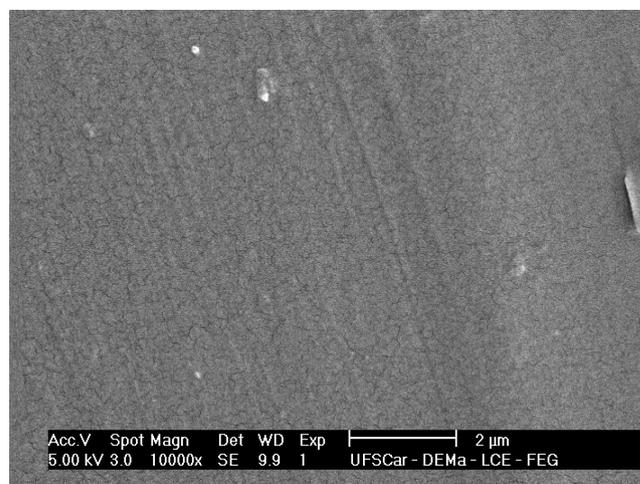


(c)

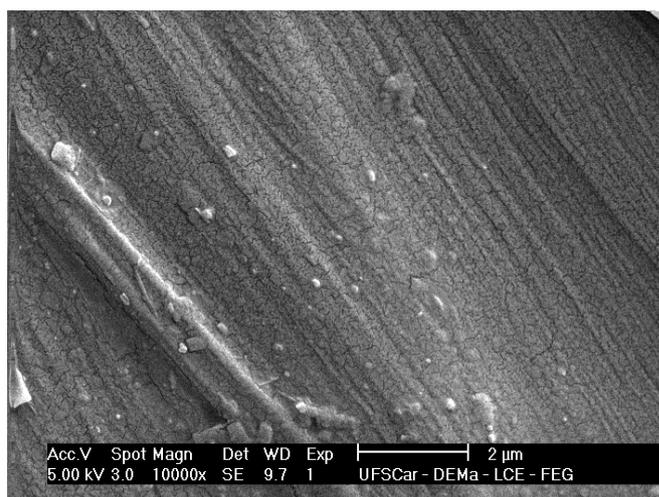
**Figura 4.45 – Micrografia (a) PHBV/PCL (50/50) 0 dias (b) PHBV/PCL (50/50) 90 dias (c) PHBV/PCL (50/50) 180 dias em contato com solução tampão fosfato**



(a)



(b)



(c)

**Figura 4.46 – Micrografia (a) PCL 0 dias (b) PCL 90 dias (c) PCL 180 dias em contato com solução tampão fosfato**

Assim foi possível confirmar as conclusões preliminares obtidas a partir dos resultados de alteração de massa e variação da massa molar média dos polímeros em estudo durante o teste de degradação *in vitro*. O PHBV apresentou degradação hidrolítica evidenciada pela alteração da morfologia superficial dos corpos de prova ao longo do tempo e cisão das cadeias no interior do polímero devido à migração de solução para o interior do polímero. O PCL aparentemente não sofreu alteração na morfologia superficial, embora tenha apresentado pequena redução nas massas dos corpos de prova no período de 180 dias. E as blendas destes polímeros sofreram degradação cujo comportamento variou em função da composição das blendas. O aumento da concentração do PCL na blenda aumentou a estabilidade à degradação hidrolítica da mesma.

#### **4.8 Conclusões parciais**

O teste de degradação *in vitro* permitiu concluir que:

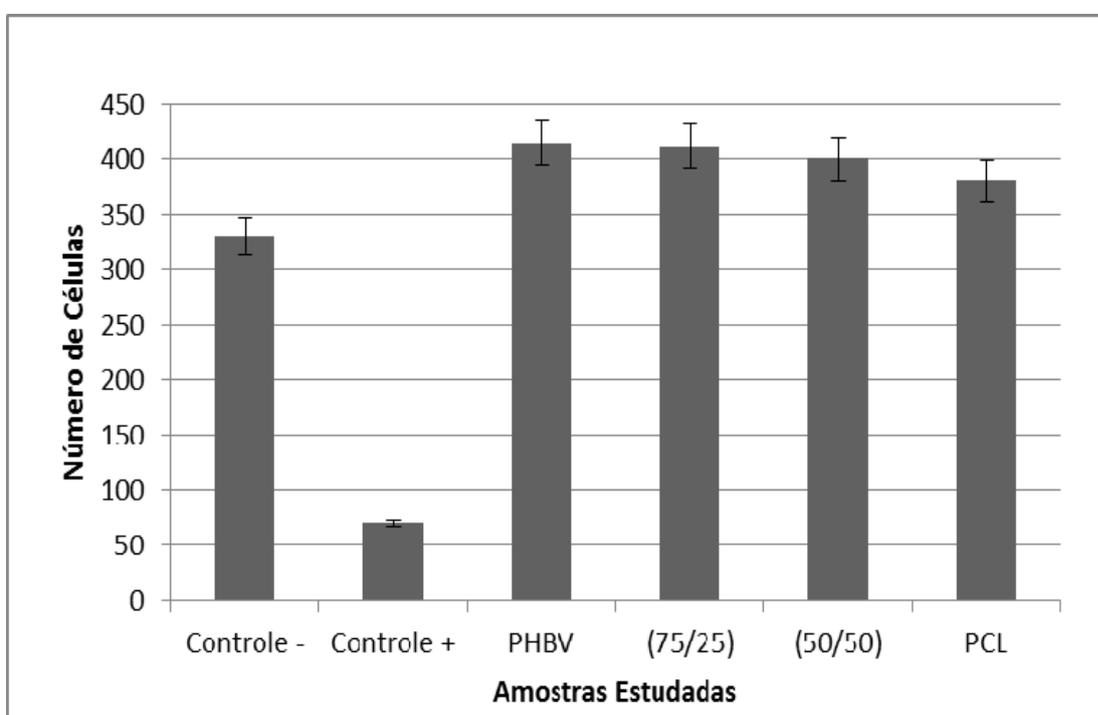
- O PHBV e o PCL sofreram degradação hidrolítica quando em contato com solução tampão fosfato a 37°C, implicando em alterações de suas propriedades mecânicas ao longo de 180 dias;
- Os resultados indicam uma provável diferença quanto ao mecanismo de degradação sofrida pelo PHBV e PCL.

#### **4.9 Citotoxicidade**

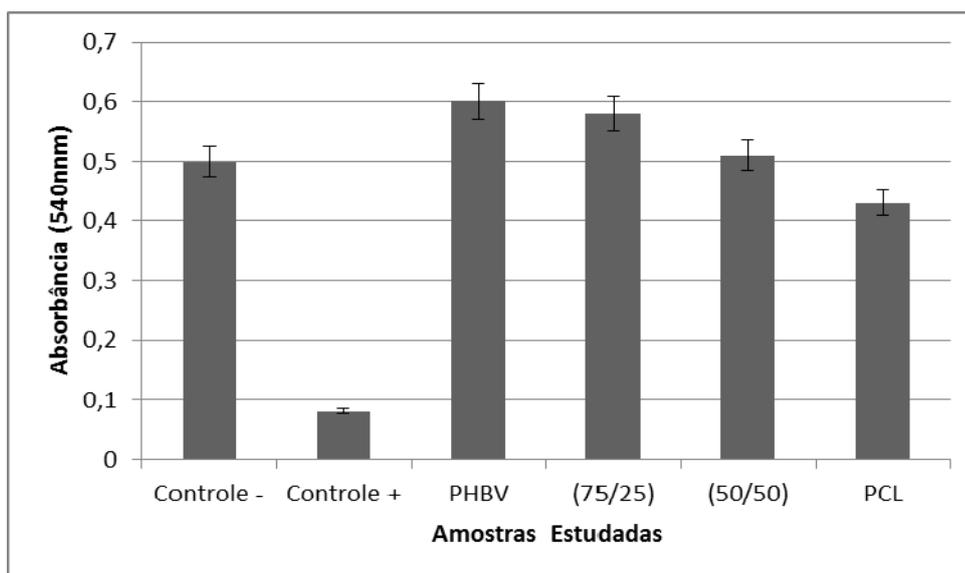
##### **4.9.1 Citotoxicidade Indireta**

Para *toxicidade indireta* foram analisados os materiais por dois procedimentos diferentes, a contagem direta e o ensaio pelo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo tetrazolium (MTT).

Na avaliação da *toxicidade indireta* por contagem direta dos polímeros puros PHBV e PCL e para as duas blends estudadas, foi observado que em contato com os extratos dos polímeros, a contagem de células foi semelhante estatisticamente a observada no controle negativo e bastante diferente do controle positivo (Figura 4.47). Assim, caracterizou-se que os polímeros estudados não apresentam toxicidade indireta. Resultados semelhantes foram obtidos pelo MTT que mostrou que os resultados referentes a todas as amostras eram estatisticamente diferentes do controle positivo (Figura 4.48).



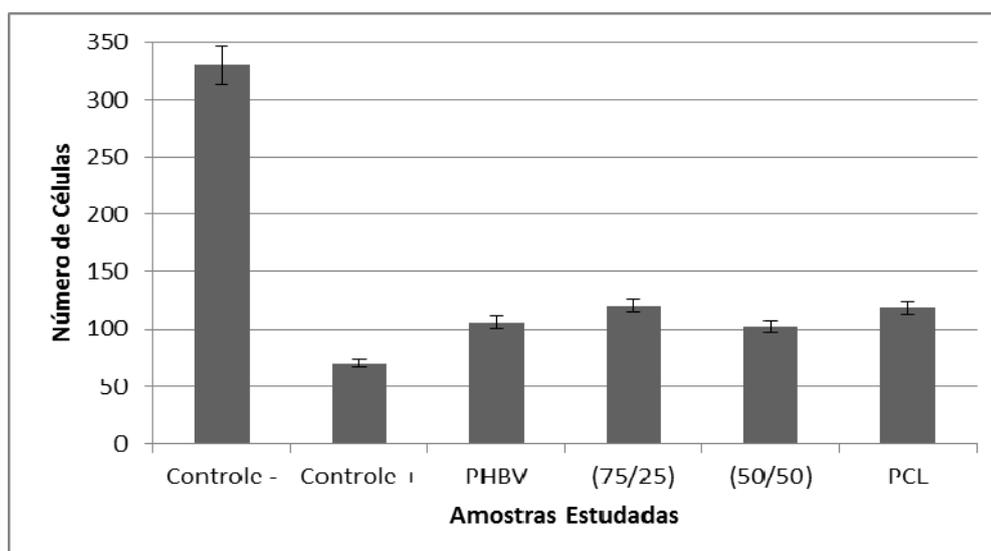
**Figura 4.47 – Toxicidade indireta dos polímeros avaliados por contagem direta (nível de significância de 0,01)**



**Figura 4.48 – Toxicidade indireta dos polímeros avaliados pelo MTT (nível de significância de 0,01)**

#### 4.9.2 Citotoxicidade Direta

Por outro lado, quando foi realizado o teste para *toxicidade direta*, os polímeros PHBV, PCL e as blends PHBV/PCL (75/25) e PHBV/PCL (50/50), mostraram resultados semelhantes ao controle positivo (Figura 4.49). Estes dados indicam toxicidade por contato com os polímeros testados.



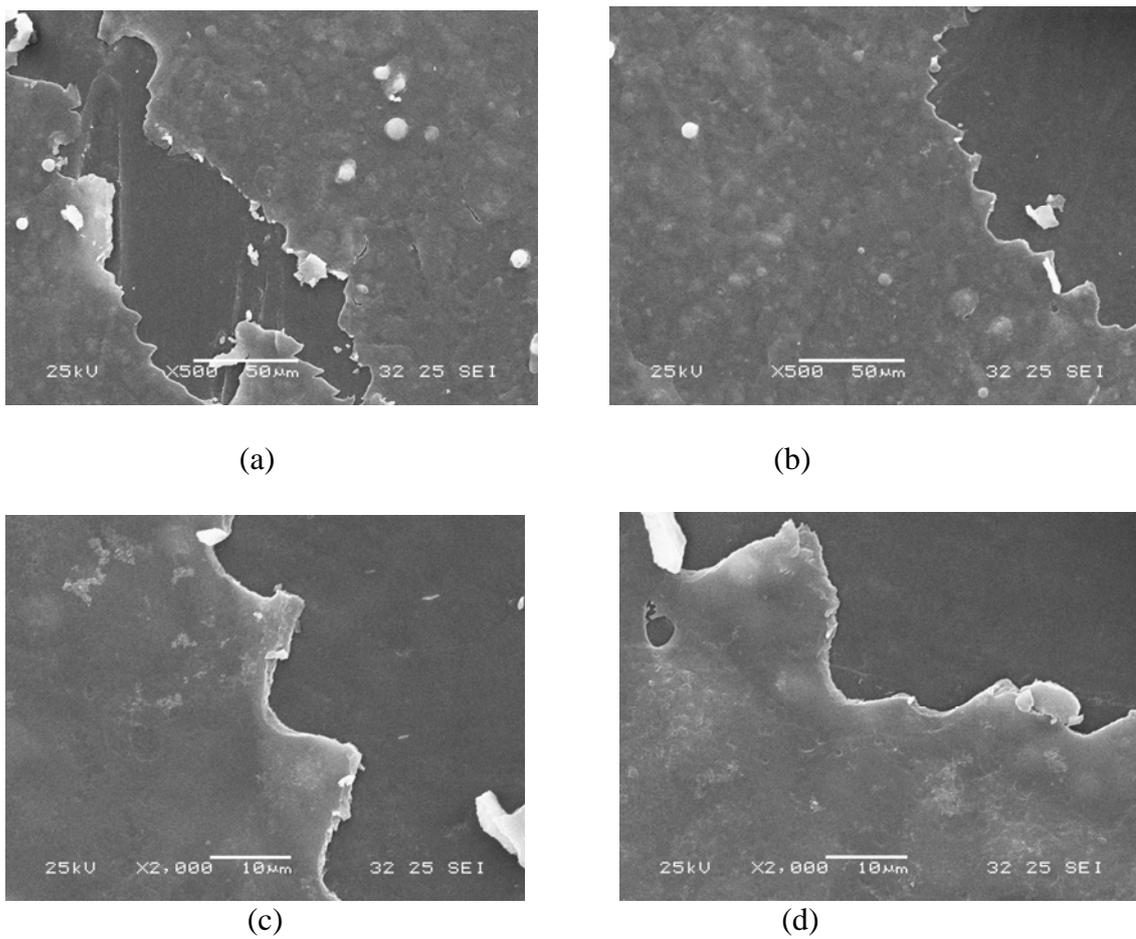
**Figura 4.49 – Toxicidade direta dos polímeros avaliados por contagem direta (nível de significância de 0,01)**

### **4.9.3 Investigação da adesão e morfologia das células Vero por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

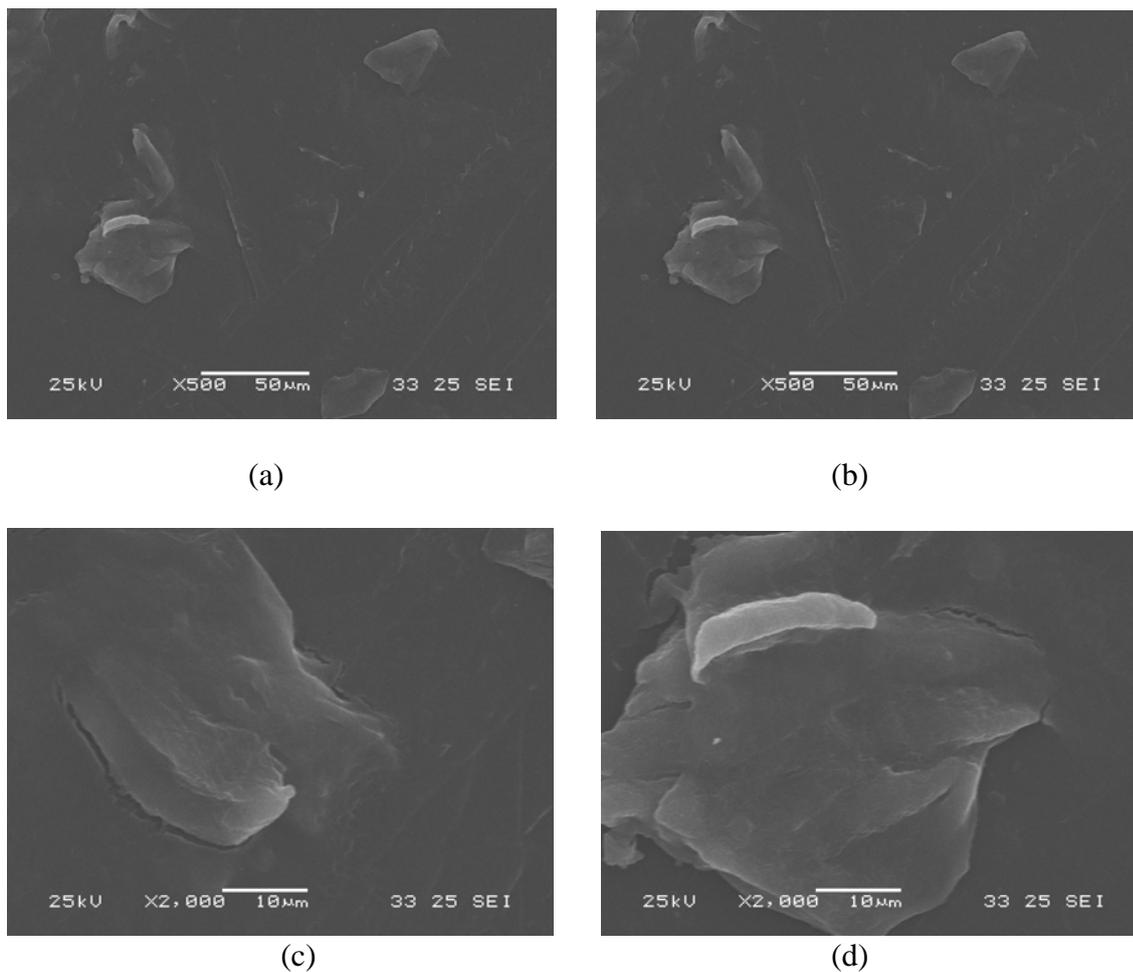
A partir das imagens obtidas por meio da MEV foi possível observar a adesão, morfologia e padrão de crescimento das células Vero sobre os materiais poliméricos.

As Figuras 4.50, 4.51, 4.52 e 4.53 apresentam as imagens de MEV dos materiais poliméricos onde é possível observar a adesão e espalhamento das células Vero sobre a superfície dos polímeros, PHBV e PCL, e nas blendas PHBV/PCL (75/25) e PHBV/PCL (50/50). Foi observado o mesmo aspecto fibroblastóide das células Vero sobre as blendas PHBV/PCL (75/25) e PHBV/PCL (50/50).

Sobre o PHBV (Figura 4.50) foram encontradas células bem achatadas e de morfologia irregular. Não foram observados prolongamentos citoplasmáticos, vesículas e/ou microvilosidades sobre as células. Os mesmos resultados se aplicam ao PCL (Figura 4.51). Por outro lado, alterações na morfologia celular puderam ser vistas nas células que cresceram sobre as blendas desses polímeros. Nas amostras de PHBV e PCL foram observadas poucas células aderidas e estas quando localizadas encontravam-se isoladas sem sinal de interação célula-célula.

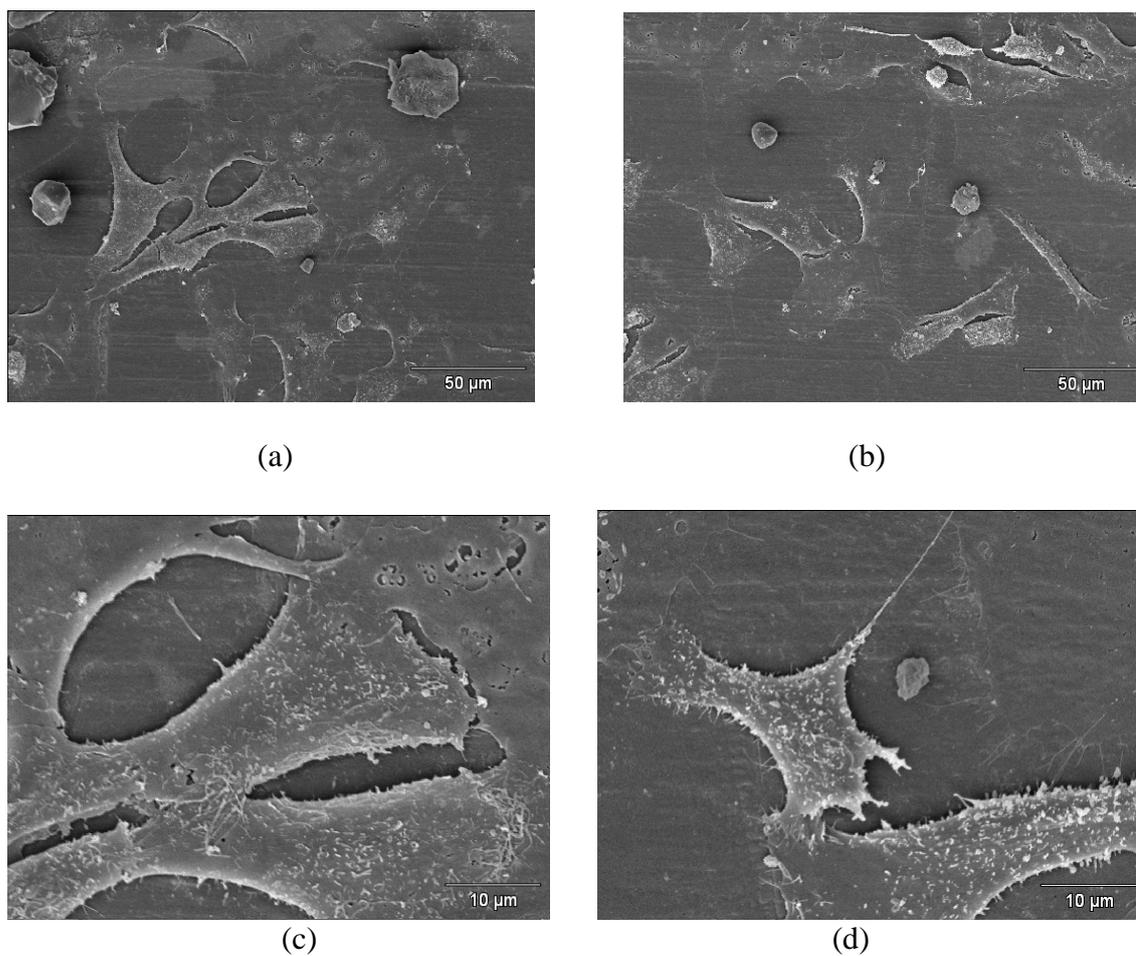


**Figura 4.50 – Microscopia Eletrônica de Varredura das células Vero cultivadas por 24 h sobre o PHBV, (a) e (b) aumento de 500x e (c) e (d) aumento de 2.000x**

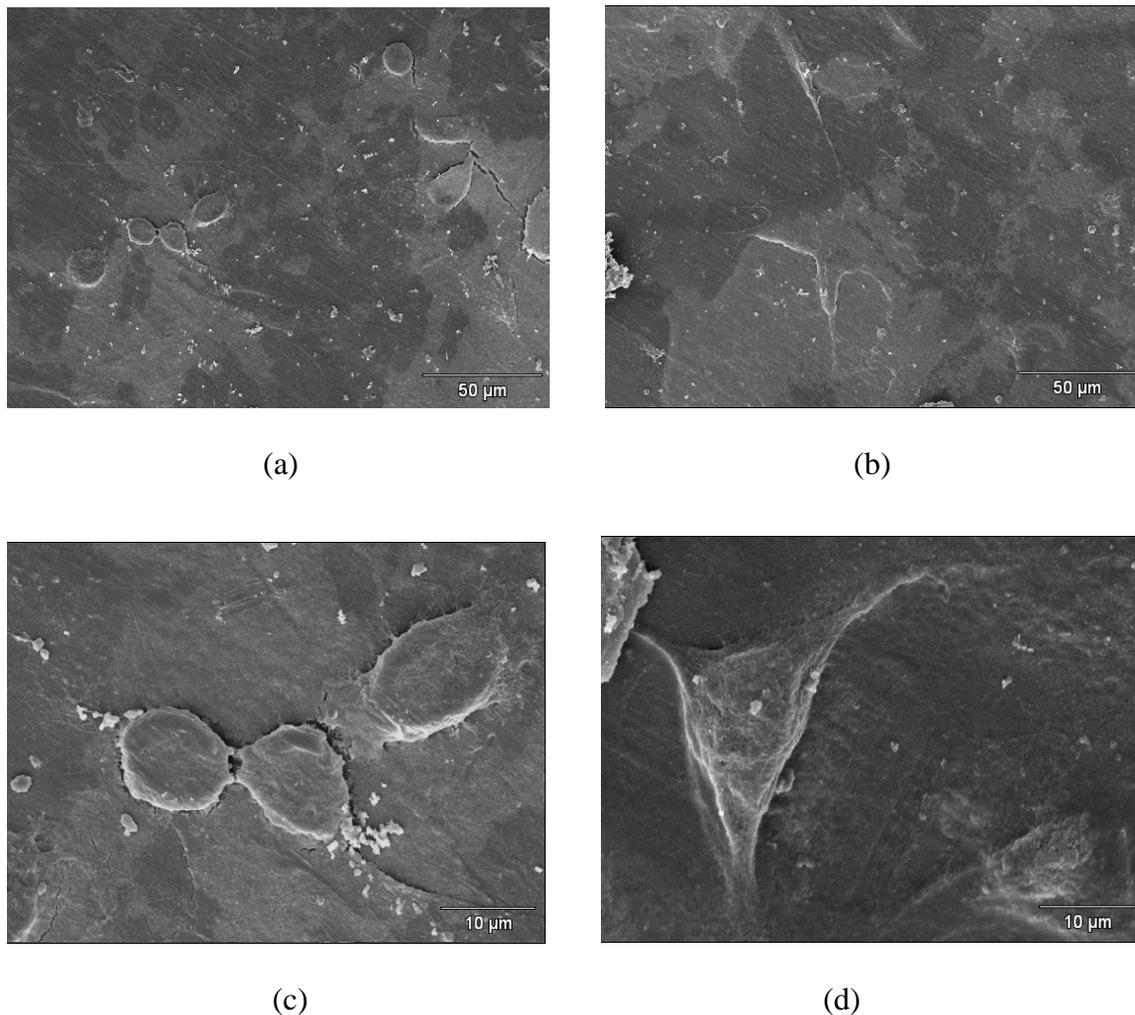


**Figura 4.51 – Microscopia Eletrônica de Varredura das células Vero cultivadas por 24 h sobre a PCL, (a) e (b) aumento de 500x e (c) e (d) aumento de 2.000x**

Na blenda PHBV/PCL (50/50) (Figura 4.52) foram observadas células mais alongadas que os polímeros puros. Também foi observada uma grande quantidade de vesículas e/ou microvilosidades sobre a superfície dessas células. Prolongamentos celulares finos também foram identificados. Resultados diferentes foram observados com a blenda PHBV/PCL (75/25) (Figura 4.53), onde as células encontravam-se mais retraídas, ora com alguns prolongamentos emitidos.



**Figura 4.52 – Microscopia Eletrônica de Varredura das células Vero cultivadas por 24 h sobre a blenda PHBV/PCL (50/50), (a) e (b) aumento de 500x e (c) e (d) aumento de 2.000x**

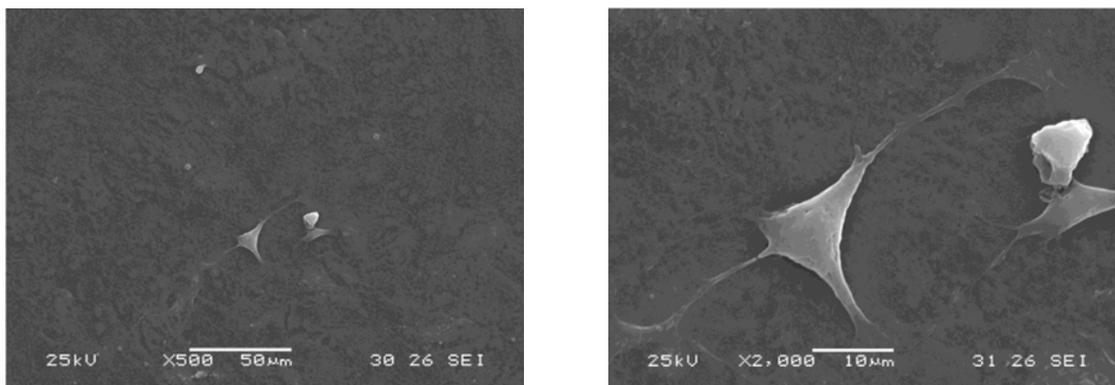


**Figura 4.53 – Microscopia Eletrônica de Varredura das células Vero cultivadas por 24 h sobre a blenda PHBV/PCL (75/25), (a) e (b) aumento de 500x e (c) e (d) aumento de 2.000x**

As Figuras 4.54, 4.55, 4.56 e 4.57 apresentam as imagens obtidas por MEV das lamínulas onde as células Vero foram inoculadas e cultivadas junto com os materiais poliméricos.

As células que cresceram sobre as lamínulas de vidro, ao lado dos polímeros, também mostraram certo padrão morfológico entre as diferentes amostras. As células que cresceram próximo ao PHBV (Figura 4.54) e o PCL (Figura 4.55) mostraram-se alongadas e bastante achatadas, lembrando a morfologia fibroblástica típica. Por outro lado, algumas vezes foram encontrados também com longos prolongamentos citoplasmáticos. Na blenda

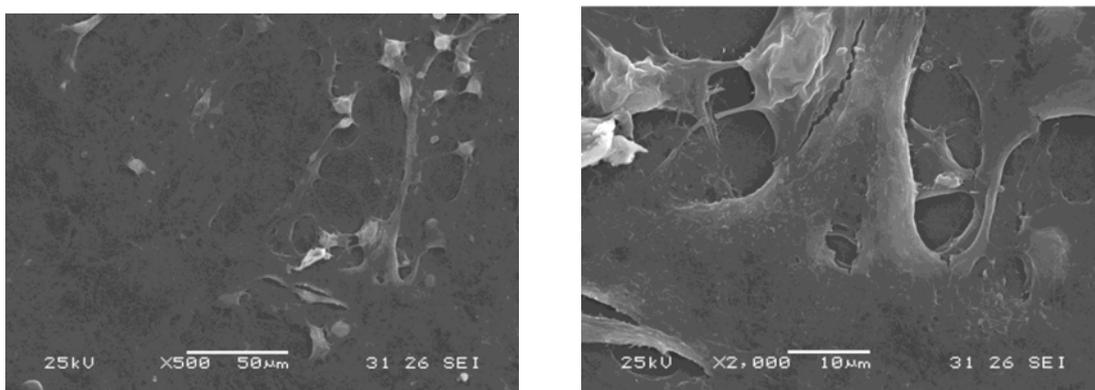
de PHBV/PCL (50/50) (Figura 4.56) foram observadas células em espalhamento, possivelmente após passarem por divisão celular. Já na blenda PHBV/PCL (75/25) (Figura 4.57) observa-se a borda da camada celular com células bem achatadas e em estado de confluência. Algumas células unidas por prolongamentos celulares foram observadas.



(a)

(b)

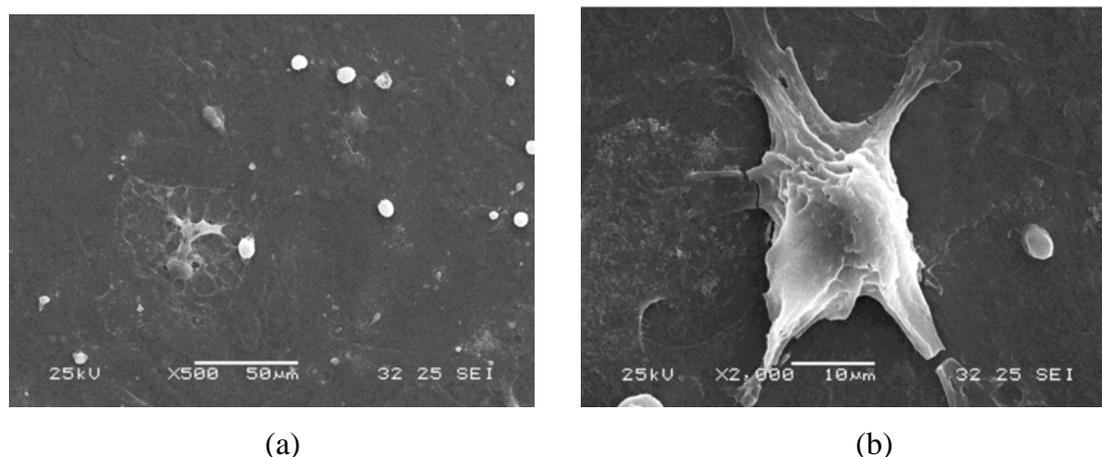
**Figura 4.54 – Microscopia Eletrônica de Varredura da superfície das lamínulas nas quais células Vero foram cultivadas em contato com o PHBV, (a) aumento de 500x e (b) aumento de 2.000x**



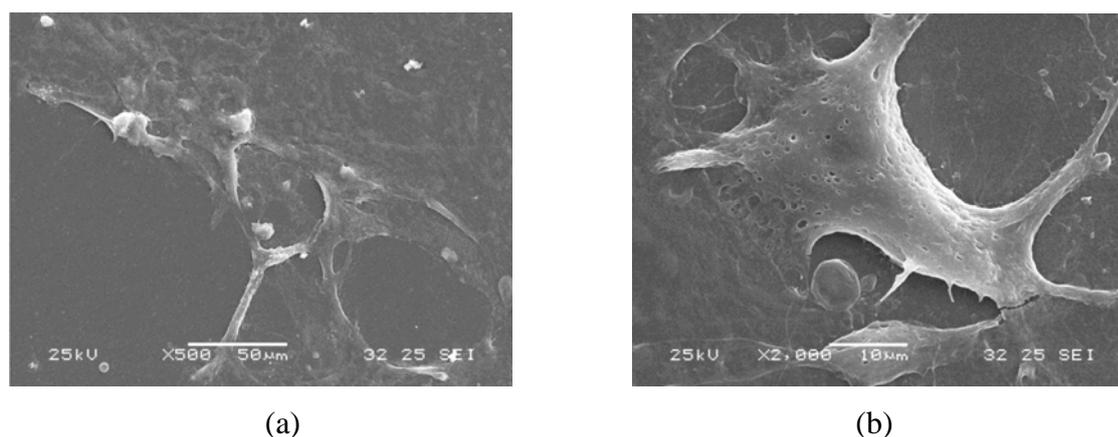
(a)

(b)

**Figura 4.55 – Microscopia Eletrônica de Varredura da superfície das lamínulas nas quais células Vero foram cultivadas em contato com a PCL, (a) aumento de 500x e (b) aumento de 2.000x**



**Figura 4.56 – Microscopia Eletrônica de Varredura da superfície das lamínulas nas quais células Vero foram cultivadas em contato com a blenda PHBV/PCL (50/50), (a) aumento de 500x e (b) aumento de 2.000x**



**Figura 4.57 – Microscopia Eletrônica de Varredura da superfície das lamínulas nas quais células Vero foram cultivadas em contato com a blenda PHBV/PCL (75/25), (a) aumento de 500x e (b) aumento de 2.000x**

A morfologia é uma expressão da diferenciação da célula. Em cultura celular, a morfologia está diretamente relacionada com a interação, com a adesão, espalhamento e estabelecimento do fenótipo. Por sua vez, esses parâmetros são dependentes de condições como o meio de cultura, (normalmente hormônios e/ou fatores de crescimento) adicionados ao meio, condições de temperatura e pressão de  $O_2/CO_2$  e o substrato de crescimento [117]. Nesse trabalho, a única condição que variou nas culturas foi o substrato de crescimento, ou seja, os polímeros e blendas estudados. Portanto, pode se

interpretar as modificações morfológicas encontradas nas células como uma alteração no padrão de diferenciação celular, que é bastante lábil em condições de cultura [117, 118 e 119].

As células Vero, quando crescendo em superfícies inertes como lamínulas de vidro ou placas de cultura, exibem uma morfologia irregular, ligeiramente alongada, típica de células fibroblásticas. Normalmente, podem ser observados prolongamentos celulares de forma discreta, bem como expansões citoplasmáticas em pequeno número. Vesículas e/ou microvilosidades podem ser observados na superfície da célula [120].

Sobre o PHBV as células não exibiram prolongamentos citoplasmáticos, vesículas e/ou microvilosidades em sua superfície. Alguns estudos do comportamento de células cultivadas sobre blendas de PHBV/PLLA, bem como os polímeros puros mostraram que a proporção dos polímeros influencia drasticamente o padrão morfológico da célula. Porém, em geral todos os substratos apresentavam uma morfologia mais condizente com o *status* secretor das células, ou seja, vesículas e/ou microvilosidades na superfície e, algumas vezes, elementos fibrosos que são condizentes com a secreção de matriz extracelular [121, 118]. Dentre as amostras aqui estudadas, as que apresentaram um padrão morfológico celular compatível com o esperado foi a blenda PHBV/PCL (50/50).

Células Vero com superfície lisa, quase sem irregularidades, seja com a morfologia retraída ou alongada, não são comuns ao contato com biomateriais. Prolongamentos nas superfícies e expansões citoplasmáticas são comuns ao contato com diferentes polímeros biorreabsorvíveis. Células Vero com a superfície quase isenta de protuberância foram descritas por MEV apenas em ligas metálicas tendo titânio como elemento básico [122].

A análise de MEV sugere que as blendas PHBV/PCL (75/25) e PHBV/PCL (50/50) sejam no máximo citostáticos e não tóxicos como indica o primeiro teste de contagem direta. Provavelmente a citotoxicidade apresentada por estes materiais esteja relacionada às características superficiais dos materiais, como por exemplo a impregnação do desmoldante empregado na

injeção dos corpos de prova. Convém ressaltar a contaminação da superfície dos corpos de prova com traços de silício conforme constatado pela análise de EDS (item 4.7.8).

#### **4.10 Conclusões parciais**

Os polímeros PHBV e PCL não apresentam efeitos citotóxicos, porém em se tratando de preparo de dispositivos biomédicos é importante avaliar também os parâmetros de processo, bem como os aditivos utilizados tais como o desmoldante empregado nos processos de injeção.

## 5 – CONCLUSÕES

A Tese de Doutorado, desenvolvida com o objetivo principal de estudar as blendas poliméricas do poli(hidroxibutirato-co-valerato) - PHBV com a poli( $\epsilon$ -caprolactona) – PCL visando a sua aplicação na confecção de dispositivos de osteossíntese, constatou que é viável o processamento dos polímeros PHBV, PCL e das blendas PHBV/PCL, através de extrusão e de injeção. Entretanto, observou-se durante o processamento do PHBV (com 12% de Valerato), que este copolímero não apresenta uma estabilidade térmica satisfatória. Foi possível a constatação visual da degradação termooxidativa do PHBV, caracterizada pela acentuada alteração de cor após o processamento.

Concluiu-se através das análises térmicas e da caracterização morfológica que as blendas PHBV/PCL (75/25) e PHBV/PCL (50/50) foram imiscíveis, nas condições empregadas neste trabalho.

Os resultados dos ensaios mecânicos demonstraram que as blendas do PHBV com PCL foram mais flexíveis que o PHBV, sendo que o PCL age como um modificador de impacto para o PHBV.

Através dos testes de degradação *in vitro* pode-se concluir que o PHBV e o PCL sofreram degradação hidrolítica quando em contato com solução tampão fosfato a 37°C, implicando em alterações de suas propriedades mecânicas ao longo de 180 dias. As blendas de PHBV e PCL apresentaram um comportamento intermediário aos dos polímeros puros, variando de acordo com a composição.

Foi observado que os polímeros PHBV e PCL não apresentam efeitos citotóxicos, porém em se tratando de preparo de dispositivos biomédicos é importante avaliar também os parâmetros de processo, bem como os aditivos utilizados tais como o desmoldante empregado nos processos de injeção.

A mistura do PCL ao PHBV viabiliza a melhoria das propriedades do PHBV para aplicações como dispositivos de osteossíntese.



## 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Analisar a possibilidade da estabilização térmica dos polímeros PHBV, PCL e das blendas PHBV/PCL, com o emprego de estabilizantes atóxicos e avaliar o comportamento resultante desta estabilização por aditivação;
- Incluir estudos do comportamento reológico na preparação e na interpretação da morfologia da blenda PHBV/PCL;
- Aprimorar as caracterizações de massa molar e de viscosidade de soluções diluídas dos polímeros da blenda PHBV/PCL;
- Realizar caracterização de massa molar considerando a retirada de amostras em diferentes posições dos corpos de prova;
- Realizar estudo da degradação *in vitro* em tempos superiores a 180 dias;
- Fazer análise de microscopia eletrônica de varredura da fratura das amostras após a degradação *in vitro*;
- Estudar a degradação *in vitro* do PHBV, PCL e suas blendas em outros meios, como por exemplo, soluções de NaOH.
- Realizar ensaios de citotoxicidade com filmes dos materiais em estudo;
- Realizar ensaios *in vivo* dos materiais em estudo.



## 7 – BIBLIOGRAFIA

1 – SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; ROCHA, R. C. S.; TACIRO, M. K. & PRADELLA, J. G. C. *Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros Biodegradáveis no Brasil*. Química Nova, vol. 30, n. 7, p.1732-1743, 2007.

2 - MONTORO, S.R.; SHIGUE, C.Y.; SORDI, M.L.T.; SANTOS, A.M. & RÉ, M.I. *Estudo cinético da redução da massa molar do poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBHV)*. Polímeros: Ciência e Tecnologia, 20, p.19-24, 2010.

3 – COELHO, N. S.; ALMEIDA, Y. M. B. & VINHAS, G. M. A *Biodegradabilidade da Blenda de Poli( $\beta$ -Hidroxi-butirato-co-Valerato)/Amido Anfótero na Presença de Microrganismos*. Polímeros: Ciência e Tecnologia, vol. 18, nº 3, p. 270-276, 2008.

4 – SIMIONI, A. R.; VACCARI, C.; RÉ, M. I. & TEDESCO, A. C. J. *PHBHV/PCL microspheres as biodegradable drug delivery systems (DDS) for photodynamic therapy (PDT)*. Journal of Materials Science, 43, 580-584, 2008.

5 – ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M & MANSUR, H. S. *Biomateriais: fundamentos & aplicações*. ed. Cultura Médica: Rio de Janeiro – RJ, 2006.

6 – HASIRCI, V., LEWANDROWSKI, K., GRESSER, J.D., WISE, D.L. and TRANTOLO, D.J., *Versatility of biodegradable biopolymers: degradability and an in vivo application*. Journal of Biotechnology, v. 86, p. 135-150, 2001.

7 – HUANG, Z.M & FUJIHARA, K., *Stiffness and strength design of composite bone plastes*. Composites Science and Technology, in press, 2004.

8 – WILLIAMS, S.F, MARTIN, D.P., HOROWITZ, D.M. and PEOPLES, O.P., *PHA applications: addressing the price performance issue. I. Tissue engineering*. International Journal of Biological Macromolecules, v. 25, p. 111-121, 1999.

9 – ASTM D 883: “*Terminology relating to plastics*” – Annual Book of ASTM Standards, Philadelphi (1994).

10 – WILLIANS, D.F.(ed), *Definitions in Biomaterials, Proceedings of a consensus conference of the European society for biomaterials*, Chester, England, march 3-5,1986, Elsevier,1987.

11 – BRUNEL, D. G. *Influência da incorporação de aditivos nas propriedades do poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) - PHBV*, São Carlos, 2008, 153 p., Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ciências e Engenharia de Materiais (PPG-CEM), Universidade Federal de São Carlos.

12 – LEMES, A. P. *Desenvolvimentos de novos compósitos biodegradáveis baseado em poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) e lignosulfonatos* 2005. 127p. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2005.

13 – AFONSO, E.D. *Desenvolvimento de produtos de plásticos biodegradáveis*. Porto Alegre: Senai-RS, 2006.

14 – AGNELLI, J.A.M. *Técnicas de Caracterização Utilizadas em materiais poliméricos*. São Carlos: UFSCar, 2001. Apostila curso.

- 15 – YOON, S.C.; SONG, J.J. & KIM, T.U. *Isolation and characterization of pseudomas putida BM01 accumulating high amount PHAMCL*. In: international Scientific Workshop on Biodegradable Plastics and Polymers, 3, 1993, Osaka. Proceedings. Toquio: Elsevier, p.394-399, 1994.
- 16 – SHARMA, R. & RAY, A. R. J.M.S. – Rev. Macromol. Chem. Phys., C35(2), 1995, p.327-359.
- 17 – CASARIN, S. A., MALMONGE, S. M. e AGNELLI, J. A. M. *Prepation and characterization of blends with biodegradable polymers: poly(hydroxybutyrate) – PHB / Ecoflex*. In: PPS 2004 AMÉRICAS REGIONAL MEETING PROCEEDINGS, Florianópolis – SC, Novembro / 2004.
- 18 – PACHEKOSKI, W. M. *Desenvolvimento de blendas biodegradáveis cosntituídas de poli-hidroxibutirato (PHB) e poli(ácido láctico) - PLA*, São Carlos, 2005, 158 p., Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ciências e Engenharia de Materiais (PPG-CEM), Universidade Federal de São Carlos.
- 19 – HU, S-G.; JOU, C-H.; YANG, M-C. *Biocompatibility and antibacterial activity of chitosan and collagen immobilized poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid)*. Carbohydrate Polymer; 58: 173-179, 2004.
- 20 – BRAUNEGG, G.; Lefebvre, G.; Genser, K. F. *Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects* J. Biotechnol.; 65: 127 (1998).
- 21 – NASCIMENTO, J. F. *Estudo da processabilidade e da caracterização do poli(ácido 3-hidroxibutírico) – PHB obtido a partir da cana-de-açúcar*. 2001. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

22 – FALCONE, D. M. B. *Influência da incorporação de poli(ácido láctico) – PLA, de pó de madeira e outros aditivos no comportamento físico-mecânico do poli(hidroxi-butilato) - PHB*, São Carlos, 2004, 143 p., Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ciências e Engenharia de Materiais (PPG-CEM), Universidade Federal de São Carlos.

23 – HRABAK, O. *PHB – Part of a new waste management system*. In: International Scientific Workshop on Biodegradable Polymers and Plastics, 2., 1991, Montpellier. Proceeding. Montpellier: Royal Society of Chemistry, 1992. P.255-258.

24 – COX, M.C. *Properties and applications of polyhydroxyalkanoates*. In: International Scientific Workshop on Biodegradable Plastics and Polymers, 3., 1993, Osaka. Proceedings. Toquio: Elsevier, p. 120-135, 1994.

25 – QUENTAL, A.C. *Blendas de PHB e PETG: formação de um copoliéster aromático/alifático via processamento reativo*. 2004. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2004.

26 – BELEM, L. P. *Biodegradação, degradação hidrolítica e cinética de cristalização do P(HB-co-HV) e do PHB, puro ou com os plastificantes dos tipos citrato e ftalato*, São Carlos, 2008, 270 p., Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ciências e Engenharia de Materiais (PPG-CEM), Universidade Federal de São Carlos.

27 – LISBÃO, S. A. *Estrutura e propriedades dos polímeros*. São Carlos, SP: EdUFSCar, 2004.

28 – EL-HADI, A.; STRAUBE, R.; MULLER, G. & HENNING, S. *Correlation between degree of crystallinity, morphology, glass temperature, mechanical*

*propertiers and biodegradation of poly(3-hydroxyalkanoate) PHAs and their blends*. Polymer Testing, n.21, p. 605-674, 2002.

29 – HOWEL, E.R. *Chem. Ind.*, p.508, 1982.

30 – BROGNOLI, R. *Plásticos biodegradáveis de polialcanoatos: copolímeros de Polihidroxibutiratos e Polihidroxivaleratos*. Porto Alegre: PPGEM/UFRGS, 200.

31 – KUNIOKA, M. & DOI, Y. *Thermal degradation of microbial copolyesters: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Poly(3--hydroxybutyrate-co-4-hydroxyvalerate)*. Macromolecules, Washington, v.23, p. 1933-1936, 1990.

32 – PHB Industrial S.A. Disponível em: <http://www.biocycle.com.br>. Acesso em: maio 2008.

33 – FREITAS JUNIOR, N.F. *Estudo das propriedades termomecânicas e morfológicas de blendas biodegradáveis de poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) com amido de milho natural e modificado*. 90p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas – Campinas – 2004.

34 – DUARTE, M. A. T. *Estudo do processamento e da degradação térmica do poli(3-hidroxibutirato) e de suas blendas com poli( $\epsilon$ -caprolactona)*. 2004. 109p. Dissertação de Mestrado - Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, SC, 2004.

35 – ROSÁRIO, F. *Estudo das modificações do PHB com PCL, com farinha de madeira e com plastificantes*. 191p. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de São Carlos – São Carlos – 2005

- 36 – ALMEIDA, W.B. *Estudo das propriedades termomecânicas e morfológicas de blendas biodegradáveis de poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) com amido de milho natural e modificado, plastificada com alquil epóxi estearato, com e sem pó de fibra de coco*. 86p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas – Campinas – 2005.
- 37 – GASSNER, F.; OWEN, A. J.; *Physical properties of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate)-poly( $\epsilon$ -caprolactone) blends*. Polymer Report, v. 35, p. 2233-2236, 1994.
- 38 – ELDSÄTER, C.; ERLANDSSON, B. RENSTARD, R. ALBERTSSON, A.C. & KARLSSON, S. *The biodegradation of amorphous and crystalline regions in film-blown poly( $\epsilon$ -caprolactone)*. Polymer, v.41, p. 1297-1304, 2000.
- 39 – ARMANI, D. K. & LIU, C. *Microfabrication technology for polycaprolactone, a biodegradable polymer*. J. Micromech. Microeng., v.10, p. 80-84, 2000.
- 40 – MARSON, J. A., *Polymers blends and composites*. Plenum Press, New York, 1976, 515p.
- 41 – FERREIRA, B.M.P. *Obtenção, caracterização, estudo “in vivo” e “in vitro” de blendas de Poli(L-ácido láctico) / Poli(hidroxi butirato-co-hidroxi valerato)*. 161p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Universidade Estadual de Campinas – Campinas – 2002.
- 42 – PENNING, J.P. & MANLEY, R. St. J. *Miscible blends of two crystalline polymers. 2. Crystallization kinetics and morphology in blends of poly(vinylidene fluoride) and poly(1,4-butylene adipate)*. Macromolecules, v.29, p.84-90, 1996.
- 43 – CHANDRA, E.; RUSTGY, R. *Biodegradable polymers*. Progress in Polymer Science, v.23, p.1273-1335, 1998.

- 44 – ISHIAKU, U.S.; PANG, K.W.; LEE, W.S.; ISHAK, Z.A.M. *Mechanical properties and enzymic degradation of thermoplastic and granular sago starch filled poly( $\epsilon$ -caprolactone)*. *European Polymer Journal*, v.38, p.393-401, 2002.
- 45 – FELISBERTI, M. I. *Caracterização de blendas poliméricas através de análise térmica e termomecânica*. In: Curso da Associação Brasileira de Polímeros – ABPol, São Paulo – Brasil, 9 - 10 dez, 1998.
- 46 – HAGE JR, E & PESSAN, L.A. *Blendas poliméricas*. Notas de aula da disciplina Blendas Poliméricas. São Carlos, PPG-CEM/UFSCar, 2002.
- 47 – ULTRACKI, L.A. *Polymer alloys and blends*. Nova York: Hanser Publishers, 1989, 356p.
- 48 – PAUL, D.R. et al. *Polymer blends: encyclopedia of polymer science and engineering*. 2.ed. Universidade de Texas: John Wiley & Sons, 1988, v.12, p.399-461.
- 49 – YOON, J-S; OH, S-H & KIM, M-N. *Compatibility of poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ethylene-co-vinyl acetate) blends*. *Polymer*, 39, 12, 1998, p.2479-2487.
- 50 – GRECO, P. MARTUSCELLI, E. *Crystallization and thermal behaviour of poly( $\alpha$ -(—)-3-hydroxybutyrate)-based blends*. *Polymer*, 30, 1989, p.1475-1483.
- 51 – MARAND, H. & COLLINS, M. *Crystallization and morphology of poly(vinylidene fluoride)/poly(3-hydroxybutyrate) blends*. *American Chemical Society, Polymer Preprints, Division of Polymer Chemistry*, 31, 1, 1990, p. 552-553.

52 – ABBATE, M.; MARTUSCELLI, E.; RAGOSTA, G. & SCARINZINI, G. *Tensile properties and impact behaviour of poly(D(-)3-hydroxybutyrate)/rubber blends*. Journal of Materials Science, 26, 4, 1991, p.1119-1125.

53 – SADOCCO, P.; CANETTI, M.; SEVES, A. & MARTUSCELLI, E. *Small-angle X-ray scattering study of the phase structure of poly(D(-)-3-hydroxybutyrate) and atactic poly(epichlorohydrin) blends*. Polymer, 34, 16, 1993, p.3368-3375.

54 – PACHEKOSKI, W. M. *Desenvolvimento de blendas poliméricas do polímero biodegradável poli-hidroxibutirato (PHB) com polipropileno (PP)*, São Carlos, 2001, 134 p., Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ciências e Engenharia de Materiais (PPG-CEM), Universidade Federal de São Carlos.

55 – CASARIN, S. A. *Desenvolvimento e caracterização de blendas e de compostos empregando polímeros biodegradáveis*, São Carlos, 2004, 131 p., Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ciências e Engenharia de Materiais (PPG-CEM), Universidade Federal de São Carlos.

56 – ANTUNES, M.C.; FELISBERTI, M.I. Proceeding of 40<sup>th</sup> International on Macromolecules Symposium – *MACRO*, Paris, França (2004) in: Quental, A. C., *Blendas de PHB/PETG: Formação de um copoliéster alifático / aromático via processamento reativo*, Tese de Doutorado, Unicamp, Campinas – SP, 2005.

57 – SOMBATMANKHONG, K.; SANCHAVANAKIT, N. ; PAVASANT, P. & SUPAPHOL, P. *Bone scaffolds from electrospun fiber mats of poly(3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and their blend*. Polymer. n.48, 2007, 1419 – 1427.

58 – VOLOVA, T.; SHISHATSKAYA, E.; SEVASTIANOV V.; EFREMOV, S. & MOGILNAYA, O. *Results of biomedical investigations of PHB/PHV fibers*. Biochemical Engineering Journal. n.16, 2003, p 125-133.

59 – LI, H. & CHANG J. *In vitro degradation of porous degradable and bioactive PHBV / wollastonite composite scaffolds*. Polymer Degradation and Stability. n.87, 2005, p 301 – 307.

60 – SUWANTONG, O.; WALEETORNCHEEPSAWAT, S.; SANCHAVANAKIT, N. et al. *In vitro biocompatibility of electrospun poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) fiber mats*. International Journal of Biological Macromolecules. n.40, 2007, p. 217 – 223.

61 – CHEN, L.J. & WANG, M. *Production and evaluation of biodegradable composites based on PHB-PHV copolymer*. Biomaterials. n.23, 2002, p 2631 – 2639.

62 – BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. & DUEK, E. A. R. *Degradação acelerada de suportes de poli( $\epsilon$ -caprolactona) e poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) em meio alcalino*. Polímeros: Ciência e Tecnologia, 16, 2, p. 141-148, 2006.

63 – AZEVEDO, M.C.; REIS, R.L.; CLAASE, M.B.; GRIJPMMA, D.W. & FEIJEN, J. *Development and properties of polycaprolactone/hydroxyapatite composite biomaterials*. Journal of Materials Science. n.14, 2003, p 103-107.

64 – BIKIARIS, D.N.; PAPAGEORGIU, G.Z.; ACHILIAS, D.S.; et al. *Miscibility and enzymatic degradation studies of poly( $\epsilon$ -caprolactone) / poly(propylene succinate) blends*. European Polymer Journal. n.43, 2007, p. 2491 – 2503.

65 – CORDEN, T.J.; JONES, I.A.; RUDD, C.D.; CHRISTIAN, P. & DOWNES, S. *Initial development into a novel technique for manufacturing a long fibre*

*thermoplastic bioabsorbable composite: in situ polymerization of poly- $\epsilon$ -caprolactone*. Composites. Part A, n.30, 1999, p. 737 – 746.

66 – SUN, H.; MEI, L.; SONG, C.; CUI, X. & WANG, P. *The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant*. Biomaterials, 27, 2006, p. 1735-1740.

67 – XING, Z. & YANG, G. *Crystallization, Melting Behavior, and Wettability of Poly( $\epsilon$ -caprolactone) and Poly( $\epsilon$ -caprolactone)/poly(N-vinylpyrrolidone) blends*. Journal of Applied Polymer Science, 115, 2010, p. 2747-2755.

68 – KIM, T.G.; LEE, D.S. & PARK T.G. *Controlled protein release from electrospun biodegradable fiber mesh composed of poly( $\epsilon$ -caprolactone) and poly(ethylene oxide)*. International Journal of Pharmaceutics. n.338, 2007, p. 276 – 283.

69 – WU, T.; ZHANG, X. & YANG, G. *Comparison of crystallization behaviors of poly( $\epsilon$ -caprolactone) in confined environment with that in bulk*. Journal of Applied Polymer Science, 107, 2008, p. 3796-3803.

70 – GADA, M.; CROSS, R.A. & MCCARTHY, S. P. *Biodegradable plasticizers: miscible blends of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate) with poly( $\epsilon$ -caprolactone) and poly(ethylene glycol)*, in: Proceedings of Third Internacional Scientific on Biodegradable Polymer and Plastics, p. 177-189, Osaka – Japan, 9-11 nov., 1993.

71 – ROSA, D. S.; PENTEADO, D. F. & CALIL, M. R. *Propriedades térmicas e biodegradabilidade de PCL e PHB em pool de fungos*. Revista de Ciência e Tecnologia. Vol. 15, jun. 2000, p 75 – 80.

72 – CARA, F.L.; IMMIRZI, B.; IONATA, E et al. *Biodegradation of poly- $\epsilon$ -caprolactone / poly- $\beta$ -hydroxybutyrate blend*. Polymer Degradation and Stability. n.79, 2003, p. 37 – 43.

73 – DUARTE, M.A.T.; HUGEN, R.G.; MARTINS, E.S.; PEZZIN, A.P.T. & PEZZIN, S.H. (2006). *Thermal and Mechanical behavior of injection molded poly(3-hydroxybutyrate)/poly( $\epsilon$ -caprolactone) blends*. Materials Research, 9, 25-27.

74 – SUAVE, J.; DALL'AGNOLL, E.C.; PEZZIN, A.P.T.; MEIER, M.M. & SILVA, D.A.K. (2010). *Biodegradable microspheres of poly(3-hydroxybutyrate)/poly( $\epsilon$ -caprolactone) loaded with malathion pesticide: preparation, characterization, and in vitro controlled release testing*. Journal of Applied Polymer Science, 117, 3419-3427.

75 – CHUN, Y.S. & KIM, W.N. *Thermal properties of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) blends*. Polymer. n.41, 2000, p 2305 – 2308.

76 – QIU, Z.; YANG, W.; IKEHARA, T & NISHI, T. *Miscibility and crystallization behavior of biodegradable blends of two aliphatic polyesters. Poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly( $\epsilon$ -caprolactone)*. Polymer. n.46, 2005, p 11814 – 11819.

77 – BERENICE, V. P. & FERMÍN, P. G. *Crystallinity analysis of binary blends of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) with poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) (PHB) and poly( $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate) (PHBV)*. In: MATERIAUX 2006 13-17 Novembre 2006 – Dijon, France

78 – VOGELSANGER, N., FORMOLO, M. C., FURLAN, S. A., SCHNEIDER, A. L., PEZZIN, S. H., PEZZIN, A. P. T. *Biodegradabilidade em solo de blendas de poli(3-hidroxibutirato) e poli( $\epsilon$ -caprolactona)* In: XI Encontro de Química da

Região Sul, 2003, Pelotas. Anais do XI -Encontro de Química da Região Sul. , 2003b. v.FQ. p.43.

79 – VOGELSANGER, N.; *Biodegradabilidade em solo de blendas poli (3-hidroxi-butirato) e poli ( $\epsilon$ -caprolactona)*. Monografia do curso de Química Industrial, UNIVILLE, dezembro, 2003

80 – PARK, J. B. & LAKES, R.S. *Biomaterials Introduction*. Second Edition. New York, cap. 10, p. 220-237, 1992.

81 – VANIN, M. *Obtenção, caracterização e estudo da adsorção de proteínas na blenda biorreabsorvível poli( $\beta$ -hidroxi-butirato) (PHB) / poli(l-ácido láctico) (PLLA)*. 212p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas – Campinas – 2003.

82 – TANZAWA, H. *Biomedical Polymers: Current Status and Overview*. In: *Biomedical Applications of Polymeric Materials*. Editor CRC Press, EUA, p.1-15, 1993.

83 – AN, Y.H., WOOLF, S.K. and FRIEDMAN, R.J., *Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices*. *Biomaterials*, v. 21, p. 2635-2652, 2000.

84 – MIDDLETON, J.C., TIPTON, A.J. *Synthetic biodegradable polymers as orthopaedic devices*. *Biomaterials*, v.21, p.2335-2346, 2000.

85 – WAKE, M.C. et al. *Effects of biodegradable polymer particles on rat marrow-derived stromal osteoblasts in vitro*. *Biomaterials*. V. 19, p. 1255-1268, 1998.

86 – ELST, M. V. et al. *The burst phenomenon an animal model simulating the long-term tissue response on PLLA interlocking nails*. Journal of Biomedical Materials Research. V.30, p. 139-143, 1996.

87 – HAYASHI, K. & NAKAMURA, T., *Materials test system for the evaluation of mechanical properties of biomaterials*. Journal of Biomedical Materials Science, v.19, p.133-144, 1985.

88 – HAYES, W.C. & BOUXSEIN, M.L., *Biomechanics of cortical and trabecular bone: implications for assesment of fracture risk*. In: Basic Orthopedic Biomechanics, edited by Mow, V.C. and hayes, W.C., Lippincott - Raven, 1997.

89 – AMARAL, M.B. *Citotoxicidade in vitro e biocompatibilidade in vivo de compósitos a base de hidroxiapatita, colágeno e quitosana*. 98p. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – USP – São Carlos – 2006.

90 – MALMONGE, S.M.; ZAVAGLIA, C.A.C.; SANTOS, A.R.JR & WADA, M.L.F. *Avaliação da citotoxicidade de hidrogéis de polihema: um estudo in vitro*. Revista Brasileira de Engenharia Biomédica. Vol.15, n.1-2, p. 49-54, 1999.

91 – FRESHNEY, R.I. *Animall cell culture – A practical approach*, IRL Press, 1989.

92 – PIETRZAK, W.S.; SARVER, D.R. & VERSTYNEN, M.L. *Bioabsorbable polymer science for the practicing surgeon*. Journal of Craniofacial Surgery, v.2, p. 87-91, 1997.

93 – SUNG, H-J; MEREDITH, C.; JOHNSON, C. & GALIS, Z.S. *The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis*. Biomaterials, v.25, p.5735-5742, 2004.

94 – TAMADA, J. A. & LANGER, R. *Erosion kinetics of hydrolytically degradable polymers*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, v.90, (2), p. 552-556, 1993.

95 – BURKERSRODA, F. SCHEDL, L. & GOPFERICH, A. *Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion*. Biomaterial, v.23, p. 4221-4231, 2002.

96 – LI, S. *Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids*. Journal of Biomedical Materials Research, v.48, (3), p. 342-353, 1999.

97 – ASTM D 1238-01: “*Standard Test Method for Flow Rates of Thermoplastics by Extrusion Plastometer*” – Annual Book of ASTM Standards, Philadelphia (2001).

98 – ASTM D 256-02: “*Standard Test Methods Determining the Pendulum Impact of Notched Specimens of Plastics*” - Annual Book of ASTM Standards, Philadelphia (2002).

99 – ASTM D 4065-95: “*Standard Practice for Determining and Reporting Dynamic Mechanical Properties of Plastics*” - Annual Book of ASTM Standards, Philadelphia (1995).

100 – ASTM D 648-01: “*Standard Test Method for Deflection Temperature of Plastics Under Flexural Load in the Edgewise Position*” - Annual Book of ASTM Standards, Philadelphia (2001).

101 – ASTM D 638-02: “*Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics*” - Annual Book of ASTM Standards, Philadelphia (2002).

102 – ASTM D 790 M-02: “*Standard Test Methods for Flexural Properties of*

*Unreinforced Plastics and Electrical Insulating Materials [Metric]* - Annual Book of ASTM Standards, Philadelphia (2002).

103 – ASTM F 1635 – 04a: “Standard test method for in vitro degradation testing of hydrolytically degradable polymer resins and fabricated forms for surgical implants” - Annual Book of ASTM Standards, Philadelphia (2004).

104 – ISO 10993 – 1: International Standard. *Biological evaluation of medical devices* – part 1 – Evaluation and testing, 1997.

105 – NBR ISO 10993 - ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. *Avaliação Biológica de produtos para saúde*. Parte 1 Avaliação e Ensaio, 1999.

106 – ASTM F813-83: *Standard practice for direct contact cell culture evaluation of materials for medical devices*.

107 – MOSSMAM, T. J. *A rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J. Immunol. Methods, 65, 1983, p.55-63.

108 – SCOTT, G. & GILLEAD, D. *Degradable polymers*. London: Chapman & Hall, 1995.

109 – WANG, L.; MA, W.; GROSS, R. A. e MCCARTHY, S. P. *Reactive compatibilization of biodegradable blends of poly(lactic acid) and poly( $\epsilon$ -caprolactone)*. Polymer Degradation and Stability, v. 59, p. 1161-168. 1998.

110 – BARBANTI, S.H. *Morfologia de polímeros bioreabsorvíveis como suporte para cultura de osteoblastos*. 94p. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2001.

111 – AVELLA, M., ERRICO, M. E., RIMEDIO, R. & SADOCCO, P. *Preparation of biodegradable polyesters/high-amylose-starch composites by reactive blending and their characterization*. Journal of Applied Polymer Science, 83, 2002, p.1432-1442.

112 – GUNARATNE, L.M.W.K.; SHANKS, R.A. *Multiple melting behavior of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) using step-scan DSC*. European Polymer Journal, v.41, p. 2980-2988, 2005.

113 – CANEVAROLO, S. V. Jr. *Técnicas de caracterização de polímeros*. Artliber, São Paulo, 1º Ed, 2004.

114 – CANTO, L. B.; PESSAN, L. A.; – “*Resistência à tração, flexão e compressão*” Em: CANEVAROLO, S. V.; – “*Técnicas de caracterização de polímeros*” Artliber, São Paulo, 2º ed (2007).

115 – HEDBERG, E. L.; SHIH, C. K.; LEMOINE, J. J.; TIMMER, M. D.; LIEBSCHNER, M. A. K.; JANSEN J. A.; MIKOS, A. G., *In vitro degradation of porous poly(propylene fumarate)/poly(DL-lactic-co-glycolic acid) composite scaffolds*. Biomaterials, 26, 2005, p.3215-3225.

116 – DUEK, E. A. R., ZAVAGLIA, C. A. C. & BELANGERO, W. D. *In vitro study of poly(lactic acid) pin degradation*. Polymer. v40, p. 6465-6473, 1999.

117 – GENARI, S.C. *Cultura de Células Animais*. In: Hernandes Faustino de Carvalho; Shirlei Maria Recco-Pimentel. (Org.). A Célula. 2 ed. Barueri: Editora Manole Ltda., p. 67-73, 2007.

118 – SANTOS JR., A.R; WADA, M.L.F. *Polímeros biorreabsorvíveis como arcabouços para cultura de células e engenharia tecidual*. Polímeros – Ciência e Tecnologia, 17: 308-317, 2007.

119 – SANTOS JR, A.R. *Bioresorbable polymers for tissue engineering*. In: Daniel Eberlin. (Org.). *Tissue engineering*. Olajnica: In-Teh, p. 235-246, 2010.

120 – GENARI, S.C.; WADA, M.L.F. *Alterations in the growth and adhesion pattern of Vero cells induced by nutritional stress conditions*. *Int. Cell Biol.*: 22: 285-294, 1998.

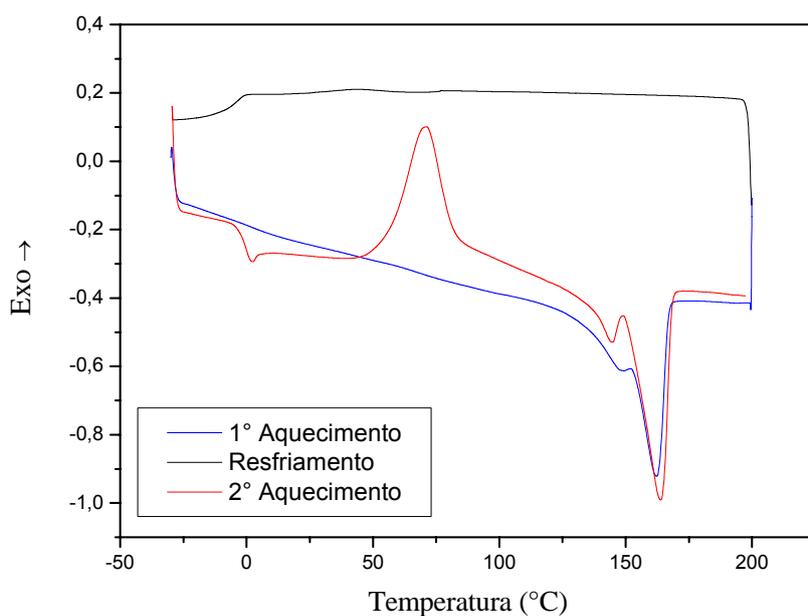
121 – LOMBELLO, C.B.; MALMONGE, S.M.; WADA, M.L.F. *Morphology of fibroblastic cells cultured on poly(HEMA-co-AA) substrates*. *Cytobios*, 101: 115-122, 2000.

122 – DONATO, T.A.G.; ALMEIDA, L.H.; NOGUEIRA, R.A.; NIEMEYER, T.C.; GRANDINI, C.R.; CARAM, R.; SCHNEIDER, S.G.; SANTOS JR, A.R. *Cytotoxicity study of some Ti alloys used as biomaterial*. *Mater. Sci. Eng. C*, 29: 1365-1369, 2009.

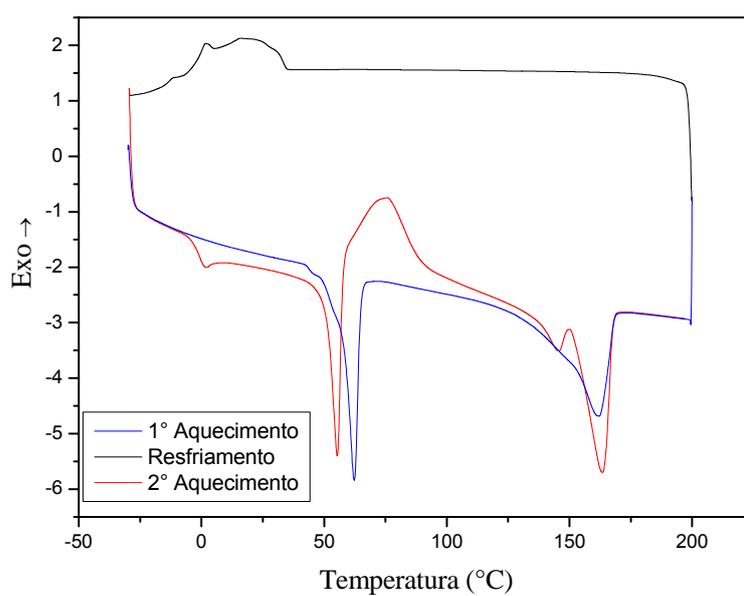


## ANEXO A

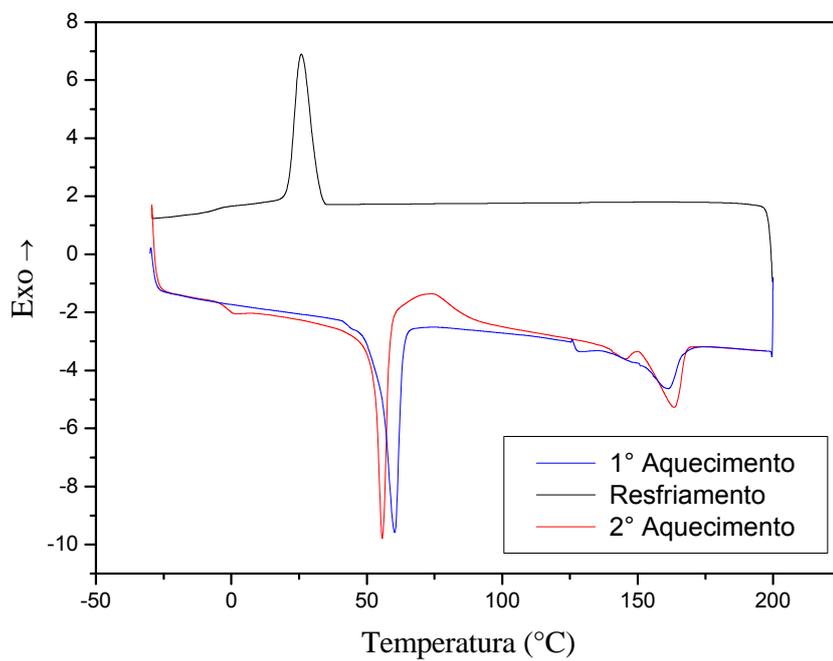
As curvas do primeiro aquecimento, resfriamento e segundo aquecimento obtidas via DSC para os polímeros puros PHBV e PCL e para as blends PHBV/PCL (75/25) e PHBV/PCL (50/50) encontram-se nas Figuras A1, A2, A3 e A4.



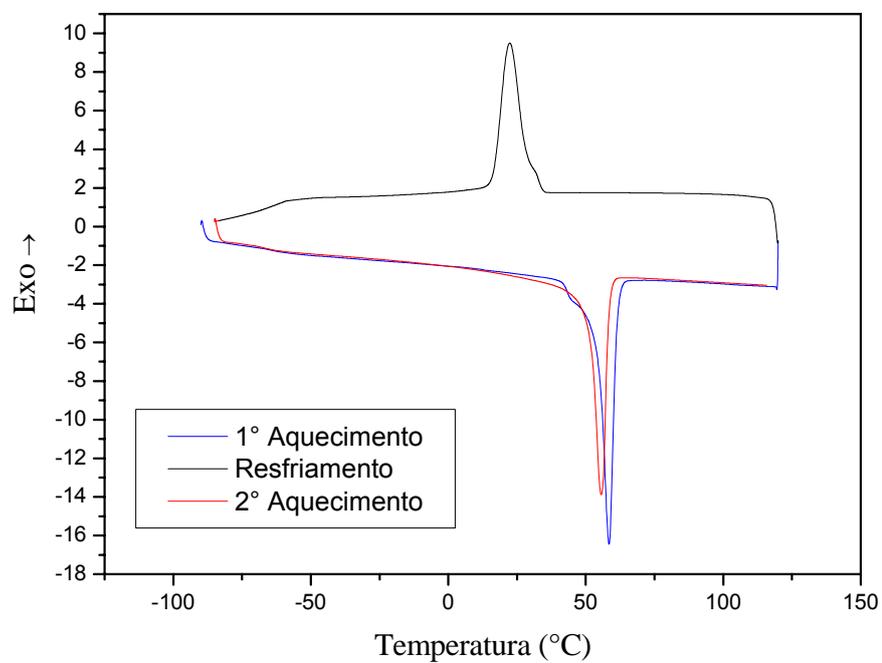
**Figura A1 – Curvas DSC para o PHBV**



**Figura A2 – Curvas DSC para a blenda PHBV/PCL (75/25)**



**Figura A3 – Curvas DSC para a blenda PHBV/PCL (50/50)**



**Figura A4 – Curvas DSC para a PCL**

## ANEXO B

Os resultados dos ensaios preliminares de tração, utilizando a velocidade de 5mm/min para a realização dos ensaios, para o polímero puro PHBV e para as blendas PHBV/PCL (75/25) e PHBV/PCL (50/50) encontram-se na Tabela B1. E os resultados dos ensaios preliminares de tração do polímero puro PCL, variando a velocidade do ensaio, encontra-se na Tabela B2.

**Tabela B1 – Resultados do ensaio de tração, velocidade de 5mm/min**

<b>Materiais</b>	<b>Tensão no escoamento (MPa)</b>	<b>Deformação no escoamento (%)</b>	<b>Módulo de Elasticidade (GPa)</b>	<b>Tensão na ruptura em tração (MPa)</b>	<b>Deformação na ruptura em tração (%)</b>
PHBV	26,6 ± 0,8	6,8 ± 0,4	1,1 ± 0,1	26,4 ± 0,9	7,6 ± 0,9
PHBV/PCL (75/25)	23,5 ± 0,9	8,9 ± 1,0	0,8 ± 0,1	17,9 ± 5,3	26,2 ± 11,1
PHBV/PCL (50/50)	20,1 ± 1,6	262,4 ± 143,5	0,5 ± 0,0	19,5 ± 2,5	289,2 ± 77,9

**Tabela B2 – Resultados do ensaio de tração para a PCL, variando a velocidade do ensaio**

<b>Materiais</b>	<b>Tensão no escoamento (MPa)</b>	<b>Deformação no escoamento (%)</b>	<b>Módulo de Elasticidade (GPa)</b>	<b>Tensão na ruptura em tração (MPa)</b>	<b>Deformação na ruptura em tração (%)</b>
PCL (5mm/min)*	18,2	390,5	0,3	18,0	379,8
PCL (50mm/min)	17,3 ± 0,2	384,2 ± 4,8	0,34 ± 0,0	17,2 ± 0,2	386,5 ± 4,2
PCL (100mm/min)	17,2 ± 0,2	389,6 ± 1,4	0,2 ± 0,2	17,1 ± 0,1	383,9 ± 8,6
PCL (200mm/min)	16,3 ± 0,2	200,9 ± 0,0	0,4 ± 0,0	15,9 ± 0,1	383,1 ± 4,9

\* Para a velocidade 5mm/min não tem desvio-padrão porque o ensaio foi realizado com somente um corpo de prova, devido ao longo tempo de duração do ensaio.



## ANEXO C

As curvas TG obtidas para o PHBV, para as blendas PHBV/PCL (75/25) e PHBV/PCL (50/50) e para o PCL, realizadas com os corpos de provas dos materiais antes da degradação *in vitro* encontram-se nas Figuras C1, C4, C7 e C10, respectivamente. As curvas realizadas após 90 dias de degradação *in vitro* encontram-se nas Figuras C2, C5, C8 e C11. E as curvas realizadas após 180 dias de degradação *in vitro* encontram-se nas Figuras C3, C6, C9 e C12.

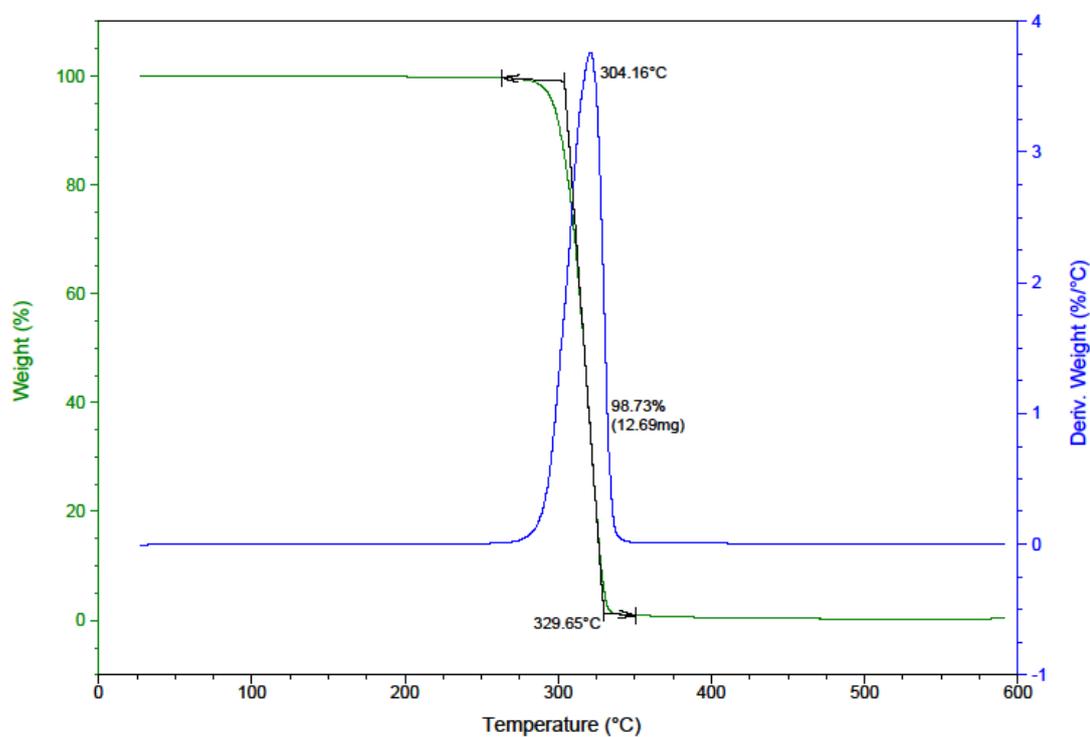


Figura C1 – Curva TG para o PHBV

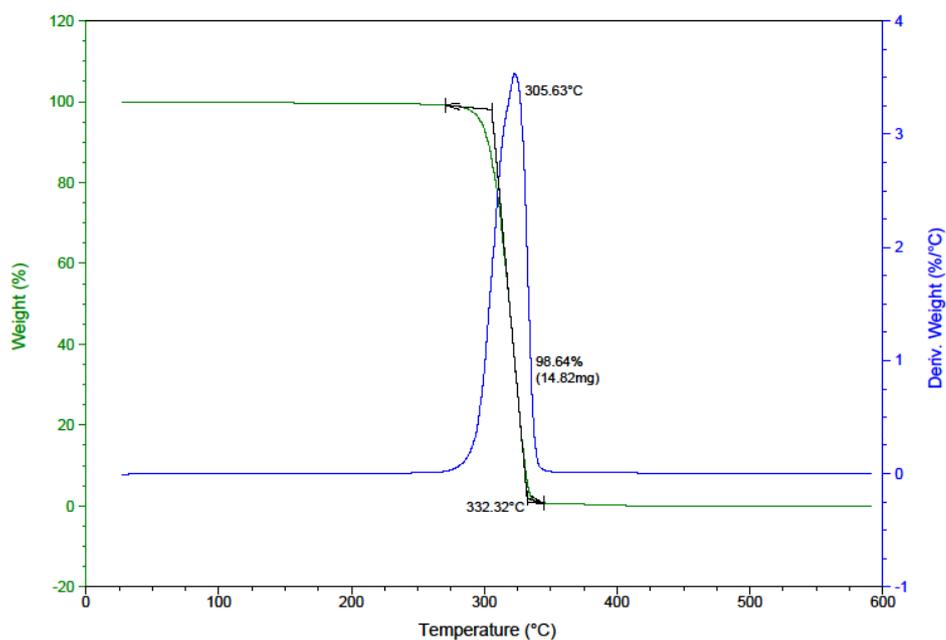


Figura C2 – Curva TG para o PHBV após 90 dias de degradação *in vitro*

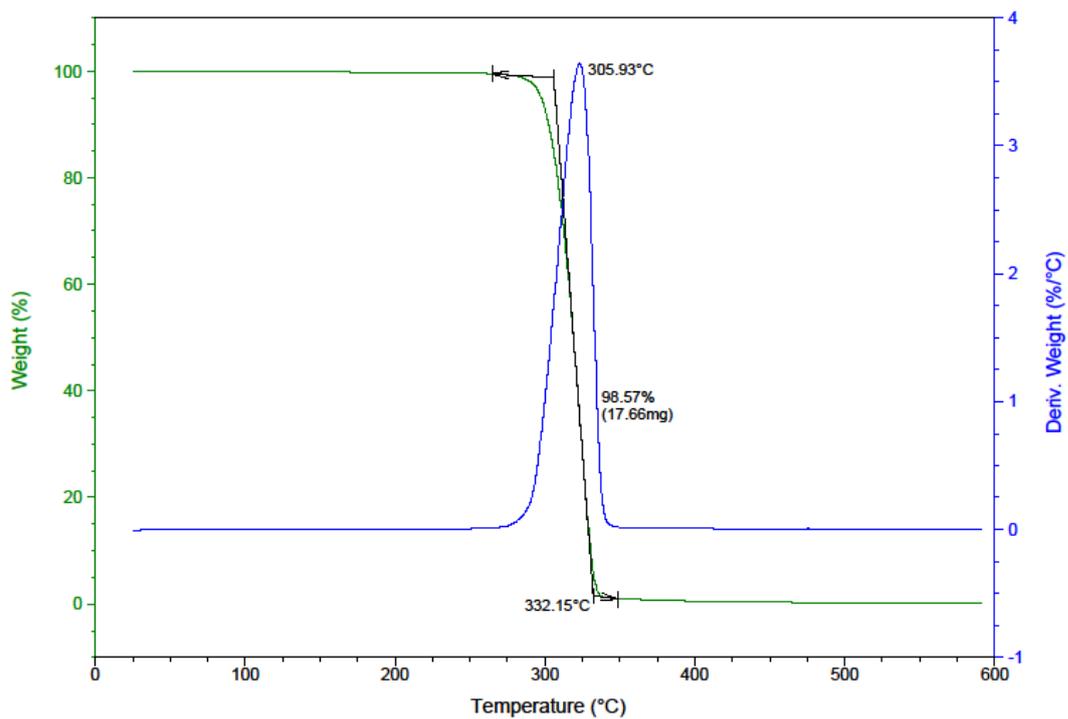


Figura C3 – Curva TG para o PHBV após 180 dias de degradação *in vitro*

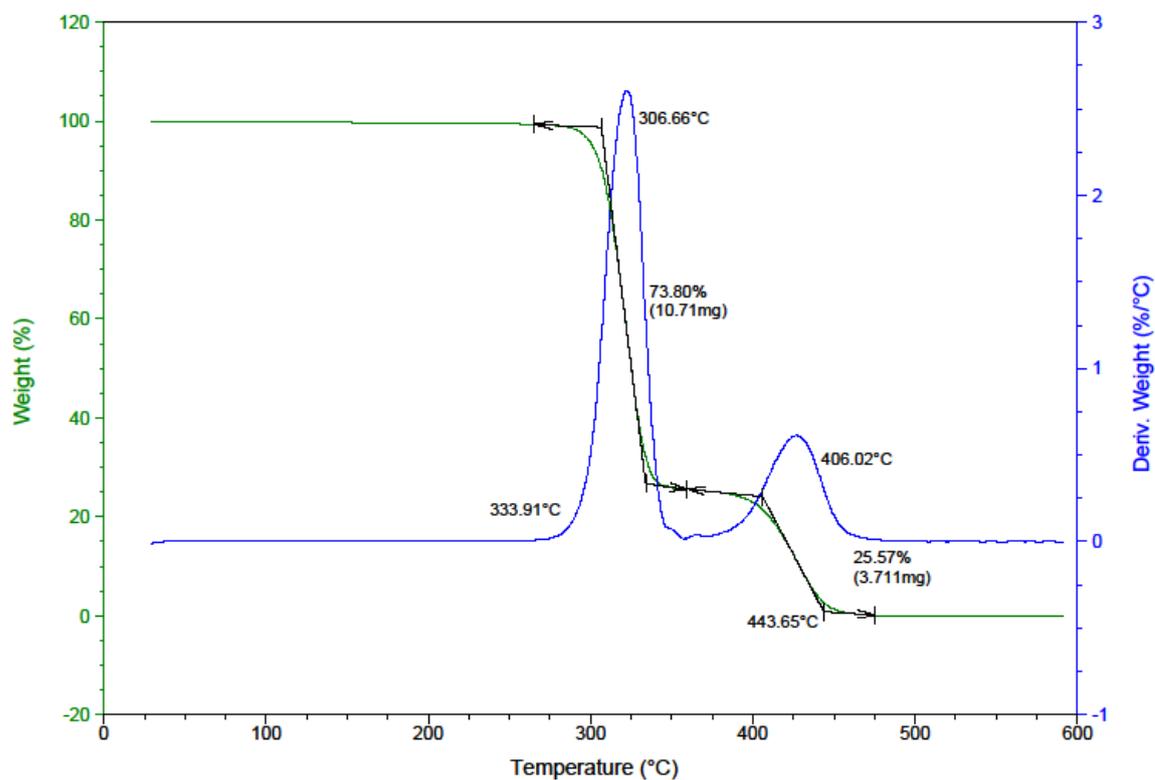


Figura C4 – Curva TG para a blenda PHBV/PCL (75/25)

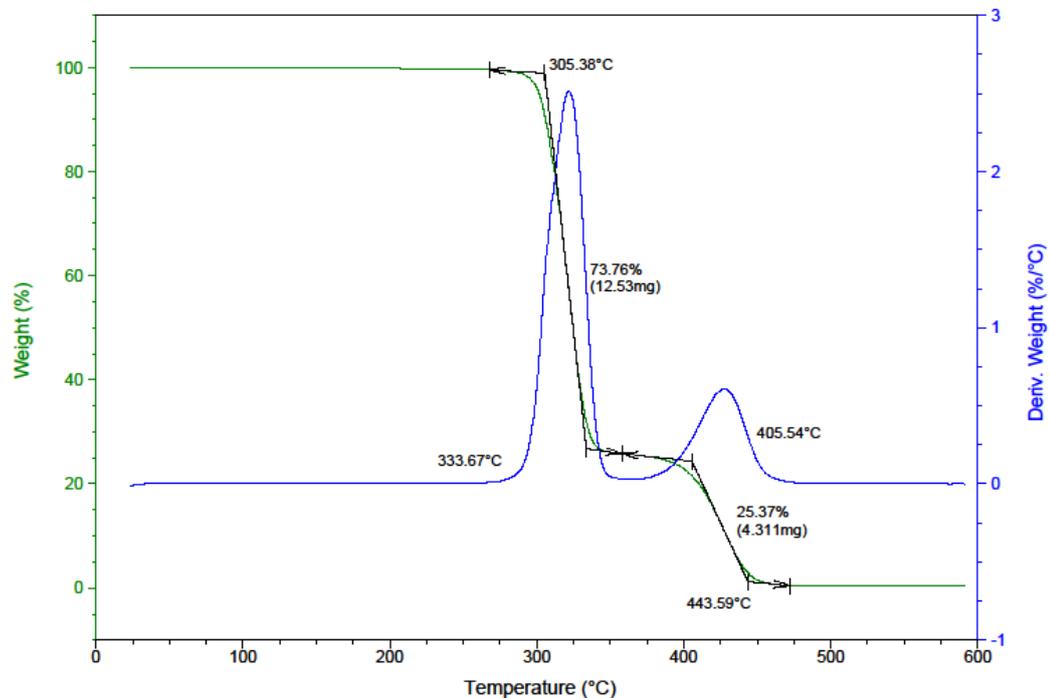
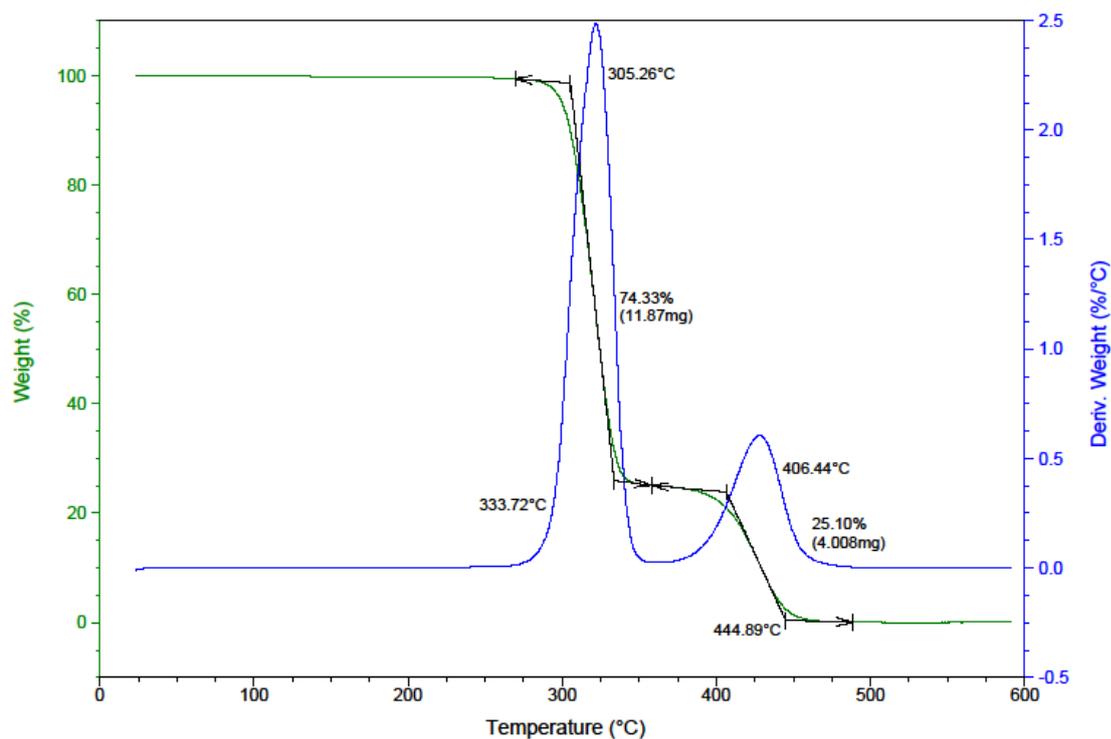
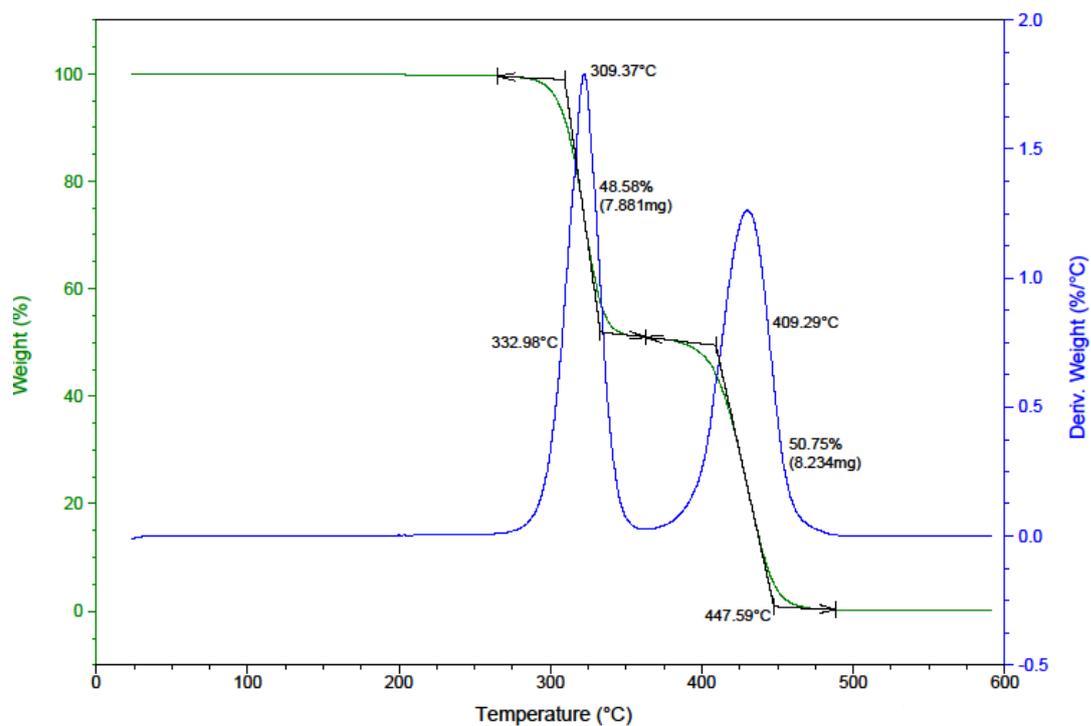


Figura C5 – Curva TG para a blenda PHBV/PCL (75/25) após 90 dias de degradação *in vitro*



**Figura C6 – Curva TG para a blenda PHBV/PCL (75/25) após 180 dias de degradação *in vitro***



**Figura C7 – Curva TG para a blenda PHBV/PCL (50/50)**

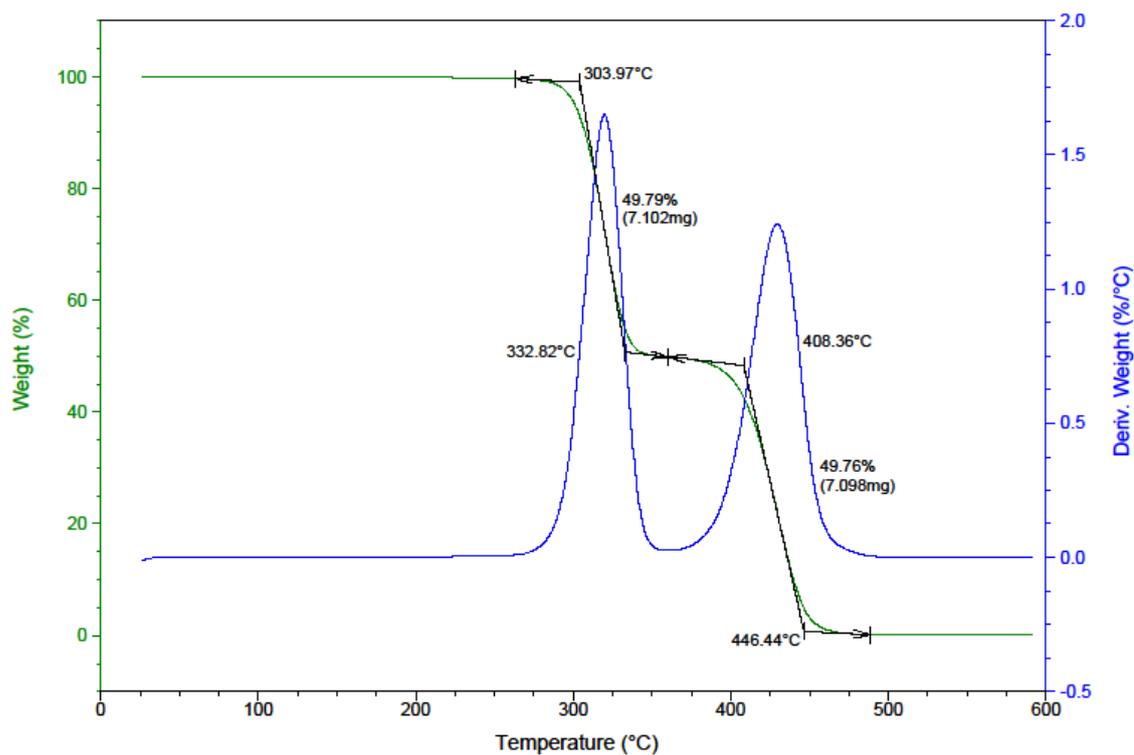


Figura C8 – Curva TG para a blenda PHBV/PCL (50/50) após 90 dias de degradação *in vitro*

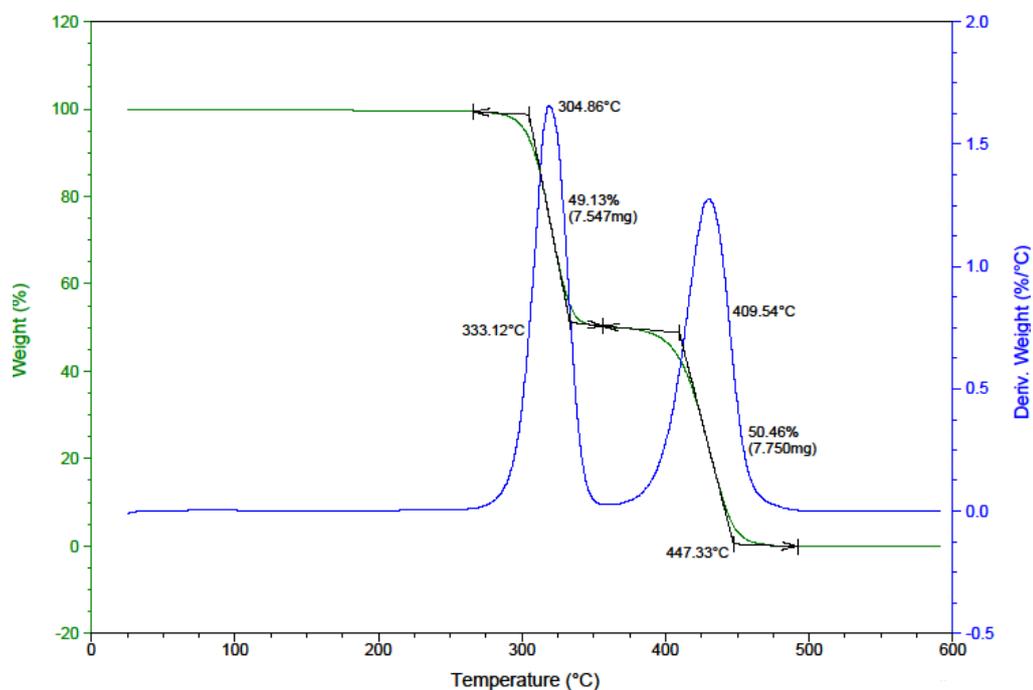


Figura C9 – Curva TG para a blenda PHBV/PCL (50/50) após 180 dias de degradação *in vitro*

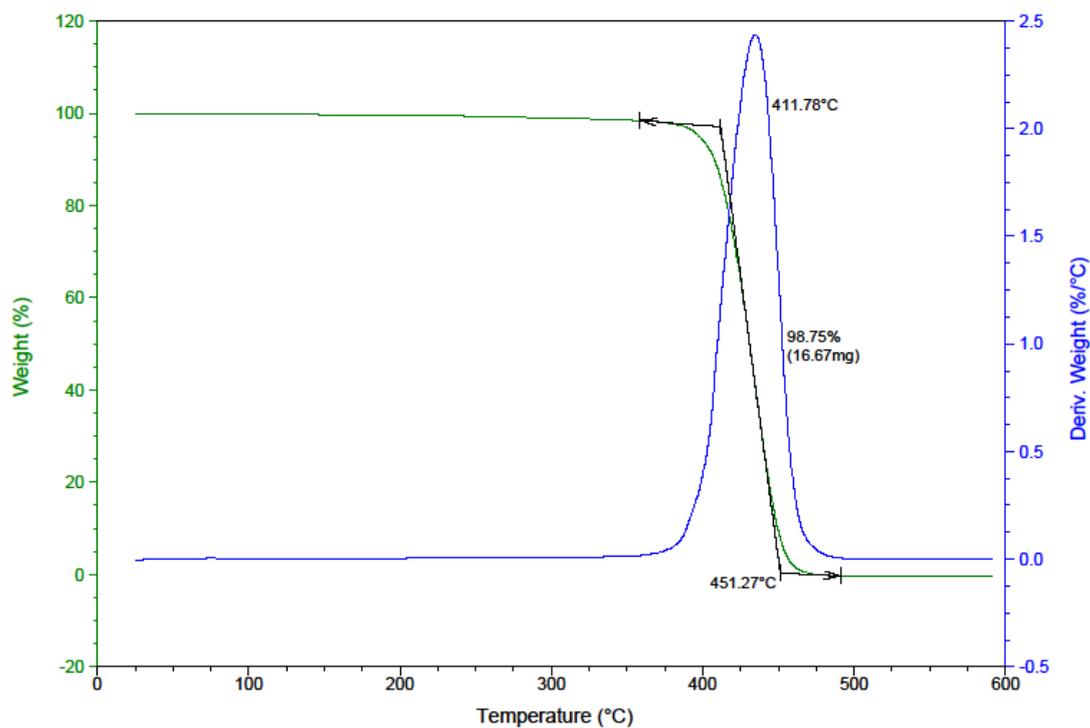


Figura C10 – Curva TG para a PCL

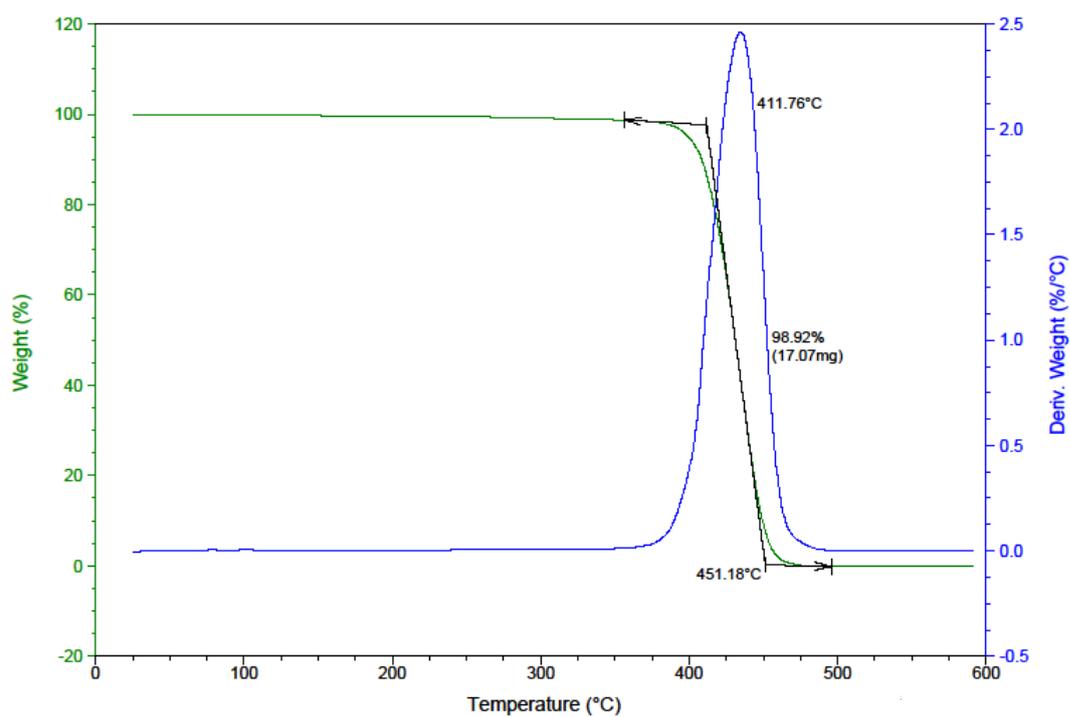


Figura C11 – Curva TG para a PCL após 90 dias de degradação *in vitro*

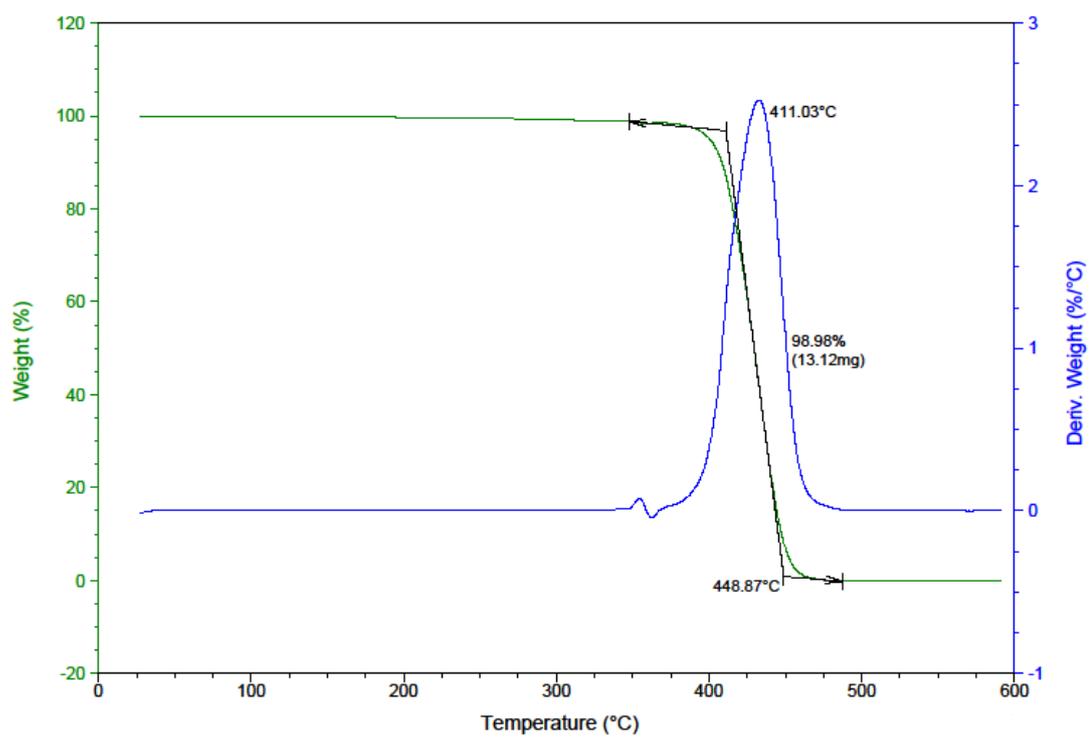


Figura C12 – Curva TG para a PCL após 180 dias de degradação *in vitro*



## ANEXO D

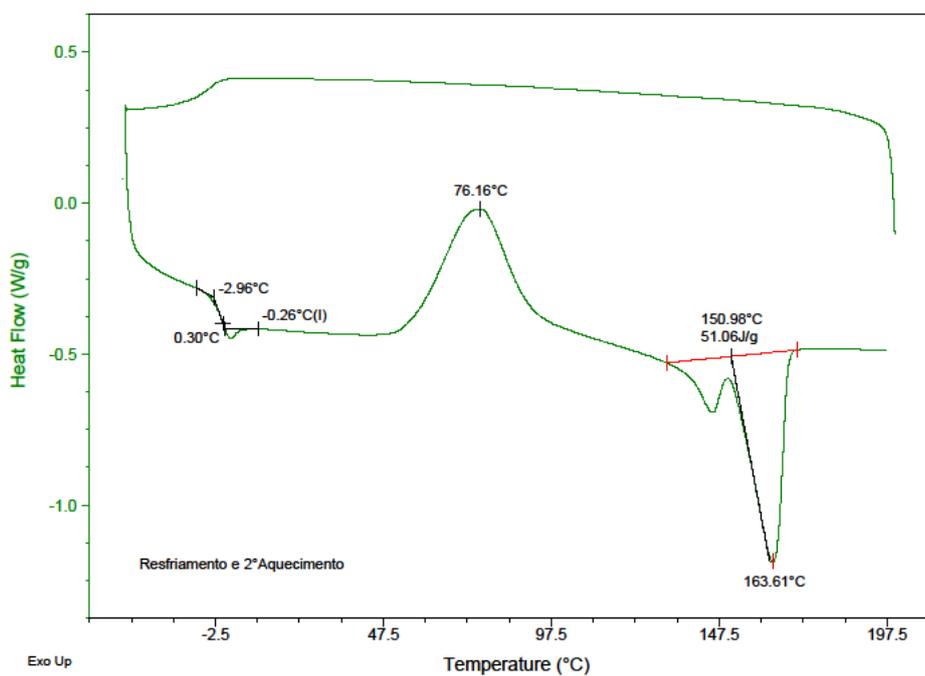
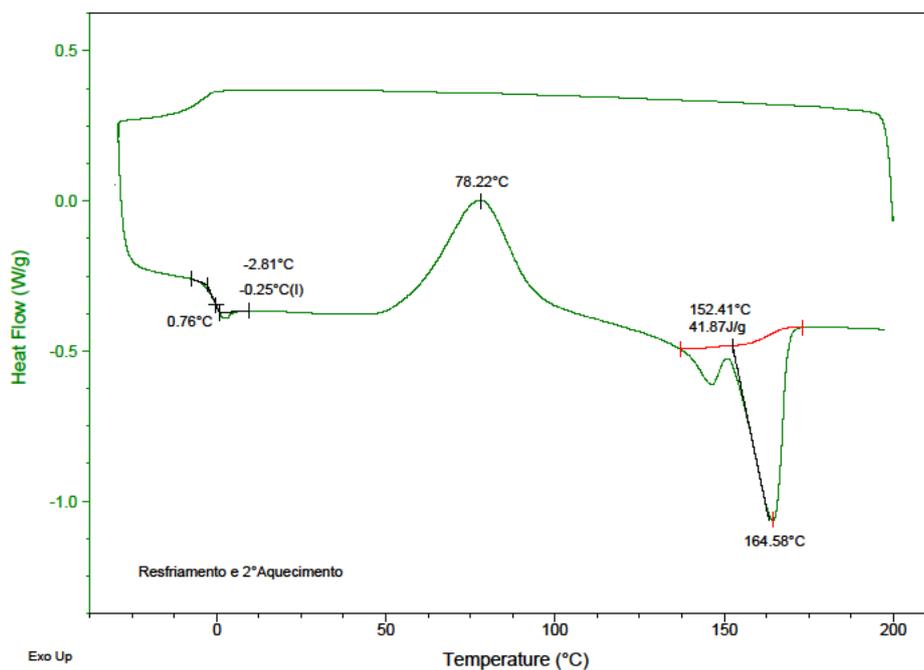


Figura D1 – Curva DSC para o PHBV

Figura D2 – Curva DSC para o PHBV após 90 dias de degradação *in vitro*

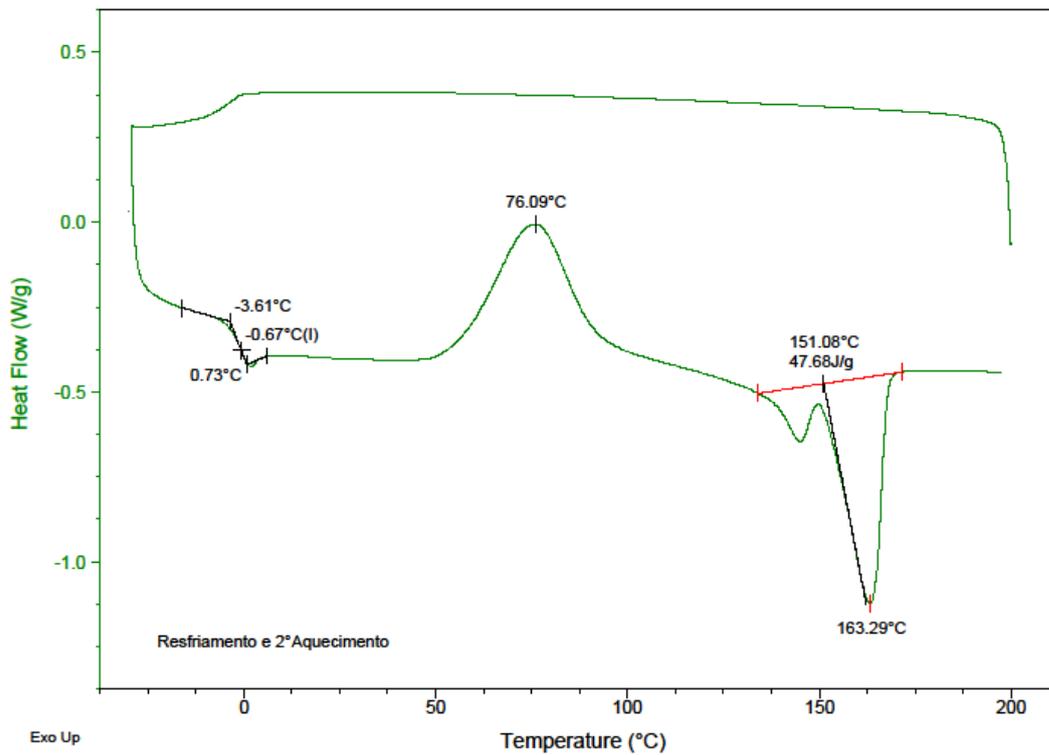


Figura D3 – Curva DSC para o PHBV após 180 dias de degradação *in vitro*

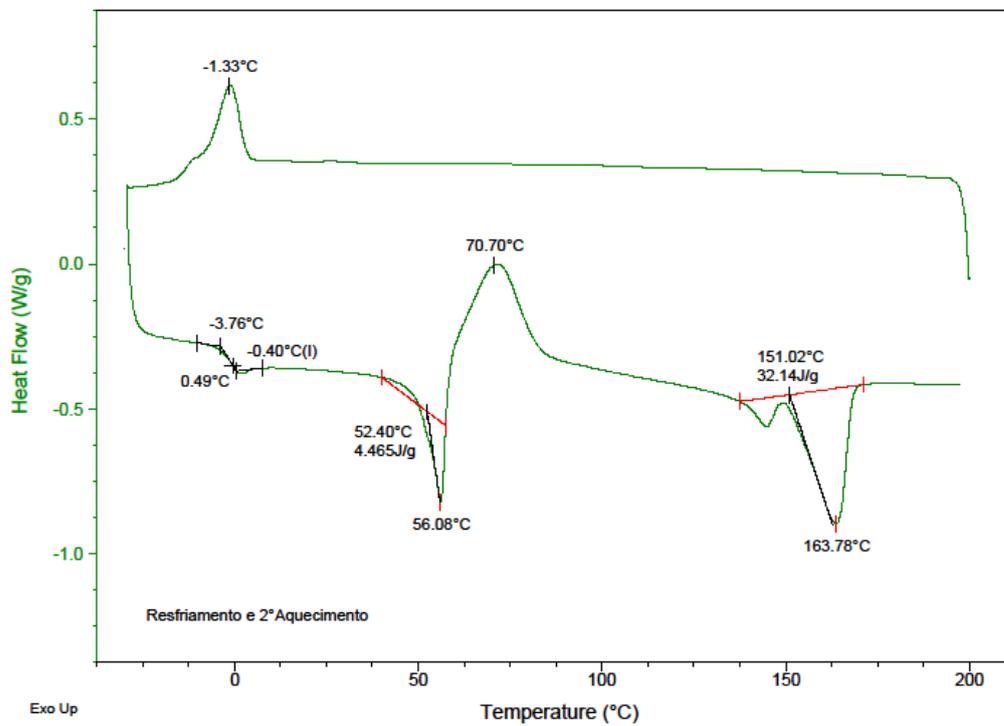
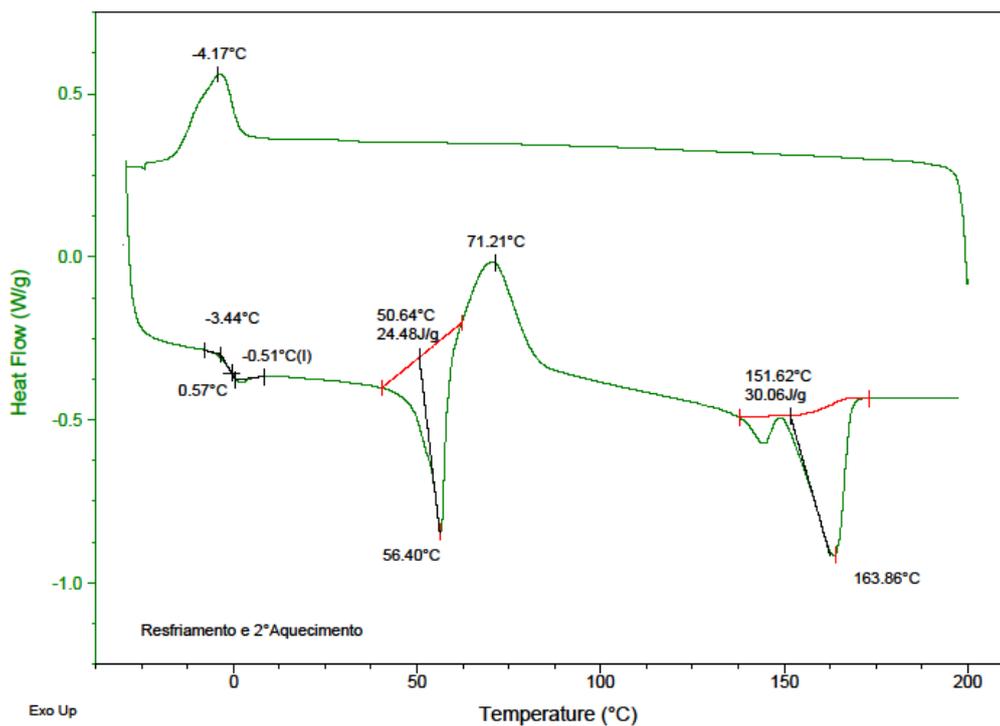
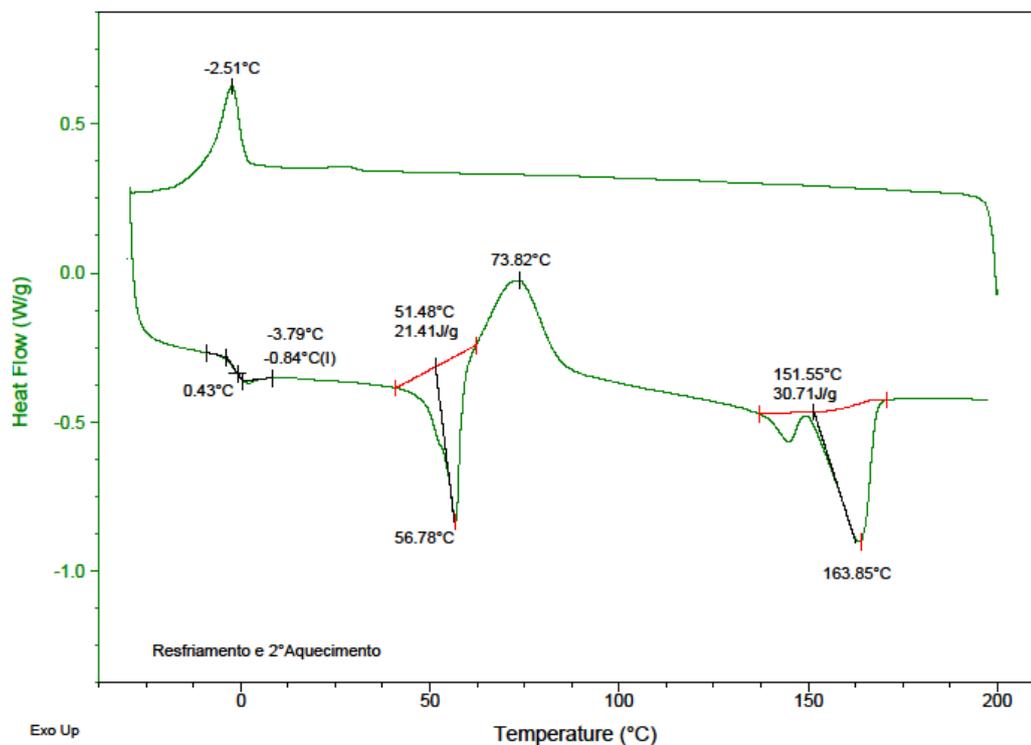


Figura D4 – Curva DSC para a blenda PHBV/PCL (75/25)



**Figura D5 – Curva DSC para a blenda PHBV/PCL (75/25) após 90 dias de degradação *in vitro***



**Figura D6 – Curva DSC para a blenda PHBV/PCL (75/25) após 180 dias de degradação *in vitro***

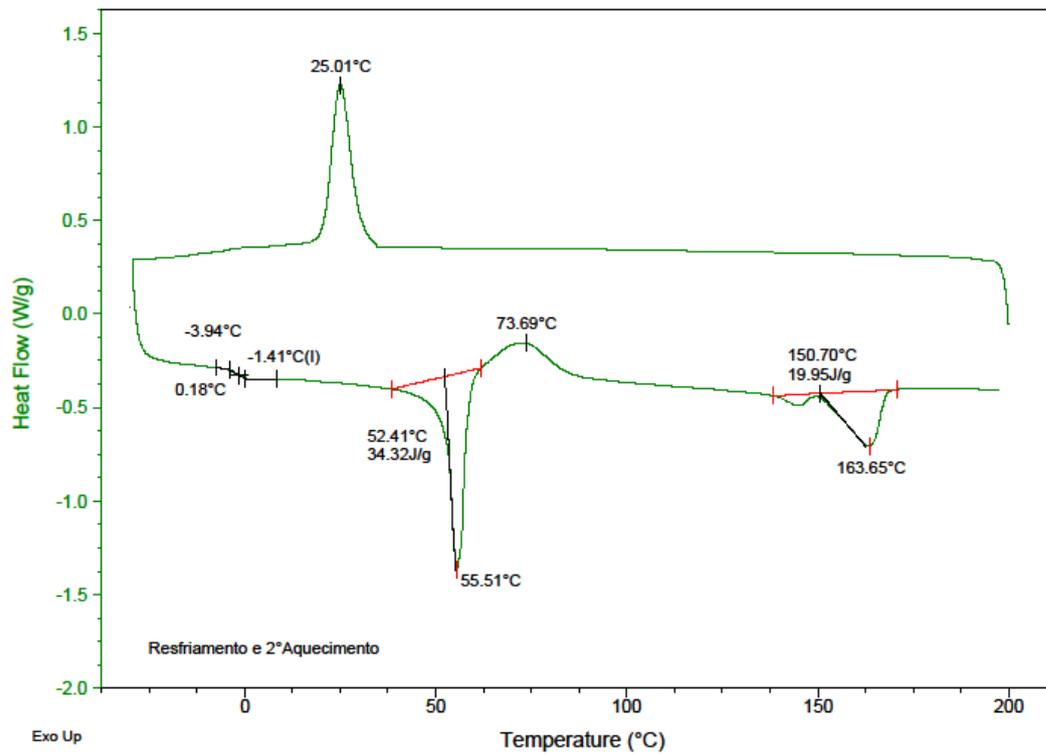


Figura D7 – Curva DSC para a blenda PHBV/PCL (50/50)

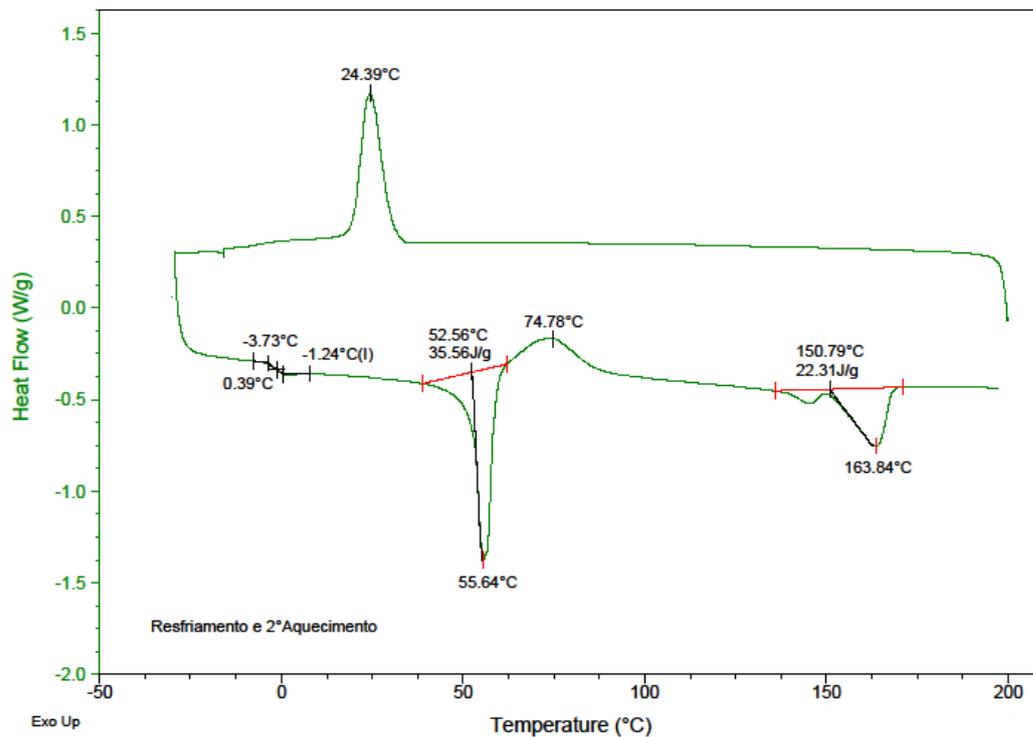
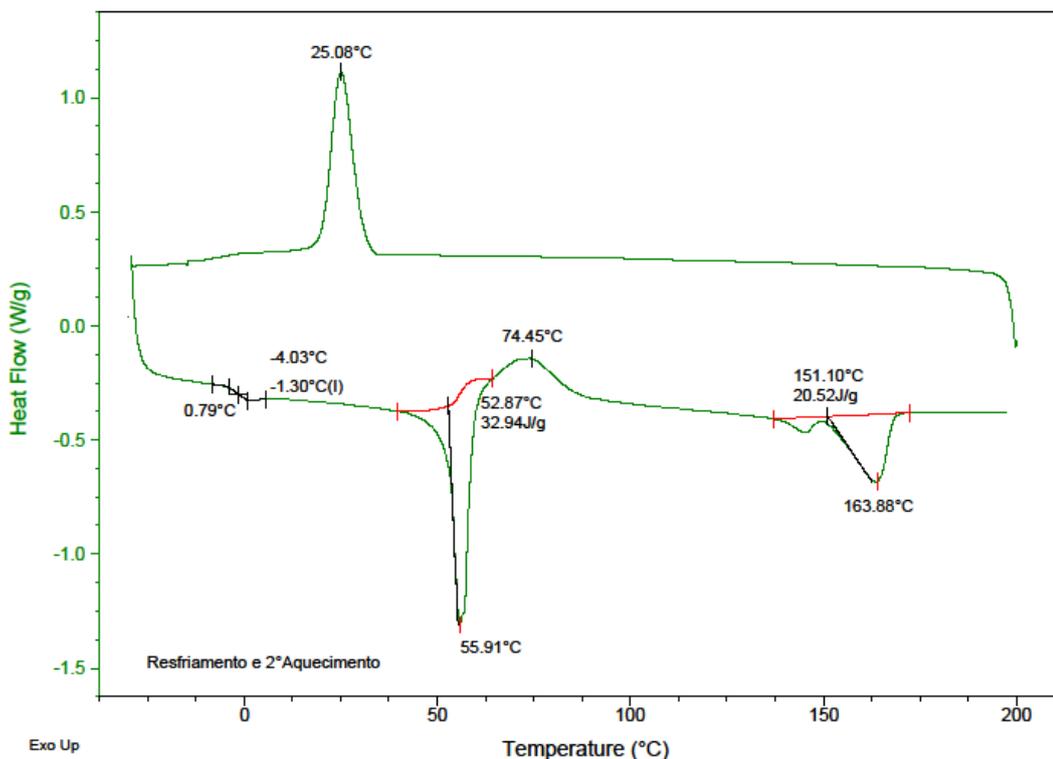
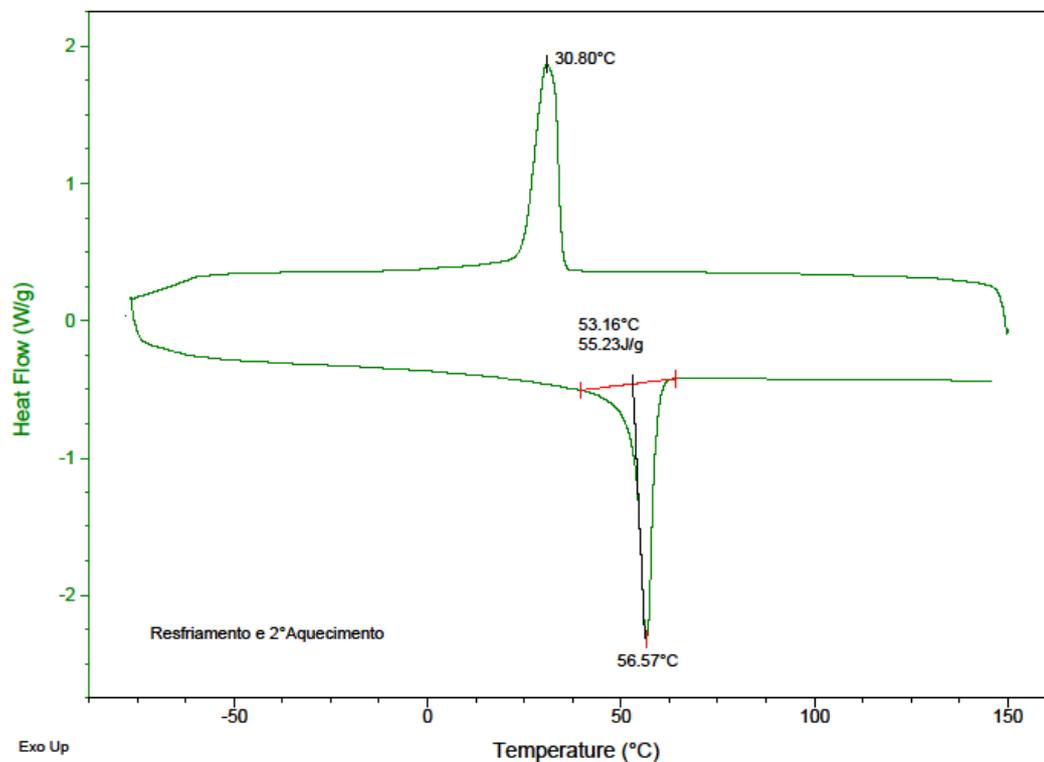


Figura D8 – Curva DSC para a blenda PHBV/PCL (50/50) após 90 dias de degradação *in vitro*



**Figura D9 – Curva DSC para a blenda PHBV/PCL (50/50) após 180 dias de degradação *in vitro***



**Figura D10 – Curva DSC para a PCL**

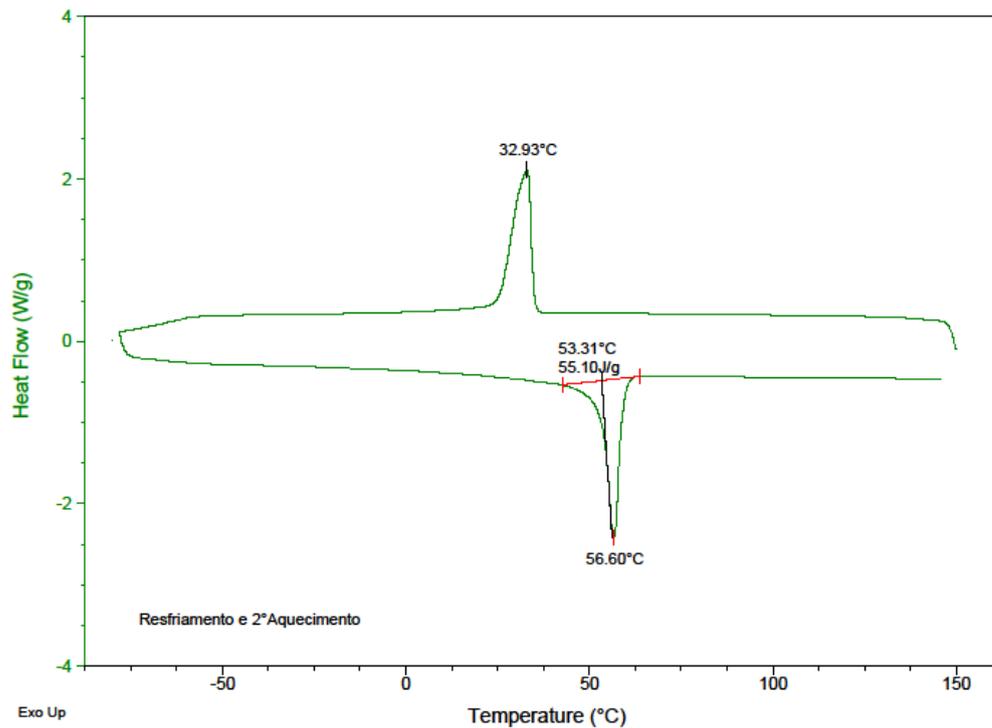


Figura D11 – Curva DSC para a PCL após 90 dias de degradação *in vitro*

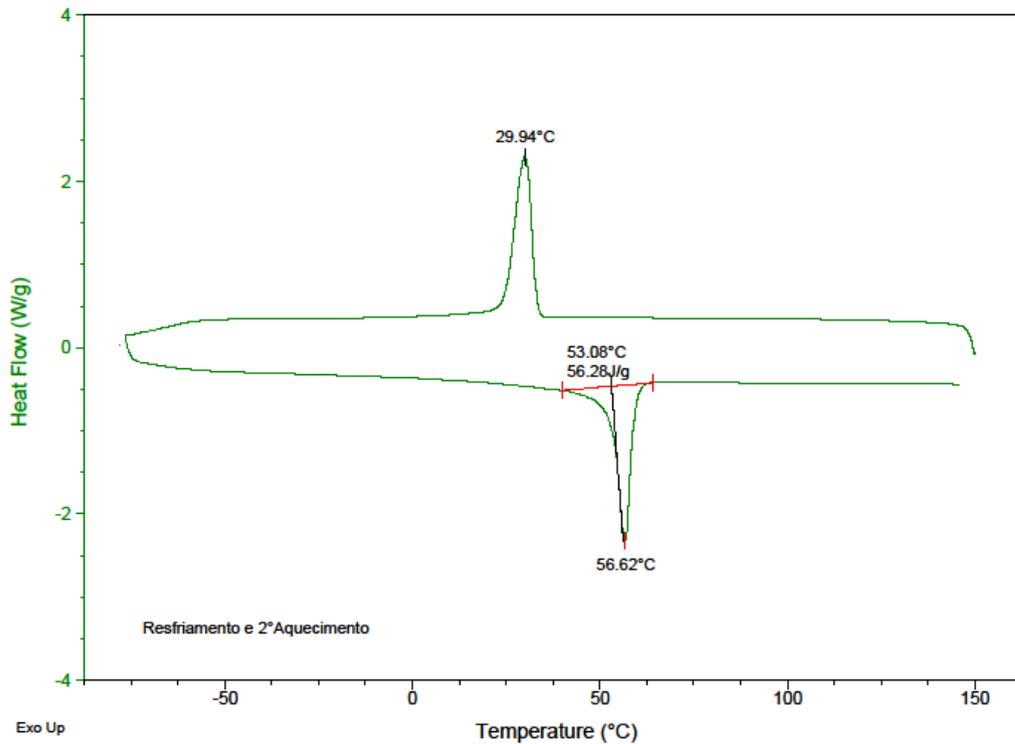


Figura D12 – Curva DSC para a PCL após 180 dias de degradação *in vitro*