

**CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA, MECÂNICA E *IN VITRO* DE  
NANOCOMPÓSITOS DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) (PHB) PARA  
APLICAÇÕES EM DISPOSITIVOS ORTOPÉDICOS**

**LUCIVAN PEREIRA BARROS JUNIOR**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

JULHO - 2014

**CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA, MECÂNICA E *IN VITRO* DE NANOCOMPÓSITOS  
DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) (PHB) PARA APLICAÇÕES EM DISPOSITIVOS  
ORTOPÉDICOS**

**LUCIVAN PEREIRA BARROS JUNIOR**

"Dissertação apresentada ao Centro de  
Ciência e Tecnologia, da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense, como parte das  
exigências para obtenção de título de Mestre  
em Engenharia e Ciência dos Materiais".

Orientador: Prof, Rubén J. Sánchez Rodríguez

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
JULHO - 2014

**CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA, MECÂNICA E *IN VITRO* DE NANOCOMPÓSITOS DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) (PHB) PARA APLICAÇÕES EM DISPOSITIVOS ORTOPÉDICOS**

**LUCIVAN PEREIRA BARROS JUNIOR**

"Dissertação apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção de título de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais".

Comissão Examinadora:

---

Dsc. Maria Inês Bruno Tavares – IMA/UFRJ

---

Dsc. Carlos Maurício Fontes Vieira - UENF

---

Dsc. Raúl Ernesto López Palacio – UENF

---

Dsc. Rubén Sánchez Rodríguez (Ciências Químicas) – UENF/CCT- LAMAV (Orientador)

*“O primeiro passo para os melhores momentos é imaginá-los.”*

Autor desconhecido.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a todos que lutam pela  
valorização da educação e do conhecimento.

## **AGRADECIMENTOS**

Durante a caminhada para alcançar nossos objetivos temos a certeza de que grandes pessoas e grandes amigos estiveram do nosso lado e colaboraram para que o resultado final fosse o melhor sempre.

Portanto, em homenagem a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a conclusão deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Assim, agradeço em primeiro lugar a Deus, pois sem o Pai maior nada seria capaz de acontecer.

Meus agradecimentos aos meus pais Lucivan e Selma que durante toda minha vida proporcionaram muito amor e o melhor ambiente para que eu pudesse ter sucesso na minha formação educacional e moral.

A minhas irmãs Rosana e Juliana pelo carinho e por trazerem à minha vida mais alegria no dia-a-dia. A minha namorada Cecília pelo amor em todas as horas.

Agradeço ao Prof. Rubén J. Sanchez Rodríguez pela oportunidade, dedicação contínua e amizade durante todos os muitos anos de convívio no LAMAV. Aos meus companheiros de trabalho Priscila e Yam por terem sido meus terceiros e quartos braços, ao Gabriel que me ajudou no início da caminhada. Aos amigos de laboratório Elaine, Camila, Darlan, Melina, Mayara, Katia e tantos outros que por aqui passaram e deixaram uma boa lembrança por momentos de descontração na hora do trabalho. Ao Michel e Renan pela paciência e assistência sempre que precisei para confecção deste trabalho. Agradeço, especialmente, ao Fabrício, a Tatiana e o Sanderson do Laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR/UENF) pela ajuda vinda em melhor hora e de boa vontade na realização dos ensaios biológicos.

Aos meus amigos leais sempre presentes e dando suporte para que eu pudesse ter onde me apoiar durante a esses anos, em especial à Bárbara e Márcia. Pelas risadas boas de cada dia, pela amenização das tensões e amizade verdadeira durante os anos dividindo as alegrias e tristezas. Ao professor Terrones pelo apoio.

E a todos os amigos e funcionários da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro que me deram todo o apoio necessário à realização deste trabalho e que foram agentes de transformação para que mais uma etapa da minha graduação fosse concluída. Obrigado.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fluxos de carbono em um sistema cíclico utilizando plásticos produzidos a partir de matérias-primas renováveis (POLATO, 2009).....	12
Figura 2 Representação 3D da estrutura do PHB (BRADLEY, 2007) .....	13
Figura 3. (A) Suturas cirúrgicas bioreabsorvíveis, (B) parafusos e placas de fixação óssea e cartilaginosa, (C) membranas biodegradáveis para tratamento periodontal e (D) malhas cirúrgicas com revestimentos de PHB para cobrimento de ferimentos (BONARTSEV et al., 2007).....	16
Figura 4 Microscopia eletrônica de varredura mostrando compósitos de PLGA contendo titânia em tamanho convencional (4,120 nm), em comparação com titânia nanofásica (32 nm) com 70/30% em peso de PLGA/titânia. As barras representam 10 micrômetros (SATO; WEBSTER, 2004).....	22
Figura 5 Grupos Hidroxilas expostos na superfície de um material em escala convencional e na escala nanométricas, respectivamente (SATO; WEBSTER, 2004).....	23
Figura 6 Curvas de tensão-deformação dos nanocompósitos de (a) SiO <sub>2</sub> Fibroso/PHBHx com 72% de Hx, (b) SiO <sub>2</sub> /PHBHx com 72% de Hx, (c) SiO <sub>2</sub> Fibroso/PHBHx com 69% de Hx e (d) SiO <sub>2</sub> /PHBHx com 69% de Hix com diferentes concentrações de carga (Xie et al., 2009) .....	24
Figura 7 Módulo de Young (a), tenacidade (a) e resistência máxima (c) dos nanocompósitos estudadas (Xie et al., 2009).....	26
Figura 8 MEV da superfície de fratura com matriz PHBHx072 pura (a), 1% de SiO <sub>2</sub> esf (b), 3% de SiO <sub>2</sub> esf (c), 5% de SiO <sub>2</sub> esf (d), vários nanovazios em 3% de SiO <sub>2</sub> esf (e), 1% de SiO <sub>2</sub> fib (f), 3% de SiO <sub>2</sub> fib (g) e 5% de SiO <sub>2</sub> fib (h) (Xie et al., 2009) .....	27
Figura 9 MEV na superfície de fratura com matriz PHBHx069 pura (a), 1% de SiO <sub>2</sub> esf (b), 1% de SiO <sub>2</sub> fib (c,d), 3% de SiO <sub>2</sub> esf (e), 3% de SiO <sub>2</sub> fib (f), 5% de SiO <sub>2</sub> esf (g,h), 5% de SiO <sub>2</sub> fib (i,j). As setas indicam as trincas formadas na amostra (Xie et al., 2009).....	28
Figura 10 Micrografias de MEV da região de fratura dos nanocompósitos com matriz PHBHx072: (a) 1% SiO <sub>2</sub> esférica, (b) 1% SiO <sub>2</sub> fibrosa, (c) 3% SiO <sub>2</sub>	

esférica, (d) 3% SiO <sub>2</sub> fibrosa, (e) 5% SiO <sub>2</sub> esférica e (f) 5% SiO <sub>2</sub> fibrosa (Xie et al., 2009) .....	29
Figura 11 Módulo de compressão (a) e resistência a compressão (b) para os nanocompósitos (Nemati Hayati et al., 2011).....	31
Figura 12 Módulo de compressão (a) e resistência à compressão (b) dos nanocompósitos com hidroxiapatita (Nemati Hayati et al., 2012).....	33
Figura 13 Micrografias de MEV de seções dos nanocompósitos com: (a) 10% nHA 20.000x, (b, c) 15% nHA 20.000x e (D, e) 20% nHA 20.000x e 40.000x (Nemati Hayati et al., 2012).....	34
Figura 14 (a) Módulo compressivo e (b) resistência à compressão da matriz de PHBV (cinza claro) e nanocompósitos de HA/PHBV (cinza escuro) (Jack et al., 2009) .....	36
Figura 15 Módulo de armazenamento versus temperatura para os compósitos: (a) HA/PHB-PHV e (b) TCP/PHB-PHV (L. J. Chen & Wang, 2002) .....	39
Figura 16 Módulo de perda versus temperatura para os compósitos: (a) HA/PHB-PHV e (b) TCP/PHB-PHV (L. J. Chen & Wang, 2002).....	40
Figura 17 Curvas Tan $\delta$ versus temperatura dos nanocompósitos: (____) PHBHV, (. . . .) PHBHV10, (- - -) PHBHV30 e ( _ _ _ _ ) PHBHV50; nas frequências: (a) 0,1 Hz, (b) 1 Hz, (c) 10 Hz e (d) 50 Hz (D. Chen et al., 2007)	41
Figura 18 Curvas de DMA para p PHBV e seus nanocompósitos: (a) módulo de armazenamento e (b) tan $\delta$ (R. Zhang et al., 2012) .....	43
Figura 19. Gráfico de DMA com variação do módulo de armazenamento com a temperatura dos biocompósitos (LEILA CORRÊA BARRETO SIQUEIRA, 2009). .....	44
Figura 20 Prensa hidráulica para moldagem dos corpos de provas.....	47
Figura 21 Máquina universal de ensaios mecânicos acoplada com sistema informatizado de captação de dados.....	48
Figura 22 Microdurômetro utilizado para os ensaios.....	48
Figura 23 Moldes metálicos para a confecção dos corpos de prova, em aço inoxidável e comum, respectivamente.....	49
Figura 24 Sistema de aquecimento uniforme. ....	49
Figura 25 Massa de PHB purificado e seco. ....	50
Figura 26 Encapsulados de PHB/ND. ....	51

Figura 27	Corpos de provas do biocompósitos PHB-x%ND na forma cilíndrica e retangular para ensaios mecânicos e termomecânicos.....	52
Figura 28	Difratograma com a curva para o cálculo da área dos picos.....	53
Figura 29	Modelo do ensaio de flexão em três pontos.....	54
Figura 30	Modelo do ensaio de compressão.....	56
Figura 36	Exemplo do cálculo do módulo de compressão/elasticidade (ASTM, 2010).....	56
Figura 32	Indentação da pirâmide de diamante em uma amostra no ensaio de microdureza.....	57
Figura 33	Diagonais da indentação impressa no material utilizada para o cálculo dos valores de microdureza. ....	58
Figura 34	Mini garra de flexão em três pontos do DMA. ....	59
Figura 35	Câmara Newbawer com células coradas para contagem. ....	62
Figura 36	Placa de cultura celular de 24 poços contendo as amostras e as células. ....	63
Figura 37	Microscopia eletrônica de varredura das capsulas de PHB/ND. ....	66
Figura 38	Micrografia no aumento de 200x e 1000x da massa de compósito da primeira formulação: PHB-9%ND.....	68
Figura 39	Micrografia no aumento de 200x e 1000x da massa de compósito da segunda formulação: PHB-12%ND.....	69
Figura 40	Micrografia no aumento de 200x da massa de compósito da terceira formulação: PHB-14%ND.....	70
Figura 41	Micrografia no aumento de 200x da massa de compósito da quarta formulação: PHB-20%ND.....	71
Figura 42	Distribuição de tamanho das partículas de PHB/ND.....	72
Figura 43	Difratogramas de raio-X obtidos para as formulações. ....	73
Figura 44	Termogramas de DSC para as amostras 1 (P3HB-9%ND), 2(P3HB-12%ND), 3 (P3HB-14%ND) e 4 (P3HB-20%ND). ....	75
Figura 45	Curvas de TGA para as amostras P3HB-9%ND, P3HB-12%ND, P3HB-14%ND, P3HB-20%ND e ND.....	76
Figura 46	Micrografia da região de fratura da formulação P3HB-9%ND .....	78
Figura 47	Micrografia da região de fratura da formulação P3HB-12%ND.....	79
Figura 48	Micrografia da região de fratura da formulação P3HB-14%ND.....	79
Figura 49	Micrografia da região de fratura da formulação P3HB-20%ND.....	80

Figura 50 Curvas de TGA para as formulações P3HB-9%ND, P3HB-12%ND, P3HB-14%ND, P3HB-20%ND, ND e PHB puro. ....	81
Figura 51 Concentração de elementos metálicos nas partículas de ND utilizadas no biocompósitos.....	82
Figura 52 Temperatura <i>on set</i> determinada na curva integral (TGA) e temperatura de máxima taxa de degradação na curva diferencial (DTG) das formulações P3HB-9%ND, P3HB-12%ND, P3HB-14%ND, P3HB-20%ND e de PHB puro.....	83
Figura 53 Efeito da concentração de ND no módulo de flexão dos biocompósitos e limites superior e inferior pré-descritos pelo modelo Voigt-Reuss. ....	85
Figura 54 Efeito da concentração de ND no módulo de flexão dos biocompósitos e linha da aproximação de Counto.....	87
Figura 55 MEV das formulações (A) P3HB-20%ND e (B) P3HB-9%ND, ressaltando o tamanho do aglomerado e a fraca interação para (A).....	88
Figura 56 Resistência a flexão teórica e experimental das formulações dos biocompósitos. ....	89
Figura 57 Micrografia mostrando aglomerados, buracos onde haviam NDs que se soltaram devido a fraca interação e fissuras na matriz para a formulação P3HB-12%ND. ....	91
Figura 58 Micrografia mostrando as partículas dispersas, bem aderidas numa matriz consolidada, para a formulação P3HB-9%ND.....	92
Figura 59 Alongamento dos biocompósitos de acordo com a concentração de ND.....	93
Figura 60 Curvas tensão-deformação para as formulações de compósito P3HB-14%ND, P3HB-20%ND e P3HB puro obtidas pelo ensaio de compressão.....	94
Figura 61 Influência da porcentagem de nanocargas (%ND) e distribuição nas propriedades compressivas da matriz ( $E_c$ , $\sigma_c$ ).....	94
Figura 62 Comportamento da microdureza de acordo com a concentração de nanodiamantes na matriz em comparação com o módulo. ....	96
Figura 63 Curva de DMA módulo de armazenamento versus temperatura.....	97
Figura 64 Curva de DMA $\tan \delta$ versus temperatura.....	98
Figura 65 Gráfico da % de Produção de NO pelos macrófagos Raw 264.7 durante o contato com os biocompósitos. Macrófagos Raw 264.7 foram	

plaqueados na concentração de $2.10^5$ células por poço de placa de 24 poços na presença ou não do biocompósito. Amostras de meio de cultura foram coletados após 1, 2, 3, 4, 7 e 9 dias após o contado das células com as amostras para avaliação de produção de óxido nítrico (NO) através do método de Griess. Culturas de macrófagos estimulados com $1 \mu\text{g/mL}$ de LPS por 24 horas foram usados como controles positivos de produção de NO na reação .	
C-: Cultura de macrófagos que não tiveram contato com o biocompósito. ....	102
Figura 66 Células mortas por LPS para controle positivo de liberação de NO e células sem contato com os biocompósitos para controle negativo de produção de NO.....	103
Figura 67 Placa de cultura celular utilizada para ensaio de produção de NO pelos macrófagos .....	104
Figura 68 Gráfico da % de liberação de LDH pelos fibroblastos durante o contato com os biocompósitos. Fibroblastos L929 foram plaqueados na concentração de $2.10^5$ células por poço de placa de 24 poços na presença ou não dos biocompósitos. Culturas de fibroblastos foram lisadas com solução de Triton 1% para ser o controle positivo de liberação de LDH.....	105
Figura 69 Micrografia ótica mostrando o crescimento celular no terceiro e sétimo dia após o contato dos fibroblastos com as amostras (A) 1, (B) 2, (C) 3 e (4). As sombras são os fragmentos dos biocompósitos. ....	107
Figura 70 Gráfico da % de liberação de LDH pelos macrófagos durante o contato com os biocompósitos. ....	108
Figura 71 Micrografias óticas dos poços contendo os fragmentos dos biocompósitos no (A) dia de contato, no (B) 1°, (C) 2°, (D) 4°, (E) 7° e (F) 9° dia após o contato, mostrando o desenvolvimento dos macrófagos.....	110
Figura 72 Micrografias óticas dos poços de controle sem contato com os biocompósitos no (A) dia de coleta, no (B) 1°, (C) 2°, (D) 4°, (E) 7° e (F) 9° dia de desenvolvimento dos macrófagos. ....	111
Figura 73 Desprendimento das células do fundo da garrafa pela movimentação dos fragmentos.....	112
Figura 74 Poços para contagem de morte celular pela revelação em azul pelo corante Trypan-blue contendo fragmentos (A) e de controle negativo (B). ....	113

Figura 75 Gráfico com as porcentagens células mortas para os poços contendo as amostras 1, 2, 3, 4, 5, controle negativo e controle positivo para liberação de LDH. .... 114

**ÍNDICE DE TABELA**

Tabela 1 Concentração de íons do SBF e do sangue humano .....	35
Tabela 2 Microdureza dos compósitos HA/PHB-PHV e TCP/PHB-PHV .....	38
Tabela 3 Tg para PHBHV e nanocompósitos de PHBHV/HA.....	42
Tabela 4 Resultados da análise dinâmico-mecânica dos nanocompósitos.....	43
Tabela 5. Tabela comparativa das propriedades mecânicas dos compósitos..	44
Tabela 6 Amostras produzidas pelo Spray Dryer com concentração e local de retirada especificado. ....	52
Tabela 7 Identificação das amostras nos poços da placa BAH.....	63
Tabela 8 Grau de cristalinidade (%) das amostras dos biocompósitos e de PHB puro estudadas.....	73
Tabela 9 Propriedades termo físicas obtidas pelo termograma de DSC e fração cristalina obtidas pelo DRX para as formulações dos compósitos PHB/ND.....	75
Tabela 10 Porcentagens de ND nas formulações dos biocompósitos.....	77
Tabela 11 Propriedades viscoelásticas das formulações.....	99
Tabela 12 Propriedades de flexão e de compressão dos biocompósitos estudados.....	100
Tabela 13 Concentração de NO produzido pelos fibroblastos L929 em contato com os biocompósitos em diferentes concentrações de ND durante 10 dias de teste.....	101



# SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA .....</b>	<b>v</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE TABELA.....</b>	<b>vii</b>
<b>SUMÁRIO .....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....</b>	<b>3</b>
<i>1.1 Objetivos.....</i>	<i>6</i>
1.1.1 Objetivo Geral .....	6
1.1.2 Objetivo Específico.....	6
<i>1.2 Justificativa .....</i>	<i>7</i>
<b>CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>8</b>
<i>2.1 Polímeros e aplicações como biomateriais.....</i>	<i>8</i>
<i>2.2 Biocompatibilidade.....</i>	<i>9</i>
<i>2.3 Poli-hidroxialcanoatos, Poli-3-hidroxi- butirato (PHB) e seus Copolímeros .....</i>	<i>10</i>
2.4.3 Características, propriedades e aplicações.....	12
2.4.4 Aplicações médicas.....	14
2.4.4.1 Dispositivos médicos de PHB .....	15
2.5 <i>Nanotecnologia: nanocompósitos.....</i>	16
2.5.1 Abordagem para aplicações ortopédicas .....	19
2.6 <i>Nanocompósitos de PHB: Comportamento mecânico.....</i>	23

<b>CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
3.1 <i>Materiais</i> .....	46
3.1.1 Especificação dos reagentes:.....	46
3.1.2 Especificação dos equipamentos .....	46
3.2 <i>Preparação dos nanocompósitos</i> .....	50
3.2.1 Purificação.....	50
3.2.2 Secagem .....	50
3.2.3 Recobrimento das partículas.....	51
3.2.4 Moldagem.....	52
3.3 <i>Caracterização dos biocompósitos</i> .....	53
3.3.1 Difração de Raio X .....	53
3.3.1 Propriedades mecânicas .....	54
3.3.1.1 Ensaio de flexão .....	54
3.3.1.2 Ensaio de compressão .....	55
3.3.1.3 Ensaio de microdureza .....	57
3.3.2 Propriedades termomecânicas.....	58
3.3.2.1 Análise Dinâmico-mecânica (DMA) .....	58
3.3.2.2 Análise de calorimetria diferencial (DSC) .....	59
3.3.2.2 Análise termogravimétrica (TGA).....	59
3.3.3 Análise morfológica .....	60
3.3.3.1 Microscopia eletrônica de varredura.....	60
3.3.4 Ensaaios biológicos <i>IN VITRO</i> .....	60
3.3.3.1 Cultura celular.....	60
3.3.3.1.1 Cultura de fibroblastos murinho L929.....	61
3.3.3.1.2 Cultura de macrófagos raw264.7 .....	61
3.3.3.2 Preparação do material para os ensaios biológicos .....	61
3.3.3.3 Teste de indução inflamatória.....	63
3.3.3.3.1 Teste da quantificação de mediadores químicos: NO.....	64
NO: Óxido nítrico .....	64
3.3.3.4 Teste de citotoxicidade .....	64
<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS .....</b>	<b>66</b>
<i>ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS ENCAPSULADOS</i> .....	66

<i>ANÁLISE DA CRISTALINIDADE E DO COMPORTAMENTO TÉRMICO</i> ....	73
<i>COMPORTAMENTO MECÂNICO DOS BIOCAMPÓSITOS</i> .....	84
<i>RELAÇÃO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS COM O OSSO</i> .....	99
<i>TESTES BIOLÓGICOS IN VITRO</i> .....	101
Teste de indução inflamatória: produção de óxido nítrico (NO) .....	101
Teste de citotoxicidade: liberação de desidrogenase láctica (LDH).....	104
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES</b> .....	<b>115</b>
<b>CAPÍTULO 6: Sugestões de continuidade do trabalho de pesquisa.</b> .....	<b>116</b>
<b>CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS</b> .....	<b>117</b>

## RESUMO

Os implantes ortopédicos existentes no mercado para aplicações em fixação de fratura óssea (Titânio, aço inoxidável e etc.) apresentam grande limitação devido à incompatibilidade das propriedades mecânicas com o osso natural, principalmente no que diz respeito ao módulo de elasticidade, propriedade que está relacionada com a quantidade de carregamento suportado pelo material em uma solicitação mecânica. Essa dissertação tem como objetivo principal o desenvolvimento de um novo material, composto de uma matriz polimérica termoplástica de poli-hidroxibutirato (PHB) carregado com uma segunda fase de nanodiamantes (ND), visando a confecção destes tipos de dispositivos ortopédicos (parafusos/pinos de fixação óssea) que possuam propriedades mecânicas mais próximas ao osso humano.

Análise de Calorimetria Diferencial (DSC) foi realizada para a avaliação da faixa de temperatura em que o material possa fundir sem que haja a degradação do mesmo.

A formulação dos nanocompósitos com diferentes composições (8,8, 11,8, 13,7 e 19,7% PHB/ND) resultou da utilização de um sistema de recobrimento/encapsulamento nas partículas de ND pela matriz de PHB. O uso desta metodologia teve como objetivo a dispersão e distribuição uniforme da carga na matriz como o objetivo principal. A análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstrou o efeito esperado.

Os resultados recaíram no estudo do efeito da adição dos NDs na matriz de PHB sobre as propriedades mecânicas na realização de ensaios de compressão, flexão e microdureza, segundo normas técnicas ASTM D695, D790 e E384, respectivamente. A avaliação das propriedades viscoelásticas e um estudo sobre o efeito da adição dos nanodiamantes na estabilidade dos nanocompósitos foram feitos por meio das análises dinâmico-mecânica (DMA) e termogravimetria (TGA). Além disso, testes *in vitro* foram realizados a fim da avaliação da citotoxicidade e da indução de resposta inflamatória do biocompósito em culturas de fibroblastos e macrófagos.

**Palavras-chave:** 1. Nanocompósitos (materiais) 2. Poli(3-hidroxibutirato) 3. Nanodiamantes 4. Dispositivos ortopédicos 5. Biomateriais.

**ABSTRACT**

Orthopedic implants in the market to bone fracture fixation (Titanium, stainless steel etc.) applications present a great limitation due to the mechanical properties incompatibility with the natural bone, mainly about the Young's modulus, which is related to the amount of load supported by the material in a mechanical stress. This thesis aims to develop a new material consisting of a thermoplastic polymer matrix of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) loaded with a second phase of nanodiamonds (ND), vising the confection of orthopedic devices (screws/pins bone fixation) that have the closest human bone mechanical properties.

The work was the development of methods for purification of PHB in order to increase the narrow window of processing this material. Differential Scanning Calorimetry (DSC) was performed to assess the temperature range at which the material may melt without degradation occurs.

The formulation of nanocomposite with different compositions (8,8, 11,8, 13,7 and 19,7% PHB/ND) resulted from the use of a system of coating/encapsulation of the ND particles by the PHB matrix. The use of this methodology aimed the ND dispersion and uniform distribution in the matrix. Morphological analysis by scanning electron microscopy (SEM) showed the expected effect.

The results were related to study the effect of the addition of ND in the PHB matrix on the mechanical based on bending, compression and microhardness tests according to ASTM D790, D695 and E384 standards, respectively. The evaluation of the viscoelastic properties and a study on the effect of the addition of ND in the stability of nanocomposites was made by dynamic mechanical analysis (DMA) and thermogravimetry (TGA). In addition, in vitro tests were performed to evaluate the cytotoxicity and the induction of inflammatory response by the biocomposite on the fibroblasts and macrophages cell cultures. A comparative study of values obtained in this work with the values of real mechanical properties of human bone was made with the aim of mapping the possible locals where the biocomposites can be applicate.

**Keywords:** 1. Nanocomposites (materials) 2. Poly(3-hydroxybutyrate) 3. Nanodiamonds 4. Orthopedic devices 5. Biomaterials.

## **CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO**

Um biomaterial é um material, que pode ser tanto natural como sintético, construído especificamente para substituir parte ou totalmente as funções de um tecido vivo do corpo humano que foi danificado ou traumatizado (RAMAKRISHNA et al., 2001). Os biomateriais são utilizados desde as civilizações mais antigas, como em olhos, orelhas, dentes e narizes artificiais presentes nas múmias egípcias e na reconstrução tecidual de partes dos corpos, desenvolvida pelos chineses e indianos. E ainda hoje muitas práticas médicas utilizam um grande número de dispositivos e implantes. Ao passar dos anos os avanços nos materiais sintéticos, nas técnicas de cirurgia e nos métodos de esterilização permitem que os biomateriais possam ser utilizados de diversas maneiras e em diversas áreas do corpo humano (RAMAKRISHNA et al., 2001).

Os biomateriais podem ter o propósito de servirem como implantes e também como dispositivos médicos. No primeiro caso são eles as suturas, placas ósseas, substituição de juntas, implantes dentários, entre outros, como dispositivos médicos pode ser utilizado em biosensores, coração artificial, vasos sanguíneos, marca-passos, etc. Apesar dos implantes e dispositivos serem utilizados para substituir/restaurar uma função de um tecido ou órgão traumatizado ou degenerado, é de suma importância que este material seja capaz também de servir como auxiliar na cura cirúrgica, promover uma melhora funcional, corrigir anomalias e melhorar a qualidade de vida dos pacientes, preservando o bem estar físico, psicológico e social do indivíduo (BURNY; DONKERWOLDKER; MUSTER, 1995; RAMAKRISHNA et al., 2001).

Pesquisadores classificam os biomateriais como bioinertes, bioativos, bioestáveis e biodegradáveis (HENCH, 1991). Porém a classificação utilizada pela engenharia divide os biomateriais nos grupos metálicos, cerâmicos, poliméricos e compósitos. Como exemplos de biomateriais metálicos pode-se citar o ouro, tântalo, aço inoxidável, ligas de titânio e etc., os materiais cerâmicos utilizados como biomateriais podem ser a alumina, zircônia, hidroxiapatita e biovidros. Um grande número de polímeros também é utilizado em aplicações médicas como o polietileno (PE), poliuretano (PU), ácido polilático (PLA), etc. E recentemente, avanços nos estudos para o

desenvolvimentos dos materiais compósitos promovem uma melhora em dispositivos ortopédicos e próteses (SCHOLZ et al., 2011) levando a excepcionais propriedades como resistência em relação à densidade e uma superior compatibilidade desses materiais (RAMAKRISHNA et al., 2001), dentre os materiais compósitos usados como biomateriais estão o polietileno de ultra alto peso molecular reforçado com fibra de carbono e resina epoxídica reforçado com fibra de carbono (RAMAKRISHNA et al., 2001).

Um desafio atual no desenvolvimento de dispositivos para uso odontológico e ortopédico é a busca de novos elementos com uma boa compatibilidade e biodegradabilidade tal que o dispositivo seja integrado à estrutura óssea sem que haja dano ao organismo em que está sendo inserido o novo material, além de propriedades, como resistência mecânica, semelhantes ao tecido humano, isto é, ao osso natural.

O osso humano é classificado como tecido duro (RAMAKRISHNA et al., 2001) e é um tecido extremamente complexo, composto por três componentes principais: matriz orgânica, componente mineral e componente celular (osteoblastos, osteoclastos e osteócitos). De acordo com o Handbook de propriedades de biomateriais os ossos podem ter o módulo de Young de 0,4 GPa para o osso esponjoso até 17,7 GPa para o osso cortical na direção longitudinal (BLACK; HASTING, 1998). Hengsberger e seus colaboradores encontraram valores do módulo de Young de  $15,0 \pm 2,5$  GPa à  $25,7 \pm 1,7$  GPa para os ossos trabecular e cortical nas direções tanto longitudinal quanto transversal por nanoindentação (HENGESBERGER S; KULIK A; ZYSSET P A, 2001). Outros autores também encontraram valores de  $18 \pm 1,7$  GPa à  $22,5 \pm 3,1$  GPa para os ossos trabecular e cortical, respectivamente, em tração (RHO et al., 1999). Quanto a resistência mecânica pode-se ter uma variação de 7,4 MPa à 133 MPa (BLACK; HASTING, 1998).

Em relação as propriedades, existe uma incompatibilidade de rigidez entre implantes metálicos ou cerâmicos existentes no mercado com o tecido natural, sendo um dos maiores problemas enfrentados em cirurgias ortopédicas, já que durante a aplicação de uma carga no sistema implante/osso a quantidade de carregamento que cada componente irá suportar está diretamente relacionada com a rigidez do material (RAMAKRISHNA et al., 2001). O titânio e o aço inoxidável, materiais metálicos utilizados em implantes,

tem seus módulos de elasticidade de 118 GPa e 206 GPa, respectivamente, a hidroxiapatita, que é um material cerâmico tem o módulo de elasticidade aproximadamente à 100 GPa (SCHOLZ et al., 2011). Esses materiais possuem valores de módulo de elasticidade muito superiores ao osso, isso faz com que o osso seja menos carregado que o implante, o que afeta a remodelagem e o processo de cura do osso, levando a uma atrofia óssea (ADAMS D; WILLIAMS D F; HILL J, 1978; CHRISTEL P; CLAES L; BROWN S A, 1991). Uma solução para este problema seria o uso de materiais poliméricos que possuem módulos relativamente mais baixos, já que essas próteses que estão em contato com o esqueleto requerem um baixo módulo de elasticidade para ser estruturalmente compatível, porém necessitam de um nível de resistência alto para assegurar a durabilidade e a praticabilidade (RAMAKRISHNA et al., 2001; SCHOLZ et al., 2011). Assim a baixa resistência característica dos polímeros impede seu uso (RAMAKRISHNA et al., 2001).

Já os materiais compósitos com matrizes poliméricas são capazes de fornecer tanto um baixo módulo, compatível com o do osso, como também uma alta resistência, pois as propriedades desses materiais podem ser adaptadas de várias maneiras (SCHOLZ et al., 2011). Se tratando de matrizes para estes compósitos, existem uma vasta gama de opções de materiais que são utilizados em biocompósitos, dentre eles dividem-se em polímeros totalmente derivado do petróleo e polímeros com base biológica parcial e total. São estes o polipropileno, poliestireno, PVC tendo como base o petróleo e o ácido polilático (PLA), que deriva da fermentação do açúcar com o ácido láctico e o poli-hidroxicanoatos (PHA), que é uma classe de polímeros produzidos por micro-organismos que o utilizam como reserva de carbono e energia (FARUK et al., 2012; SILVA, 2009).

As cargas de reforço, que é responsável pelo suporte da carga estrutural que o material recebe, podem ser do tipo fibroso ou particulado (FARUK et al., 2012). Como cargas particuladas, que é ênfase deste trabalho, tem-se nanoargilas montmorilonita, partículas de diamantes em tamanhos micro ou nanométricos, esféras de vidro bioativos, resíduo de madeira, hidroxiapatita, dentre outros (BAKAR; CHEANG; KHOR, 2003; CARASCHI; RAMOS; LEÃO, 2008; COELHO, 2003; ZHANG et al., 2011). O uso de nanocargas vem sendo cada vez mais pesquisado para aplicações médicas pelo fato de produzirem

uma melhor interação entre o implante e o novo tecido que irá se formar na interface implante/osso (SATO; WEBSTER, 2004).

O poli-3-hidroxi-butarato (P3HB) e o poli-hidroxi-valerato (PHBV) são polímeros da classe PHA mais pesquisados para biomateriais (SILVA, 2009). Com maior destaque, o P3HB que é obtido por meio de uma bactéria que quando alimentada com excesso de carbono armazena energia na forma de poliéster (CARASCHI; RAMOS; LEÃO, 2008). Esse grande interesse no PHB deve-se ao fato dele ser um polímero ambientalmente degradável, e que além de ser produzido a partir de matéria-prima renovável podem ser processados como termoplásticos convencionais. Além da possibilidade de um número infinito de aplicações (HOLMES, 1985). Este trabalho visou a utilização do PHB para o uso em dispositivos ortopédicos, em pinos de fratura óssea, associado com nanopartículas de diamantes formando um material compósito inédito na literatura.

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo Geral**

Este trabalho tem como objetivo principal a formulação e caracterização de biocompósitos utilizando matriz termoplástica de Poli-3-hidroxi-butarato (P3HB) com nanopartículas de diamantes (ND) para a produção de dispositivos para odontologia e ortopedia.

Ainda, tem como objetivo o estudo do efeito da metodologia de preparação na distribuição e interface ND – P3HB e seu impacto nas propriedades mecânicas e termomecânicas do biocompósito, assim como o estudo *in vitro* do contato de células com o biocompósito.

### **1.1.2 Objetivo Específico**

- Formular nanobiocompósitos de P3HB/ND e realizar a caracterização térmica e mecânica.

- Desenvolver uma formulação com propriedades mecânicas comparáveis as exibidas pelo osso humano;
- Analisar, o efeito da metodologia da formulação do nanocompósito P3HB/ND sobre a distribuição e dispersão das partículas de ND na matriz polimérica do biocompósito;
- Desenvolver um material que não seja citotóxico e que não gere uma resposta inflamatória ao tecido vivo;

## **1.2 Justificativa**

O desenvolvimento de biocompósitos e membranas absorvíveis as quais apresentam vantagens como ausência de um segundo ato cirúrgico e eliminação de danos aos tecidos neoformados, assim como propriedades mecânicas desejáveis são áreas de interesse da Faculdade de Odontologia de Campos (FOC), parceira nesta linha de pesquisa ou que pode vir a representar tanto uma contribuição científica como de apoio às políticas de extensão destas instituições, contribuindo para a sua consolidação.

Fundamentar com as propriedades alcançadas em trabalhos anteriores do grupo (PHB –HAP) destacando as diferenças da carga.

Ainda, a realização deste trabalho é estimulada pela falta das características físicas do compósito de poli-3-hidroxitirato e nanodiamantes descrita na literatura, bem como a ausência de estudos de avaliação mecânica dos dispositivos de fixação de fratura óssea fabricados a partir de nanocompósito utilizando nanodiamantes e P3HB.

## **CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### ***2.1 Polímeros e aplicações como biomateriais***

Nas últimas décadas os polímeros têm chamado bastante atenção dos pesquisadores que visam a utilização desses materiais em biomateriais. Visam a criação de implantes que possam servir de núcleo de crescimento para o novo tecido natural, uma vez danificado, a partir de células específicas (LANGER R, 1993). Como consequência, tem-se a integração total da célula (MOONEY DJ, 1995).

Os polímeros biodegradáveis sofrem degradação via hidrólise ou ataque enzimático, e os subprodutos dessas reações são metabolizadas pelo organismo e depois liberados via excreção normal (HOWARD GT, 2002) o que os torna ideal para o uso como biomateriais. É o que ocorre com os poliésteres alifáticos que são obtidos através de poli- $\alpha$ -hidróxi-ácidos tais como poli(ácido-láctico), poli(ácido-glicólico) e poli(caprolactona) (LEE SJ, 2002; PEKTOK E, 2008; SAHOO S, 2007).

Dessa forma, a criação de um material que permita uma resposta inerte ao tecido é o objetivo do desenvolvimento de biomateriais, que tem como ênfase a produção de componentes bioativos que forneçam uma reação fisiológica controlada no ambiente do tecido (HENCH LL, 2002).

Um novo interesse que vem aparecendo frequentemente nos estudos é a produção de polímeros já existentes a partir de fontes naturais ou renováveis, com a finalidade da formação do mesmo polímero, desta vez classificado como biopolímero. Ramires (2010) que estudou o desenvolvimento de biocompósitos a partir de matrizes poliméricas e reforços com a maior proporção de componentes de fontes naturais possível, produziu em seu trabalho resinas fenólicas, que são amplamente conhecidas e usadas devido as suas excelentes propriedades, como estabilidade térmica e dimensional, resistência química, resistência a chama, a partir de matéria-prima renovável (RAMIRES, 2010).

A resina fenólica, basicamente obtida de fonte não renovável como o fenol e o formaldeído, foi produzida a partir da substituição desses reagentes

por reagentes equivalentes naturais, como o tanino e a lignina no lugar do fenol e o glicoxal, um aldeído que pode ser obtido de fontes naturais no lugar do formaldeído. Ramires (2010) indica que a lignina e o tanino são capazes de substituir o fenol na produção das matrizes fenólicas, sem que haja perda nas propriedades da mesma (RAMIRES, 2010).

Entre os polímeros biodegradáveis estão o ácido Poliláctico (PLA), Policaprolactona (PCL), a Resina biodegradável a base de soja, o poli-Butileno succinato (PBS) e o Poli-3-hidroxi-butilato (P3HB).

## **2.2 Biocompatibilidade**

A biocompatibilidade consiste na habilidade de um material em desempenhar uma resposta benéfica e/ou apropriada no hospedeiro em uma dada aplicação. A resposta apropriada envolve a aceitação do implante artificial tanto pelos tecidos circundantes à prótese quanto do organismo como um todo (ANDERSON, 2009).

A biocompatibilidade está associada ao sucesso do implante no organismo, e além das propriedades do material, ela depende do contexto em que o tal material será utilizado, das técnicas de cirúrgica e das condições de saúde do paciente (BOUILLAGUET S, WATAHA JC, TAY FR, BRACKETT MG, 2006). Assim, o material que é biocompatível não deve provocar uma resposta inflamatória, não pode ser citotóxico ou imunogênico, além de dever proporcionar propriedades mecânicas adequadas para que ele não falhe durante o uso e nas atividades normais do hospedeiro (ANDERSON, 2009). E são chamados de biomateriais.

Os biomateriais já são considerados hoje em dia como uma nova classe de materiais, principalmente devido às suas especificidades.

Os biomateriais podem ser metálicos, cerâmicos, poliméricos sintéticos e poliméricos naturais, compósitos ou de biorecobrimento. Em 1930 os aços inoxidáveis foram introduzidos, assim como ligas de outros metais como cromo e cobalto. Esses materiais obtiveram grande aceitação nas fixações de fraturas e aparecendo nas primeiras cirurgias de substituição de articulações (BRONZINO J D, 1999). Com os materiais poliméricos, a sua não toxicidade foi

descoberta na II Guerra Mundial, onde pilotos de aviões eram atingidos por fragmentos de polimetilmetacrilato (PMMA) das aeronaves e não sofreram reações malélicas com a presença do material estranho no corpo, tornando o uso do PMMA difundido para o uso de implantes, como córnea e ossos do crânio devido a traumas diversos. No início do século XX, quando os plásticos sintéticos começaram a surgir em grande quantidade no mundo e pela sua fácil fabricação, deu-se então a um grande volume de produção de implantes experimentais a partir desses materiais. E o avanço dos polímeros nas últimas décadas possibilitou uma considerável progressão nas muitas áreas da ciência e biotecnologia (RATNER BD, 2004).

Desse modo os biomateriais são geralmente definidos como materiais sintéticos ou naturais, sólidos ou líquidos, dependendo do destino que o material terá como aplicação, utilizados em dispositivos médicos ou em contato com sistemas e organismos biológicos (TWEEDEN KS, 1995). De acordo com Williams (1987), os biomateriais são quaisquer substâncias e/ou combinações de substâncias, com origens sintéticas ou naturais, que podem ser usadas por um período de tempo longo e/ou indeterminado, substituindo uma parte ou todo sistema biológico danificado, sendo um órgão, tecido ou função do organismo em questão (WILLIAMS, 1987).

Sendo assim, esses materiais devem ser biocompatíveis, ou seja, devem atender ao requisito da aplicação o qual foram projetados, isto é, não devem estimular ou provocar nenhum tipo de reação alérgica e/ou inflamatória.

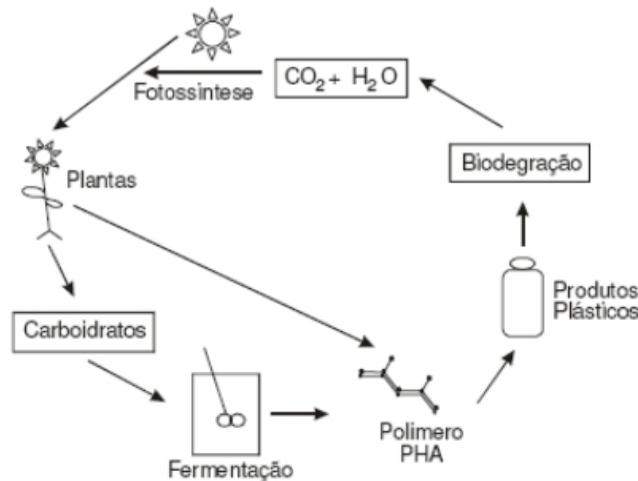
### **2.3 Poli-hidroxicanoatos, Poli-3-hidroxi-butirato (PHB) e seus Copolímeros**

O poli-3-hidroxi-butirato (P3HB), que também pode ser chamado simplesmente de poli-hidroxi-butirato (PHB) (ANDRADE, 2006), foi o primeiro biopolímero da família dos PHAs a ser sintetizados por meio do *Bacillus megaterium*, em 1923 pelo microbiologista Maurice Lemoigne. Porém só em 1958 a sua verdadeira função como reserva de energia e de carbono foi descoberta por Macre e Wilkinson (CARMINATTI, CRISTIANE, FILIPE EL MESSANE, MARIA CECÍLIA ZANCHET BRANDÃO, 2006; TELLES; SARAN; UNÊDA-TREVISOLLI, 2011). O interesse por esses polímeros biodegradáveis

aumentou na década de 60 quando suas propriedades foram mais amplamente estudadas e consideradas semelhantes às propriedades de polímeros termoplásticos (CARMINATTI, CRISTIANE, FILIPE EL MESSANE, MARIA CECÍLIA ZANCHET BRANDÃO, 2006), principalmente quando se fala de sua conformação, como o copolímero P3HB-3HV, formado pelos monômeros 3-hidroxi-butirato e 3-hidroxi-valerato, que pode ser moldado termoplasticamente e processado sob a forma de fibras, folhas e também na forma tridimensional (ANDRADE, 2006).

Entre os biopolímeros, os Poli-hidroxiácidoalcanoatos (PHAs) destacam-se para a produção de biomateriais, pois suas propriedades assemelham-se aos termoplásticos derivados do petróleo, principalmente devido à sua elevada massa molar, porém podem ser produzidos por meio de matéria-prima renovável e são biodegradáveis, oferecendo assim um ciclo fechado (FIGURA 1), minimizando o impacto deste material no meio ambiente (SCHIMIDT, 2011), pois integram-se mais rapidamente à natureza, quando descartados em condições em que sua decomposição é favorecida (TELLES; SARAN; UNÉDA-TREVISOLLI, 2011). Além disso, os PHAs podem ser reciclados e incinerados sem gerar resíduos tóxicos (CARMINATTI, CRISTIANE, FILIPE EL MESSANE, MARIA CECÍLIA ZANCHET BRANDÃO, 2006).

O Poli-hidroxiácidoalcanoato (PHA) é da família dos poliésteres microbiológicos, isto é polímeros biodegradáveis que são produzidos a partir de micro-organismos, que precisam acumular uma reserva energética (SCHIMIDT, 2011; SILVA, 2009). Mais de 300 micro-organismos são capazes de produzir os PHAs, porém para a produção industrial somente alguns apresentam um rendimento apropriado (RODRÍGUEZ et al., 2003; SCHIMIDT, 2011; SILVA et al., 2000).



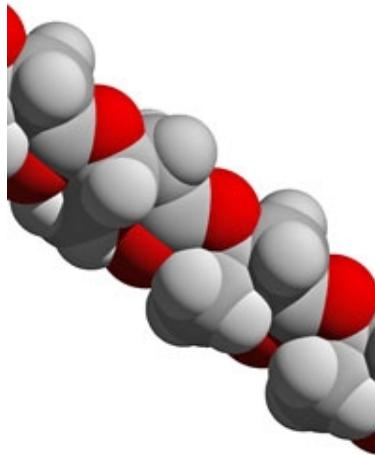
**Figura 1. Fluxos de carbono em um sistema cíclico utilizando plásticos produzidos a partir de matérias-primas renováveis (POLATO, 2009).**

As propriedades mecânicas e físicas desses poliésteres estão relacionadas com a composição monomérica, peso molecular e distribuição de peso molecular do polímero. E o peso dos polímeros depende do micro-organismo que irá produzi-lo, das condições de crescimento da cultura de bactéria e da natureza da fonte de carbono (CARMINATTI, CRISTIANE, FILIPE EL MESSANE, MARIA CECÍLIA ZANCHET BRANDÃO, 2006; SCHIMIDT, 2011). Pelo menos 100 diferentes monômeros já foram identificados como constituintes de PHAs sintetizados por bactérias, demonstrando a grande diversidade do material, aumentando a gama de aplicações dos PHAs (SCHIMIDT, 2011; WALTER BORZANI et al., 2001).

### 2.4.3 Características, propriedades e aplicações

Os PHAs apresentam uma vasta variação em suas propriedades, desde materiais rígidos e quebradiços até plásticos com ótimas propriedades de impacto e elastômeros resistentes, sendo influência do tamanho dos grupos alcanos ramificados e da sua composição. São polímeros com alta resistência a umidade, hidrofóbicos, podendo ser utilizados na indústria alimentícia e em produtos de higiene, já que também são biodegradáveis (MACHADO; PEREIRA, 2010).

A estereoregularidade do PHB faz com que este polímero seja um material altamente cristalino. No estado sólido sua cadeia é uma hélice compacta (FIGURA 2) de duas roscas, ou seja, duas unidades de monômeros para completar uma da hélice (BRAUNEGG; LEFEBVRE; GENSER, 1998). Assim ele possui uma excepcional regularidade estereoquímica, com cadeias lineares e todos os carbonos quirais possuindo configuração estereoquímica-R, como consequência sua cadeia é totalmente isotática, tornando-o capaz de ter uma cristalinidade na faixa de 55 à 80% (MACHADO; PEREIRA, 2010).



**Figura 2 Representação 3D da estrutura do PHB** (BRADLEY, 2007)

O PHB possui várias propriedades em comum com o polipropileno (PP), inclusive seu ponto de fusão de 177°C se aproxima do PP. Porém o biopolímero é mais frágil e mais rígido (BRAUNEGG; LEFEBVRE; GENSER, 1998), principalmente devido à sua alta cristalinidade. Para contornar este fato e diminuir a porcentagem cristalina do PHB comonômeros são sintetizados para formação de copolímeros, comonômeros de 3-hidroxicaproato (3-HV), 3-hidroxiisovalerato (3-HP) e 4-hidroxiisobutirato (4-HB), geralmente são utilizados. A menor cristalinidade está relacionada às maiores massas molares desses comonômeros, o que deixa o processo de cristalização mais lento. Estudos constatam que a cristalinidade dos copolímeros diminui com frações maiores de unidades monoméricas de 3-HP e HV (BRAUNEGG; LEFEBVRE; GENSER, 1998; MACHADO; PEREIRA, 2010).

Um problema maior que o PHB apresenta e que também pode ser minimizado pela formulação de copolímeros é a sua alta instabilidade térmica e alta velocidade de degradação, devido à estreita faixa de temperatura entre a degradação e a fusão, dificultando seu processamento. A adição de plastificantes pode aumentar a estabilidade térmica do biopolímero, pois diminuem sua temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e temperatura de fusão ( $T_m$ ) para valores mais baixos (KONING, 1995).

Outras propriedades que o PHB possui e está diretamente relacionada ao seu arranjo molecular de dupla hélice é a piezoelectricidade. A simetria particular dos cristais de PHB gerará uma carga quando este se submeter à uma deformação cisalhante. Esta propriedade, infelizmente, somente capacita o PHB em aplicações específicas tais como em sensores de pressão em selagem a quente (HOLMES, 1985).

Embora as propriedades físicas dos PHAs abrangem dos sólidos rígidos até as borrachas macias, o custo de produção em comparação aos polímeros de origem petroquímica (KAHAR et al., 2004) limita as aplicações em produtos de baixo valor agregado. Porém, diversos estudos investigam novas alternativas de matéria-prima para a produção dos PHAs com um menor custo de produção, tendo em vista que 40% dos custos de produção estão relacionados com a matéria-prima. É o caso de Oliveira e seus colaboradores (2004) que propõem o uso do processo de fermentação em estado sólido para a produção dos PHAs utilizando como matéria-prima resíduos agroindustriais. Este processo tem um alto rendimento e ainda estaria contribuindo para resolver o problema da disposição desses resíduos no meio ambiente (OLIVEIRA et al., 2007).

#### **2.4.4 Aplicações médicas**

Nos últimos anos os PHAs têm atraído muita atenção como possíveis substitutos de polímeros convencionais derivados de fonte não renovável, como o petróleo, e por apresentarem a possibilidade de aplicações nas áreas médicas. Pois além de biodegradáveis, são também biocompatíveis (MACHADO; PEREIRA, 2010).

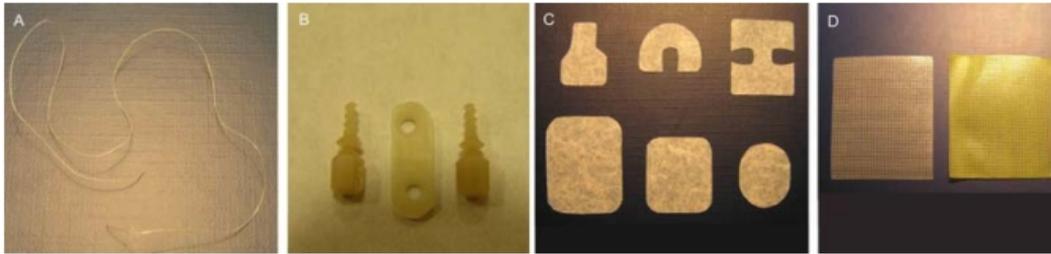
O P3HB foi inicialmente proposto para aplicações médicas típicas tais como suturas, placas ósseas, talas, microcápsulas, gazes, e na forma de pó como lubrificante de luvas (HOLMES, 1985; MILLER; WILLIAMS, 1986). O corpo externo/estranho, implantes e/ou próteses de PHB produz uma resposta excepcionalmente suave e a sua biodegradabilidade é muito lenta.

O fato de materiais cirúrgicos, cotonetes e etc. serem deixados por médicos dentro dos pacientes geram ações judiciais muito caras só nos Estados Unidos, e o uso do PHB nesses materiais diminuiria essa preocupação, já que ele irá se biodegradar.

O principal objetivo dos pesquisadores, na verdade, é a obtenção de um material que substitua a parte do organismo danificada e ao mesmo tempo sirva como substrato para o crescimento do tecido natural, enquanto se degrada. Um exemplo prático seria o enxerto vascular ou vaso sanguíneo compostos por fibras muito finas de PHB dispostas em forma de tubos impermeáveis à água com diâmetro adequado. Este tubo atuaria como um “esqueleto” temporário para o crescimento de novos tecidos, e como consequência, a partir da degradação do biomaterial, este seria totalmente substituído pelo tecido natural. Isso evitaria formação de bloqueios em artérias sintéticas, que surgem em resposta ao organismo estranho não-degradante na parede do vaso (HOLMES, 1985).

#### *2.4.4.1 Dispositivos médicos de PHB*

O desenvolvimento de dispositivos médicos já é uma realidade no que se diz respeito as cirurgias dentárias, ortopédicas, craniomaxilofacial e de pele. A figura 3 mostra os dispositivos médicos tendo como base o P3HB (BONARTSEV et al., 2007).



**Figura 3. (A) Suturas cirúrgicas bioreabsorvíveis, (B) parafusos e placas de fixação óssea e cartilaginosa, (C) membranas biodegradáveis para tratamento periodontal e (D) malhas cirúrgicas com revestimentos de PHB para cobrimento de ferimentos (BONARTSEV et al., 2007)**

### **2.5 Nanotecnologia: nanocompósitos**

Há no mundo uma necessidade constante de inovação que provoca cada vez mais o domínio da dimensão nanométrica, capaz de ser a grande chave para uma revolução tecnológica (ARAKI, 2007).

A unidade de medida usada na nanotecnologia é o nanômetro ( $10^{-9}$  metros) e a palavra nanotecnologia é derivada dessa ordem de grandeza e de tecnologia. Deste modo, nessa área tem-se o estudo e utilização de tecnologias aplicadas em escalas nanométricas (STEINMETZ, 2006). Seu desenvolvimento tem tornando possível a preparação de novos nanomateriais, como nanocompósitos e nanotubos (ARAKI, 2007).

Vale ressaltar a diferença entre nanociência e nanotecnologia. A nanociência estuda e manipula materiais nas três escalas – macromolecular, molecular e atômica – com propriedades diferentes quando comparada com escalas maiores. Já as nanotecnologias fazem o design, caracterizam, produzem e aplicam dispositivos na escala nanométrica. Apesar das diferenças, é comum usar o termo nanotecnologia para se referir às nanociências e as nanotecnologias (N&N) por uma questão de simplificação. Segundo a definição de N&N, elas abrangem montagem, manipulação, produção e projeto no nível molecular e atômico e para diversos autores, um dispositivo deve ter dimensões nanométricas e explorar propriedades diferenciadas associadas à nanoescala (100 nm até 0,2 nm aproximadamente) para ser nanotecnológico (FERNANDES; FILGUEIRA, 2008).

Em 1959, em uma conferência na Califórnia, o físico Richard Feynman foi o primeiro a discorrer sobre a possibilidade de se manipular átomos e

desenvolver novos materiais. Por conta disso ele é considerado por muitos o pai da nanotecnologia e foi nesse discurso que se deu o marco do início dessa ciência (STEINMETZ, 2006).

Algumas aplicações da nanotecnologia são encontradas em microprocessadores, produtos farmacêuticos e de beleza, fabricação de pneus (ARAKI, 2007), agricultura, na área têxtil e na engenharia civil (STEINMETZ, 2006) Outros avanços já obtidos são o aumento da resistência dos plásticos, fabricação de tecidos que não mancham e de vidros auto-limpantes (FERNANDES; FILGUEIRA, 2008). Hoje essa ciência está sendo associada a muitas áreas e os resultados obtidos são motivadores, tendo-se ainda um futuro promissor, de possibilidades ainda inimagináveis (STEINMETZ, 2006).

Na agricultura, uma área que já sofre um grande impacto pelo uso da nanotecnologia, tem-se utilizado nanopartículas magnéticas para remover do solo os contaminantes e nanosensores que monitoram a saúde animal, entre outras aplicações (ALVES, 2005).

No tratamento de água, nanotubos de carbono (ALVES, 2005), detentores de excelentes propriedades mecânicas e elétricas de grande interesse (ARAKI, 2007), podem constituir filtros e nanomembranas e nanoargilas podem ser usadas para dessalinizar, purificar e eliminar toxinas da água de forma eficiente, portátil e não muito custosa (ALVES, 2005).

Uma área de atuação da nanotecnologia que vem obtendo grande destaque é a área médica. Estudos são constantemente realizados e já se utiliza a nanociência em tratamentos e métodos cirúrgicos. A nanomedicina tem como principal objetivo o tratamento de doenças não por remédios ou cirurgias, e sim por manipulação direta nos átomos dos pacientes de forma a fazer neles reparos e reorganizações. Com isso serão obtidas muitas vantagens, com maior rapidez e eficácia dos tratamentos. A medicina física, que contempla o desenvolvimento de novas próteses, é de grande interesse, pois atualmente são poucos e de limitadas funcionalidades os dispositivos que no corpo humano podem ser permanentemente implantados. Outra aplicação é na criação de nanorrobôs que irão identificar e reparar defeitos no corpo humano, permitindo a cura de muitas doenças hoje incuráveis, como o câncer. Todos esses avanços médicos proporcionarão uma melhor saúde e qualidade de vida das pessoas (STEINMETZ, 2006).

A nanotecnologia é também uma grande chance para países em desenvolvimento, pois ela tem um potencial inovador muito grande e por usar a dimensão nanométrica, desperta a criação de novas classes de materiais, como por exemplo, os nanocompósitos. Segundo o Dr. Peter Singer, Universidade de Toronto, ciência e tecnologia são necessárias para um país se desenvolver. Tem-se como exemplo a China, um país em desenvolvimento que só tem crescido, inclusive na produção científica: é o terceiro país que mais afirma patentes nas aplicações em nanotecnologia, ficando atrás do Japão e Estados Unidos (ALVES, 2005). O interesse em N&N no Brasil dispostou entre os anos 1999 e 2001, período em que os Estados Unidos tornaram a nanotecnologia uma iniciativa federal (FERNANDES; FILGUEIRA, 2008). O Brasil ocupa (2007) a 15ª posição no ranking mundial em ciência e as N&N constituem uma área que vem conquistando cada vez mais espaço no país, proporcionando novos conhecimentos tecnológicos e científicos, uma vez que há um potencial de crescimento muito grande no mesmo (ARAKI, 2007).

As N&N são um grande fator de progresso para a humanidade e seu potencial é tão alto e são tantas as aplicações que se deve ter uma conscientização por parte da sociedade para que sejam avaliados os riscos e benefícios e assim possa haver uma integração proveitosa entre ambas (STEINMETZ, 2006).

O objetivo do desenvolvimento de um compósito é obter um material com melhores propriedades, tais como maior rigidez e resistência à tração e temperatura de distorção térmica, além de reduzir custos. Com o desenvolvimento das N&N, tornou-se possível a obtenção desses compósitos em escala nanométrica - os nanocompósitos.

Quando uma partícula tem pelo menos uma de suas dimensões da ordem de  $10^{-9}$ m, ela é dita nanométrica. Deste modo, designa-se nanocompósito o material de duas fases onde uma delas - a carga - está dispersa na outra - a matriz - em nível nanométrico. Frequentemente se usa matrizes poliméricas com cargas minerais.

A interação da matriz com a carga é mais eficiente, pois o fato de se trabalhar na nanoescala faz com que a área de contato entre elas seja maior, melhorando as propriedades dos nanocompósitos em comparação com os compósitos. A segunda opção geralmente contém 20 a 30% de carga,

enquanto a primeira contém 2 a 10% (GARCIA, 2003). Para isso, vale lembrar que a carga deve ter uma boa dispersão e uma distribuição homogênea da matriz utilizada, assim deve-se evitar que aglomerados das partículas de formem fazendo com que esses aglomerado agem como grandes partículas micrométricas (NEMATI HAYATI; REZAIIE; HOSSEINALIPOUR, 2011).

Alguns fatores determinantes na qualidade dos nanocompósitos são a relação de aspecto, que relaciona o comprimento da partícula com sua largura – quanto maior essa relação, melhor é -, a homogeneidade e a concentração da carga na matriz. Como é preciso menos carga para uma igual ou superior qualidade frente aos compósitos tradicionais, o peso do produto final ao se utilizar nanocompósitos é menor, o que é muito importante para diversas áreas, por exemplo a aeroespacial.

Há uma tendência a se ter cada vez mais opções de nanocompósitos pois assim como a nanotecnologia, sua utilização apresenta muitas vantagens, além de possibilidades futuras. Uma das grandes aplicações dessa classe de materiais já nos dias de hoje se encontra na indústria automobilística, onde se obtém uma melhora nas propriedades mecânicas e também um menor peso do produto (GARCIA, 2003).

### **2.5.1 Abordagem para aplicações ortopédicas**

Um dos principais motivos que a corrida para o desenvolvimento de novos implantes ortopédicos esteja tão veloz se deve ao grande número de implantes que falham em serviço e sua baixa vida útil, que pode ir de 10 a 15 anos. Tempo muito baixo, principalmente quando se refere a pacientes jovens que precisarão voltar diversas vezes ao consultório médico para fazer avaliações e novas cirurgias de reparo ou de troca de implantes ao longo de sua vida (EMERY; CLARKE; GROVER, 1997).

As principais causas para as falhas desses implantes estão relacionadas à falta de suporte que o implante dá pra o crescimento do novo tecido ósseo, causando uma interface fraca de integração do implante com o osso circundante. Devido a isso, um espaço entre o osso e o implante é originado e possíveis detritos gerados por desgastes dos componentes de articulações

ficam alojados nesses espaços causando a morte celular. O desequilíbrio de tensão e deformação, isto é, a incompatibilidade das propriedades mecânicas entre o implante e o osso circundante também contribui para essas falhas levando a uma soltura do implante, causando a fratura, muitas vezes de ambas as partes (SATO; WEBSTER, 2004).

Para vencer essas barreiras o implante precisa incitar a regeneração óssea para que haja o preenchimento do intervalo implante/osso levando a uma fixação firme do dispositivo ortopédico ao osso adjacente. Assim, o material para aplicações ortopédicas deve fornecer um ambiente habitável para as células de formação óssea, para que elas possam colonizar a superfície do implante e conseguir sintetizar o neotecido nessa interface. Entretanto, não é o que ocorre, os materiais utilizados atualmente não são compatíveis com as células responsáveis pelo processo de formação e regeneração do osso, que são os osteoblastos, assim o tecido que irá se formar terá uma fraca conexão nesta interface. Isso faz com que o próprio carregamento fisiológico possa levar a soltura do implante e sua eventual fratura. Então o que se deseja é uma formação rápida e sólida do tecido ósseo na superfície de contato com o implante que minimizará essas consequências (SATO; WEBSTER, 2004).

Essa forte integração desejada entre o osso neoformado e o material do implante tem sido estudada por engenheiros e cientistas que descobriram que as células formadoras do osso (osteoblastos) só irão aderir na superfície do implante após certas proteínas, provenientes do sangue, da medula óssea e de outros tecidos, serem adsorvidas na superfície do mesmo. Pois essas proteínas irão controlar a adesão das células no implante, mediando também a diferenciação e o crescimento dessas células (RATNER et al., 1996).

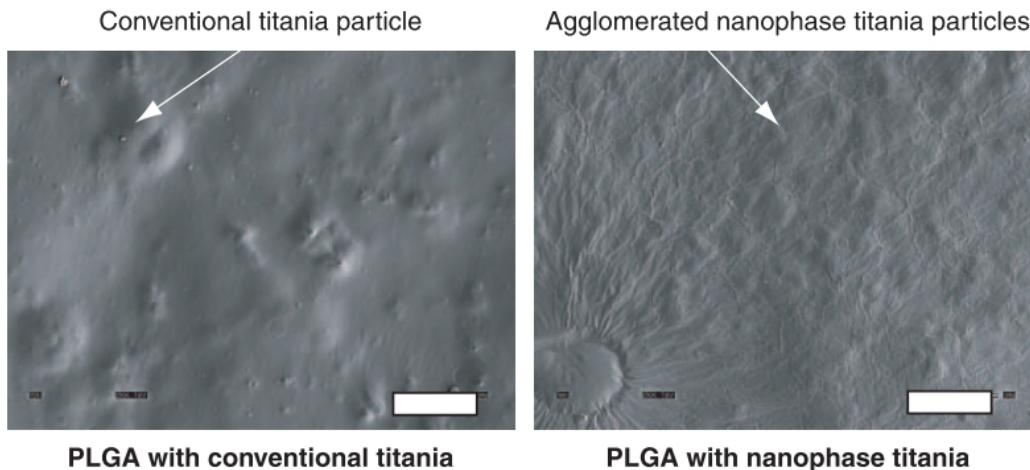
Então o que tem sido estudado em termos de melhoramento da regeneração óssea nessa interface é a mudança da superfície química do biomaterial a fim de aumentar a osteointegração. Assim novos materiais são projetados e utilizados como implantes podendo ser metais (ligas de CoMoCr, Titânio e suas ligas), cerâmicas (zircônia, alumina e hidroxiapatita), polímeros (poliuretano, polietileno, ácido poli-láctico) e substâncias biologicamente sintetizadas, como é o caso do colágeno mineralizado em fluido corporal (P et al., 2004). Entretanto, esses materiais nem sempre levam a uma otimização dos implantes ortopédicos, por exemplo, muitos metais tem se mostrado com

uma pobre osteointegração. Estudos comprovam que o titânio não gera formação óssea e ainda induz a formação de um tecido fibroso macio, prejudicial à fixação do implante. Já as cerâmicas que tem excelentes biocompatibilidade e interação com as células ósseas, pois conseguem adsorver proteínas em sua superfície, são utilizadas em reparos localizados ou para revestir implantes metálicos (SATO; WEBSTER, 2004). Segundo Sato e seus colaboradores, 2004, a ferramenta utilizada pra promover as osteointegração do implante pela manipulação da superfície química dos materiais ainda não alcançou resultados universais e um padrão para o aumento da regeneração óssea ainda não foi estabelecido, promovendo melhorias em alguns casos e em outros não.

Outro método para promover melhor integração implante e osso é a criação de microrrugosidades na superfície do dispositivo ortopédico. E que se mostrou mais eficiente na promoção do crescimento ósseo que a modificação da superfície química. Estudos já alcançaram uma osteointegração em implantes de titânio com microrrugosidades na sua superfície, promovendo adesão e proliferação de células ósseas (osteoblastos) em contrapartida de nenhuma formação óssea em superfície lisa (ANSELME et al., 2002; BOYAN et al., 2001). Porém, como o osso é composto por constituintes nanoestruturais, os osteoblastos não podem agir da maneira mais eficiente nessas microrrugosidades. Sendo assim, os estudos devem ser dirigidos cada vez mais para a nanotecnologia (SATO; WEBSTER, 2004). Webster e seus colaboradores compararam alumina, titânia e hidroxiapatita em escala convencional e nanométrica e as nanorugosidades dessas nanofases melhoraram as respostas dos osteoblastos (WEBSTER; SIEGEL; BIZIOS, 2001).

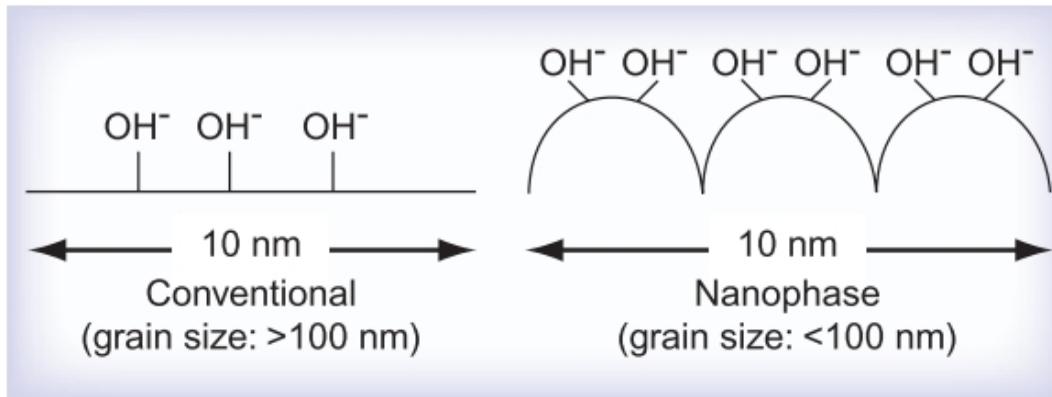
Estudos comprovam a importância de constituintes nanoestruturados para ativação das funções dos osteoblastos, responsáveis pela regeneração óssea e deposição de minerais que contem cálcio. Em estudos *in vitro* foi observado que a adesão dos osteoblastos foi melhorada em titânio revestido por nanotubos orgânicos que imitam os componentes estruturais do osso em comparação ao titânio não revestido (CHUN et al., 2004). A deposição de minerais contendo cálcio foi aumentada pelos osteoblastos também quando são utilizados nanocompósitos cerâmicos e poliméricos. A Figura 4 mostra

compósitos poliméricos com matriz de ácido poli-láctico-co-glicólico carregada com titânia, as funções das células do osso são alcançadas no compósito polimérico contendo as cerâmicas em nanofase comparada com as cerâmicas em tamanhos convencionais (SATO; WEBSTER, 2004). Kay e seus colaboradores demonstraram que os compósitos com nanopartículas de titânia promoveram maior adesão dos osteoblastos que compósitos carregados com titânia em tamanho convencional (KAY et al., 2002).



**Figura 4** Microscopia eletrônica de varredura mostrando compósitos de PLGA contendo titânia em tamanho convencional (4,120 nm), em comparação com titânia nanofásica (32 nm) com 70/30% em peso de PLGA/titânia. As barras representam 10 micrômetros (SATO; WEBSTER, 2004).

O benefício de materiais nanofásicos ou nanoestruturados para implantes ortopédicos está na interação mais eficiente, nesta escala, de proteínas que vão mediar a adesão, diferenciação e crescimento das células ósseas na superfície do biomaterial (WEBSTER et al., 2000a, 2000b). Como as proteínas são moléculas carregadas, uma das principais razões para que as proteínas sejam atraídas para a superfície de materiais nanoestruturados é devido a sua alta energia superficial comparada com materiais em escalas convencionais, que se dá pela grande área superficial que altera a distribuição elétrica desses materiais (Figura 5) (KLABUNDE et al., 1996). Isso leva a um aumento das funções dos osteoblastos (SATO; WEBSTER, 2004).



**Figura 5 Grupos Hidroxilas expostos na superfície de um material em escala convencional e na escala nanométricas, respectivamente (SATO; WEBSTER, 2004).**

Embora muitas vantagens na osteointegração esses materiais nanofásicos podem promover, esta área ainda está no início do seu desenvolvimento. Questões sobre a influência desses materiais, tanto na manipulação em sua produção quanto no implante no organismo propriamente, ainda são desconhecidas (SATO; WEBSTER, 2004).

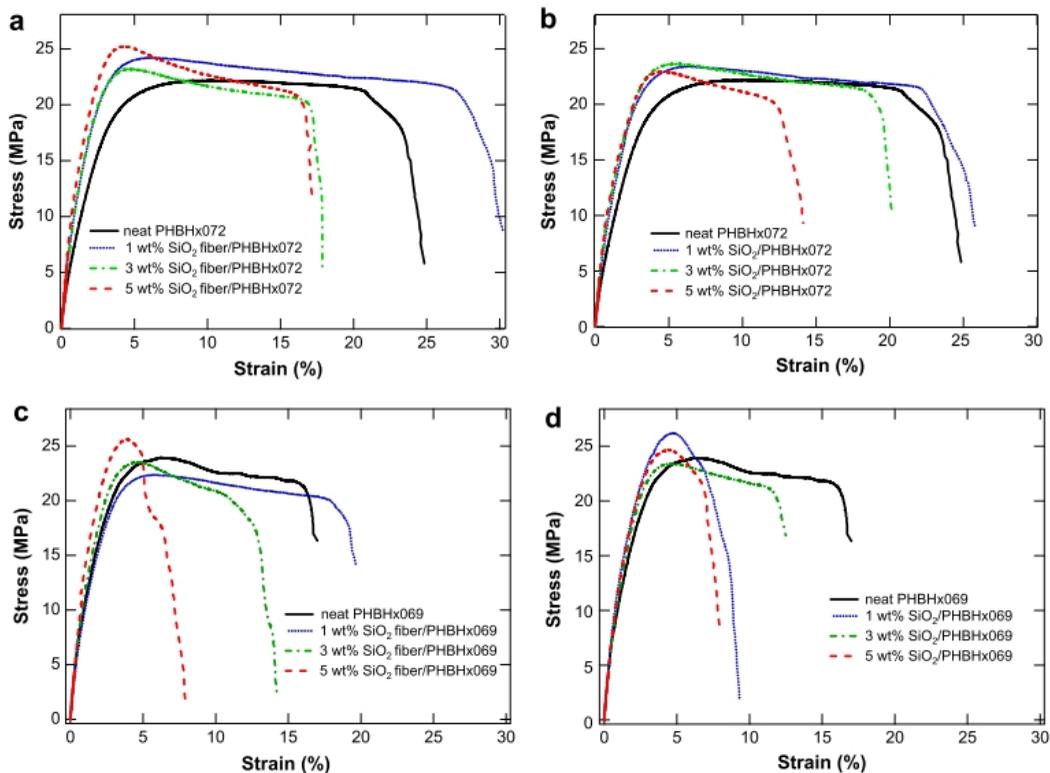
## **2.6 Nanocompósitos de PHB: Comportamento mecânico**

Toda a família de PHA's tem sido investigada para aplicações biomédicas, sendo assunto nas pesquisas nas últimas décadas e, recentemente, em aplicações na engenharia tecidual. Testes *in vitro* mostram que o PHB é biocompatível com uma vasta gama de tipos de células como osteoblastos, fibroblastos, tecidos endoteliais e epiteliais (NEMATI HAYATI et al., 2012).

Atualmente, materiais compósitos com matrizes poliméricas e cargas cerâmicas estão sendo desenvolvidos com o objetivo da otimização das propriedades mecânicas aliado com uma melhora na interação do material e a célula ou tecido orgânico. Já que as partículas de hidroxiapatitas presentes no osso, em tamanho nanométrico, são consideradas importantes para as propriedades mecânicas do mesmo. Além disso, esses compósitos possuem a estrutura similar ao osso, chamados de estruturas *Scaffolds* (NEMATI HAYATI et al., 2012).

Propriedades como módulo de *Young*, módulo de compressão, resistência à compressão, dureza, alongamento, tenacidade à fratura entre outras tem sido estudadas por diversos autores.

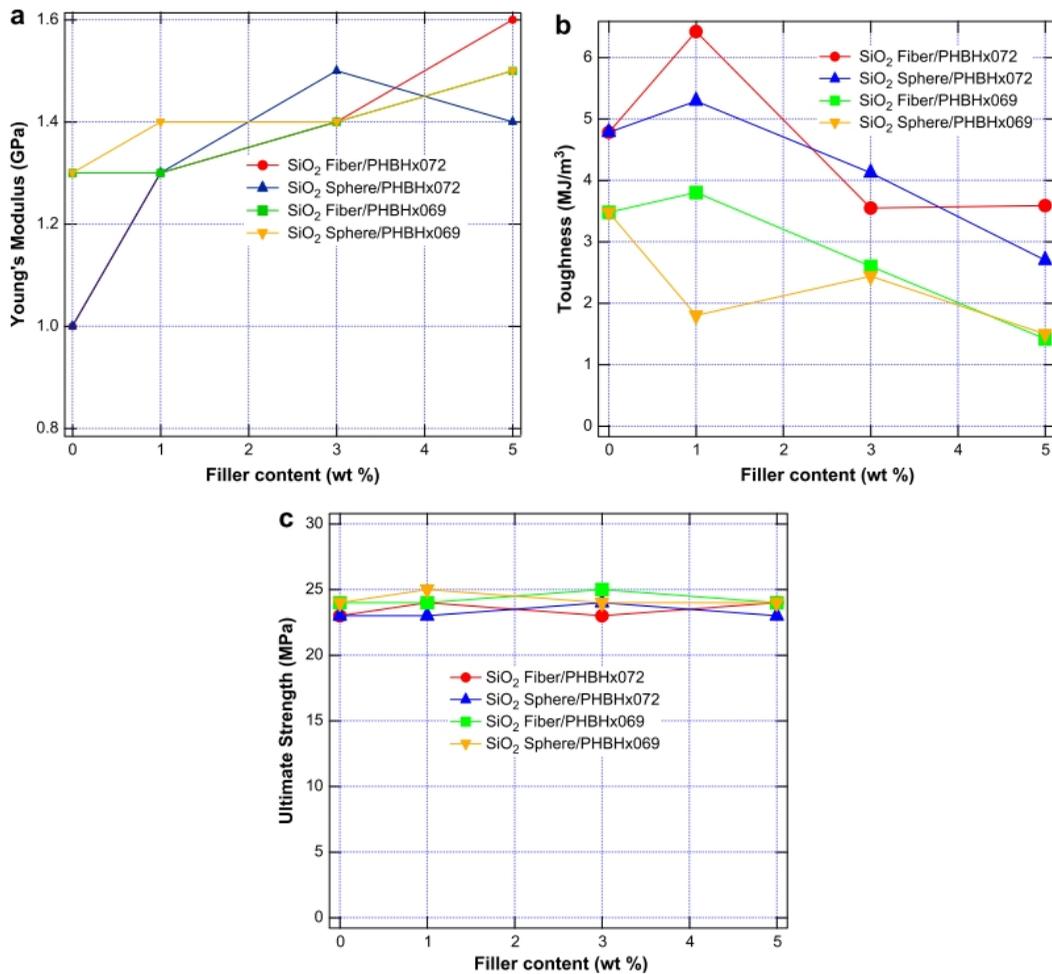
Xie e seus colaboradores (2009) investigaram a influência da porcentagem do copolímero Hidroxihexanoato e suas diferentes massas molares na matriz poli-3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato (PHB-Hx) e a influência da incorporação de nanopartículas de SiO<sub>2</sub> em formas esféricas, com diâmetros de 10-15 nm, e fibrosas, com diâmetro de 9-15 nm e comprimento de 40-100 nm, nas propriedades mecânicas do nanocompósito. O módulo de *Young*, a deformação na ruptura, tenacidade e resistência máxima foram obtidas por ensaio de tração (XIE et al., 2009). Foram incorporadas 0, 1, 3 e 5% de SiO<sub>2</sub> esféricas e fibrosas em formulações com 69 e 72% de Hidroxihexanoato na matriz de PHBHx.



**Figura 6** Curvas de tensão-deformação dos nanocompósitos de (a) SiO<sub>2</sub>Fibroso/PHBHx com 72% de Hx, (b) SiO<sub>2</sub>/PHBHx com 72% de Hx, (c) SiO<sub>2</sub>Fibroso/PHBHx com 69% de Hx e (d) SiO<sub>2</sub>/PHBHx com 69% de Hix com diferentes concentrações de carga (Xie et al., 2009)

O módulo de *Young* teve um acréscimo em seu valor com a incorporação da carga de SiO<sub>2</sub> para todos os nanocompósitos. O alongamento no momento da fratura e a tenacidade tiveram seus valores máximos com 1% de carga e decresceram com o aumento da carga, com exceção da formulação SiO<sub>2</sub>/PHBHx069. Mostrando que essa formulação é mais frágil (FIGURA 6d) com nanopartículas esféricas adicionadas em relação à SiO<sub>2</sub> fibrosa, cujo um aumento na ductilidade foi alcançada (XIE et al., 2009).

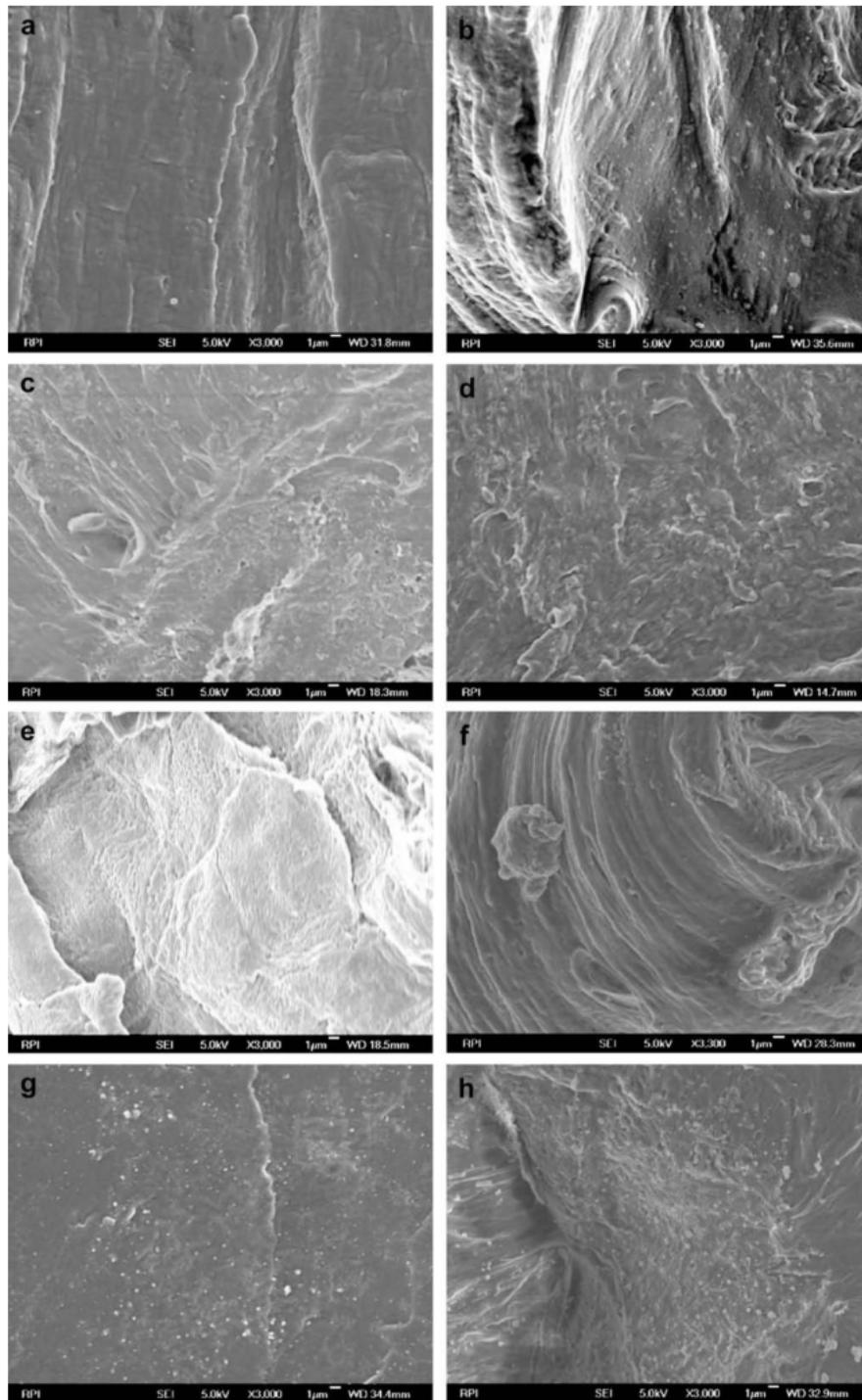
A resistência máxima variou pouco de formulação para formulação, enquanto o módulo de *Young*, o alongamento na fratura e a tenacidade tiveram uma forte influência da matriz. Comparando com a matriz pura um aumento de 30 e 34% no módulo e na tenacidade, respectivamente, foi observado para o nanocompósito 1-wt%SiO<sub>2</sub>fiber/PHBHx072. Sendo que a adição de sílica fibrosa na mesma matriz obteve um mesmo acréscimo no módulo, porem um menor aumento na tenacidade (FIGURA 8) (XIE et al., 2009).



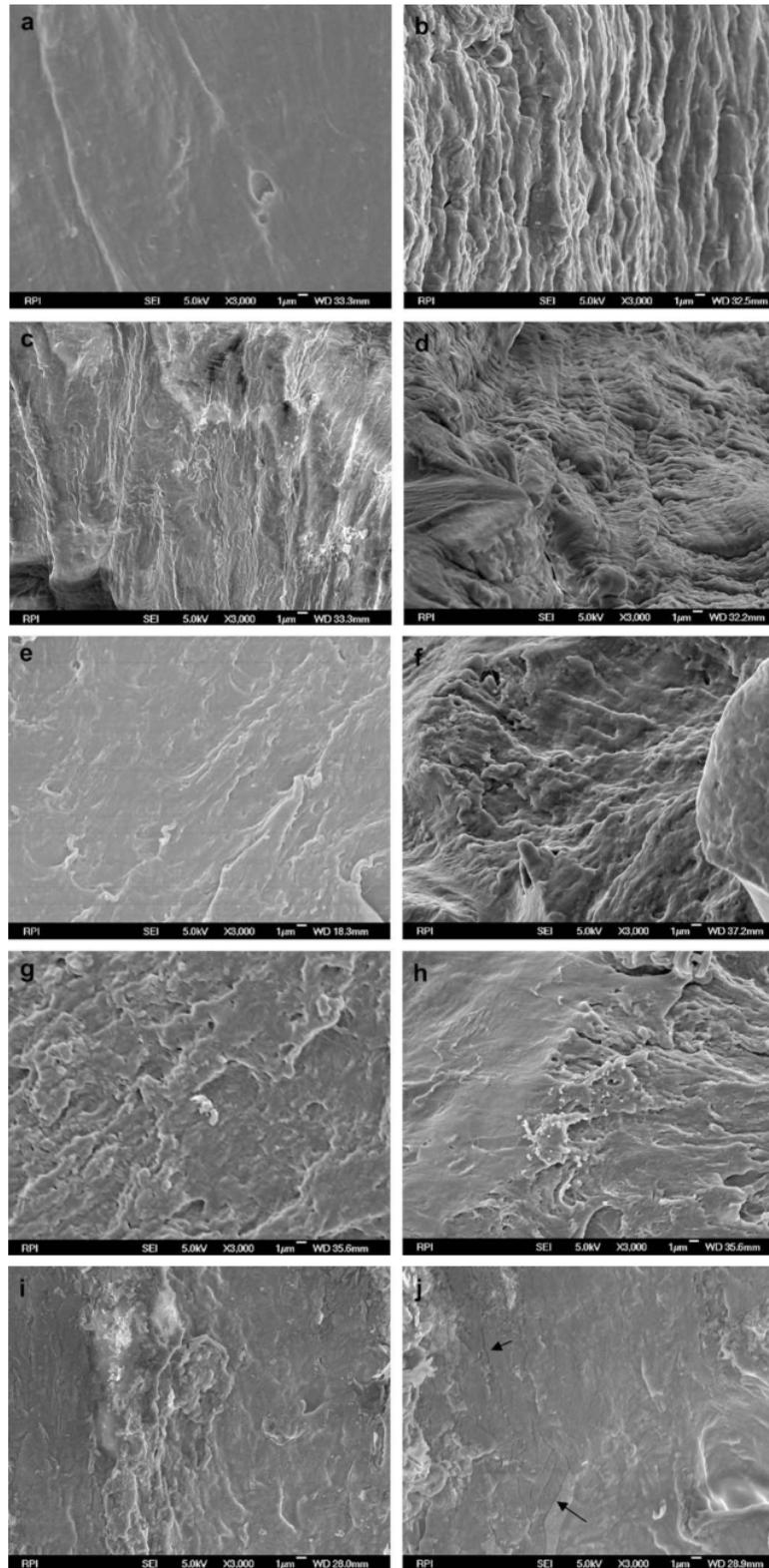
**Figura 7** Módulo de Young (a), tenacidade (a) e resistência máxima (c) dos nanocompósitos estudados (Xie et al., 2009)

Na matriz PHBHx069, um ligeiro acréscimo na tenacidade foi obtida com a adição de 1% de sílica fibrosa, enquanto que com a adição de sílica esférica a matriz experimentou um máximo com 3% em peso de sílica (XIE et al., 2009).

O autor atribuiu estas variações nas propriedades mecânicas dos nanocompósitos à estrutura amorfa do polímero e a morfologia dos agregados formados pela carga incorporada na matriz que podem ser vistas por meio de microscopia eletrônica de varredura, como mostram as micrografias de MEV a seguir (FIGURAS 8-10).

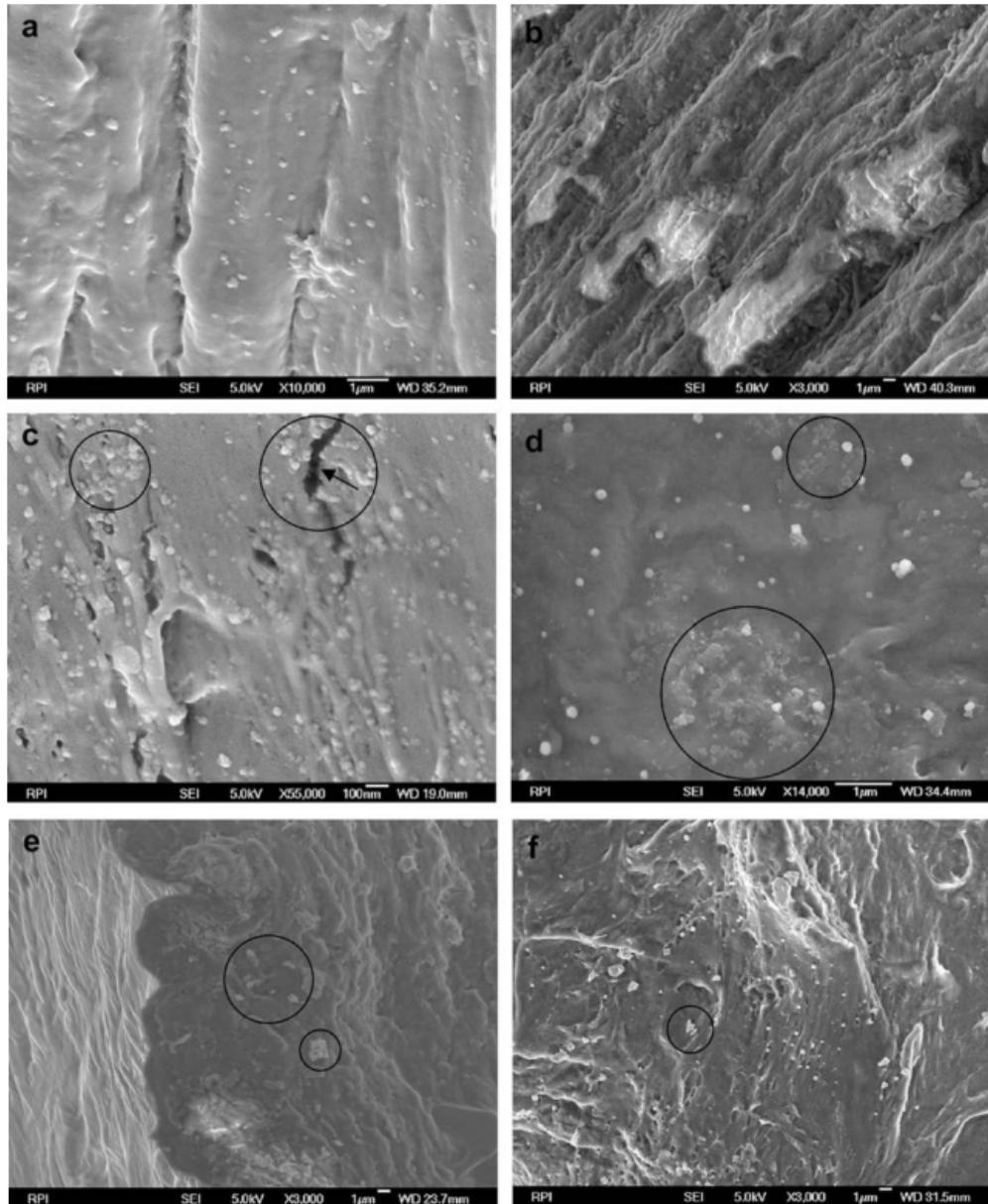


**Figura 8** MEV da superfície de fratura com matriz PHBHx072 pura (a), 1% de SiO<sub>2</sub> esf (b), 3% de SiO<sub>2</sub> esf (c), 5% de SiO<sub>2</sub> esf (d), vários nanovazios em 3% de SiO<sub>2</sub> esf (e), 1% de SiO<sub>2</sub> fib (f), 3% de SiO<sub>2</sub> fib (g) e 5% de SiO<sub>2</sub> fib (h) (Xie et al., 2009)



**Figura 9** MEV na superfície de fratura com matriz PHBHx069 pura (a), 1% de SiO<sub>2</sub> esf (b), 1% de SiO<sub>2</sub> fib (c,d), 3% de SiO<sub>2</sub> esf (e), 3% de SiO<sub>2</sub> fib (f), 5% de SiO<sub>2</sub> esf (g,h), 5% de SiO<sub>2</sub> fib (i,j). As setas indicam as trincas formadas na amostra (Xie et al., 2009)

Pelo MEV da região de fratura dos nanocompósitos após os ensaios de tração é possível observar que as amostras exibem variáveis graus de maneira intensa de mecanismos como cavitação e fibrilação. Nas matrizes, principalmente na PHBHx072, é possível notar vazios causados pelo descolamento da carga/matriz (FIGURA 10-e,g,h).



**Figura 10** Micrografias de MEV da região de fratura dos nanocompósitos com matriz PHBHx072: (a) 1% SiO<sub>2</sub> esférica, (b) 1% SiO<sub>2</sub> fibrosa, (c) 3% SiO<sub>2</sub> esférica, (d) 3% SiO<sub>2</sub> fibrosa, (e) 5% SiO<sub>2</sub> esférica e (f) 5% SiO<sub>2</sub> fibrosa (Xie et al., 2009)

Na figura 11-j muitas trincas podem ser vistas, principalmente devido aos grandes aglomerados de carga formados nas formulações com alta concentração de sílica. Esses aglomerados, que podem chegar a 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro, não conseguem prevenir que estes vazios se coalesçam para forma de trincas catastróficas (XIE et al., 2009).

A dispersão da carga de sílica também influencia nas propriedades mecânicas dos nanocompósitos. Uma boa dispersão é obtida para a matriz PHBHx072 com cargas de 1% de sílica esférica e fibrosa (FIGURA 11-a e 11-b). À medida que a concentração de carga é aumentada o tamanho dos aglomerados aumenta e sua distribuição é mais larga promovendo trincas nas amostras. Círculos na Figura 11 indicam os aglomerados das nanopartículas e as setas apontam as trincas formadas.

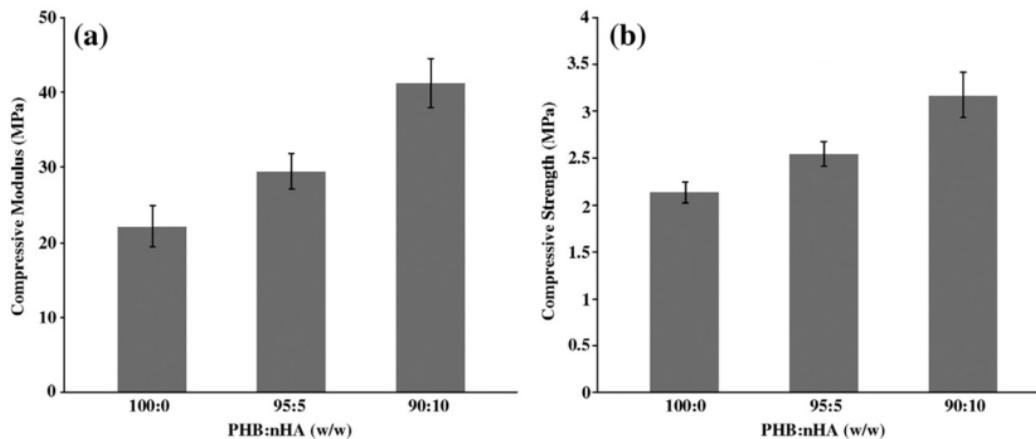
Estudos mais recentes obtiveram uma dispersão homogênea e distribuição uniforme da carga ao estudarem a incorporação de nanohidroxiapatita na matriz termoplástica de poli-hidroxibutirato. Os autores associaram a melhoria das propriedades mecânicas de módulo de compressão e resistência a compressão à este efeito (NEMATI HAYATI; REZAIE; HOSSEINALIPOUR, 2011). Observando valores dessas propriedades similares às mesmas propriedades do osso esponjoso.

Essa dispersão homogênea das nanopartículas de hidroxiapatita promove uma alta área superficial de interface, o que aumenta a transferência de tensão entre a matriz e as nanopartículas, resultando assim em um melhoramento das propriedades dos compósitos.

Esse aumento das propriedades mecânicas é necessário aos compósitos pois eles precisam ter resistência suficiente para suportar o novo tecido ósseo em formação no lugar do implante. Assim os compósitos devem manter suas propriedades enquanto o tecido danificado se regenera e recupera suas funções específicas (NEMATI HAYATI; REZAIE; HOSSEINALIPOUR, 2011).

O autor obteve um aumento significativo do módulo de compressão e da resistência a compressão ao adicionar 5 e 10% de nanopartículas de hidroxiapatita na matriz estudada. Com 5% de nanohidroxiapatita o módulo de compressão aumentou de  $22.16 \pm 2,75$  MPa, para a matriz pura, para  $29,57 \pm 2,36$  MPa. Para os nanocompósitos com 10% de carga o aumento foi ainda

maior, para  $41,33 \pm 3,21$  MPa. O mesmo comportamento é observado para a resistência a compressão, que obteve valores de  $2,55 \pm 0,13$  MPa para 5% de carga nanométrica e  $3,18 \pm 0,24$  MPa para 10% de carga, em comparação à  $2,14 \pm 0,11$  MPa para a matriz pura (NEMATI HAYATI; REZAIIE; HOSSEINALIPOUR, 2011).

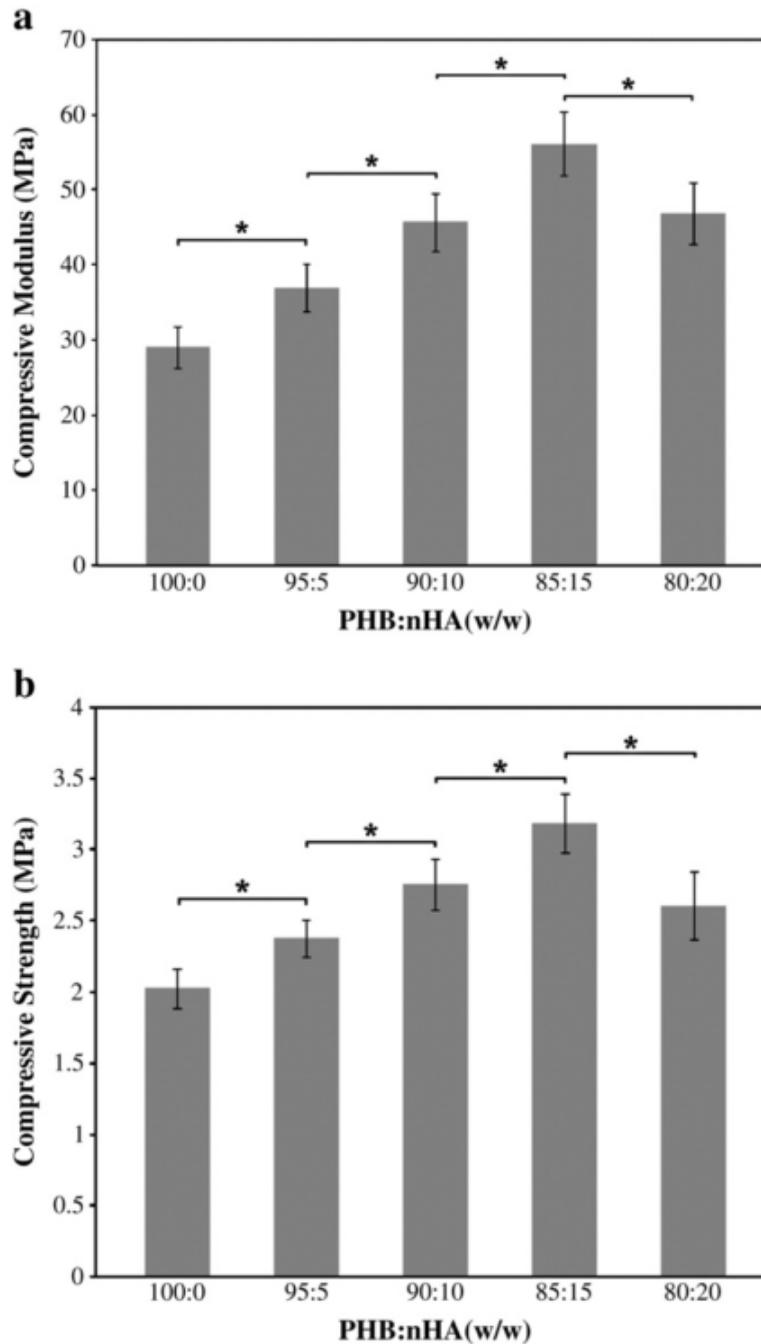


**Figura 11** Módulo de compressão (a) e resistência a compressão (b) para os nanocompósitos (Nemati Hayati et al., 2011)

A Figura 12 mostra a influência da carga nanométrica no comportamento mecânico dos nanocompósitos. Os autores também associam esta melhora das propriedades à porosidade do material, tamanho dos poros e distribuição da porosidade no material (interconecção entre poros), além da dispersão homogênea e distribuição uniforme da carga. A porosidade elevada, geralmente, é necessária para que seja permitido o crescimento celular, vascularização e a difusão de nutrientes (NEMATI HAYATI; REZAIIE; HOSSEINALIPOUR, 2011).

Para a complementação dos seus estudos Nemati estudou também a incorporação de 15 e 20% de nanohidroxiapatita na matriz, além de 5 e 10% de carga. Pela Figura 12 é possível perceber a tendência do comportamento compressivo do nanocompósito estudado por Nemati (NEMATI HAYATI et al., 2012), na imagem o módulo de compressão e resistência a compressão sofreram um aumento significativo com maiores porcentagens de nanohidroxiapatita, com 5% de nanopartículas o módulo e a resistência omitidas foram de  $36,91 \pm 3,12$  MPa e  $2,38 \pm 0,13$  MPa, respectivamente.

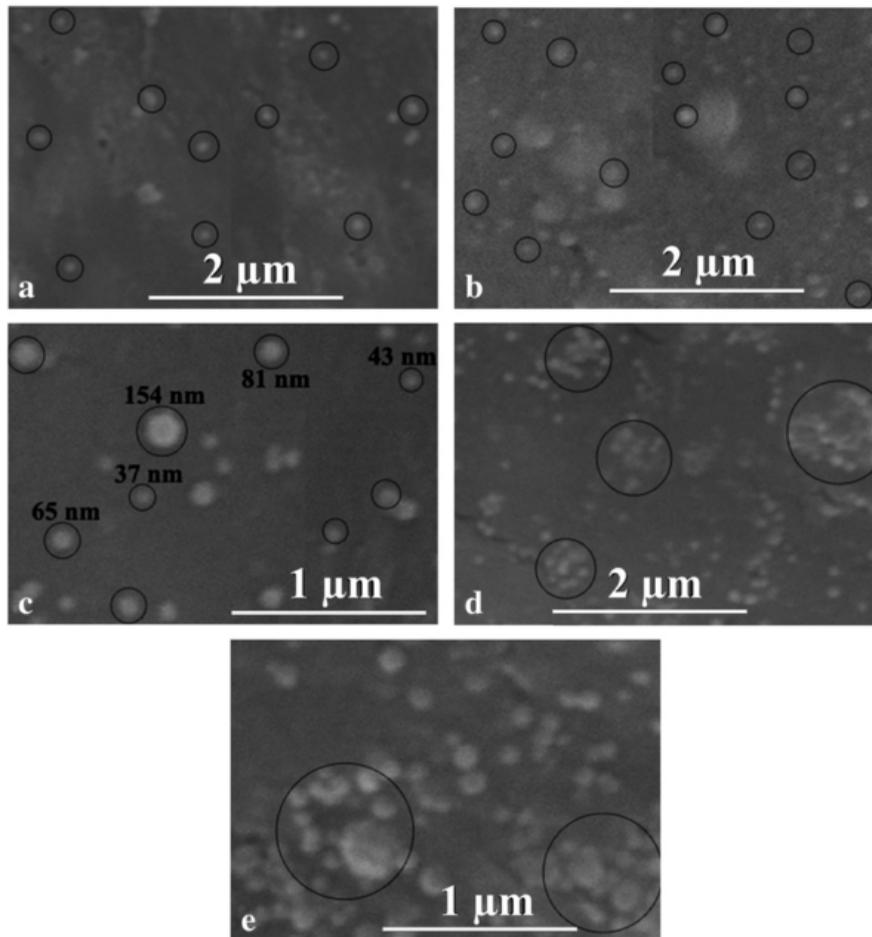
Aumentando a porcentagem de carga para 10 e 15% o módulo aumenta para  $45,73 \pm 3,87$  MPa e  $56,12 \pm 4,28$  MPa, respectivamente. As resistências correspondentes à essa quantidade de carga também resultaram em maiores valores de  $2,76 \pm 0,18$  MPa e  $3,19 \pm 0,21$  Mpa, respectivamente. Já com a quantidade de 20% de nanopartículas de hidroxiapatita o módulo e a resistência deixam a tendência de crescimento e diminuem de valor para  $46,89 \pm 4,05$  MPa e  $2,61 \pm 0,24$  MPa, respectivamente (FIGURA 12).



**Figura 12** Módulo de compressão (a) e resistência à compressão (b) dos nanocompósitos com hidroxiapatita (Nemati Hayati et al., 2012)

Isso é devido ao fato de que quando o nanocompósito, ou qualquer compósito, está sob aplicação de uma carga a ligação interfacial transfere a carga aplicada da matriz para as partículas dispersas, no caso das nanopartículas de hidroxiapatita, esse reforço vai suportar a carga, deixando o material com melhores propriedades mecânicas (NEMATI HAYATI et al., 2012).

A partir dos resultados obtidos por Nemati a adição de nanopartículas até uma quantidade de 15% resultou em um aumento significativo nas propriedades compressivas do nanocompósito, e as partículas ficaram bem dispersas na matriz. Assim, com a quantidade de até 15% de nanohidroxiapatita a área superficial de interface das partículas com o polímero/matriz aumentou, promovendo a otimização das propriedades.



**Figura 13** Micrografias de MEV de seções dos nanocompósitos com: (a) 10% nHA 20.000x, (b, c) 15% nHA 20.000x e (D, e) 20% nHA 20.000x e 40.000x (Nemati Hayati et al., 2012)

Contudo, a partir de 20% de hidroxiapatita incorporada no PHB houve um decréscimo tanto no módulo compressivo quanto na resistência à compressão. Tal comportamento está associado à presença de aglomerados das partículas formados na matriz. Isso resulta em uma fraca interação entre as partículas, que estão aglomeradas, e a matriz polimérica, formando no material

pontos fracos na estrutura que podem concentrar tensões quando uma carga é aplicada ao material fazendo com que haja a fratura, pela formação de microtrincas catastróficas. A figura 13 mostra a dispersão das nanopartículas no compósito e os aglomerados formados no nanocompósito com 20% de carga (NEMATI HAYATI et al., 2012). A menor área superficial de interface está associada ao fato de que as partículas ao se aglomerarem deixam de ser no tamanho da escala nanométrica e passam a formar grandes aglomerados micrométricos como mostram os círculos nas figuras 13(d, e).

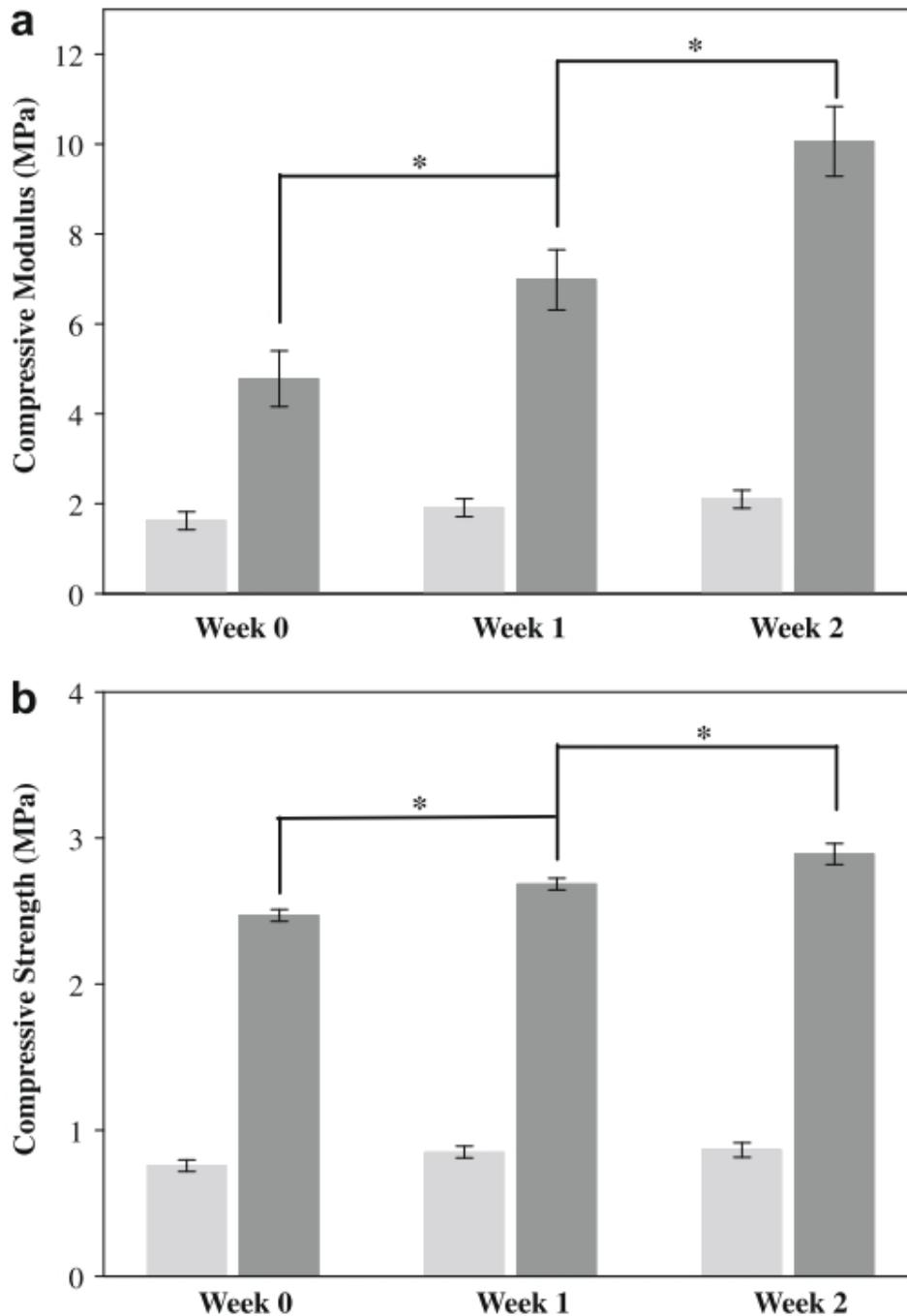
Jack e seus colaboradores também investigaram as propriedades compressivas do nanocompósito com matriz de PHB e nanocargas de hidroxiapatita (JACK et al., 2009). Ele utilizou uma carga de 2% em peso de hidroxiapatita. E relacionou as propriedades compressivas com o tempo de uma e duas semanas de imersão do material em um simulador de fluido corporal, chamado SBF (*simulated body fluid*), para indução da mineralização, isto é, a deposição de Ca-P (Fosfato de Cálcio) (JACK et al., 2009). Já que, estudos comprovam que o aumento no grau de deposição de fosfato de cálcio in vitro pode ser uma indicação de aumento da bioatividade in vivo (MISRA et al., 2008).

A composição do SBF em comparação ao sangue é mostrada na Tabela 2.

**Tabela 1 Concentração de íons do SBF e do sangue humano**

	Ion concentration (mM)							
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Blood	142.0	5.0	2.5	1.5	103.0	1.0	27.0	0.5
SBF	142.0	5.0	2.5	1.5	147.8	1.0	4.2	0.5

**(FONTE: (CHEN et al., 2007))**



**Figura 14 (a) Módulo compressivo e (b) resistência à compressão da matriz de PHBV (cinza claro) e nanocompósitos de HA/PHBV (cinza escuro) (Jack et al., 2009)**

Foi constatado que a imersão da matriz pura de PHB no SBF por duas semanas não influenciou significativamente nos resultados do módulo e resistência à compressão (JACK et al., 2009). Dessa maneira, esse resultado confirma que o polímero não se degrada significativamente nesse período de

tempo. A figura 14 mostra que a incorporação de hidroxiapatita conduz a aumento notável tanto na rigidez quanto na resistência do material comparado com a PHB puro, mesmo antes da imersão em SBF. Com a imersão em SBF um maior aumento na rigidez e na resistência é alcançado, com subsequente aumento da deposição de fosfato de cálcio na superfície do material, durante as duas semanas de imersão. Desse modo, o efeito da imersão em SBF é benéfico, já que um aumento nas propriedades compressivas com o aumento da mineralização é desejada para aplicações in vivo desses nanocompósitos (JACK et al., 2009; MISRA et al., 2008).

O autor obtém módulo e resistência à compressão máxima após a imersão em SBF com valores se aproximando aos valores reportados aos ossos trabecular e esponjoso (módulo compressivo ~ 50-500 MPa e resistência ~ 2-12 MPa) (JACK et al., 2009).

A associação de uma boa dispersão e uma distribuição homogênea do reforço (carga) na matriz à melhoria das propriedades mecânicas do material está sempre presente nos estudos sobre nanocompósitos e em compósitos em geral. Em nanocompósitos, principalmente, quando há a possibilidade de haver aglomeração das nanopartículas, que prejudica na dispersão e distribuição da carga, como já foi comentado neste mesmo item do presente trabalho.

Vale comentar que para um material compósito ser utilizado em aplicações biomédicas uma distribuição homogênea da carga é essencial. Principalmente porque quando a camada de apatita biológica (tecido natural) se desenvolve entre as partículas do compósito e o tecido circundante, estas partículas irão proporcionar uma ancoragem uniformemente distribuída para a prótese, enquanto a matriz do polímero se degrada (CHEN; WANG, 2002). É isso que o autor Chen explica ao constatar uma melhoria nas propriedades de microdureza e módulo de armazenamento e perda (DMA) ao investigar a incorporação de duas partículas cerâmicas bioativas na matriz de plihidroxibutirato-poli-hidroxivalerato (PHB-PHV), a hidroxiapatita (HA) e fosfato de tricálcio (TCP).

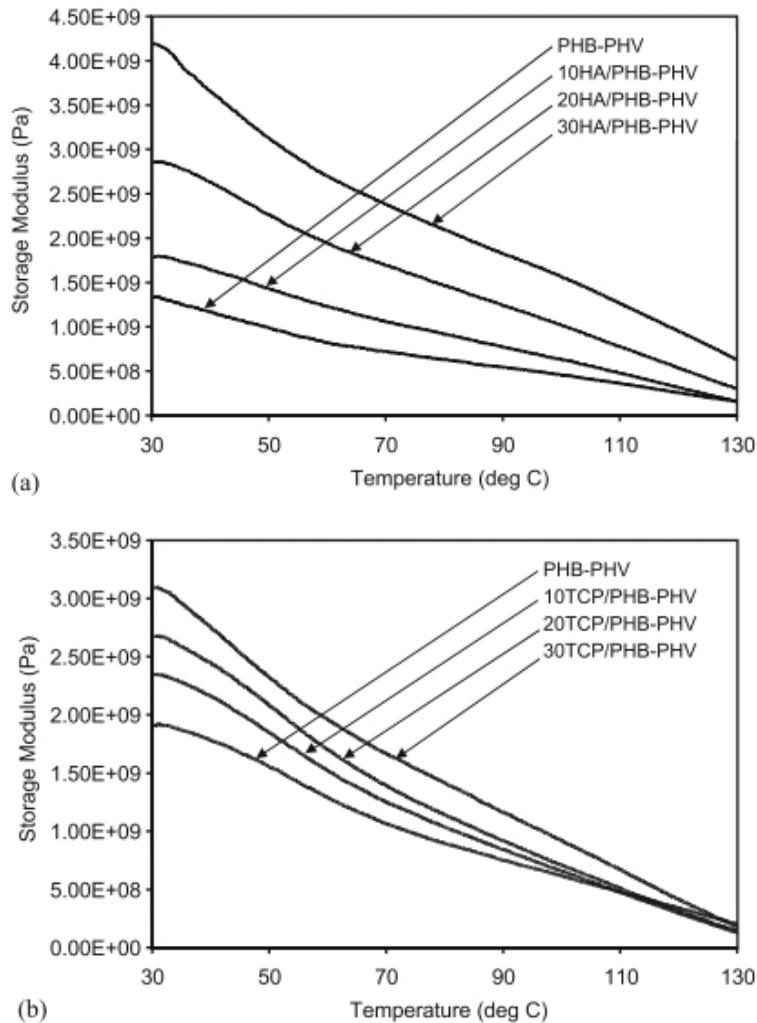
Ele observou uma tendência ascendente na microdureza dos compósitos HÁ/PHB-PHV e TCP/PHB-PHV com o aumento do volume das partículas nos compósitos. E como a microdureza pode ser um indicativo do valor do módulo de *Young*, os resultados, mostrado na tabela 3, sugerem que a

medida que há um aumento de porcentagem de HA ou TCP, o módulo de *Young* do material também aumenta, tornando o material mais rígido (CHEN; WANG, 2002).

**Tabela 2 Microdureza dos compósitos HA/PHB-PHV e TCP/PHB-PHV**

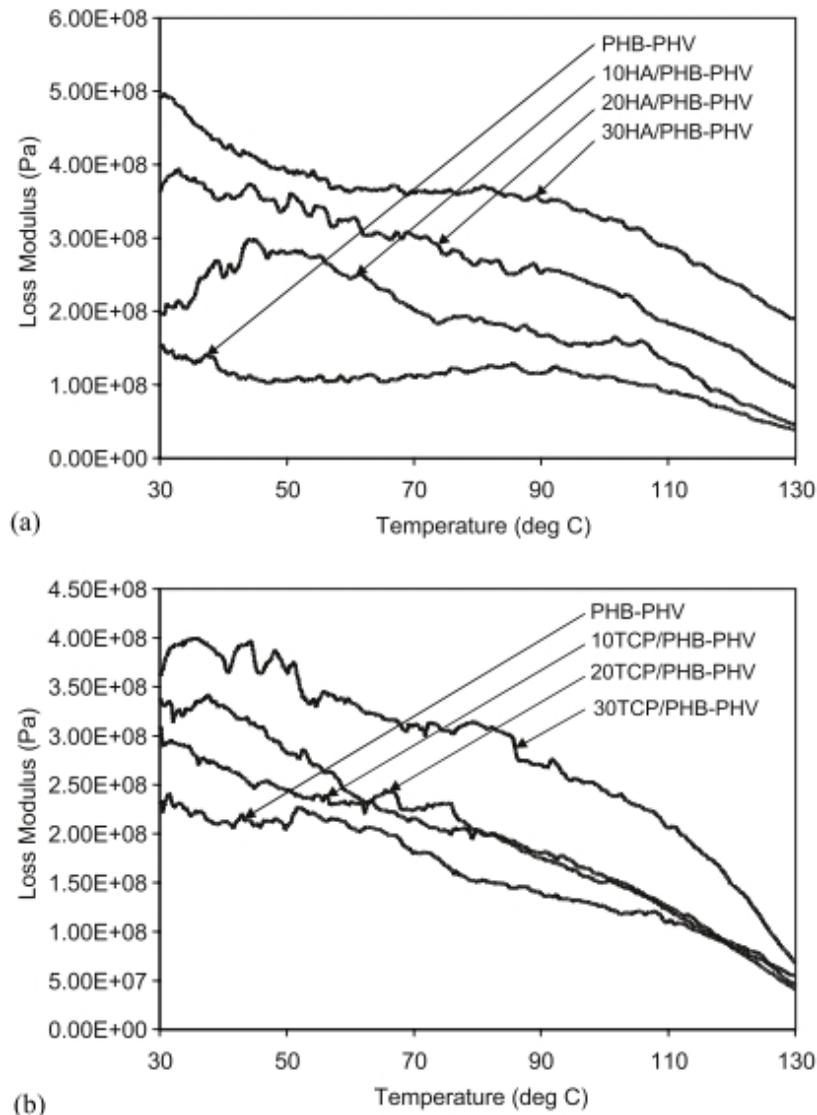
Nominal bioceramic content (vol%)	Microhardness (VHN)	
	HA/PHB-PHV	TCP/PHB-PHV
0	$8.56 \pm 0.14$	$8.56 \pm 0.14$
10	$10.12 \pm 0.46$	$9.26 \pm 0.14$
20	$13.19 \pm 0.50$	$9.54 \pm 0.07$
30	$15.73 \pm 0.44$	$10.18 \pm 0.16$

(FONTE:(CHEN; WANG, 2002))



**Figura 15** Módulo de armazenamento versus temperatura para os compósitos: (a) HA/PHB-PHV e (b) TCP/PHB-PHV (L. J. Chen & Wang, 2002)

As propriedades viscoelástica foram eficientemente avaliadas por DMA. E um aumento do módulo de armazenamento foi observado com o aumento da quantidade de biocerâmica na matriz de PHB-PHV (CHEN; WANG, 2002). O efeito da adição das biocerâmicas na fase amorfa da matriz (viscosa) também mostra a tendência geral de acréscimo no módulo de perda, como mostram as figuras 15 e 16.

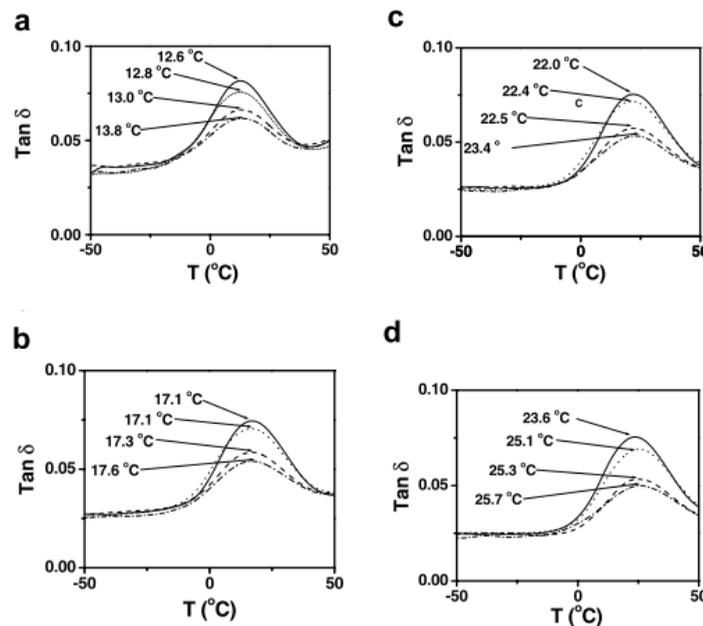


**Figura 16** Módulo de perda versus temperatura para os compósitos: (a) HA/PHB-PHV e (b) TCP/PHB-PHV (L. J. Chen & Wang, 2002)

Como a matriz PHB-PHV é um material viscoelástico, ela tem a capacidade tanto de armazenar energia (medida em módulo de armazenamento) como dissipar a mesma (medida em módulo de perda). A dissipação de energia em um material compósito pode estar associada ao atrito que ocorre entre o material de reforço e a matriz, assim ele atribui o aumento do módulo de perda com o aumento do atrito entre as partículas de biocerâmicas e matriz já que há aumento da quantidade de carga no compósito. O aumento do módulo de armazenamento é devido ao fato de que com a adição das biocerâmicas (HA e TCP) a mobilidade da fase amorfa da

matriz é prejudicada, já que as partículas restringem o movimento das cadeias poliméricas (CHEN et al., 2007; CHEN; WANG, 2002).

Os valores da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) também podem ser explicados por meio da relação da perda da mobilidade das cadeias com o aumento de carga no compósito. Foi o Chen fez ao estudar a  $T_g$  por DMA dos nanocompósitos de PHBV com incorporação de 10, 30 e 50% de nanopartículas de hidroxiapatitas (HA), investigando o efeito da variação da frequência utilizada nos ensaios (0,1, 1, 10 e 50 Hz). A figura 17 mostra a curva de  $\tan \delta$  versus a temperatura indicando as  $T_g$ 's dos nanocompósitos (CHEN et al., 2007).



**Figura 17** Curvas  $\tan \delta$  versus temperatura dos nanocompósitos: (\_\_\_\_) PHBV, (. . . .) PHBV10, (- - -) PHBV30 e ( \_ \_ \_ \_ ) PHBV50; nas frequências: (a) 0,1 Hz, (b) 1 Hz, (c) 10 Hz e (d) 50 Hz (D. Chen et al., 2007)

Com o aumento da frequência dos ensaios os valores das  $T_g$ 's aumentam, pois os movimentos de relaxação do polímero são atrasados quando maiores valores de frequência são utilizados. Isso reflete na curva  $\tan \delta$ , já que os picos do módulo de perda ficam em valores mais altos de temperatura, acompanhado por um aumento da  $T_g$  (CHEN et al., 2007). Pela tabela 4 é possível ter uma melhor visualização dos valores da  $T_g$  dos nanocompósitos.

**Tabela 3 T<sub>g</sub> para PHBHV e nanocompósitos de PHBHV/HA**

	T <sub>g</sub> (°C)			
	0.1 Hz	1 Hz	10 Hz	50 Hz
PHBHV	12.6	17.1	22.0	23.6 <sup>a</sup>
PHBHV10	12.8	17.1	22.4	25.1
PHBHV30	13.0	17.3	22.5	25.3
PHBHV50	13.8	17.6	23.4	25.7

<sup>a</sup> This datum was obtained at 20 Hz.

**(FONTE: (CHEN et al., 2007).**

Segundo Zhang, a presença de surfactantes no sistema dos compósitos também pode ter um efeito negativo nas propriedades termomecânicas do material. Zhang, ao estudar as propriedades termomecânicas de módulo de armazenamento e temperatura de transição vítrea dos nanocompósitos de matriz PHBHV e carga (1, 3 e 5%) hidróxido de alumínio e cobalto (SS-LDH), constatou que a adição de SS-DLH não provocou nenhuma mudança fundamental nos valores das T<sub>g</sub>'s dos nanocompósitos. Já nos valores do módulo de armazenamento há uma tendência de crescimento dos módulos, de 9762 MPa em -30°C e 1550 MPa em 120°C, e 10772 MPa e 13826 MPa em -30°C, para os nanocompósitos com carga de 1% e 3 % de SS-LDH, respectivamente. Entretanto, o módulo de armazenamento do nanocompósito com 5% de carga diminuiu. Isso significa que com menores concentrações de carga o efeito do reforço é mais significativo, e a medida que a concentração aumenta o efeito do plastificante passa a dominar. Já que, com altas cargas de SS-LDH o nanocompósito contém grande quantidade de longas cadeias alquils do surfactante, que possuem baixo desempenho mecânico. Assim, como muitos surfactantes ficam aderidos a superfície das partículas de LDH a interação entre o LDH e a matriz fica prejudicada e as partículas não conseguem suportar a carga quando esta é aplicada ao compósito, aumentando os movimentos conformacionais das cadeias poliméricas da matriz na região de interface matriz/carga. Essa fraca interação leva à baixos valores do módulo de armazenamento (ZHANG et al., 2012). A Figura 18 e a tabela 5 mostram os resultados obtidos por Zhang.

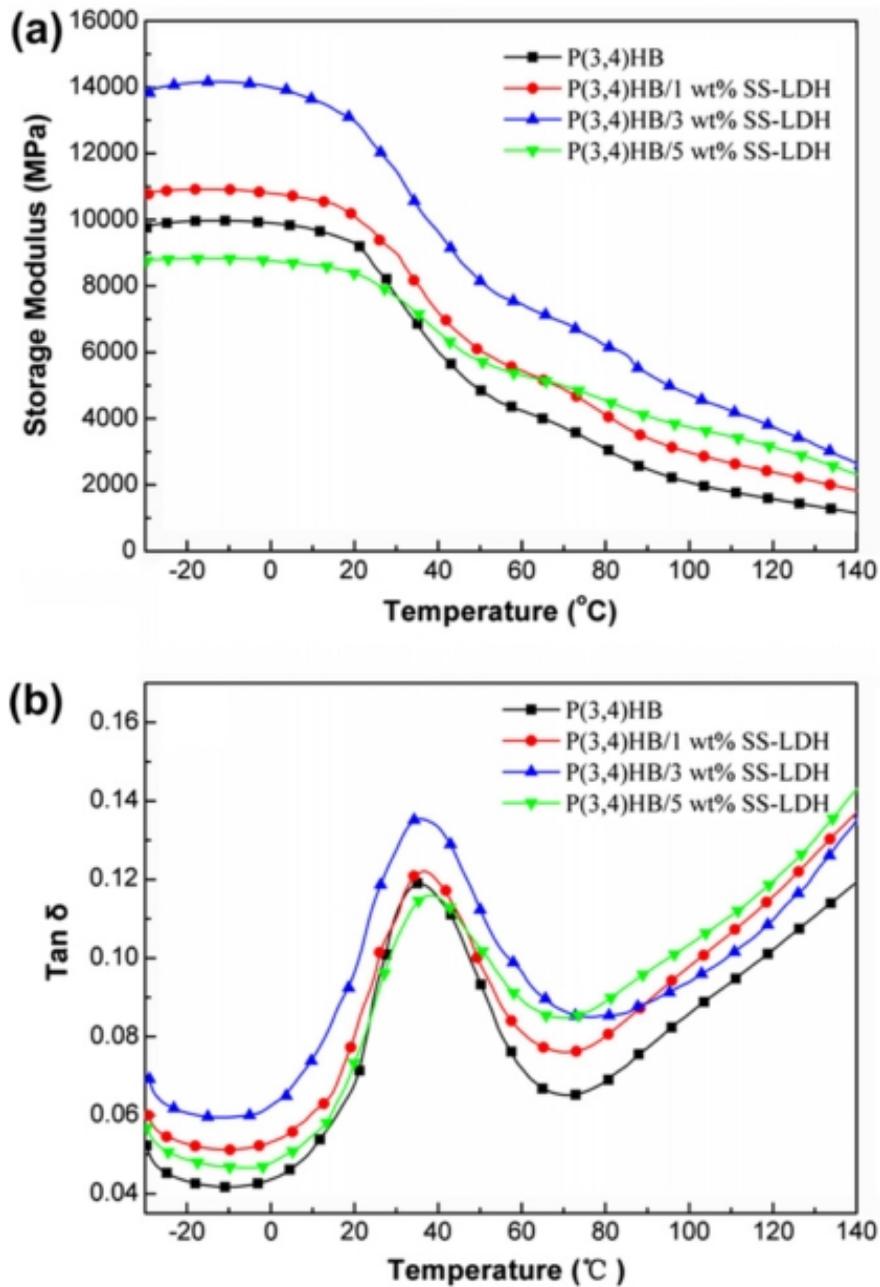


Figura 18 Curvas de DMA para p PHBV e seus nanocompósitos: (a) módulo de armazenamento e (b) tan δ (R. Zhang et al., 2012)

Tabela 4 Resultados da análise dinâmico-mecânica dos nanocompósitos

Sample code	T <sub>g</sub> (°C)	Storage modulus (MPa)	
		-30 °C	120 °C
P(3,4)HB	35	9762	1559
P(3,4)HB/1 wt% SS-LDH	36	10,772	2382
P(3,4)HB/3 wt% SS-LDH	36	13,826	3761
P(3,4)HB/5 wt% SS-LDH	37	8766	3137

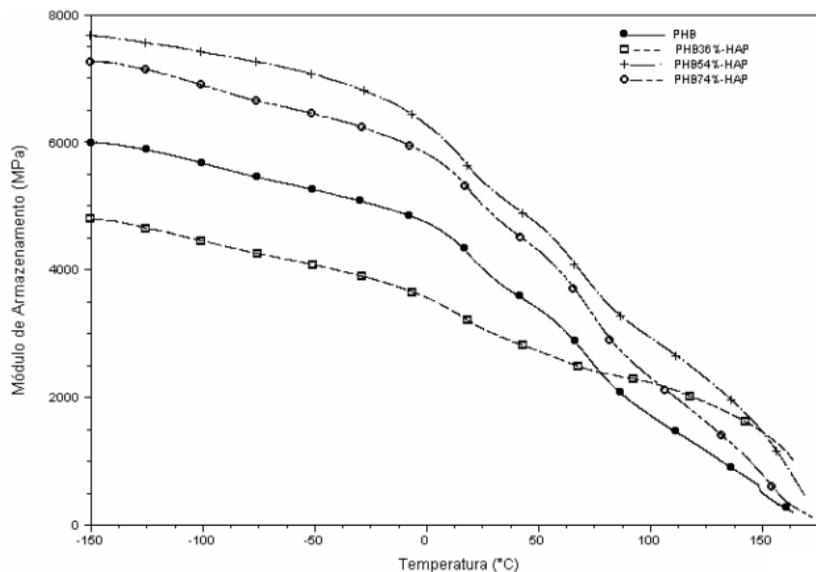
(FONTE: (ZHANG et al., 2012))

Leila e seus colaboradores também estudaram biocompósitos com matriz polimérica de PHB e cargas de hidroxiapatita e sua propriedades mecânicas e termomecânicas. Os autores observam um aumento nas propriedades mecânicas de módulo de elasticidade e resistência mecânica com a introdução da carga particulada de hidroxiapatita, sendo que com maiores proporções de carga há um decréscimo nessas propriedades, que estão associadas, segundo os autores, a aglomerações formadas (LEILA CORRÊA BARRETO SIQUEIRA, 2009). Como mostra a tabela 5.

**Tabela 5. Tabela comparativa das propriedades mecânicas dos compósitos.**

Corpo de prova (% em massa)	$\sigma$ máxima (MPa)	Deformação máxima (%)	Módulo Elástico (GPa)
PHB	25,25	0,8	3,0
PHB/HAP(74/26)	24,77	0,58	3,9
PHB/HAP(54/46)	23,38	0,44	4,5
PHB/HAP(36/64)	14,16	0,19	5,8
Osso desproteínizado (GenOx Inorg.)	1,28	15,60	0,011

(FONTE:(LEILA CORRÊA BARRETO SIQUEIRA, 2009))



**Figura 19. Gráfico de DMA com variação do módulo de armazenamento com a temperatura dos biocompósitos (LEILA CORRÊA BARRETO SIQUEIRA, 2009).**

Os autores associam o aumento do módulo de armazenamento dos compósitos com o aumento da porcentagem de carga introduzida ao efeito de limitação dos movimentos conformacionais das cadeias poliméricas do PBH, como pode ser visto na Figura 19.

Como pode ser observado nos estudos existentes na literatura, o desenvolvimento de biocompósitos segue crescendo de maneira acelerada. Porém nos estudos presentes ainda há uma falta da análise da interação de interface carga/matriz. Esse efeito deve ser levado em consideração no que se diz respeito ao melhoramento das propriedades mecânicas do biocompósito final. Este trabalho tem o intuito de aplicar uma metodologia de revestimento prévio da carga utilizada com a matriz polimérica, afim de que essa interação seja fortalecida, conduzindo a um compósito com reforço mais disperso, distribuído e com uma interação carga/matriz mais eficiente.

## **CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 *Materiais***

#### **3.1.1 Especificação dos reagentes:**

- a) Poli-3-hidroxi-*butirato* (PHB) (PHB Indústria).  
Massa molar em peso ( $M_w$ ) ~ 600.000 Dalton  
Temperatura de fusão ( $T_M$ ): 175°C.  
Temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ): 19,5°C.  
Densidade ( $\text{g/cm}^3$ ): 1,20-1,24.
  
- b) Nanopartículas de diamante sintéticos ( $d \sim 125 \text{ nm}$ ) (Diambra diamantes).
  
- c) Álcool Etilico ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ) 95% PA (Sigma-Aldrich).
  
- d) Clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ), 99,8% PA (Sigma-Aldrich).

#### **3.1.2 Especificação dos equipamentos**

- a) Sistema utilizado no encapsulamento das partículas de ND com PHB (procedimento sujeito a patente);
  
- b) Prensa Hidráulica Modelo Marcone Ero Eletronic, para moldagem dos corpos de prova utilizados nos ensaios mecânicos;



**Figura 20 Prensa hidráulica para moldagem dos corpos de provas.**

- c) Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) JEOL JSM-6460LV (COPPE/UFRJ), para a investigação da distribuição e dispersão das partículas na matriz;
- d) Microscópio ótico invertido ZEISS Germany Axiovert 135 M (LBR/CBB/UENF) para a investigação morfológica celular;
- e) Máquina Universal de Ensaio Mecânico Instron 5582, para a realização dos ensaios mecânicos de flexão e compressão;



**Figura 21** Máquina universal de ensaios mecânicos acoplada com sistema informatizado de captação de dados.

- f) Equipamento de DMA Q800 TA Instruments, para a realização dos ensaios termomecânicos;
- g) Microdurômetro da marca Shimadzu da série HMV-2, para o estudo do efeito das partículas de ND na microdureza dos biocompósito;



**Figura 22** Microdurômetro utilizado para os ensaios.

- h) Moldes metálicos (aço inox e comum) com cavidades retangular e circular para a confecção dos corpos de prova retangulares e cilíndricos;



**Figura 23 Moldes metálicos para a confecção dos corpos de prova, em aço inoxidável e comum, respectivamente.**

- i) Sistema de aquecimento uniforme na forma anelar, para o aquecimento lateral dos moldes de aço.



**Figura 24 Sistema de aquecimento uniforme.**

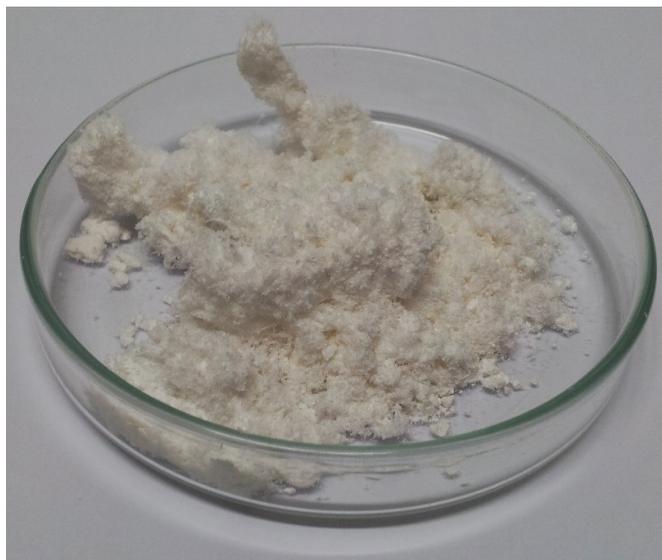
## **3.2 Preparação dos nanocompósitos**

### **3.2.1 Purificação**

O PHB utilizado foi purificado utilizando o clorofórmio como solvente na proporção de 10 g de PHB para 160 ml de clorofórmio. Em um balão de fundo redondo foi deixado sob agitação contínua de 150 RPM à temperatura ambiente. O polímero foi purificado em refluxo durante uma média de 10 horas e, logo após, foi precipitado em solução de etanol 95% a uma temperatura de aproximadamente 0°C sob agitação contínua.

### **3.2.2 Secagem**

A solução de PHB precipitado em etanol foi deixada em repouso para que houvesse a decantação do precipitado. Após a separação do PHB do álcool etílico, o polímero foi levado à estufa para secar à 60°C durante 2 horas, para a eliminação parcial dos solventes. O PHB purificado foi armazenado em um dessecador a vácuo. A figura 25 mostra a massa de PHB seca e purificada.



**Figura 25** Massa de PHB purificado e seco.

### 3.2.3 Recobrimento das partículas

Para o recobrimento/encapsulamento das partículas de nanodiamantes, na matriz de PHB, foi preparada uma solução de PHB purificado em clorofórmio na proporção de 4 g de PHB para 150 ml de clorofórmio formando uma solução homogênea de PHB no clorofórmio.

As partículas de nanodiamantes foram adicionadas na solução, sob agitação, em duas concentrações diferentes de PHB-ND, sendo a primeira de 4:1 e a segunda de 8:1. Esta solução de Clorofórmio-PHB-ND foi evaporada utilizando procedimento específico (sujeito a reivindicação de patente) o que permitiu o recobrimento das nanopartículas. O encapsulamento das partículas (FIGURA 25) foi condicionado pelas condições da metodologia utilizada obtendo-se concentrações e recobrimento diferentes para as amostras 1-4 (TABELA 6)



**Figura 26 Encapsulados de PHB/ND.**

**Tabela 6 Amostras produzidas pelo Spray Dryer com concentração e local de retirada especificado.**

Amostra	Concentração (PHB:ND)
1	8:1
2	4:1
3	8:1
4	4:1

### 3.2.4 Moldagem

Para a confecção dos corpos de prova para os ensaios mecânicos de flexão, compressão e a análise térmica DMA, as partículas P3HB/ND (FIGURA 26) foram previamente pesadas e colocadas no molde metálico (FIGURA 23) confeccionados.

O molde foi levado a um sistema de vibração a vácuo por um tempo de 5 minutos para que as partículas pudessem ficar melhor acomodadas dentro da matriz do molde. O sistema foi levado à prensa e aquecido à 135°C com o auxílio de um sistema de aquecimento uniforme (FIGURA 24). Ao estabilizar a temperatura, uma pressão de 8 T sobre o êmbolo do molde foi aplicada para a moldagem dos corpos de prova.



**Figura 27** Corpos de provas do biocompósitos PHB-x%ND na forma cilíndrica e retangular para ensaios mecânicos e termomecânicos.

Moldes metálicos com cavidades retangular e circular foram utilizados para a confecção dos corpos de prova retangulares (5x12x35mm) e cilíndricos

(12,7 mm de diâmetro por 20mm de altura) para ensaios mecânicos de flexão e compressão, respectivamente (FIGURA 26).

### 3.3 Caracterização dos biocompósitos

#### 3.3.1 Difração de Raio X

As análises foram realizadas a partir das formulações do encapsulado PHB/ND, do PHB puro e das partículas de ND. A difração de raio X foi utilizada para determinar a porcentagem de cristalinidade da fase polimérica e a influência da adição das partículas de ND sobre a cristalinidade. Os difratogramas do PHB foram obtidos utilizando um difratômetro Shimadzu XRD-7000, disponível na UENF/CCT/LAMAV, equipado com raios-x de Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 0,1540$  nm). As varreduras foram feitas na faixa do ângulo de difração  $2\theta = 2 - 40^\circ$  e velocidade de  $0,5^\circ/\text{min}$ . As porcentagens de cristalinidade foram calculadas a partir da deconvolução da curva experimental e ajuste utilizando uma função matemática com auxílio do programa *OriginLab 8.0*. A relação entre as áreas dos picos e a área total (picos e halos) representa a porcentagem de fase cristalina.

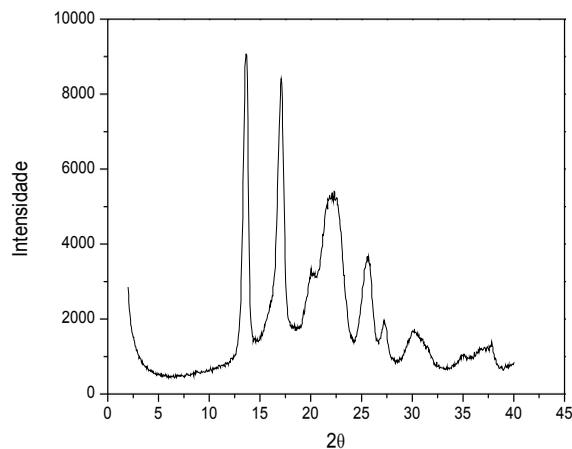
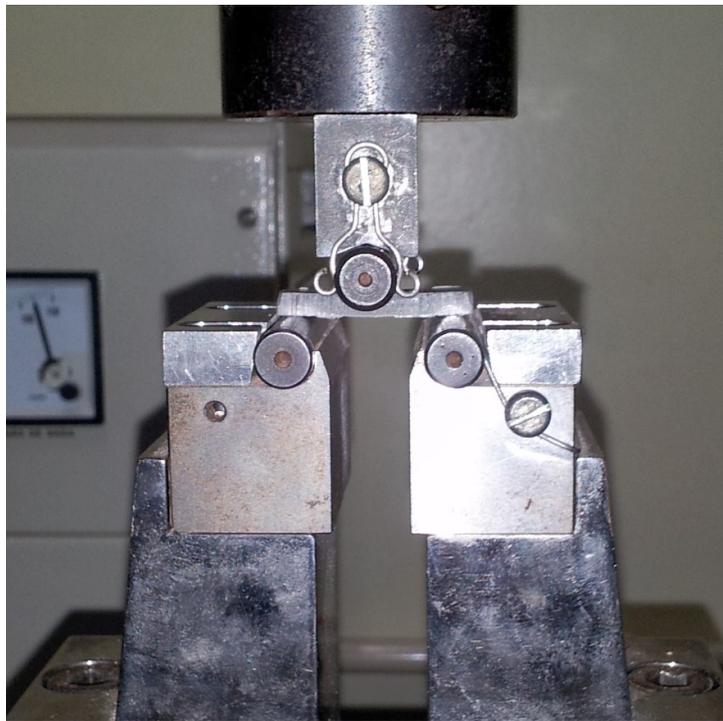


Figura 28 Difratograma com a curva para o cálculo da área dos picos.

### 3.3.1 Propriedades mecânicas

#### 3.3.1.1 Ensaio de flexão

O desempenho mecânico dos biocompósitos foram testados sob condição de flexão no sistema de três pontos. Os ensaios foram realizados, em cinco corpos de prova para cada concentração de nanocarga, por meio de testes na máquina universal de ensaios mecânico, marca Instron, modelo 5582 (FIGURA 21).



**Figura 29 Modelo do ensaio de flexão em três pontos.**

Os valores de módulo de flexão/elasticidade ( $E$ ) e tensão máxima ( $\sigma_M$ ) foram determinados. Utilizando a velocidade de ensaio de 1,0 mm/min, as condições do ensaio foram de acordo com a norma ASTM D790. Os resultados de módulo de flexão e tensão de flexão máxima foram calculados pelas seguintes equações, respectivamente:

$$E = L^3m/4bd^3 \quad (1)$$

$$\sigma_m = 3PL/2bd^2 \quad (2)$$

Onde:  $b$  e  $d$  são a largura e a espessura da amostra, respectivamente,  $L$  é o comprimento entre os apoios,  $D$  é a deformação máxima no centro do feixe,  $P$  é a carga no ponto máximo da curva e  $m$  é o declive da parcela inicial da linha reta da curva de carga por extensão (Nxmm) (ASTM, 2007).

Para encontrar o valor de  $m$  utilizou-se o programa Lab Origin para construção da curva Carga por Extensão (Nxmm) e o coeficiente angular da curva linear calculado.

### 3.3.1.2 Ensaio de compressão

As propriedades compressivas de um material avaliam o comportamento do mesmo quando submetido a uma força de compressão uniaxial. Para a obtenção dessas propriedades foi utilizada uma máquina universal de ensaios mecânicos, marca Instron, modelo 5582.

Corpos de prova cilíndricos com dimensões de 12,7 mm de diâmetro e 25,4 mm de altura e uma velocidade de ensaio de 1,3 mm/min foram os parâmetros do ensaio de acordo com a norma ASMT D695.

A resistência à compressão ( $\sigma_c$ ) e módulo de compressão (elasticidade) ( $E_c$ ) foram calculados. De acordo com a norma técnica ASTM, a  $\sigma_c$  calcula-se dividindo a carga máxima compressiva suportada pela amostra durante o ensaio pela área mínima da seção transversal do corpo de prova, expressando o resultado em MPa. Já o módulo de compressão foi calculado a partir do desenho de uma reta tangente na porção inicial linear da curva de tensão deformação, escolhendo um ponto aleatório nesta curva e o ponto de interseção da reta tangente com a curva tensão deformação e calculando o coeficiente linear entre estes dois pontos (ASTM, 2010) como mostra a figura 30.

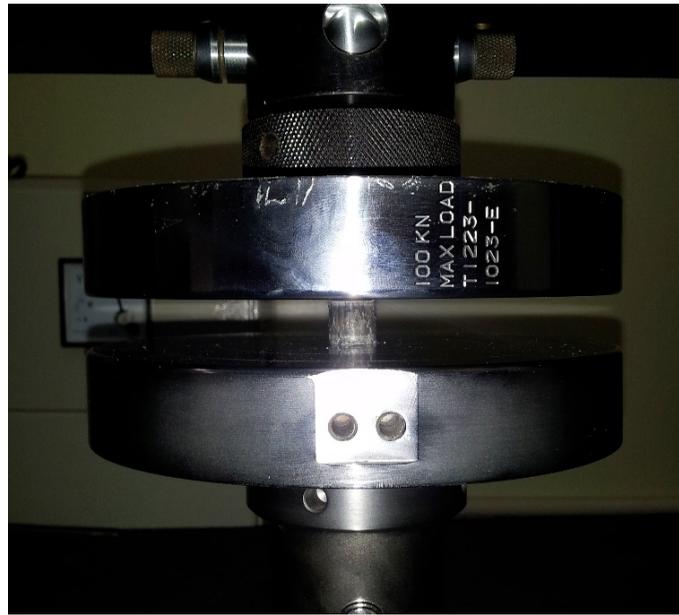


Figura 30 Modelo do ensaio de compressão.

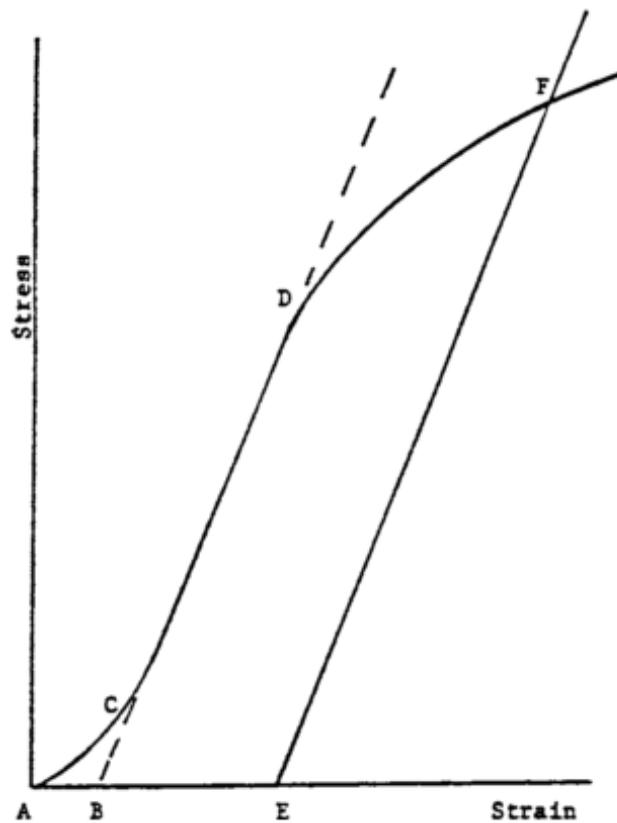
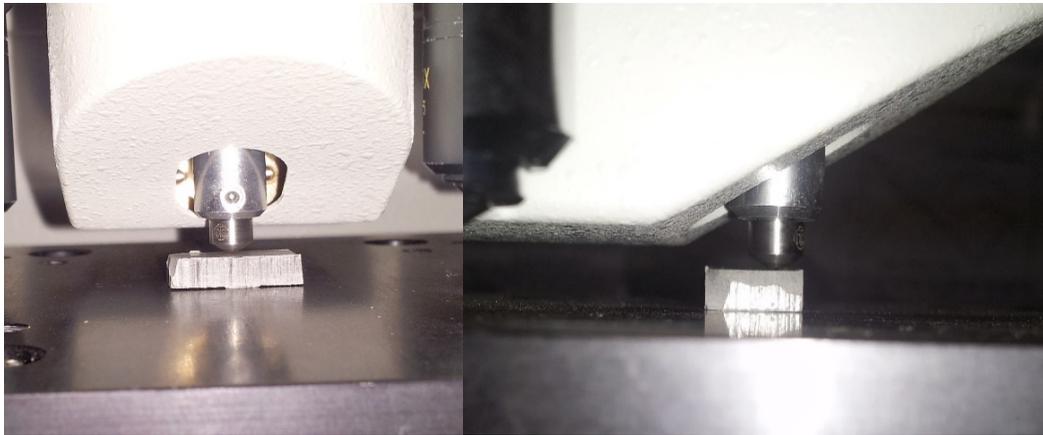


Figura 31 Exemplo do cálculo do módulo de compressão/elasticidade (ASTM, 2010)

### 3.3.1.3 Ensaio de microdureza

A dureza dos materiais é uma ferramenta muito útil para a avaliação dos materiais, controle de qualidade e de processos de produção. Ensaios de microdureza consistem na formação de uma indentação relativamente pequena na superfície da amostra a ser avaliada. O penetrador de diamante tem uma geometria específica de acordo com o tipo de dureza que será medida (Vickers, Knoop, Rockwell, Brinell e etc), que é pressionada na superfície da amostra deixando uma marca de um quadrado ou círculo impressa, então as dimensões são medidas e o valor da microdureza é adquirido (ASTM, 2013).

Foram realizados ensaios de microdureza Vickers e com condições do teste de acordo com a norma técnica ASMT E 384. O ensaio foi realizado em um microdurômetro da marca Shimadzu da série HMV-2 e uma carga de 300 g (CHEN; WANG, 2002) e um tempo de indentação de 20 segundos. Para cada formulação foram feitas 15 indentações. O microdurômetro gera valores de microdureza de acordo com as medições das diagonais impressas no material pelo indentador de diamante.



**Figura 32** Indentação da pirâmide de diamante em uma amostra no ensaio de microdureza.



**Figura 33** Diagonais da indentação impressa no material utilizada para o cálculo dos valores de microdureza.

### 3.3.2 Propriedades termomecânicas

#### 3.3.2.1 Análise Dinâmico-mecânica (DMA)

Para a investigação das propriedades termomecânicas foi realizada a análise Dinâmico-mecânica na unidade de caracterização térmica e de superfície de materiais (UCTS) do Sepol/LAMAV. Este ensaio foi realizado por meio de corpos de prova de dimensões 3,5x0,9x0,4 (CxLxE) em um DMA Q800 TA instruments. Foi utilizada uma mini garra de flexão em três pontos (FIGURA 33). As condições de análise foram frequência 1 HZ, amplitude de 10  $\mu\text{m}$  e força estática de 0,1 N. As amostras foram resfriadas até 25°C, mantidas isotermicamente a esta temperatura durante 3 minutos e posteriormente aquecidas a uma taxa de 3°C/min até 190°C. Foram determinados os módulos de armazenamento ( $E_s$ ), módulo de perda ( $E_L$ ) e de amortecimento ( $\tan \delta$ ).



**Figura 34** Mini garra de flexão em três pontos do DMA.

#### 3.3.2.2 *Análise de calorimetria diferencial (DSC)*

Com o PHB purificado (FIGURA 25), foi realizado o ensaio de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Esta análise foi feita para que se pudesse ter a temperatura, ou faixa de temperatura, na qual o material a ser utilizado (PHB), especificamente considerando sua massa molar e dispersão, apresenta suas transições e a porcentagem de cristalinidade observada após a formação das nano partículas P3HB/ND. Essa informação foi relevante para o estabelecimento das condições dos corpos de prova evitando a degradação parcial do P3HB dada a sua estreita janela de processamento (ABE, 2006). As análises foram feitas no sistema DSC QDSC 2000 – TA Instruments, com resfriamento controlado (LNCS) na Unidade de Caracterização Térmica e Superficial (UCTS/SEPOL). Utilizou-se uma amostra de PHB de 2,9 mg em uma faixa de temperatura de -105 à 200°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min e atmosfera de nitrogênio dinâmica de 20mL/min.

#### 3.3.2.2 *Análise termogravimétrica (TGA)*

As análises de termogravimetria foram realizadas nas partículas P3HB/ND utilizando o sistema de TGA SDT 2960 – TA Instruments, existente na Unidade de Caracterização Térmica e Superficial (UCTS/SEPOL). A análise termogravimétrica foi realizada com o propósito de avaliar o efeito da adição

dos nanodiamantes na estabilidade da matriz polimérica de P3HB e a determinação das quantidades efetivas das nanocargas no biocompósito. A faixa de temperatura utilizada no ensaio foi de 20 à 850°C, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min e um fluxo de ar de 100 mL/min.

### **3.3.3 Análise morfológica**

#### *3.3.3.1 Microscopia eletrônica de varredura*

Por microscopia eletrônica de varredura foi investigada a dispersão/distribuição da carga de nano diamante na matriz polimérica observando a região de fratura após ensaio de flexão o que permitiu obter informações como possíveis concentrações de tensões, etc., que permitam explicar as propriedades mecânicas encontradas. Pelo MEV também foi analisada as diferenças morfológicas das partículas dos biocompósitos (diferentes amostras). A análise foi feita no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) JEOL JSM-6460LV (COPPE/UFRJ) com voltagem de 15 kV. As amostras foram metalizadas com ouro.

### **3.3.4 Ensaios biológicos *IN VITRO***

Após a investigação das propriedades mecânicas deste material que terá como finalidade o contato com o organismo humano foi necessário a sua avaliação biológica (ALVES et al., 2010). Desse modo, foram feitos testes biológicos para a avaliação de citotoxicidade e indução de resposta inflamatória do material colocando os nanobiocompósitos estudados em contato direto com culturas celulares de fibroblastos e macrófagos, respectivamente (RARE, 1985). Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR/CBB/UENF).

#### *3.3.3.1 Cultura celular*

Dois tipos de células foram crescidos em cultura, como dito anteriormente, essas foram fibroblastos murinos L929 e macrófagos murinos da linhagem raw2647 registrado pela *American Type Culture Collection* (ATCC).

#### 3.3.3.1.1 Cultura de fibroblastos murinho L929

Células de fibroblastos de murinos L929 (ATCC CLL-1; *American Type Culture Collection*) anteriormente armazenadas em nitrogênio líquido foram descongeladas e cultivadas em meio DMEM-F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em estufa à 37°C com ambiente de 5% de CO<sub>2</sub> até formarem uma monocamada aderente no fundo da garrafa.

#### 3.3.3.1.2 Cultura de macrófagos raw264.7

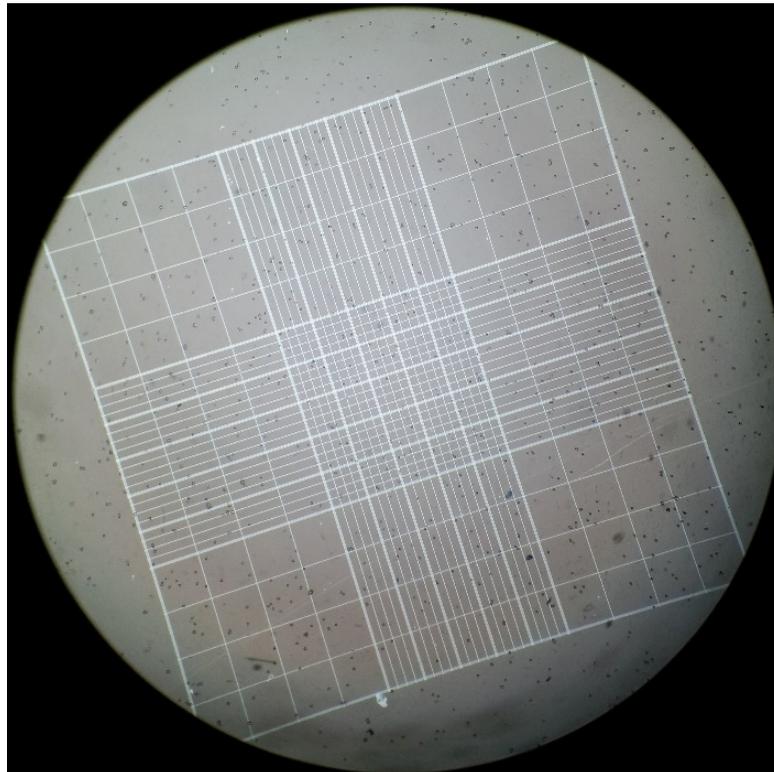
Os macrófagos raw264.7 (ATCC TIB-71; *American Type Culture Collection*), também descongeladas e cultivados no mesmo meio descrito no item anterior, acrescido com a solução de antibiótico Penicilina 50u/mL e Estreptomicina 50µg/mL. As células também foram mantidas em uma estufa à 37°C com ambiente de 5% de CO<sub>2</sub> até a formação da monocamada no fundo da garrafa antes do início dos testes.

#### 3.3.3.2 Preparação do material para os ensaios biológicos

As células foram coletadas das garrafas para contagem e posterior teste *in vitro* com os biocompósitos. Para a cultura de fibroblastos foi utilizada a Tripsina 0,05% e EDTA 0,05% em PBS (tripsinação) para a coleta, principalmente devido a boa aderência das células com o fundo da garrafa, já para a cultura de macrófagos foi feito um jateamento com pipeta com o próprio meio para que houvesse o desprendimento das células do fundo da garrafa. Uma amostra de 50 µL de cada uma das culturas de célula foi corada com o corante Tryplan-blue (0,1% em PBS) e levadas a câmara de Newbawer para a contagem das células vivas, com o auxílio do microscópio ZEISS Germany

Axiovert 135M, nos 4 quadrantes (FIGURA 34) para a determinação da concentração celular no meio de  $2 \times 10^5$  células por mL.

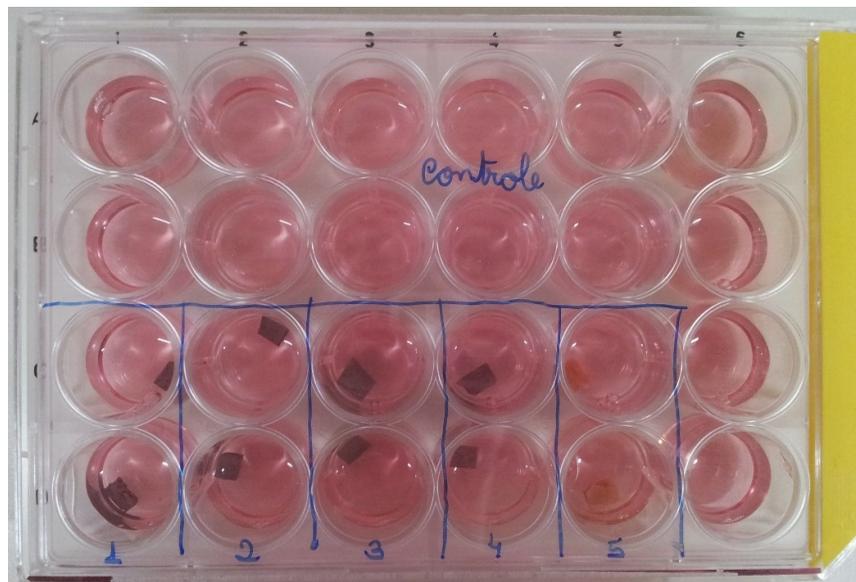
Amostras dos biocompósitos foram cortadas na forma cúbica com dimensões aproximadamente de 3 mm de lado para serem postas em contato com as culturas celulares. As amostras foram esterilizadas em uma autoclave vertical da marca Phoenix Lufenco modelo AV-75 a uma temperatura de  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. Todas as amostras, em duplicada, foram divididas em diferentes poços da placa de cultura celular de 24 poços numeradas de 1 à 5 para identificar as diferentes concentrações de ND (TABELA 7) e 60.000 células foram colocadas em cada poço com 1 mL de meio de cultura para que as amostras sejam cobertas como mostra a (FIGURA 35). Poços contendo células foram mantidos sem material para que servissem como controle de ausência de citotoxicidade. Controles positivos para citotoxicidade foram feitos usando solução de 10% de Triton 100x para cada dia de experimento.



**Figura 35** Câmara Newbaver com células coradas para contagem.

**Tabela 7 Identificação das amostras nos poços da placa BAH.**

Poço	Concentração (PHB:ND)
1	8:1
2	4:1
3	8:1
4	4:1
5	-

**Figura 36 Placa de cultura celular de 24 poços contendo as amostras e as células.**

### 3.3.3.3 Teste de indução inflamatória

No teste de indução de resposta inflamatória, os macrófagos e os fibroblastos foram plaqueadas nas placas contendo os biocompósitos e mantidas na estufa à 37°C durante os dez dias de experimentos, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Durante o experimento foram coletadas amostras de sobrenadantes dos poços contendo os biocompósitos e dos poços de controle. Os pontos de coleta para os macrófagos foram após o 1°, 2°, 3°, 4°, 7° e 9° dia de contato e houve a troca do meio sobrenadante no 4° dia do experimento. Já para os fibroblastos as coletas foram após o 1°, 3°, 4°, 7° e 10° dia de contato e houve a troca do meio sobrenadante no 4° dia do experimento. Para avaliação

da resposta inflamatória foi avaliado o mediador inflamatório no sobrenadante das culturas: Oxido nítrico (NO).

Para avaliar a produção NO, pelos macrófagos e fibroblastos, foi feito pelo método de Griess. No 10º dia de contato, isto é, ao final do experimento as amostras foram coradas com o corante Trypan-Blue (0,02% de PBS) com a finalidade da revelação em azul das células mortas para contagem.

#### 3.3.3.3.1 Teste da quantificação de mediadores químicos: NO

##### NO: Óxido nítrico

O NO também é um produto dos macrófagos ativados por citocinas (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997). O papel do NO no sistema imune é como um agente tóxico para organismos infecciosos, indutor ou supressor de apoptose e imunoregulador (BOGDAN, 2001). A avaliação da produção de NO pelos macrófagos e pelos fibroblastos foram feitos por meio do método de Griess. Desse modo, o reagente de Griess p-aminobenzenosulfonamida 1% + diidrocloreto de naftilenodiamino 0,1% em 5% de ácido fosfórico, recém preparado, foi adicionado a 50 µL dos sobrenadantes coletados dos poços contendo as amostras do biocompósito. Após 10 minutos foi medida a absorvância no comprimento de onda de 570 nm no espectrofotômetro de placa (Dynatech MR 5000) presente no LBR/CBB/UENF. Para o cálculo da concentração de NO nos sobrenadantes coletados utilizou-se como referência uma curva de nitrito de sódio subtraída dos valores dos aditivos com ausência das células.

#### 3.3.3.4 Teste de citotoxicidade

Para os testes de citotoxicidade foram utilizados os dois tipos de culturas celulares. Os pontos de coletas de sobrenadantes das células plaqueadas com macrófagos e fibroblastos, que foram coletados como descrito no item anterior, foram utilizados para a monitoração da presença de enzima marcadora de citotoxicidade após o contato das células com o biocompósito. A LDH (deidrogenase láctica) foi utilizada como marcador de dano/morte celular. Já

que qualquer danificação na membrana celular irá causar a liberação da enzima podendo esta ser constatada na fração coletada do sobrenadante onde estará dissolvida (RARE, 1985)

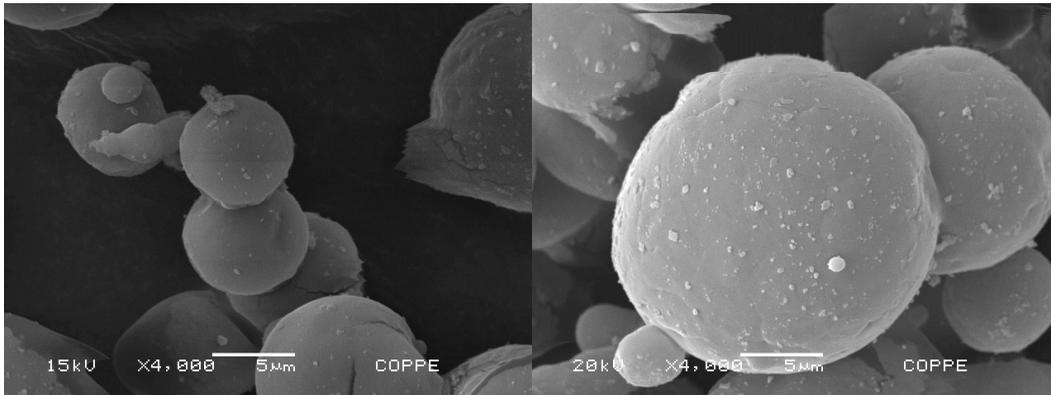
Para as culturas de fibroblastos L929 no 3° e 7° dia analisou-se a morfologia celular dos poços contendo o biocompósito comparando com os poços de controle por microscopia ótica. Para a monitoração da morte celular, tanto dos fibroblastos e dos macrófagos, no final do experimento foi utilizado o corante Trypan-blue para identificação das células mortas coradas em azul. A morfologia celular dos macrófagos também foi analisada por microscopia ótica durante os dias de contato.

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

### *ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS ENCAPSULADOS*

Para confecção dos biocompósitos de nanodiamantes e poli(3-hidroxi-butirato), os NDs foram recobertos/encapsulados pelo polímero termoplástico e analisados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Estudos anteriores já utilizaram a técnica de encapsulamento de nanopartículas com o polímero PHB para aumentar a estabilidade da nanopartículas encapsuladas e, se for o caso, diminuir sua toxicidade, ou ainda para distribuição de fármacos para tratamento de doenças (PANDIAN et al., 2011; SILVA et al., 2007).

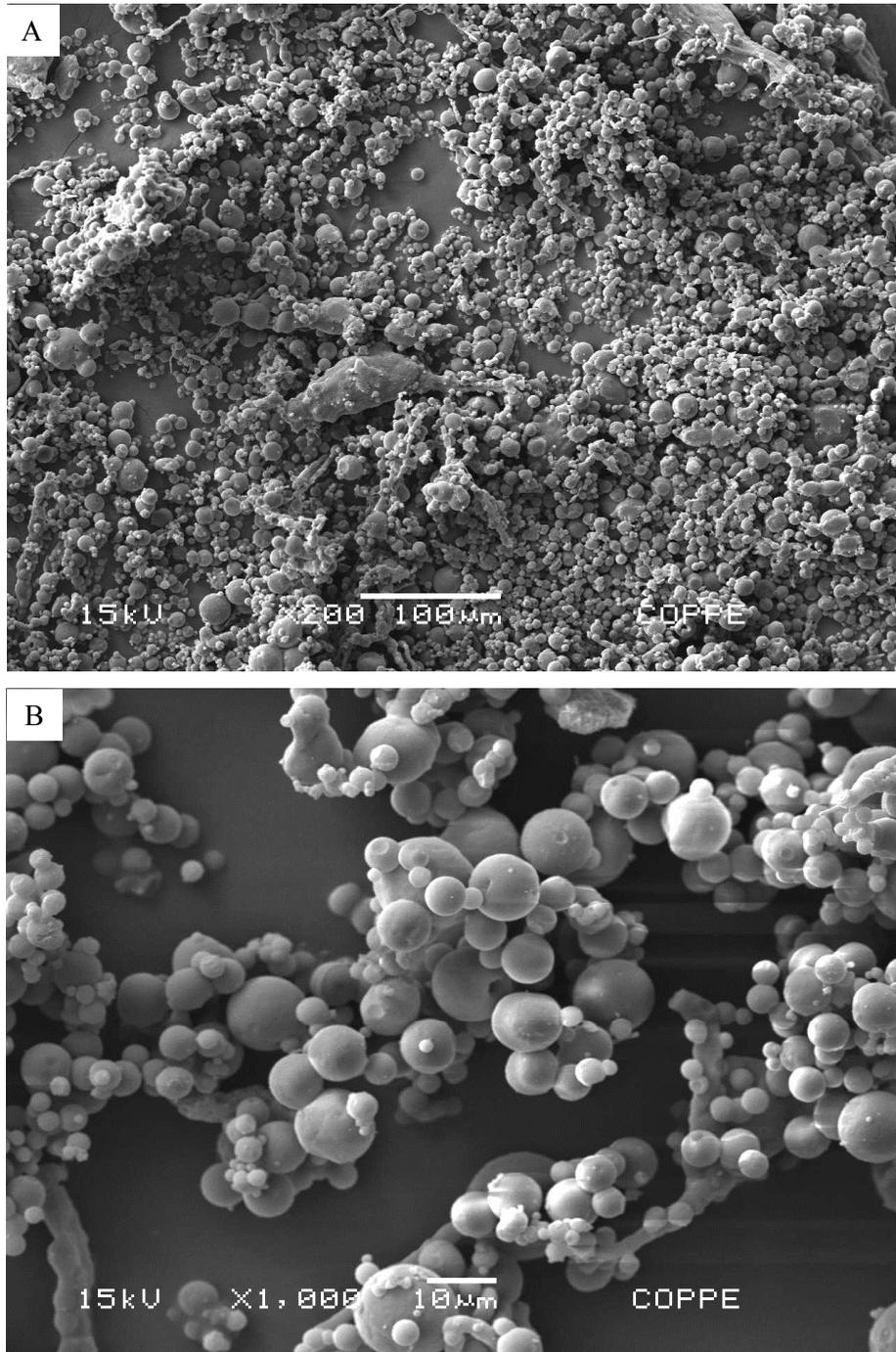
As partículas de PHB/ND, que consistem em nanodiamantes encapsulados com o polímero PHB, são mostradas na Figura 37.



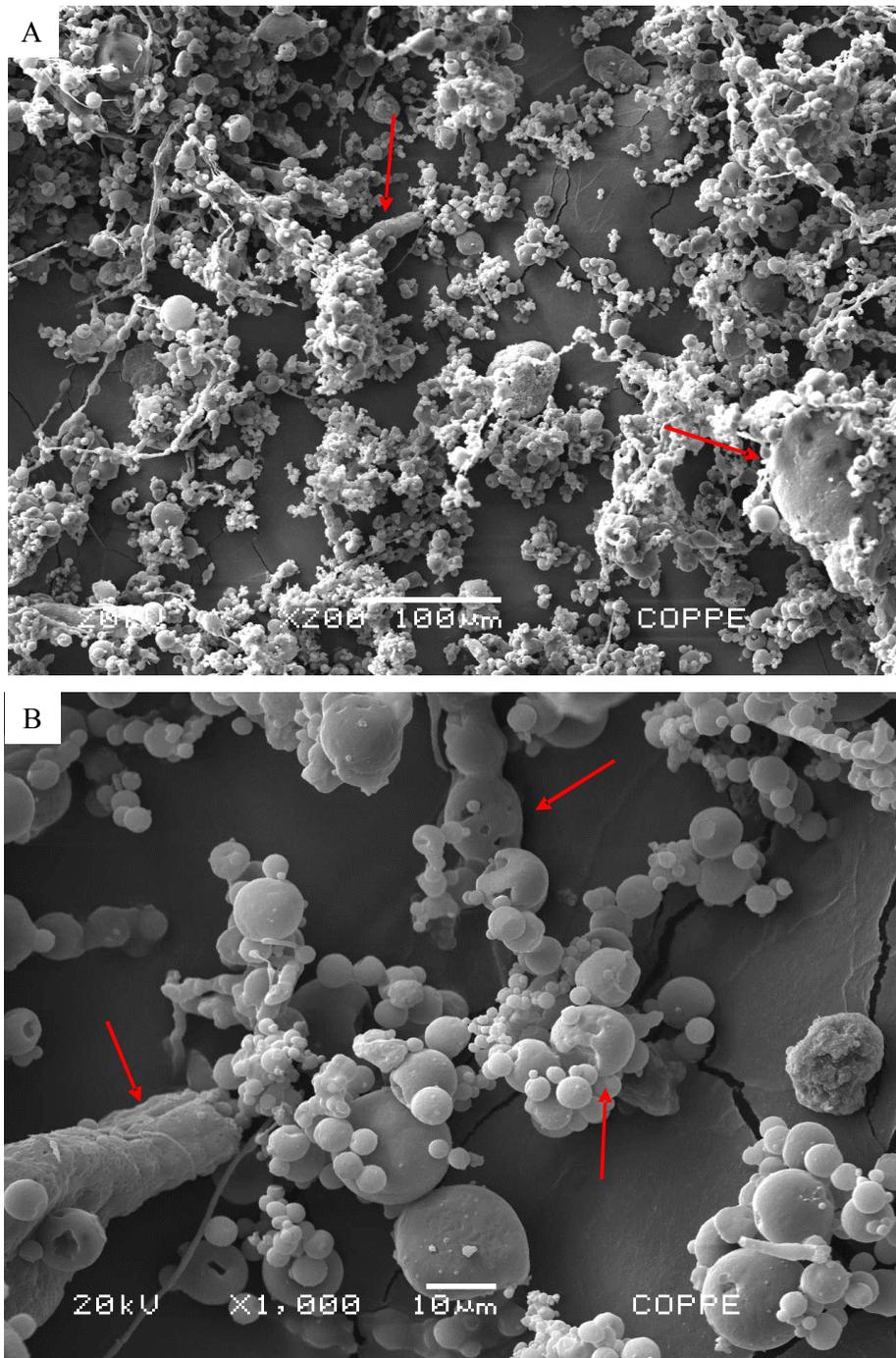
**Figura 37** Microscopia eletrônica de varredura das capsulas de PHB/ND.

Pelas micrografias apresentadas é possível observar a morfologia esférica das capsulas de PHB/ND. Para a confecção dos corpos de provas utilizados para a caracterização mecânicas dos biocompósitos foram preparadas quatro formulações de partículas de PHB/ND com diferentes concentrações de nanodiamantes e diferenças morfológicas que podem influenciar nas propriedades dos biocompósitos, na estabilidade da matriz de PHB e ainda na dispersão e distribuição das nanopartículas de diamantes na matriz após a confecção dos corpos de prova. Foram estas denominadas de P3HB-9%ND, P3HB-12%ND, P3HB-14%ND e P3HB-20%ND.

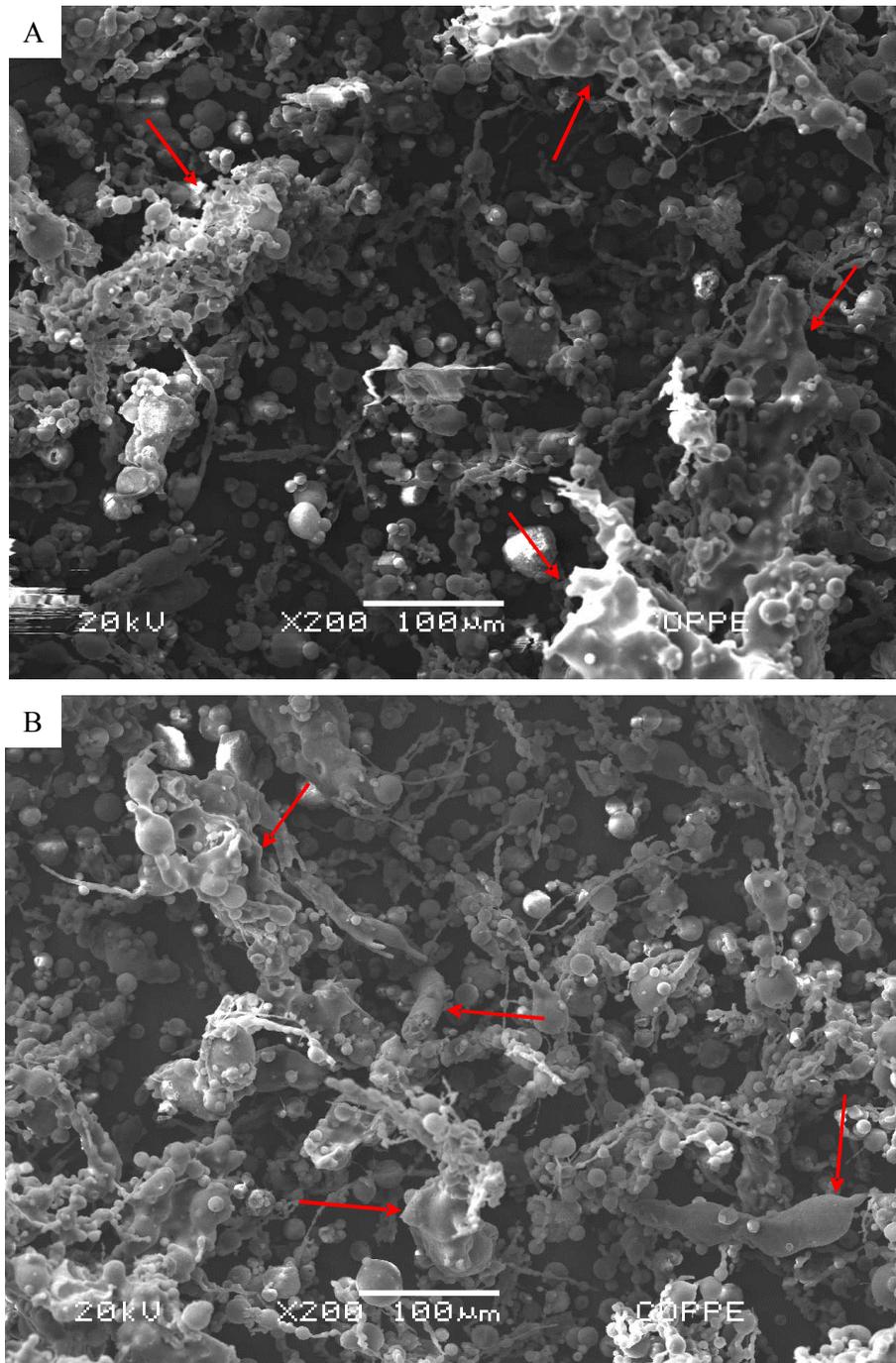
As figuras 38, 39, 40 e 41 mostram as quatro formulações das partículas de PHB/ND produzidas e que foram utilizadas para a confecção dos corpos de prova. Uma das principais diferenças das formulações está na dispersão das partículas, o que pode gerar melhor distribuição dos ND na matriz do biocompósito. Pela figura 38, referente a primeira formulação produzida (P3HB-9%ND), é possível perceber que as partículas estão dispersas uma das outras, isto é, não houve aglomeração das partículas esféricas e também não houve o coalescência das mesmas. Predominando então partículas morfologicamente uniformes e esféricas. Na segunda formulação produzida, P3HB-12%ND, (Figura 39) já é possível visualizar alguns aglomerados e coalescência de partículas de PHB/ND, na mesma amostra também se nota que algumas partículas aparecem deformadas, não mais em na forma de uma esfera perfeita, indicado pelas setas vermelhas. Na figura 40, essas características vão se tornando mais intensas. Isto significa que no encapsulamento da terceira formulação de partículas foram gerados maiores coalescência das partículas, pela figura 40-B é possível observar que algumas partículas já deixam de ser esféricas e tomam formas esticadas. Na quarta formulação, (P3HB-20%ND) essas deformações das partículas continuam ocorrendo e os aglomerados coalescem em proporções maiores como pode ser visto pela figura 41. A figura 41-A mostra que a coalescência chegou a uma proporção de formação de filmes de PHB/ND. A morfologia regular das partículas tem grande influência nas propriedades mecânicas do biocompósito final, pois geram uma melhor distribuição da carga diamantada na matriz de PHB depois de processados os corpos de prova. Além disso, os aglomerados coalescidos prejudicam a compactação das partículas no processo de moldagem para a produção dos corpos de prova, causando uma falta de contato entre as mesmas.



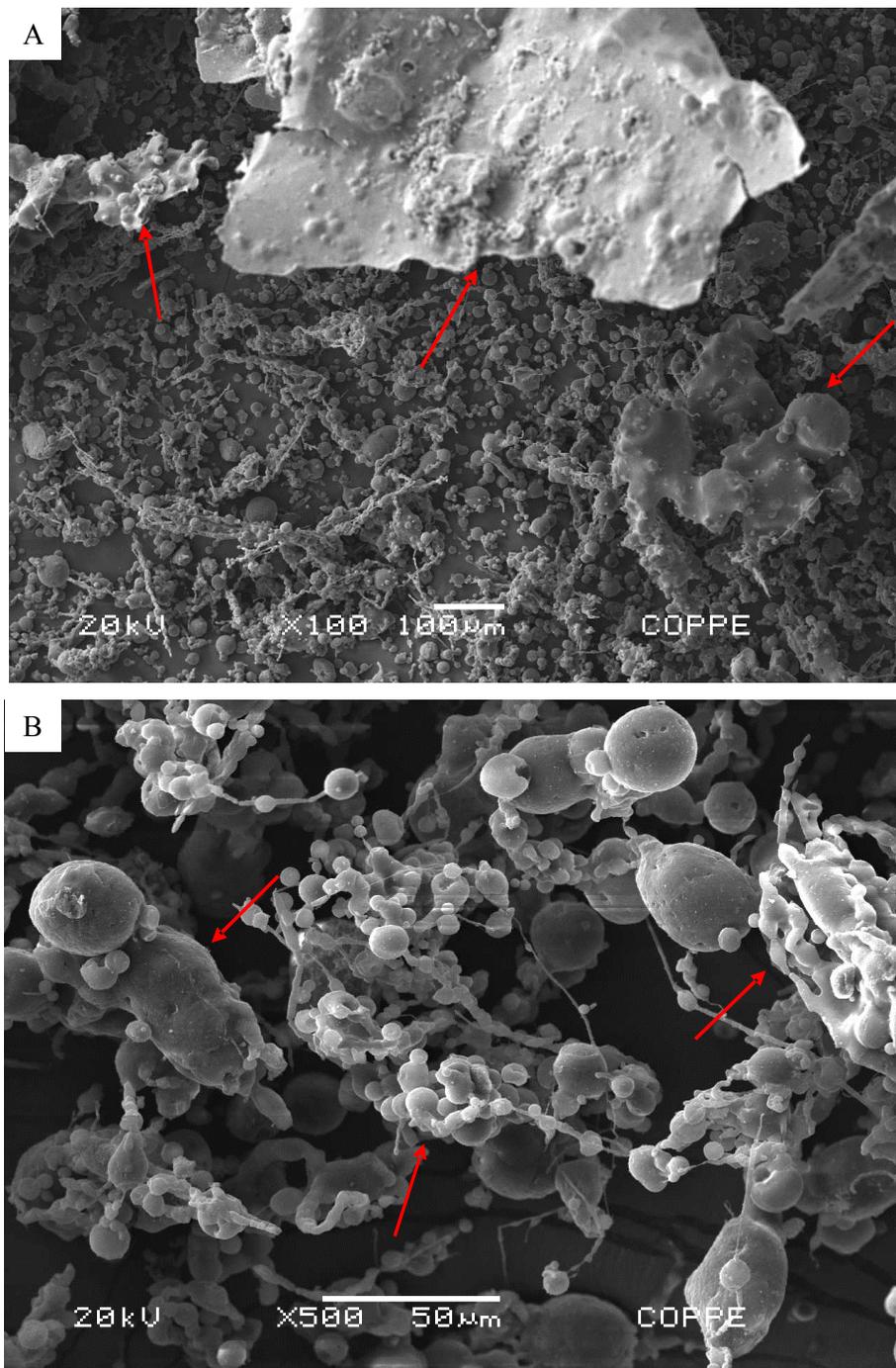
**Figura 38** Micrografia no aumento de 200x e 1000x da massa de compósito da primeira formulação: PHB-9%ND.



**Figura 39** Micrografia no aumento de 200x e 1000x da massa de compósito da segunda formulação: PHB-12%ND.

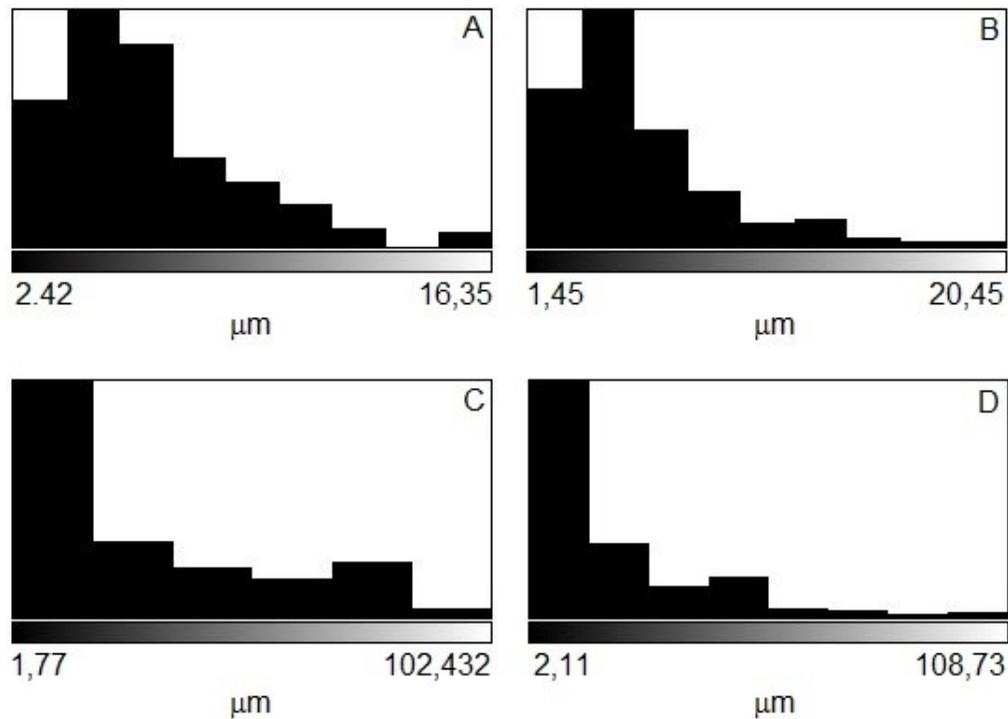


**Figura 40** Micrografia no aumento de 200x da massa de compósito da terceira formulação: PHB-14%ND.



**Figura 41** Micrografia no aumento de 200x da massa de compósito da quarta formulação: PHB-20%ND.

Uma análise da distribuição dos tamanhos das capsulas foi feita e pode ser visualizada pela figura 42.

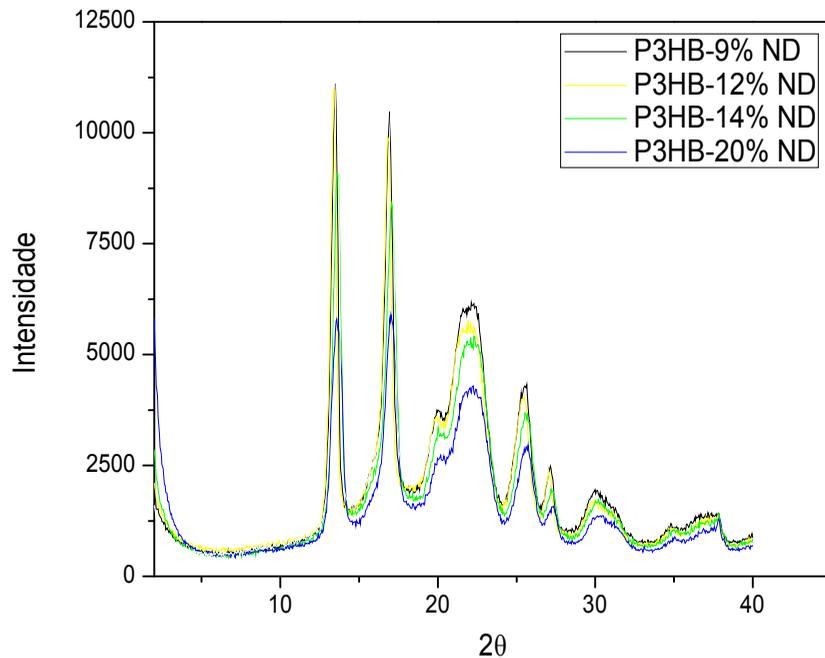


**Figura 42 Distribuição de tamanho das partículas de PHB/ND.**

O principal objetivo do estudo da distribuição dos diâmetros das capsulas é analisar a faixa de tamanhos das capsulas. É possível perceber que para a figura 42-A e 42-B a faixa é bastante estreita quando comparada com a figura 42-C e 42-D, referentes aos sistemas P3HB-14%ND e P3HB-20%ND. Assim, a média dos diâmetros foram de  $6,3 \pm 2,63$ ,  $5,9 \pm 3,41$ ,  $29,0 \pm 26,75$  e  $21,8 \pm 22,29$   $\mu\text{m}$ , para P3HB-9%ND, P3HB-12%ND, P3HB-14%ND e P3HB-20%ND, respectivamente. Essa grande variação do tamanho das capsulas para as formulações P3HB-14%ND e P3HB-20%ND está relacionada a coalescência dos aglomerados das partículas, que irão agir como uma capsula somente (figuras 38-41). O grande efeito da coalescência, conseqüentemente, da grande variação de tamanho do diâmetro está principalmente na confecção dos corpos de prova. Essa disparidade pode influenciar no empacotamento das partículas no molde, causando a falta de contato entre elas, como dito no Capítulo 3 (metodologia) os moldes foram levados a um sistema de vibração para que as partículas das formulações de PHB/ND pudessem ficar mais acomodadas no molde.

### ANÁLISE DA CRISTALINIDADE E DO COMPORTAMENTO TÉRMICO

Por meio dos difratogramas de Raio-X (DRX) (figura 43) foi possível a identificação da fase cristalina do PHB, sabendo que o poli(3-hidroxibutirato) é um material semicristalino que apresenta seus planos de reflexão em (020), (110), (021), (101), (111), (121), (040), (002) e (200) (PINTO, 2007). O cálculo da porcentagem de cristalinidade das formulações dos biocompósitos (P3HB-9%ND, P3HB-12%ND, P3HB-14%ND e P3HB-20%ND) é mostrado na tabela 8.



**Figura 43** Difratogramas de raio-X obtidos para as formulações.

A tabela 8 mostra a cristalinidade para cada formulação dos biocompósitos de ND recoberto com PHB.

**Tabela 8** Grau de cristalinidade (%) das amostras dos biocompósitos e de PHB puro estudadas.

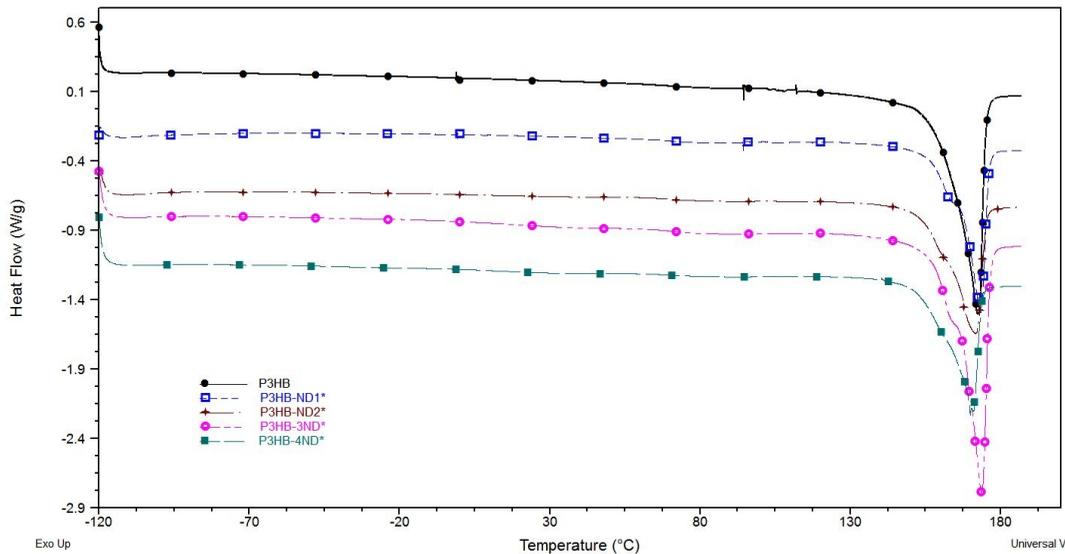
Formulação	Cristalinidade (%)
P3HB-9%ND	54,8
P3HB-12%ND	55,9

P3HB-14%ND	60,1
P3HB-20%ND	59,0

A determinação do grau de cristalinidade, ou como é muitas vezes chamado de fração cristalina é um parâmetro de grande importância na definição de propriedades físicas e químicas de um polímero (COELHO; ALMEIDA; VINHAS, 2008) pelo que resulta necessária sua análise juntamente com as propriedades mecânicas.

No particular o poli(3-hidroxi-butarato) por ser um material altamente cristalino geralmente ele se torna mais frágil e apresenta uma faixa de aplicabilidade menor (OLIVEIRA et al., 2007). Considerando as partículas dos biocompósito PHB/ND (formulações P3HB-X%ND) é possível perceber que a presença das nanopartículas de ND promovem inicialmente um aumento da cristalinidade da matriz polimérica até a formulação P3HB-14%ND, e para a formulação P3HB-20%ND há a tendência do decréscimo. Jee, ao estudar a adição de ND em uma matriz termoplástica, indica que o efeito da adição de nanopartículas de diamante numa matriz polimérica é o de aumentar a fração cristalina da matriz, pois os ND agem como agente de nucleações de novos cristais fazendo com que a matriz seja mais cristalina, porém quando a quantidade de partículas de ND aumenta o efeito passa a ser o de diminuição da fração cristalina, essa tendência está associada a aglomeração dos diamantes, o que limita a organização das cadeias poliméricas para que elas se cristalizem. Por meio das micrografias eletrônicas de varredura da figura 49 podem ser vistos esses aglomerados de ND e, conseqüentemente, a tendência da diminuição da cristalinidade da formulação P3HB-20%ND em comparação a formulação P3HB-14%ND.

A análise calorimétrica das formulações P3HB-9%ND, P3HB-12%ND, P3HB-14%ND e P3HB-20%ND mostrada na figura 44 permitiu calcular o  $\Delta H_m$ , que é o calor de fusão associado a fase cristalina da matriz e a temperatura de fusão ( $T_m$ ) de cada formulação. Essas propriedades se relacionam com arquitetura dos cristais (tabela 9).



**Figura 44** Termogramas de DSC para as amostras 1 (P3HB-9%ND), 2 (P3HB-12%ND), 3 (P3HB-14%ND) e 4 (P3HB-20%ND).

**Tabela 9** Propriedades termo físicas obtidas pelo termograma de DSC e fração cristalina obtidas pelo DRX para as formulações dos compósitos PHB/ND.

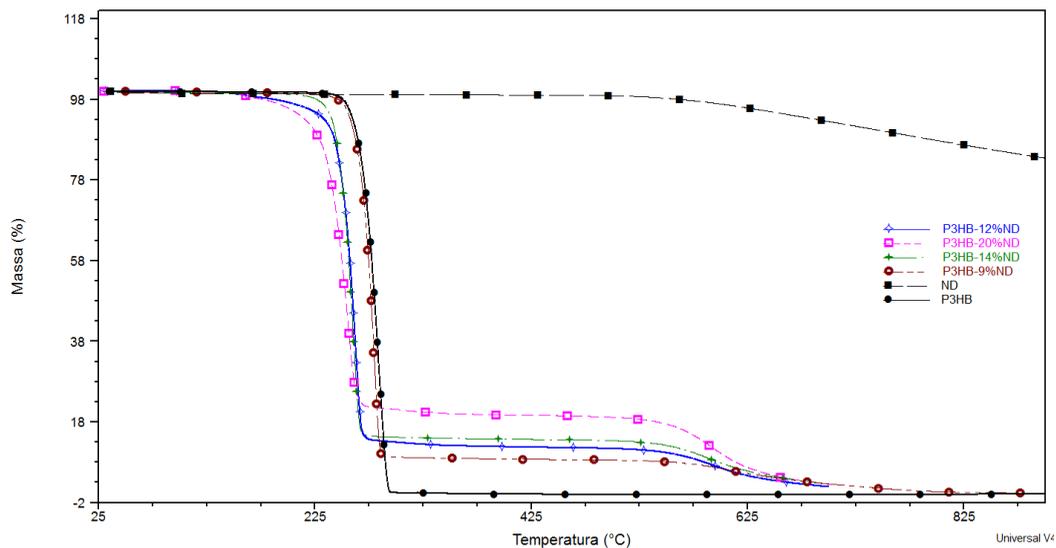
Formulação	$\Delta H_m$ (J/g)	$T_m$ (°C)	Cristalinidade (%)
P3HB-9%ND	70,90	173,1	53,25
P3HB-12%ND	71,0	171,5	55,10
P3HB-14%ND	108,50	173,6	86,11
P3HB-20%ND	65,68	169,9	56,02
P3HB	103,50	172,5	70,90

As formulações P3HB-9%ND e P3HB-12%ND tem valores próximos de  $\Delta H_m$ , temperaturas de fusão e de porcentagens de cristalinidade, como pode ser visto na tabela 9. A formulação P3HB-14%ND obteve maior calor de fusão e temperatura de fusão associada a fase cristalina e, conseqüentemente maior cristalinidade, enquanto que a formulação P3HB-20%ND obteve os menores valores das três propriedades, apresentando menor cristalinidade e cristais provavelmente com maiores defeitos.

Essas diferenças podem estar associadas a quantidade de ND presente nas partículas de ND encapsulado por PHB, assim como, a dispersão das partículas de ND na matriz polimérica de PHB gerando ou não aglomerados de ND que influenciam na cristalinidade,  $T_m$  e  $\Delta H_m$  das formulações. As

micrografias eletrônicas de varredura confirmam a presença de aglomeração e coalescimento das partículas de P3HB/ND principalmente para a quarta formulação, a qual foi formulada com a maior quantidade de nanopartículas. A presença de aglomerados também é vista na formulação P3HB-14%ND, porém em menor escala. Nas formulações P3HB-9%ND e P3HB-12%ND não se apreciam aglomerados (figura 38-41). O cálculo das quantidades relativas de ND na matriz realizados a partir da análises termogravimétrica (TGA), Figura 45, são apresentados na Tabela 10.

A análise realizada com as partículas de ND permitiu determinar o intervalo de estabilidade térmica até uma temperatura de aproximadamente 570°C, temperatura na qual se detectou perdas de massa devido à oxidação (CO e CO<sub>2</sub>) que ocorre na superfície do diamante.



**Figura 45** Curvas de TGA para as amostras P3HB-9%ND, P3HB-12%ND, P3HB-14%ND, P3HB-20%ND e ND.

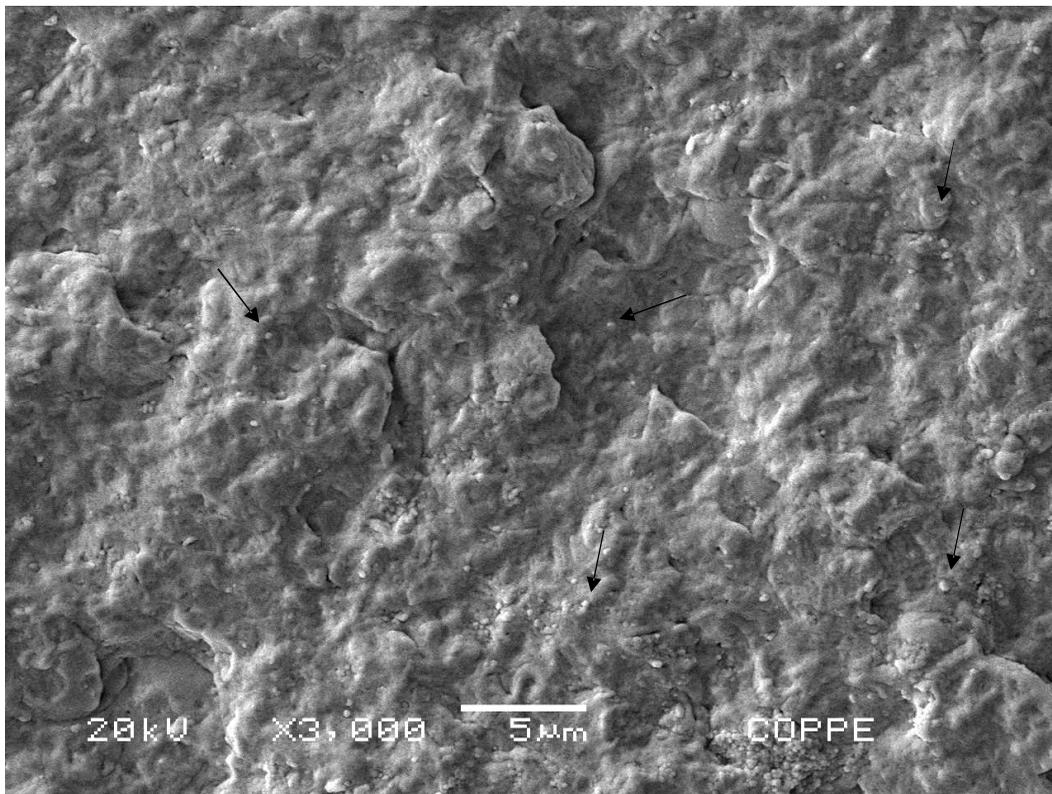
As curvas de perda de massa foram a base do cálculo da porcentagem de ND nas formulações, fixando como temperatura de referência 400°C, temperatura na qual a matriz foi degradada totalmente e a massa se mantém constante até a temperatura onde as partículas de ND se oxidam. A massa residual existente a 400°C foi considerado como a carga de ND (tabela 10).

**Tabela 10 Porcentagens de ND nas formulações dos biocompósitos.**

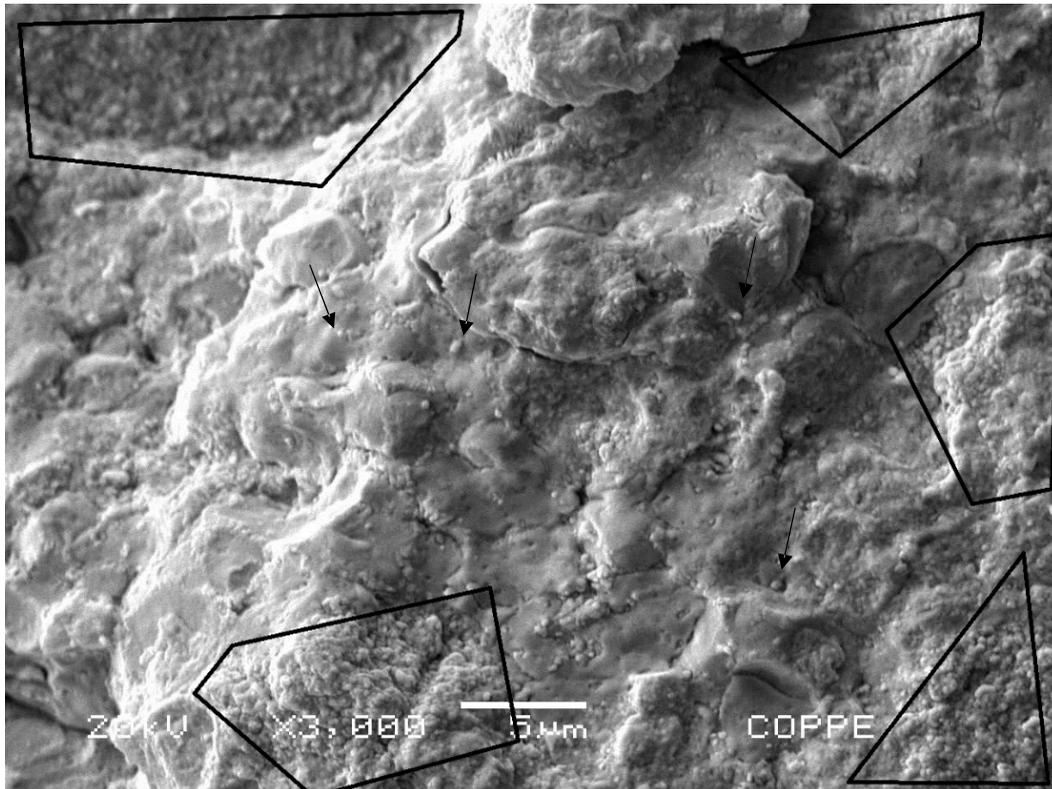
Amostra	% ND
P3HB-9%ND	8,8
P3HB-12%ND	11,8
P3HB-14%ND	13,7
P3HB-20%ND	19,7

A partir dos resultados das porcentagens de ND na matriz polimérica de PHB obtidos por TGA é possível reforçar a explicação anterior que associa a tendência de diminuição da cristalinidade,  $T_m$  e  $\Delta H_m$  da formulação P3HB-20%ND a alta quantidade de partículas de ND nas partículas P3HB/ND. A alta concentração de ND, aproximadamente 20%, gera aglomerações que impedem que as cadeias se organizem de modo a se cristalizarem livremente, retardando o crescimento dos cristais (JEE; LEE, 2011). As formulações P3HB-9%ND e P3HB-12%ND, com aproximadamente 9 e 12% de ND obtiveram valores muito próximos para a cristalinidade,  $T_m$  e  $\Delta H_m$ . Já para a formulação P3HB-14%ND foi determinado uma porcentagem de 14% de ND, apesar da proximidade de quantidade de ND com a P3HB-12%ND (12% de ND) altos valores de cristalinidade,  $T_m$  e  $\Delta H_m$  do encapsulado foram gerados, isso pode indicar que os efeitos de aglomeração e nucleação podem estar competindo nessa amostra. O coalescimento das partículas de P3HB/ND geram no biocompósito, após moldado, aglomerações das partículas de ND, as figuras 46, 47, 48 e 49 mostram a região de fratura após o ensaio mecânico de flexão dos biocompósitos, pelo MEV é possível observar formação de aglomerados nas formulações P3HB-12%ND, P3HB-14%ND e P3HB-20%ND, apenas a formulação P3HB-9%ND não teve a formação desses aglomerados. Nota-se que na formulação P3HB-9%ND as partículas de ND, algumas indicadas com as setas, estão dispersas e se distribuem uniformemente por toda a seção da amostra. Nas formulações P3HB-12%ND e P3HB-14%ND já encontra-se a formação de aglomerados dos nanodiamantes, porém é possível ainda observar partículas de ND dispersas na matriz (indicada com setas), por isso ainda há a tendência do aumento da cristalinidade até a terceira formulação,

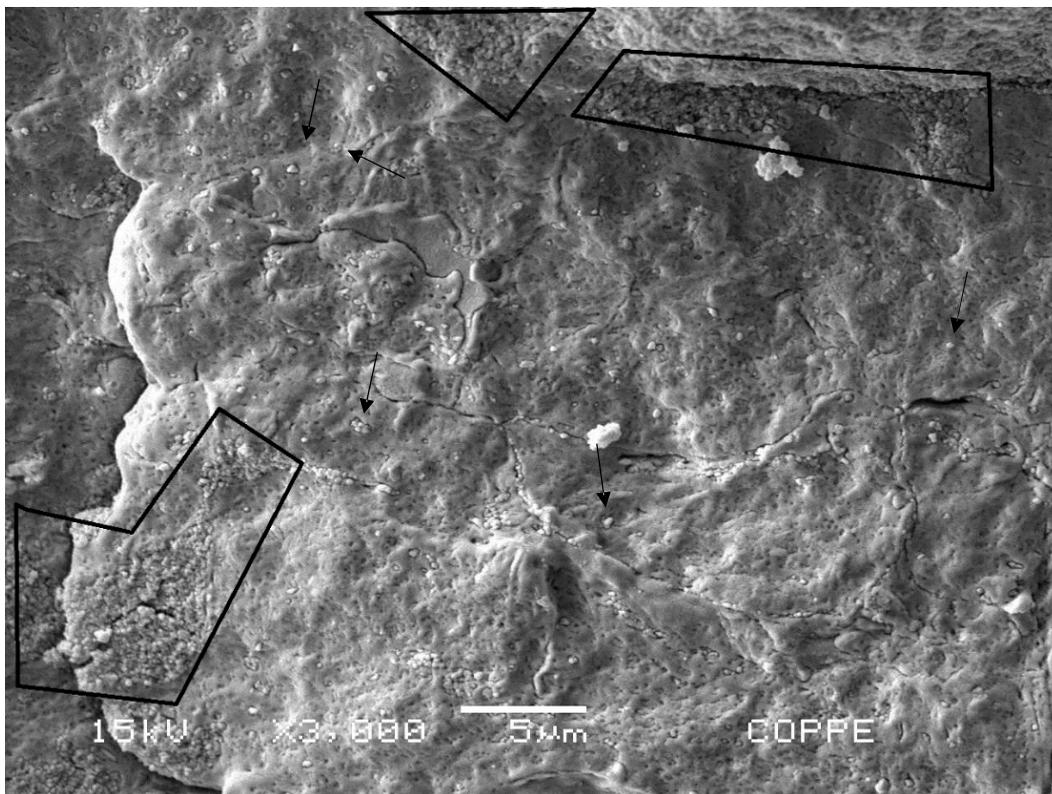
pois o efeito da tendência de nucleação de novos cristais pelos NDs dispersos e o impedimento do crescimento dos cristais pela aglomeração dos nanodiamantes concorrem entre si. Na formulação P3HB-20%ND esses aglomerados, indicados com os polígonos, tomam dimensões maiores e não se vê mais partículas dispersas na matriz, assim a tendência da cristalinidade passa a ser de decréscimo a partir de quantidades superiores a 20% de ND na matriz de PHB, pois os aglomerados vão agir no sentido de impedir o crescimento dos cristais.



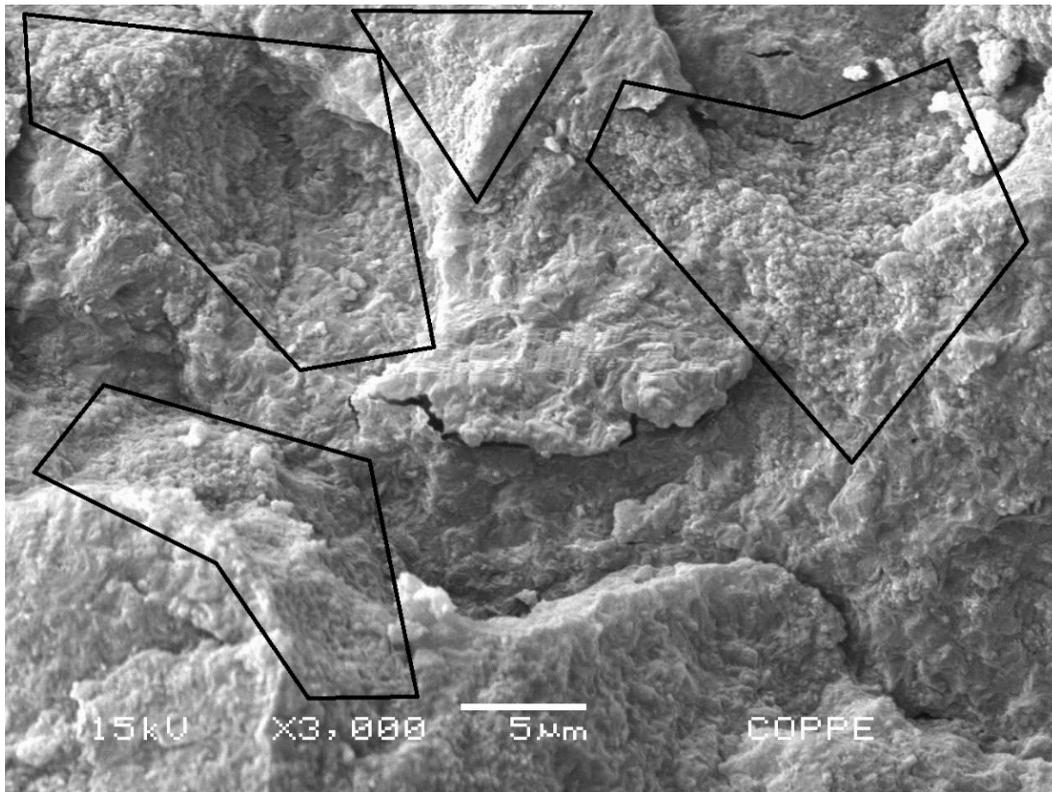
**Figura 46** Micrografia da região de fratura da formulação P3HB-9%ND .



**Figura 47** Micrografia da região de fratura da formulação P3HB-12%ND.

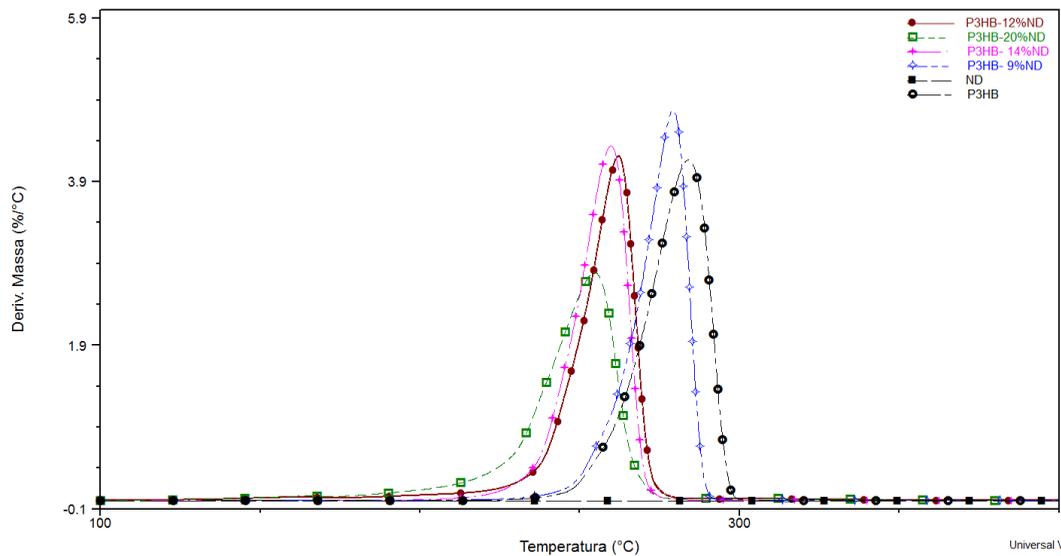


**Figura 48** Micrografia da região de fratura da formulação P3HB-14%ND.



**Figura 49** Micrografia da região de fratura da formulação P3HB-20%ND.

O efeito das nanopartículas de diamante na estabilidade térmica da matriz de PHB também foi avaliado com auxílio do perfil termogravimétrico, já que um dos principais motivos das limitações no uso do PHB, no particular para a confecção de dispositivos e formatos específicos para preenchimento ósseo, é a sua estreita janela de processamento, ou seja, proximidade das temperaturas de fusão e da degradação (ABE, 2006). A Figura 51 mostra o perfil da curva diferencial termogravimétrica na qual se observam o deslocamento das temperaturas de máxima taxa de degradação ou temperatura de pico ( $T_p$ ).

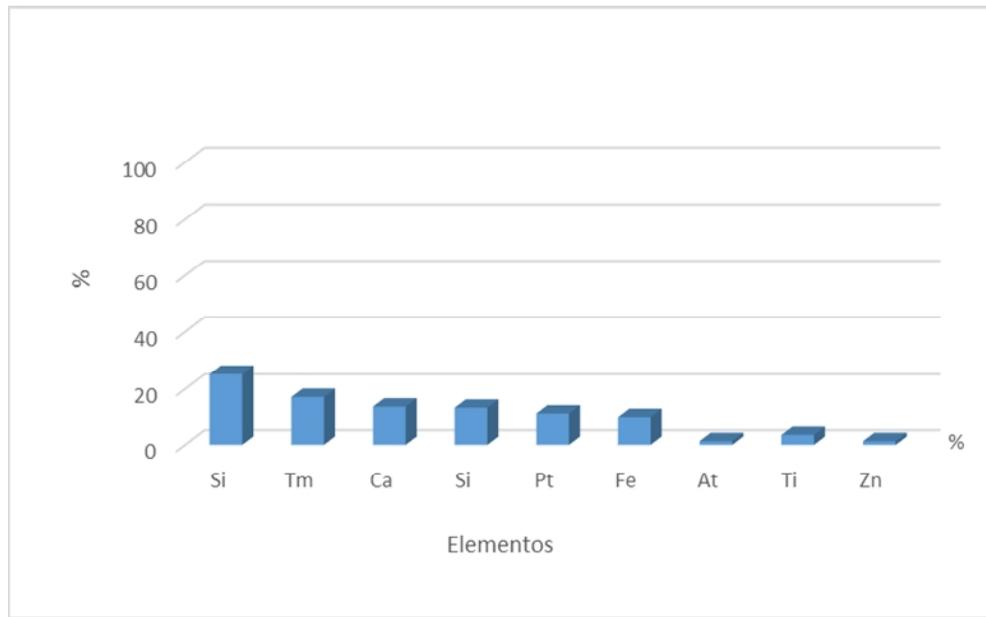


**Figura 50** Curvas de TGA para as formulações P3HB-9%ND, P3HB-12%ND, P3HB-14%ND, P3HB-20%ND, ND e PHB puro.

Foi observado que as partículas do compósito da formulação P3HB-20%ND com maior porcentagem de ND foi a que apresentou a  $T_p$  a uma menor temperatura e as partículas do compósito da formulação P3HB-9%ND a que teve maior  $T_p$ , isto é, mostra a maior taxa de degradação a uma temperatura maior.

Este processo de degradação térmica no P3HB ocorre, quase exclusivamente, por cisão aleatória da cadeia (ABE, 2006). A maior quantidade de ND associada a uma piora na estabilidade térmica da massa de compósito pode estar relacionada com possíveis íons metálicos presentes na superfície dos nanodiamantes, esses íons podem ser provenientes do processo de síntese dos NDs, onde dopantes metálicos são utilizados como agentes catalíticos da reação de crescimento de cristais de diamantes (RANGEL et al., 2008).

Análises de fluorescência foram realizadas para análise quantitativa, *in situ*, para encontrar a concentração de elementos metálicos presente nos nanodiamantes como mostra a figura 50, é constatado a presença desses metais.



**Figura 51 Concentração de elementos metálicos nas partículas de ND utilizadas no biocompósitos.**

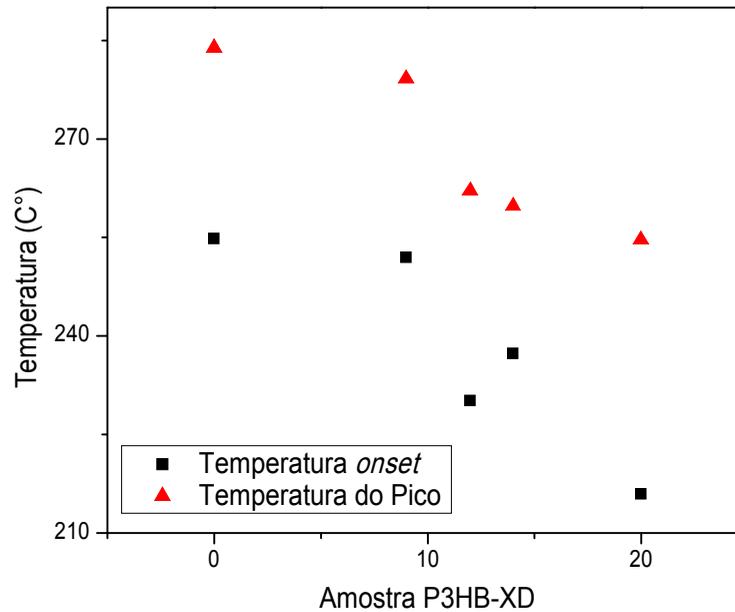
Segundo Abe (2006) a presença de íons de  $\text{Ca}^+$  na matriz de um poliéster faz com que o início da degradação seja deslocado para temperaturas menores que para o polímero sem presença do íon. O mesmo ocorreu com íons de  $\text{Mg}^+$  e  $\text{Zn}^+$ . Comportamento que foi explicado considerando que os íons interagem com os grupos carboxílicos facilitando a reação de cisão da cadeia (ABE, 2006). Assim, quanto maior a quantidade de ND presente na massa de compósitos maior será a presença desses íons superficiais.

Essas reações de cisão são auto-aceleradas, isto é, quanto mais acontecem esse tipo de reação de cisão de cadeia mais elas serão ativadas. Isso ocorre devido as reações gerarem unidades de ácido 3-hidroxi-butírico no início da cadeia. Assim, o ácido carboxílico livre das unidades de ácido 3-hidroxi-butírico libera íons ( $\text{H}^+$ ). Esses íons agem como eletrófilos, ou seja, núcleos altamente reativos atraídos para as zonas ricas em elétrons, e o seu efeito aumenta com o aumento dos produtos de baixo peso molecular gerados na reação de cisão (NGUYEN; YU; MARCHESSAULT, 2002).

De acordo com Abe (2004), ao estudar as matrizes de ácido Poliláctico (PLLA) e policaprolactona (PCL), a presença de íons metálicos na matriz polimérica agem como catalizadores dessas reações de cisão, agindo também como catalizadores de reações de despolimerização. A intensidade dos picos

da curva DTG se correlaciona com a quantidade desses compostos (ABE et al., 2004).

Uma diminuição da intensidade dos picos foi observada na curva DTG da Figura 51 com o aumento da porcentagem de ND, além do deslocamento da temperatura associada a maior taxa de degradação ( $T_p$ ) para valores mais baixos.



**Figura 52** Temperatura *on set* determinada na curva integral (TGA) e temperatura de máxima taxa de degradação na curva diferencial (DTG) das formulações P3HB-9%ND, P3HB-12%ND, P3HB-14%ND, P3HB-20%ND e de PHB puro.

A formulações de compósitos P3HB-12%ND e P3HB-14%ND tiveram temperaturas de degradação muito próximas (Figura 52). Apesar da formulação P3HB-12%ND ter menor quantidade de ND que a formulação P3HB-14%ND, a temperatura inicial de degradação ( $T_{onset}$ ) de P3HB-12%ND é menor que a temperatura *onset* do biocompósito da formulação P3HB-14%ND, constatando uma menor estabilidade térmica, como pode ser observado na Figura 45, onde há o início da queda da curva TGA para esta formulação. Isso pode estar relacionado com a melhor dispersão das partículas, apesar de ambas as formulações (P3HB-12%ND e P3HB-14%ND) terem a presença de

aglomerados, na formulação P3HB-12%ND há uma melhor dispersão como pode ser visto pelo MEV da figura 39 e 41 do que na P3HB-14%ND. Essa melhor dispersão faz com que haja maior contato carga/matriz e, conseqüentemente, maior dispersão também dos íons presente na superfície dos NDs, assim inicialmente o efeito dos íons sobre a estabilidade térmica da formulação P3HB-12%ND parece ser mais decisivo da degradação da matriz, fazendo com que está comece a degradação (temperatura *onset*) primeiro que a formulação P3HB-14%ND, que tem maior quantidade de nanodiamante, para somente depois o efeito da maior quantidade de ND da formulação P3HB-14%ND fazer com que ela se degrade com maior velocidade a uma temperatura menor que a amostra P3HB-12%ND (figura 52).

### **COMPORTAMENTO MECÂNICO DOS BIOCOMPÓSITOS**

A presença de aglomerados e a falta de dispersão das partículas de ND na matriz polimérica do biocompósito, sua morfologia, assim como a interação da superfície da carga com a matriz, são fatores que influenciam fortemente nas propriedades mecânicas e termomecânicas do biocompósito final, principalmente devido ao caráter manométrico da carga.

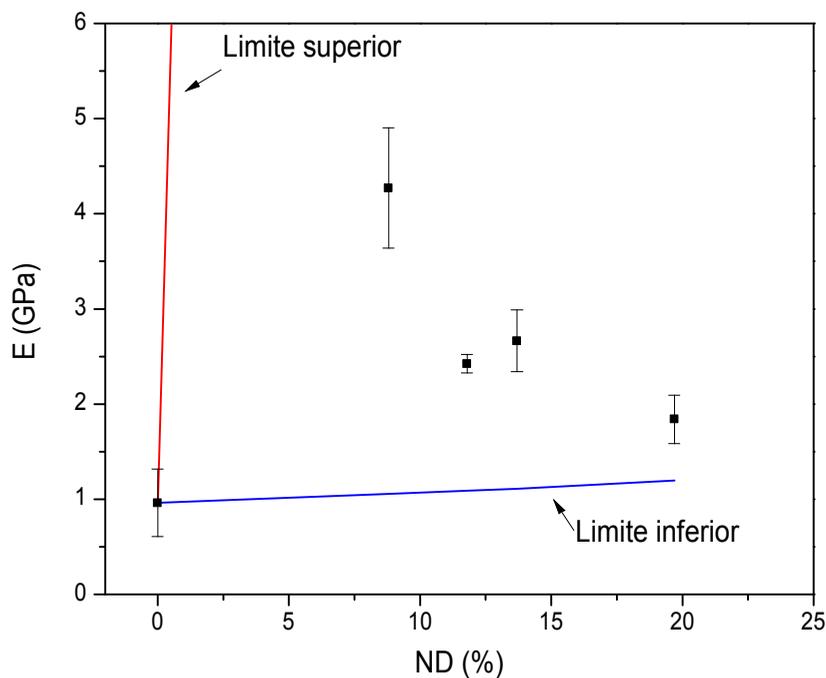
A figura 53 mostra os módulos de flexão dos biocompósitos das formulações P3HB-9%ND, P3HB-12%ND, P3HB-14%ND e P3HB-20%ND, de acordo com as concentrações de ND na matriz de PHB, 9, 12, 14 e 20% de ND, respectivamente, assim como o módulo da matriz de PHB pura obtidas pelo ensaio de flexão. É possível perceber que com a adição das partículas de ND o módulo é aumentado em relação a matriz pura, para todas as concentrações de ND, seja qual for o estado de dispersão das nanopartículas mostradas nas micrografias das figuras 46-49. Esse efeito é dado ao alto módulo de elasticidade da carga particulada de ND. Para uma melhor estimativa do efeito da presença da nanocargas na matriz polimérica P3HB, foi utilizado dois modelos mecânico clássico como referência para observar a variação do módulo dos biocompósitos. O primeiro foi o modelo Voigt-Reuss (REYNAUD et al., 2001).

A figura 53 ilustra os limites superiores e inferiores dados pelas equações (3) e (4) do modelo Voigt-Reuss.

$$E(\text{limite inferior}) = \frac{E_{np}E_m}{[E_{np}(1 - V_{np}) + E_mV_p]} \quad (3)$$

$$E(\text{limite superior}) = E_{np}E_m + E_m(1 - V_{np}) \quad (4)$$

Onde  $E_{np}$  é o módulo da nanopartículas,  $E_m$  é o módulo da matriz e  $V_{np}$  é a fração volumétrica da carga.

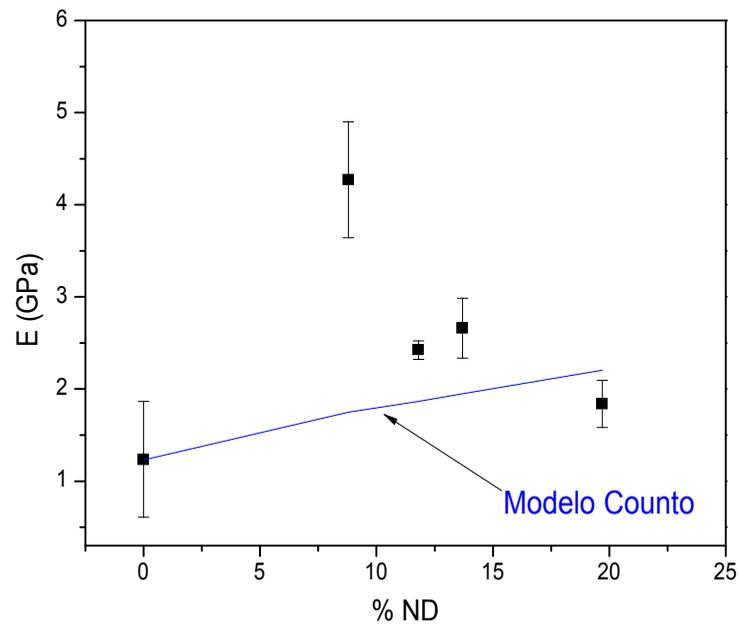


**Figura 53 Efeito da concentração de ND no módulo de flexão dos biocompósitos e limites superior e inferior pré-descritos pelo modelo Voigt-Reuss.**

Esse modelo prover uma relação linear entre os módulos da matriz do compósito e a fração volumétrica da carga estimando grosseiramente o módulo final do compósito (estimado). Desse modo, o módulo real do compósito, ou seja, os valores experimentais, devem situar-se entre dois limites teóricos (superior e inferior) indicando uma boa dispersão das nanocargas na matriz, ou seja, indica que o compósito tem distribuição homogênea da carga (FU et al., 2008; REYNAUD et al., 2001; ZHAO et al., 2010).

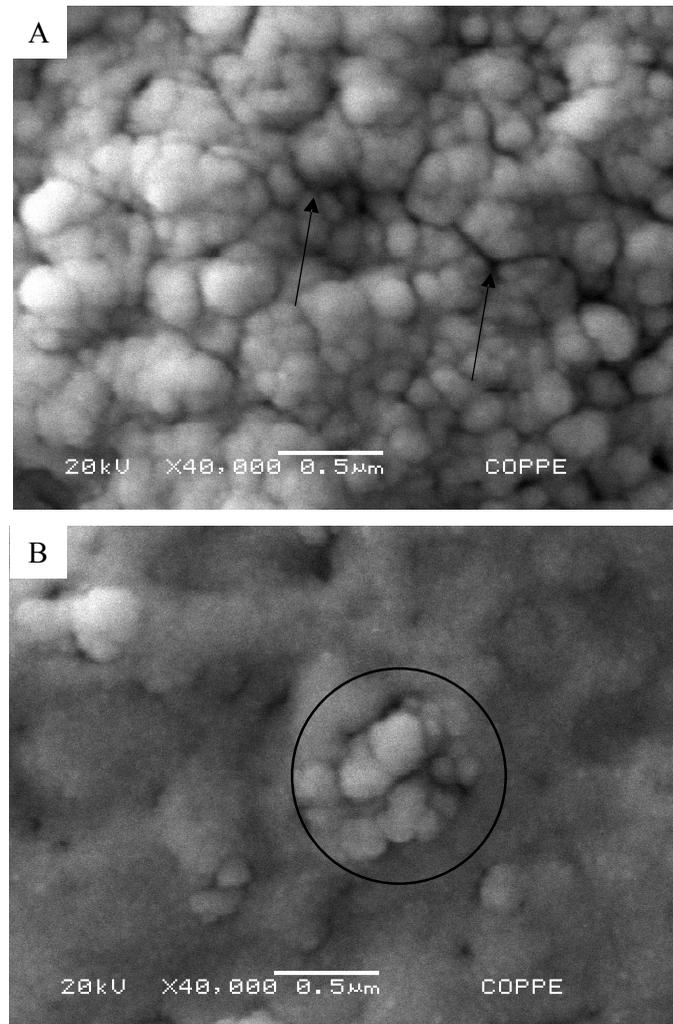
Os valores experimentais estão entre os dois limites propostos por Voigt e Reuss, isso indica que houve uma distribuição homogênea da carga em todo biocompósito. Pela figura 53, ainda é possível notar que quanto maior a concentração de partículas de ND o módulo decresce, principalmente para as formulações P3HB-12%ND e P3HB-20%ND, com 12 e 20% de ND, respectivamente. Essa diminuição do módulo está associada a aglomeração das nanopartículas à medida que há o aumento na porcentagem no biocompósito, essas aglomerações podem ser visualizadas nas micrografias eletrônicas de varredura das figuras 46-49. O maior módulo da formulação P3HB-9%ND, em comparação a outras formulações também pode ser explicada pela falta de aglomerações nesse biocompósito, a figura 46 mostra que as partículas de ND estão dispersas e não aglomeradas na matriz, confirmando o que foi previsto pelo modelo Voigt-Reuss.

O segundo modelo utilizado para avaliar a influência dos nanodiamantes na matriz de PHB foi o modelo de Counto, que assume que o aumento do módulo está associado a uma boa ligação interfacial carga/matriz. Este modelo foi largamente estudado e constatado que seus resultados estão totalmente de acordo com dados experimentais (FU et al., 2008).



**Figura 54 Efeito da concentração de ND no módulo de flexão dos biocompósitos e linha da aproximação de Counto.**

Na figura 54, a formulação P3HB-20%ND ficou abaixo da linha de aproximação teórica do modelo de Counto. Isso indica a fraca interação entre a carga e matriz para este biocompósito, essa fraca adesão está associada a aglomeração dos NDs. Visto isso, com esses aglomerados não há contato da matriz com partículas de ND no interior destes aglomerados fazendo com que o módulo decresça. Pela figura 55, por meio do MEV, pode-se ver a grande extensão dos aglomerados para a formulação P3HB-20%ND em comparação a formulação P3HB-9%ND, assim como a fraca interação/adesão carga/matriz imposta pela aglomeração dos nanodiamantes.



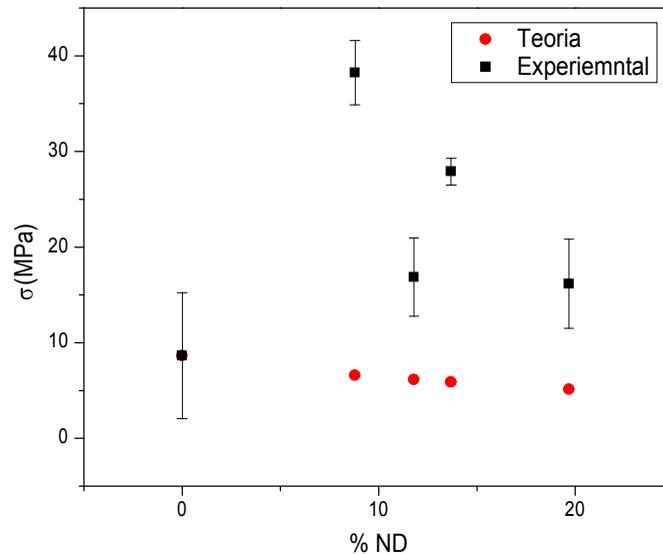
**Figura 55 MEV das formulações (A) P3HB-20%ND e (B) P3HB-9%ND, ressaltando o tamanho do aglomerado e a fraca interação para (A).**

A micrografia mostra que as partículas agregadas na formulação P3HB-20%ND promovem a fraca interação indicada com a seta na Figura 55-A, e resalta o menor tamanho do aglomerado para a formulação P3HB-9%ND na Figura 55-B, circulado, que promove uma transferência de tensão mais homogênea para a matriz (ZHAO et al., 2010).

Outro modelo mecânico que também foi utilizado para analisar a interação carga/matriz nos biocompósitos nanocarregados foi o modelo Nicolais-Narkis. Este modelo estima a adesão carga/matriz pela resistência mecânica do biocompósito por meio da equação seguinte (FU et al., 2008).

$$\sigma_c = \sigma_m(1 - \alpha V_{np}^{2/3}) \quad (5)$$

Onde  $\sigma_C$  é a resistência do compósito,  $\sigma_m$  é a resistência da matriz, o valor de  $a$  é 1,21 e está associada a geometria esférica da nanocarga e  $V_{np}$  é a fração volumétrica da nanopartículas.



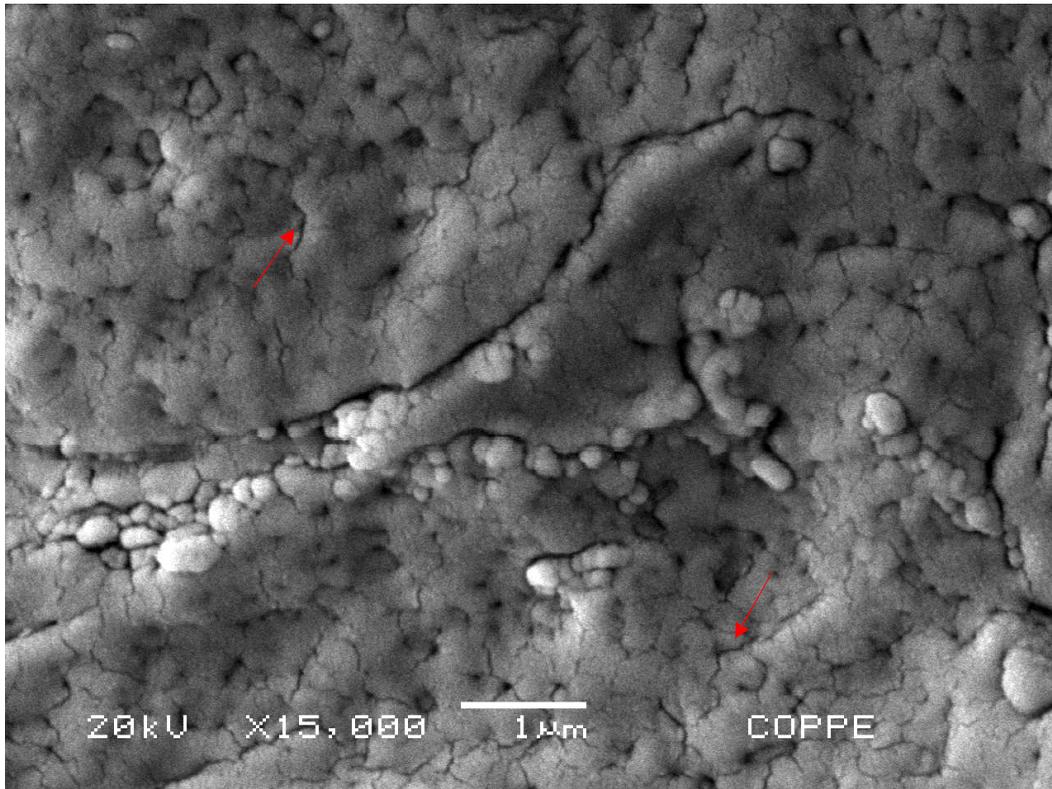
**Figura 56 Resistência a flexão teórica e experimental das formulações dos biocompósitos.**

Este modelo assume que quando há alguma redução na resistência mecânica do compósito é devido a fraca interação entre a carga e a matriz que gera uma perda de seção útil do material, isso quer dizer que como a interface entre as duas fases não é bem aderida um espaço entre elas é assumido fazendo com que a seção útil do compósito diminua, diminuindo também a resistência final, pois não haverá transferência dos esforços provenientes de aplicação de cargas para a fase carga, que é a fase responsável pelo reforço do material. Assim a função de evitar a propagação de trincas no material é perdida (FU et al., 2008).

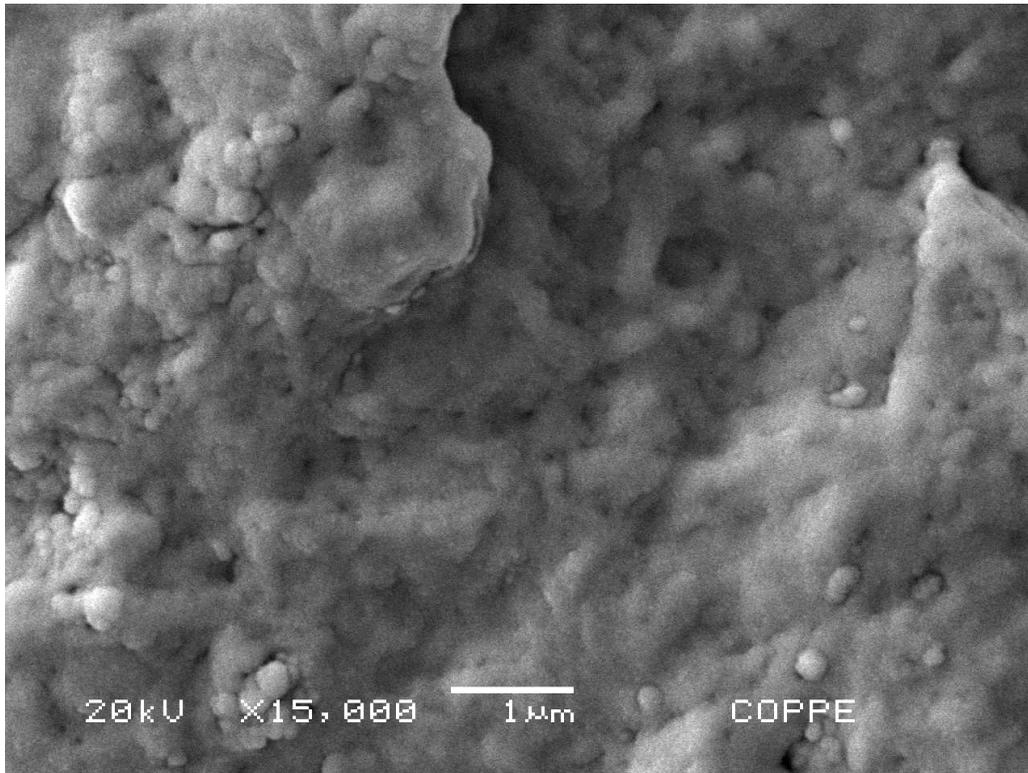
Por meio dos modelos mecânicos analisados é possível fazer uma correlação das propriedades adquiridas com a morfologia das partículas das formulações e análise superfície de fratura dos biocompósitos. Desse modo, as

formulações que mais se distanciaram das aproximações dos modelos mecânicos, foram realmente as que obtiveram dispersões da nanocargas e interação carga/matriz inferiores.

Os valores das resistências mecânica das formulações estudadas podem ser observadas na figura 56. O maior valor foi obtido para a formulação P3HB-9%ND e os menores valores para as formulações P3HB-12%ND e P3HB-20%ND, ficando o biocompósito P3HB-14%ND com valores intermediários. Mais uma vez as fracas propriedades mecânicas estão associadas a aglomeração dos NDs e a fraca interação entre os nanodiamantes e a matriz de P3HB. Analisando novamente a figura 49 da formulação P3HB-20%ND é possível de, além de visualizar os grandes aglomerados, notar também uma trinca promovida pela falta de adesão dos aglomerados com a matriz (XIE et al., 2009) que não são eficiente na transferência uniformemente da tensão, agindo como concentradores de tensão, propagando essas trincas, assim diminuindo a resistência do compósito (HAN; DONG, 2011). A figura 57 mostra a interface carga/matriz da formulação P3HB-12%ND. É possível visualizar com bastante clareza a fraca interação carga/matriz pelos espaços vazios deixados por partículas de ND que se soltaram durante a fratura no ensaio mecânico, essa fraca adesão e, conseqüentemente, soltura das nanopartículas promoveram pequenas fissuras na matriz indicadas com setas vermelhas, que se propagam livremente pelo material, já que a interface carga/matriz não é eficiente para pará-las. Em contra partida a figura 58 mostra a boa adesão dos nanodiamantes na matriz para a formulação P3HB-9%ND, que pela menor quantidade de partículas de ND não formaram aglomerados. Como o efeito de nanopartículas na resistência de um compósito pode ser tanto do aumento dos valores, servindo como reforço e barreira de propagação de trincas, como também o efeito de diminuição da resistência, quando estas partículas agem como concentradores de tensão. Os dois efeitos devem ser levados em consideração, pois nos materiais compósitos eles concorrem entre si (FU et al., 2008).



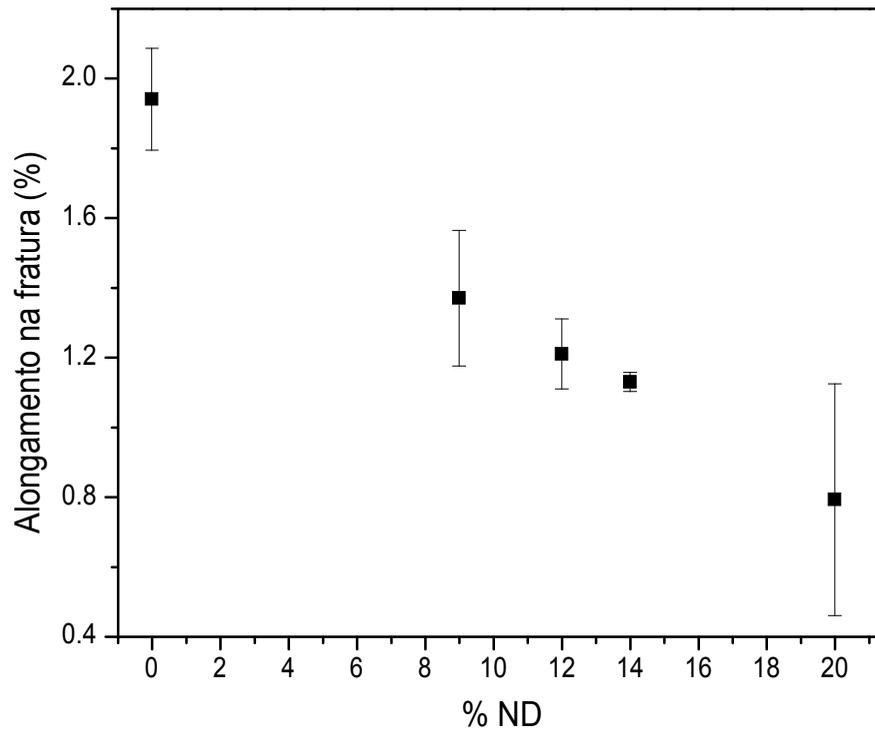
**Figura 57** Micrografia mostrando aglomerados, buracos onde haviam NDs que se soltaram devido a fraca interação e fissuras na matriz para a formulação P3HB-12%ND.



**Figura 58** Micrografia mostrando as partículas dispersas, bem aderidas numa matriz consolidada, para a formulação P3HB-9%ND.

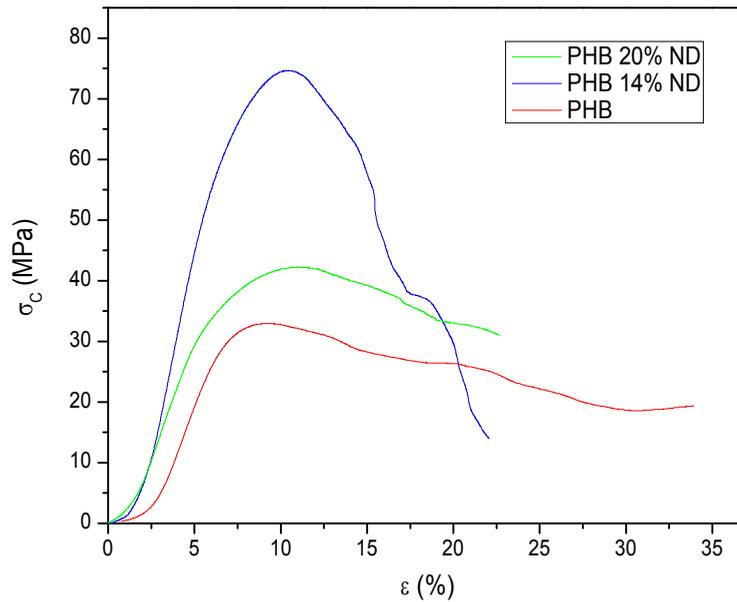
Os alongamentos a partir dos ensaios de flexão, para os biocompósitos, são mostrados no gráfico da figura 59. A medida que a concentração de nanocargas de diamantes é aumentada, o alongamento sofre um decréscimo.

Essa queda do alongamento está associada, primeiramente, a grande rigidez das nanocargas de diamantes em comparação à matriz. Assim, quanto maior a porcentagem de ND no biocompósito, menor a quantidade de polímero para promover um alongamento e a fratura do material se dará com menores valores de alongamento (HAN; DONG, 2011). Esse aumento da fragilidade do material também está associado aos aglomerados formados em concentrações maiores de ND, já que esses vão agir como concentradores de tensão e a falta de adesão não vai impedir a propagação das trincas nem a transferência uniformemente da tensão para a matriz, resultando na fratura do material.

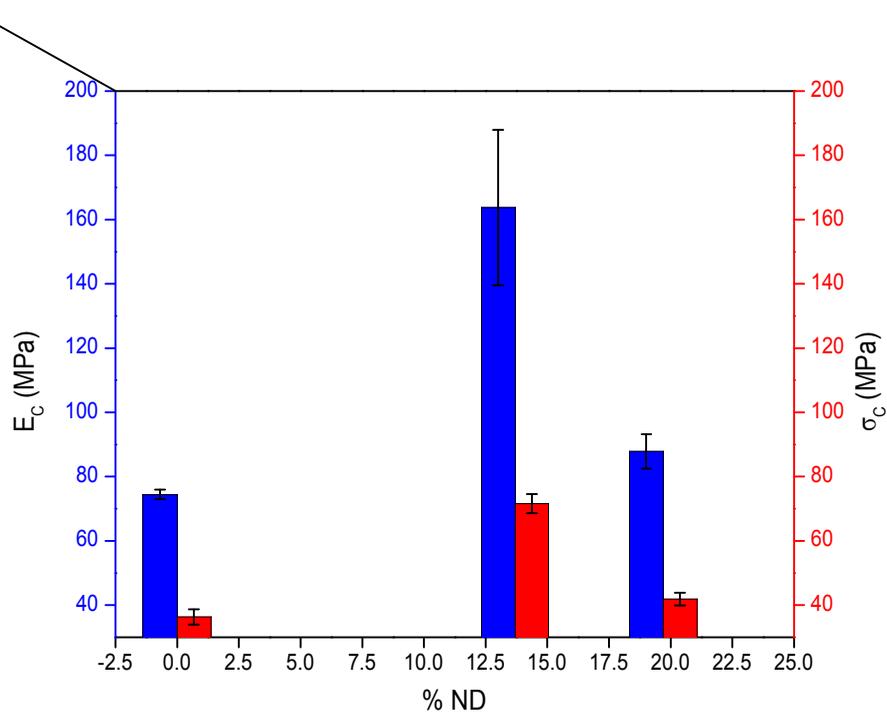


**Figura 59 Alongamento dos biocompósitos de acordo com a concentração de ND.**

As propriedades compressivas foram analisadas para as formulações P3HB pura, P3HB-14%ND e P3HB-20%ND, para estudar a influência da concentração de nanodiamantes no módulo e resistência compressiva. Os valores foram obtidos da curva tensão-deformação da figura 60 e a tendência do comportamento mecânico na figura 61.



**Figura 60** Curvas tensão-deformação para as formulações de compósito P3HB-14%ND, P3HB-20%ND e P3HB puro obtidas pelo ensaio de compressão.



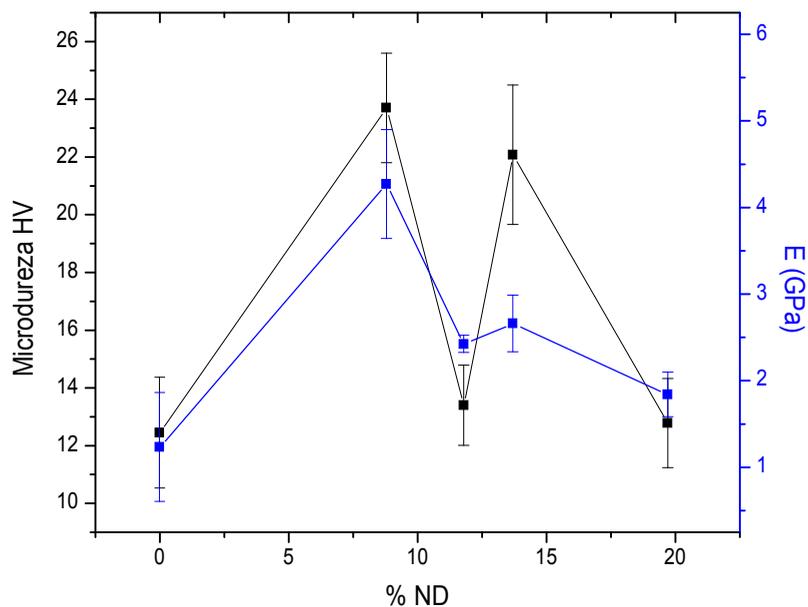
**Figura 61** Influência da porcentagem de nanocargas (%ND) e distribuição nas propriedades compressivas da matriz (E<sub>c</sub>, σ<sub>c</sub>).

O comportamento compressivo da matriz de P3HB com a adição de 14 e 20% de ND segue a mesma tendência do comportamento das propriedades de flexão. Com 14% de nanopartículas há um grande aumento das propriedades compressivas e com 20% de ND as propriedades caem, mas continuam acima dos valores para o P3HB puro. As propriedades compressivas também são significativamente afetadas e decididas pelo estado da interface entre a carga e a matriz, e também pode variar de acordo com o processo de fabricação dos corpos de prova (NEMATI HAYATI et al., 2012) que influencia na distribuição da carga na matriz. O processamento para o recobrimento das partículas de nanodiamantes com P3HB do encapsulado de 20% de ND gerou no próprio encapsulado e nos corpos de prova moldados a pior dispersão, distribuição e interação carga/matriz em relação as outras mostras (P3HB-9%ND, P3HB-12%ND e P3HB-14%ND), como pôde ser visualizado nas micrografias eletrônicas de varredura. Assim, quando o compósito P3HB-20%ND está sobre esforço mecânico a fraca ligação interfacial não transfere o carregamento da matriz para as nanopartículas, e agem como pontos fracos na estrutura do material e podem fraturar com a aplicação do carregamento, levando a propriedades mecânicas piores para este biocompósito quando comparada com as outras formulações.

Partículas inorgânicas podem aumentar significativamente não só o módulo do biocompósito, mas também a sua dureza. Ensaio de microdureza foram realizados para analisar o efeito das nanopartículas, a figura 62 mostra que a microdureza segue a mesma tendência do módulo de elasticidades dos biocompósitos. A figura 62 mostra que os biocompósito P3HB-12%ND e P3HB-20%ND tiveram os menores valores para a microdureza, quando comparados com o P3HB-9%ND e P3HB-14%ND e valores ligeiramente maiores que o P3HB puro.

O efeito de partículas inorgânicas duras, como o ND, na otimização da dureza em matrizes poliméricas pode ter como base de explicação dois mecanismos principais. O primeiro está associado a alta dureza do ND, assim seja qual for a quantidade de partículas de ND na matriz haverá um aumento da dureza devido ao alto módulo dessas partículas, e o segundo mecanismo pode estar no aumento da cristalinidade da matriz polimérica pela adição dos NDs, que se traduz em alta dureza no material compósito final (ZHANG et al.,

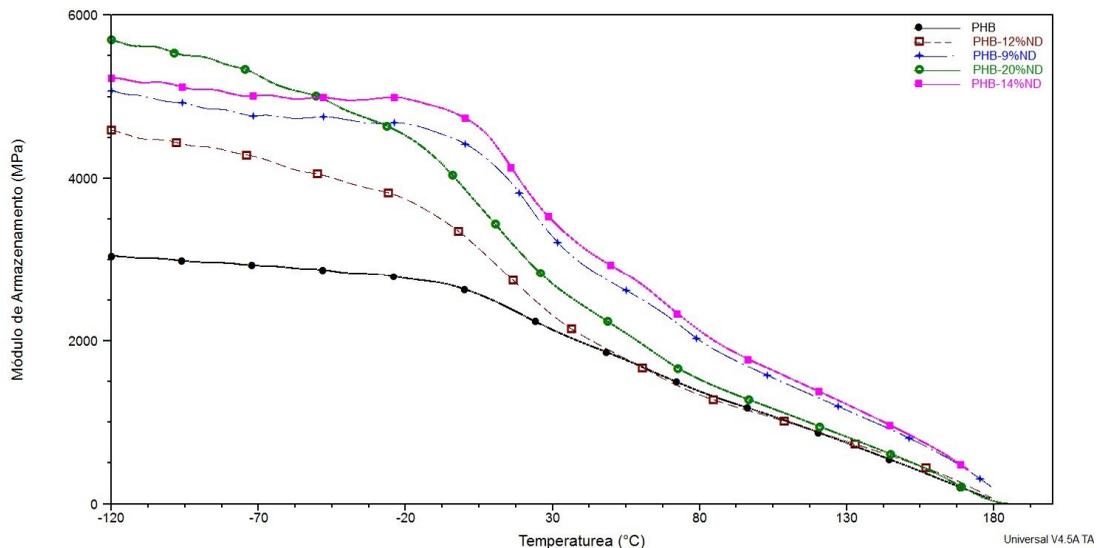
2011). A uniformidade do material também influencia nos valores da microdureza. Desse modo, a formulação P3HB-9%ND devido à alta uniformidade do material, em relação a distribuição e dispersão nas partículas de ND na matriz (figura 46), a alta dureza da formulação P3HB-14%ND pode ter influência tanto do mecanismo da contribuição da dureza dos NDs quanto da alta cristalinidade encontrada para este compósito (Tabela 8). O biocompósito P3HB-20%ND obteve o menor valor de microdureza devida ao efeito das aglomerações dos nanodiamantes agirem como impedimentos a cristalização e também a má distribuição dos NDs na matriz. Já para a amostra P3HB-12%ND a fraca adesão das partículas vista na microscopia da figura 57 pode ter causado a baixa dureza do compósito. Concluindo que partículas mais bem dispersas podem ter o efeito do aumento da cristalinidade levando a um aumento da dureza e do módulo do compósito final (ZHANG et al., 2011).



**Figura 62** Comportamento da microdureza de acordo com a concentração de nanodiamantes na matriz em comparação com o módulo.

Os ensaios com esta técnica permitem relacionar as propriedades mecânicas discutidas anteriormente com as relaxações moleculares e deformações microscópicas geradas a partir dos rearranjos moleculares nas formulações P3HB/ND. As curvas do módulo de armazenamento *versus*

temperatura da figura 63, a adição de partículas de nanodiamantes na matriz de P3HB.

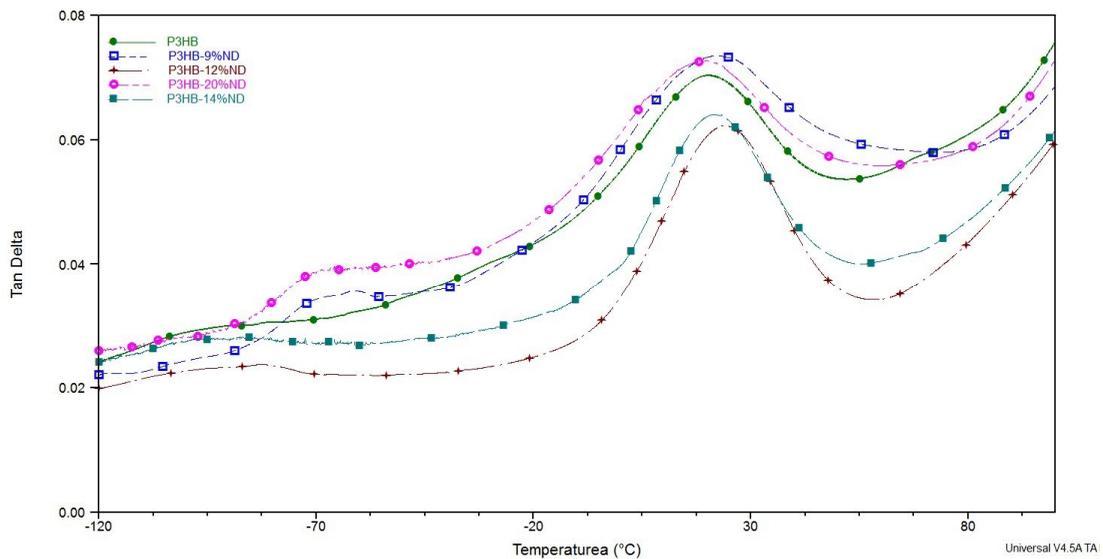


**Figura 63** Curva de DMA módulo de armazenamento versus temperatura.

A temperaturas próximas a 25°C observa-se o efeito de reforço das nanocargas conseqüências da ancoragem das cadeias poliméricas que limita o início de seus movimentos conformacionais (L.J. CHEN, 2002). As amostras que obtiveram os maiores valores do módulo foram a de P3HB-14%ND e P3HB-9%ND, essas formulações apresentaram também as melhores propriedades de flexão, microdureza e de compressão para a P3HB-14%ND. A melhor dispersão da formulação P3HB-9%ND, vista pelo MEV, promove um ancoramento mais eficiente das cadeias, o biocompósito P3HB-14%ND, apesar da presença de aglomerados de diamantes é possível observar na microscopia eletrônica de varredura da figura 48, que esses aglomerados têm pequena extensão e que há partículas de ND dispersas na matriz, como está indicada em setas na micrografia. Assim o efeito de limitar a mobilidade das cadeias poliméricas do P3HB é mais eficiente do que para as amostras P3HB-20%ND, que tem aglomerados em grande extensão que podem ser considerados como uma segregação de fase. Desse modo, a amostra P3HB-20%ND possui basicamente duas regiões (figura 49), uma com grande concentração de diamante (aglomerados) e outra formada pelo maior volume da fase polimérica

na que a mobilidade das cadeias não limitados. Já para a amostra P3HB-12%ND o principal motivo para que essa formulação tenha o menor módulo, comparada as outras formulações de compósitos, e chegando a valores próximos ao valor do módulo da matriz de P3HB é devido a fraca adesão do ND com matriz. Pela figura 48 é possível ver que os NDs se soltam da matriz após o ensaio de flexão, essa falta de adesão faz com que a ancoragem das cadeias seja prejudicada.

Pela curva  $\tan \delta$  versus temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) (figura 64) é possível notar alguma variação nas temperaturas de transição vítrea para as formulações de compósitos, mostrada na tabela 11 que reforçam a interpretação anterior.



**Figura 64** Curva de DMA  $\tan \delta$  versus temperatura.

A formulação P3HB-20%ND tem valor de  $T_g$  semelhante matriz P3HB, pelas causas anteriormente discutidas. As formulações P3HB-9%ND e P3HB-14%ND obtiveram  $T_g$ 's próximas assim como módulo de armazenamento, com os maiores valores em relação as outras formulações. Comportamento devido a boa dispersão sem um efeito marcado de aglomerações de encapsulados para a formulação P3HB-9%ND. No particular para a formulação P3HB-14%ND a presença marcada da fase cristalina e a boa interação carga/matriz, que é confirmada por meio da comparação do modelo Nicolais-Narkis (figura 56), já que há uma concorrência de aglomerados e contribuição da fase cristalina à ancoragem dos movimentos conformacionais, tendo um marcado efeito na  $T_g$ .

O biocompósito P3HB-12%ND, apresenta uma  $T_g$  maior que o de 9% de NDs, mostrando o efeito esperado pelo aumento da carga, no entanto seu módulo de armazenamento resulta inferior ao P3HB-9%ND dada a fraca interação entre as nanopartículas de diamante e o P3HB como foi observado nas imagens no MEV (figura 57), que faz com que a rigidez do biocompósito diminua.

**Tabela 11 Propriedades viscoelásticas das formulações.**

Formulação	$E'$ (MPa)	$T_g$ (°C)	$E'$ à 25°C (MPa)
P3HB-9%ND	5074	21,86	3492
P3HB-12%ND	4593	24,2	2452
P3HB-14%ND	5228	21,9	3664
P3HB-20%ND	5687	19,0	2852
P3HB	3048	19,0	2211

### **RELAÇÃO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS COM O OSSO**

Os valores das propriedades de resistência e módulos, de flexão e de compressão para todas as formulações dos biocompósitos estudados são mostradas na tabela 12.

A introdução das partículas de nanodiamantes na matriz de P3HB na forma de capsulas/partículas (figura 37) de NDs revestidos com o polímero resultou em um aumento das propriedades mecânicas em todas as concentrações estudadas. O módulo de flexão na formulação P3HB-9%ND foi de  $4,27 \pm 0,628$  GPa, que é maior do que a mesma propriedade para os ossos trabeculares que variam na faixa de 0,02 até 0,5 GPa, e foi conseguida um valor que também pode ser comparado com os valores do limite inferior para o osso cortical, que de acordo com Fung variam de 3 GPa a 30 GPa (FUNG, 1993). A resistência a flexão de todas as formulações do biocompósito foram mais altas que a do osso trabecular que é em média de 7,4 Mpa. As propriedades compressivas também obtiveram valores próximos aos valores das propriedades compressivas do osso humano, os valores do módulo

compressivo encontrado para a formulação P3HB-14%ND foi de  $163,72 \pm 15,22$  Mpa, que está de acordo com a faixa do módulo compressivo do osso trabecular que varia de 50 a 500 MPa. O mesmo ocorre para a resistência a compressão de  $71,61 \pm 3,05$  MPa para o mesmo biocompósito, o valor encontrado ultrapassa a resistência a compressão do osso trabecular, 2 a 12 MPa, e chega a um valor próximo ao valor de resistência do osso cortical que chega a 100 MPa (PUPPI et al., 2010).

**Tabela 12 Propriedades de flexão e de compressão dos biocompósitos estudados.**

Biocompósito	$\sigma_{flexão}$ (MPa)	$E_{flexão}$ (GPa)	$\sigma_{compressão}$ (MPa)	$E_{compressão}$ (MPa)
P3HB-9%ND	$38,21 \pm 3,361$	$4,27 \pm 0,528$	-	-
P3HB-12%ND	$16,82 \pm 4,091$	$2,42 \pm 0,099$	-	-
P3HB-14%ND	$27,89 \pm 1,407$	$2,67 \pm 0,325$	$71,61 \pm 3,055$	$163,72 \pm 15,18$
P3HB-20%ND	$16,13 \pm 4,655$	$1,94 \pm 0,256$	$41,88 \pm 1,926$	$87,85 \pm 5,293$
P3HB	$7,79 \pm 1,730$	$1,28 \pm 0,081$	$36,31 \pm 2,314$	$74,44 \pm 1,549$
Osso cortical	-	3-30	-	-
Trabécula	7,7	0,02-0,5	2-12	50-500

Esses valores das propriedades muito próximos dos valores reais do osso humano é essencial para evitar a incompatibilidade de rigidez entre implantes metálicos ou cerâmicos existentes no mercado com o tecido natural, sendo um dos maiores problemas enfrentados em cirurgias ortopédicas, já que durante a aplicação de uma carga no sistema implante/osso a quantidade de carregamento que cada componente irá suportar está diretamente relacionada com a rigidez do material (RAMAKRISHNA et al., 2001). Valores do módulo de

implantes similares ao osso humano também evita a atrofia óssea, já que o osso, desse modo, receberia a mesma carga que o implante, não afetando a remodelagem e o processo de cura do osso (ADAMS D; WILLIAMS D F; HILL J, 1978; CHRISTEL P; CLAES L; BROWN S A, 1991).

### **TESTES BIOLÓGICOS IN VITRO**

#### **Teste de indução inflamatória: produção de óxido nítrico (NO)**

Para os testes de indução inflamatória foi realizada a medição da produção de Óxido Nítrico (NO) pelos macrófagos e pelos fibroblastos nos sobrenadantes das células em contato com o biocompósitos nos poços das placas de cultura celular. O NO é um gás solúvel produzido por macrófagos, fibroblastos e outros tipos de células como as endoteliais e neurônios. Esse mediador químico desempenha um papel importante no recrutamento de leucócito durante o processo inflamatório (ROBBINS et al., 2001). Como o NO é um produto dessas células quando ativadas por citocina, compostos microbianos ou ambos (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997) qualquer estímulo inflamatório sobre os fibroblastos e macrófagos serão liberadas doses de NO pelas células. A partir daqui denotaremos as amostras P3HB-9%ND, P3HB-12%ND, P3HB-14%ND e P3HB-20%ND como amostras 1, 2, 3 e 4, respectivamente, somente para facilitar a compreensão.

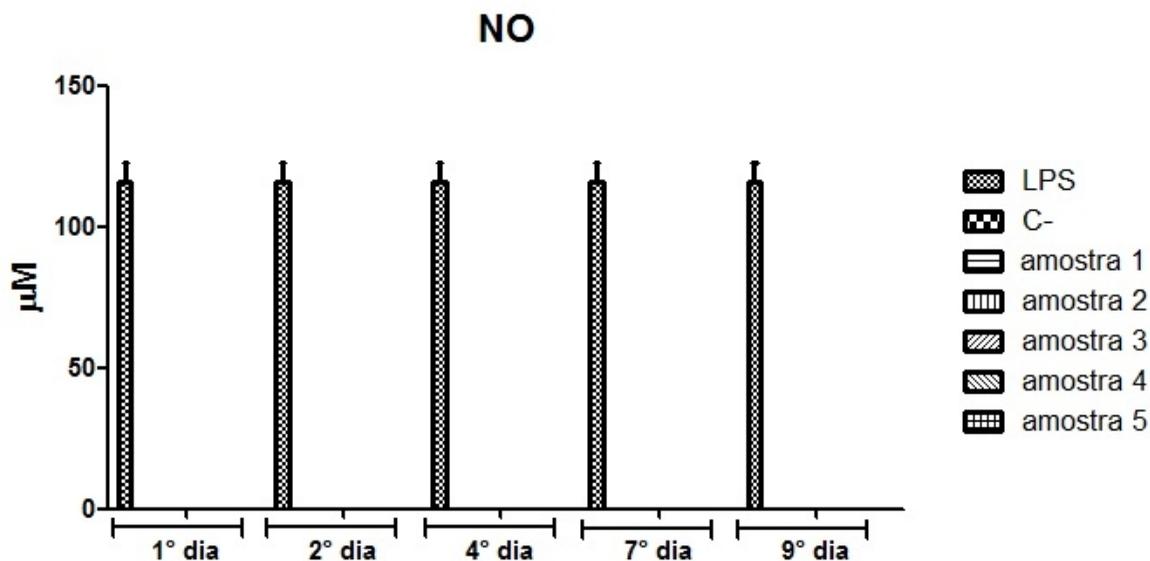
A tabela 13 indica a concentração de NO para os poços com fibroblastos.

**Tabela 13 Concentração de NO produzido pelos fibroblastos L929 em contato com os biocompósitos em diferentes concentrações de ND durante 10 dias de teste.**

Amostra	[NO] micromolar				
	1° dia	3° dia	4° dia	7° dia	10° dia
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0

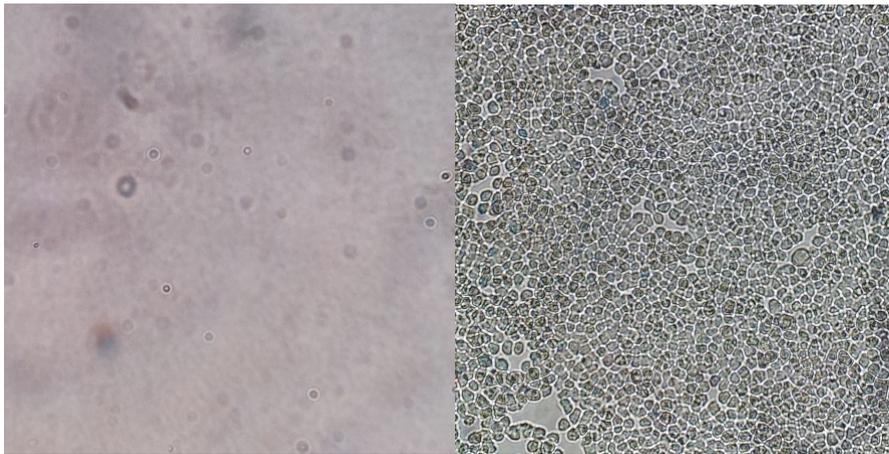
4	0	0	0	0	0
PHB puro	0	0	0	0	0

Como pode ser observado não houve qualquer produção do mediador inflamatório (NO) pelos fibroblastos nos 10 dias em que as células ficaram em contato com o biocompósito. Dado a síntese de NO, um importante indício de estresse ou estado de agressão das células. Isso indica que o contato das células com o biocompósito não gerou nenhum estímulo inflamatório nas células em nenhuma concentração de ND pelo período dos 10 dias de teste. O mesmo ocorre para os macrófagos, podendo ser visto pela figura 65 a ausência de produção de óxido nítrico (NO) pelos mesmos nos 9 dias de contato das células com os fragmentos. Para confirmar que os macrófagos usados eram capazes de produzir NO, estes foram estimulados com 1 µg/mL de LPS.



**Figura 65 Gráfico da % de Produção de NO pelos macrófagos Raw 264.7 durante o contato com os biocompósitos. Macrófagos Raw 264.7 foram plaqueados na concentração de  $2 \cdot 10^5$  células por poço de placa de 24 poços na presença ou não do biocompósito. Amostras de meio de cultura foram coletados após 1, 2, 3, 4, 7 e 9 dias após o contato das células com as amostras para avaliação de produção de óxido nítrico (NO) através do método de Griess. Culturas de macrófagos estimulados com 1 µg/mL de LPS por 24 horas foram usados como controles positivos de produção de NO na reação. C-: Cultura de macrófagos que não tiveram contato com o biocompósito.**

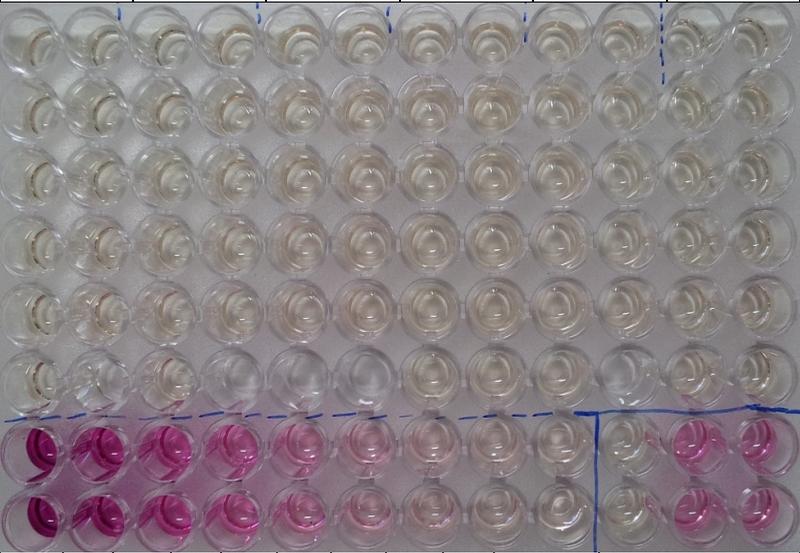
O gráfico mostra que a concentração de NO produzida pelos poços de controle positivo para inflamação, isto é, os poços em que as células foram estimuladas por LPS e, conseqüentemente, a morte das mesmas foi de 100%. Para as amostras 1, 2, 3 e 4 com diferentes porcentagens de partículas de ND e a amostra 5 para o PHB puro foi observada 0% de produção de NO e morte celular. Isso significa que os biocompósitos são inertes para os macrófagos independentemente das composições das formulações. A figura 66 mostra as células estimuladas com LPS, para o controle positivo, e as células do controle negativo para a inflamação, respectivamente. É possível observar que as células realmente foram estimuladas e sofreram 100% de morte com a adição de LPS em contra partida com o poço de controle negativo.



**Figura 66 Células mortas por LPS para controle positivo de liberação de NO e células sem contato com os biocompósitos para controle negativo de produção de NO.**

Para confirmar a não produção de NO pelos macrófagos no experimento a figura 67 mostra a placa de cultura celular utilizada para a realização do teste para avaliar a sua produção. Na figura estão especificadas as amostras ensaiadas, isto é, as diferentes formulações dos biocompósitos e o PHB puro, pode ser visto também os dias de contato das células com as amostras, o controle negativo para inflação (sem contato com os fragmentos dos biocompósitos), o controle positivo para morte celular (adição de LPS 1 µg/mL para morte das células) e nas últimas linhas uma curva com diferentes concentrações de NO. Na curva a coloração lilás indica a concentração de NO nos poços da placa de cultura celular. Quanto maior a concentração de NO

mais intensa é a coloração lilás no poço. O controle positivo com a adição de LPS exibe uma coloração lilás, indicando a produção de NO, enquanto que todas as amostras para todos os dias de contato com os biocompósitos, independente da porcentagem de partículas de ND nas formulações não exibem a coloração, assim como os poços de controle negativo. Isso constata que em nenhum momento foi liberado NO pelas células, sendo assim os biocompósitos não estimularam uma resposta inflamatória nos macrófagos.

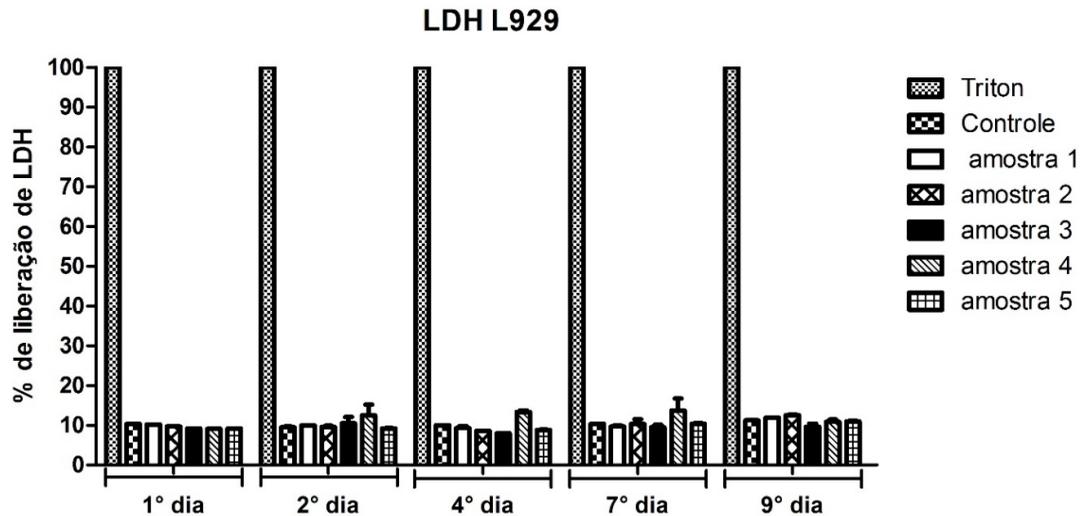
Dia de contato	1	2	3	4	7	9
Amostra						
1						
2						
3						
4						
PHB						
Controle negativo						
Curva de produção de NO						
						LPS

**Figura 67** Placa de cultura celular utilizada para ensaio de produção de NO pelos macrófagos

### Teste de citotoxicidade: liberação de deidrogenase láctica (LDH)

Para os testes de biocompatibilidade dos biocompósitos foi avaliada a presença de deidrogenase láctica (LDH) no sobrenadante das culturas em presença dos biocompósitos. A LDH é uma enzima mitocondrial que é liberada para o meio de cultura quando a célula morre, desse modo podemos avaliar a

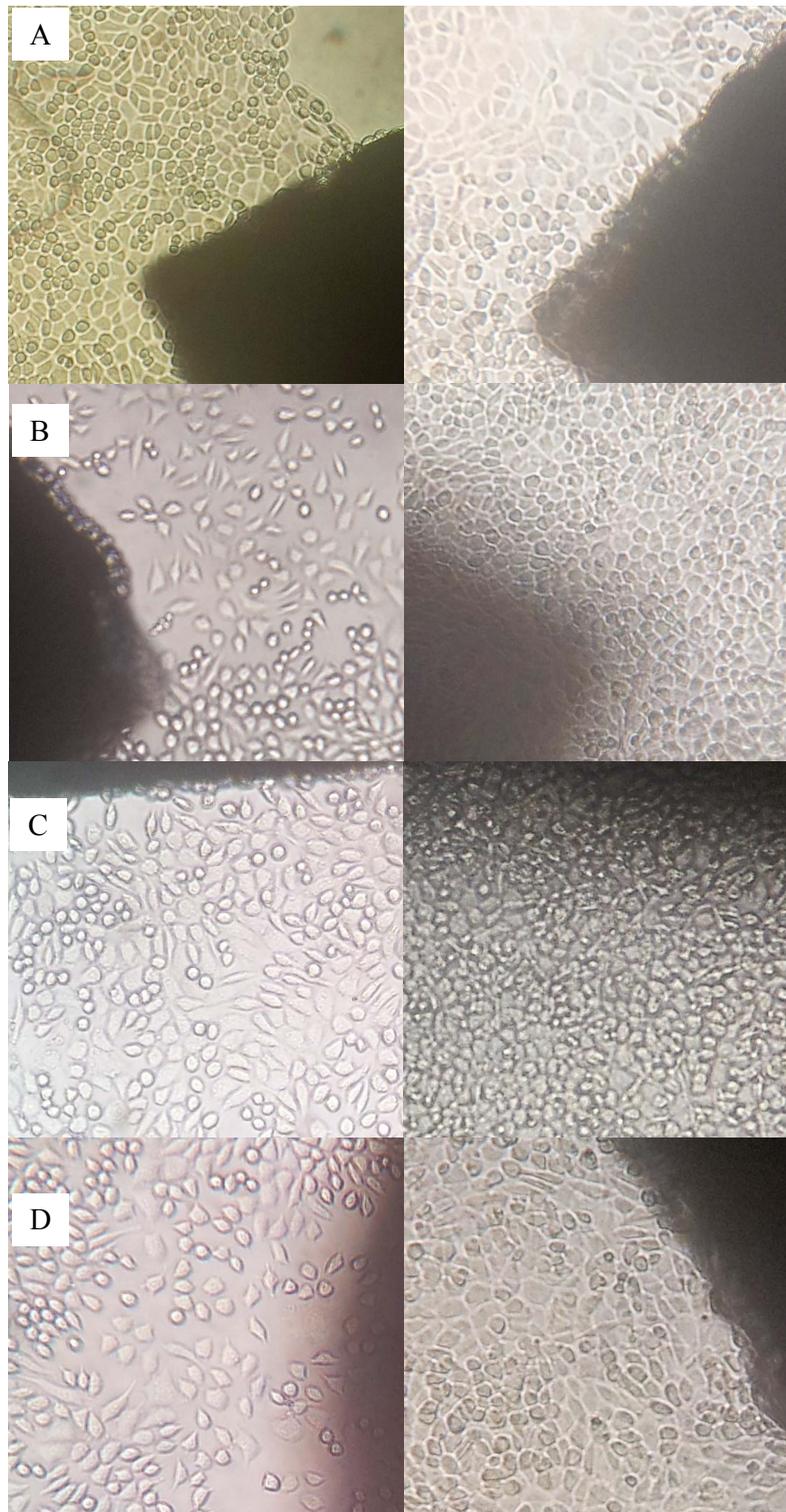
citotoxicidade dos biocompósitos para a cultura celular. A morfologia celular para a verificação de efeitos adversos na aparência celular (RARE, 1985).



**Figura 68** Gráfico da % de liberação de LDH pelos fibroblastos durante o contato com os biocompósitos. Fibroblastos L929 foram plaqueados na concentração de  $2.10^5$  células por poço de placa de 24 poços na presença ou não dos biocompósitos. Culturas de fibroblastos foram lisadas com solução de Triton 1% para ser o controle positivo de liberação de LDH.

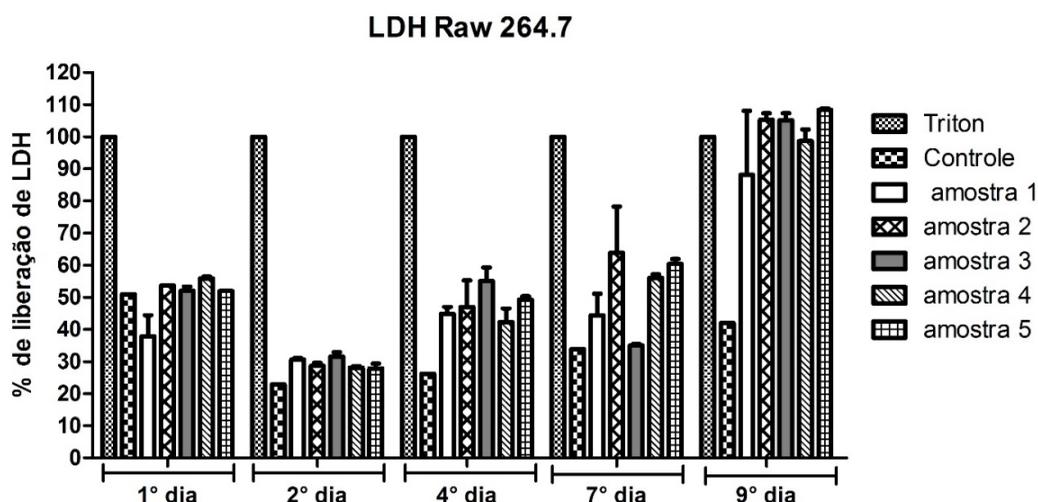
A partir da figura 68 é possível avaliar a liberação de LDH pelos fibroblastos L929. Pode-se perceber que a liberação da enzima LDH, nos poços onde os fibroblastos estavam em contato com as amostras dos biocompósitos e para o PHB puro foi similar ao poço onde os fibroblastos não tinham contato com os biocompósitos. Este resultado indica que a liberação de LDH não foi estimulada pela presença dos fragmentos, e pode estar relacionada com a morte celular natural que ocorre na cultura. Mais uma vez a porcentagem de partículas de ND presente nas diferentes formulações (amostras 1, 2, 3 e 4) não influencia na biocompatibilidade do material. Assim, os biocompósitos tem um comportamento não citotóxicos para culturas de fibroblastos o que também pode ser visto pelas micrografias da 69 que mostram uma aparência celular normal e saudável (RARE, 1985) no terceiro e no sétimo de dia de contato para todas as formulações dos biocompósitos estudados. O desenvolvimento/crescimento é possível de ser visualizado, onde no terceiro dia de contato ainda há algum espaço no fundo da garrafa de cultura celular para a proliferação das mesmas ou poucas células aderidas, já

nas micrografias do sétimo dia de contato esse espaço já está totalmente coberto pelos fibroblastos, indicando que a presença do biocompósito não interferiu no crescimento celular.



**Figura 69** Micrografia ótica mostrando o crescimento celular no terceiro e sétimo dia após o contato dos fibroblastos com as amostras (A) 1, (B) 2, (C) 3 e (4). As sombras são os fragmentos dos biocompósitos.

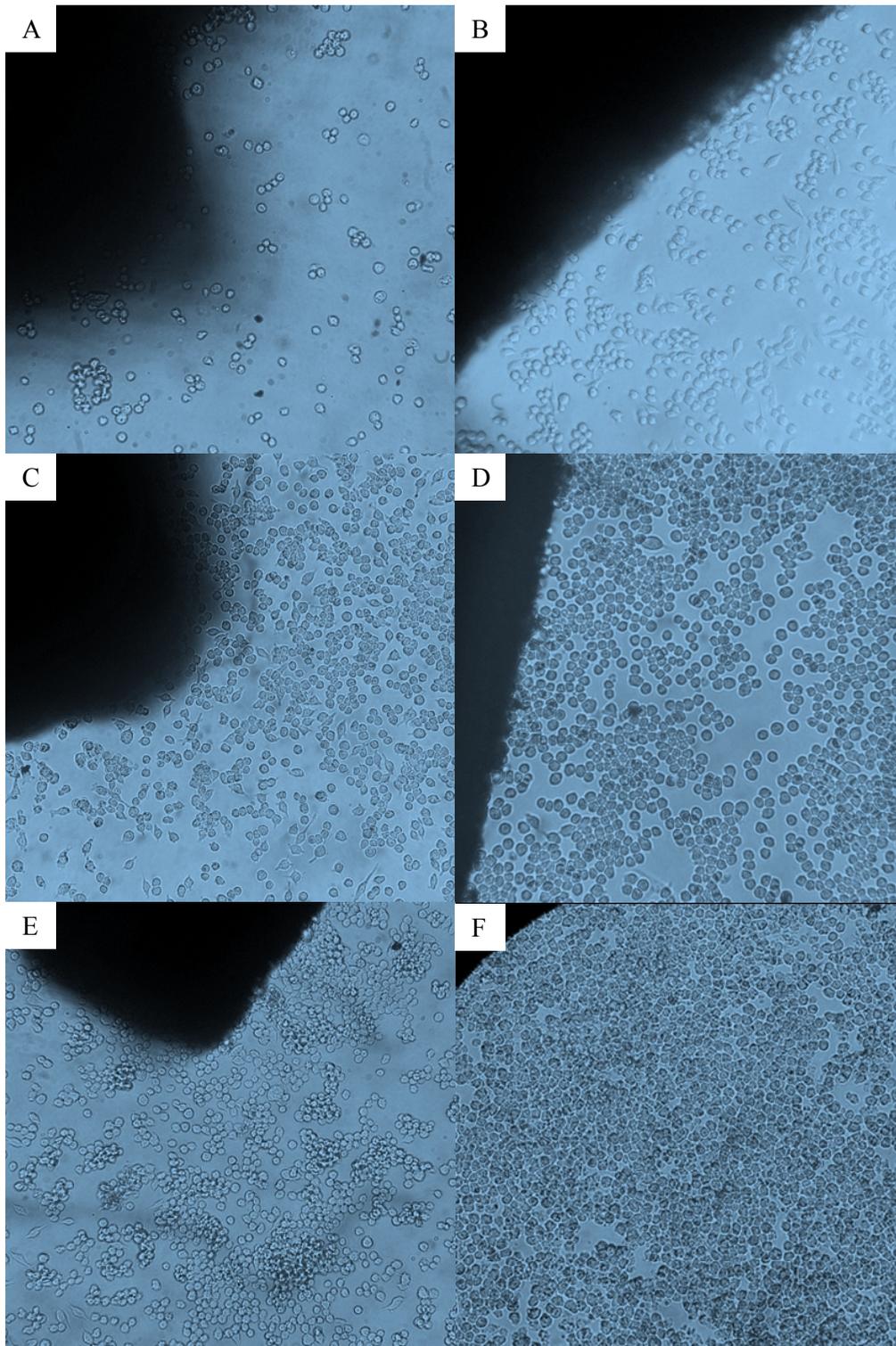
O mesmo teste de liberação de LDH foi feito para cultura de macrófagos. O gráfico indica a porcentagem de liberação de LDH pelos macrófagos em contato com os biocompósitos de diferentes composições nos 9 dias de experimento biológico. Pelo gráfico da figura 70 é possível notar que ocorreu uma liberação significativa de LDH pelos macrófagos já no primeiro dia após feito o contato da cultura celular com os fragmentos dos biocompósitos. As concentrações de LDH encontradas nos poços contendo os fragmentos foram ligeiramente maiores que as concentrações de LDH observadas nos poços de controle negativo no primeiro e segundo dia após o contato com os biocompósitos, essa diferença no sétimo e nono dia foi maior, principalmente devido a enzima LDH não ser volátil e ficar acumulada no sobrenadante do meio de cultura.



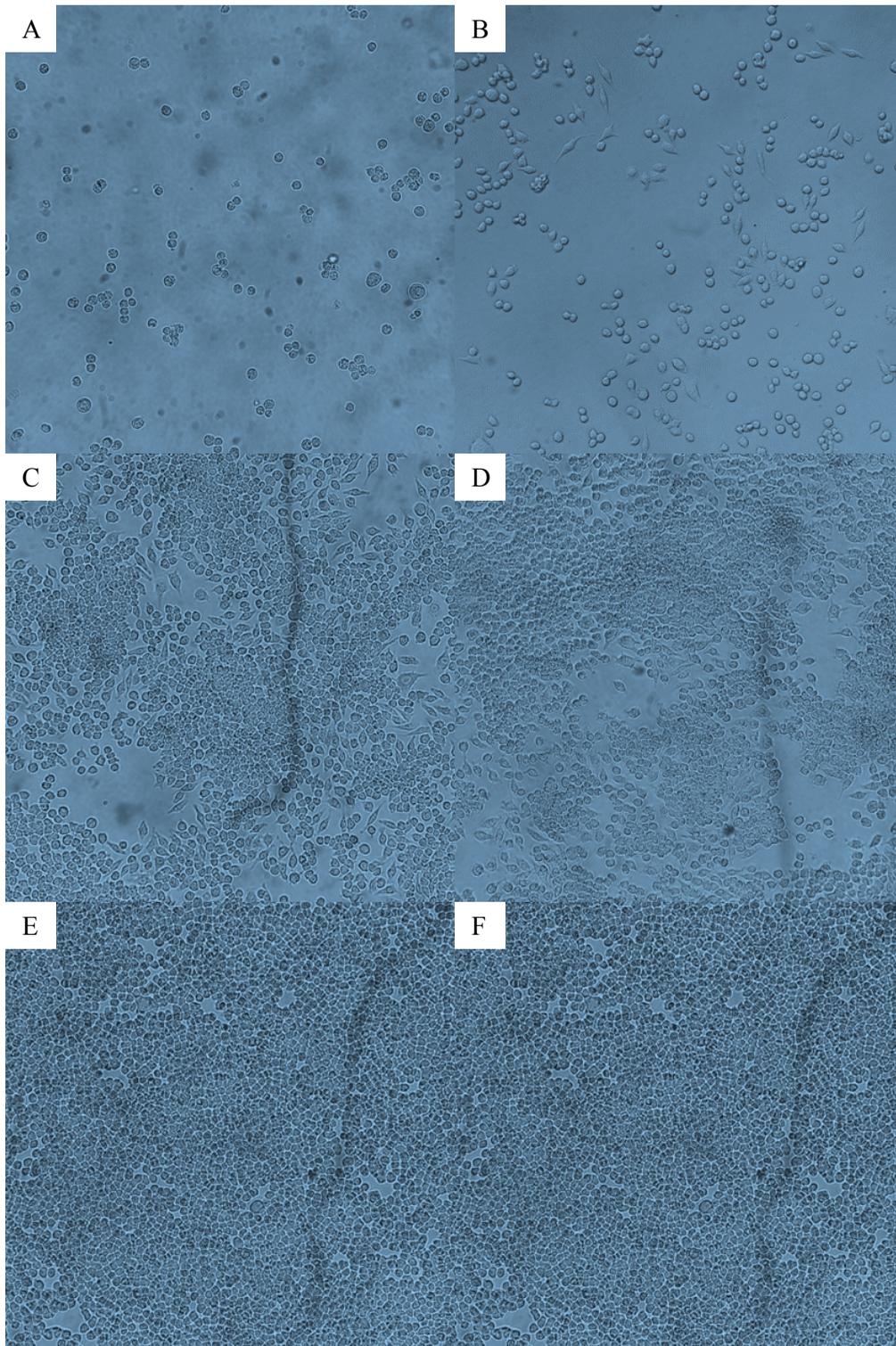
**Figura 70 Gráfico da % de liberação de LDH pelos macrófagos durante o contato com os biocompósitos.**

Apesar de alguma liberação de LDH constatada pelos macrófagos (figura 70) é possível observar que não houve estímulo citotóxico celular nos macrófagos como pode ser visualizado pela figura 71. Pela figura pode ser visto um desenvolvimento normal de crescimento da cultura celular desde o dia do contato (dia 0), as primeiras 24 horas (dia 1) e após o 2º, 4º, 7º e 9º dia de contato onde foram coletados os sobrenadantes e mensurados os níveis de concentração de LDH nos meios celulares. Os macrófagos, pelas microscopias óticas, tiveram crescimento normal e sem nenhuma deformação celular, ou

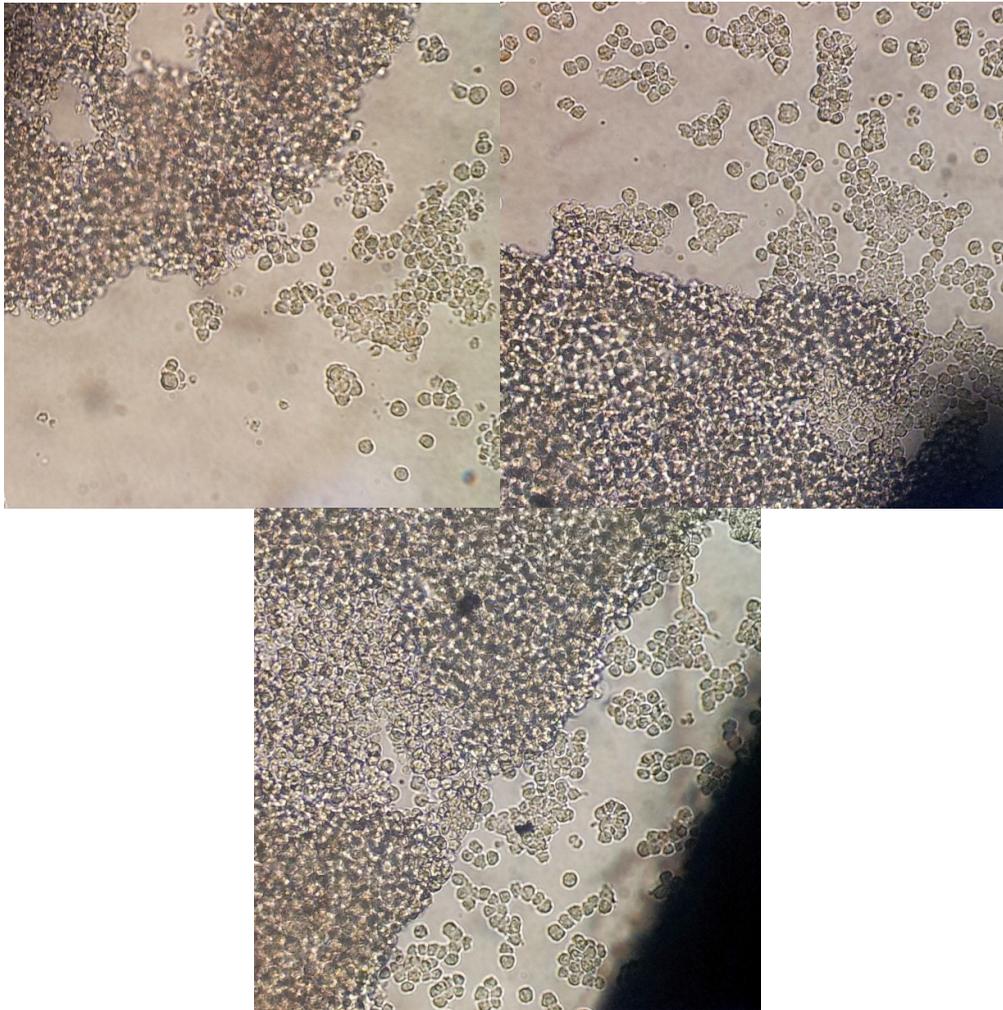
resposta fagocíticas aos fragmentos de biocompósitos presente no mesmo meio que as células. Desse modo, a concentração de LDH presente nos sobrenadantes pode ter outras origens, que não a indução de citotoxicidade pelos macrófagos, como por exemplo o estresse das células causados pela movimentação dos fragmentos durante os testes e falta de espaço para as células crescerem livremente. Como os fragmentos dos biocompósitos estavam soltos dentro dos poços a movimentação da placa durante seu manuseio fez com que os fragmentos se movessem do lugar arrastando e despreendendo as células dos locais de crescimento e as sobrepondo umas sobre as outras (figura 73), isso pode ter causado um estresse nos macrófagos, causando a liberação de LDH. A falta de espaço para o alto número de células e ainda para as células se proliferarem também é um fator de estresse que pode ser causado aos macrófagos, este é outro indício de que o biocompósito não gera uma resposta inflamatória, já que para as micrografias dos poços de controle negativo para inflamação, isto é, com ausência dos fragmentos dos biocompósitos foi liberado também concentrações significativas de LDH, assim como pelos macrófagos dos poços contendo os fragmentos com as formulações dos biocompósitos, isso pode ser visto na figura 71 e 72. Isso significa que a presença do biomaterial não influenciou a liberação da enzima LDH pelos macrófagos, já que encontrou-se os mesmos níveis de LDH nos poços de controle sem os fragmentos.



**Figura 71** Micrografias óticas dos poços contendo os fragmentos dos biocompósitos no (A) dia de contato, no (B) 1°, (C) 2°, (D) 4°, (E) 7° e (F) 9° dia após o contato, mostrando o desenvolvimento dos macrófagos.

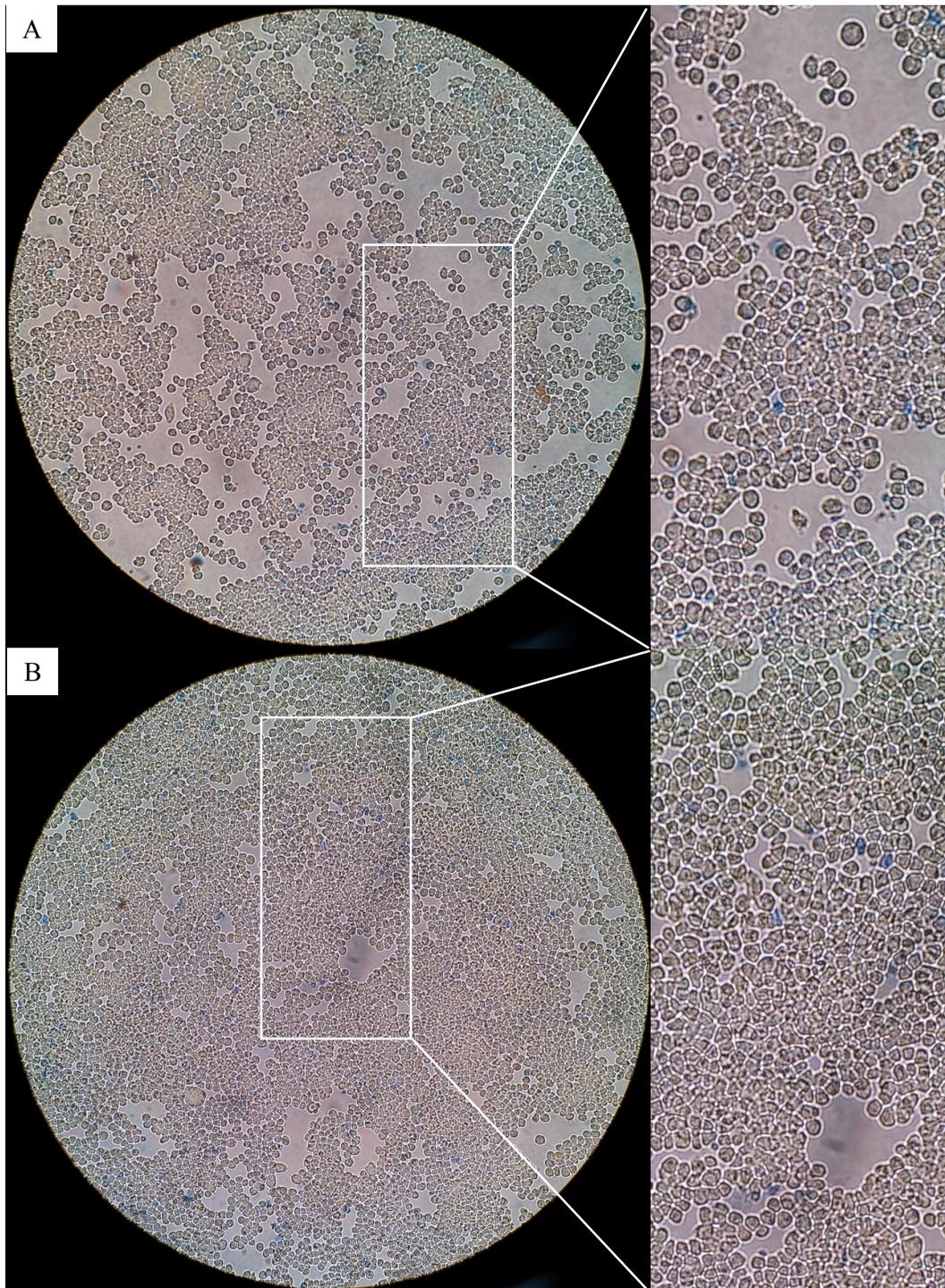


**Figura 72** Micrografias óticas dos poços de controle sem contato com os biocompósitos no (A) dia de coleta, no (B) 1°, (C) 2°, (D) 4°, (E) 7° e (F) 9° dia de desenvolvimento dos macrófagos.



**Figura 73 Desprendimento das células do fundo da garrafa pela movimentação dos fragmentos.**

Testes com Trypan-Blue foram realizados para revelar em azul as células mortas, este corante é capaz de entrar nas células mortas corando-as em azul podendo assim diferenciar células vivas de mortas. A figura 74 mostra as células coradas com o corante para um poço em contato com o biocompósito e para o poço de controle negativo, respectivamente. A contagem foi feita em todas as amostras dos biocompósitos e do PHB puro e feito o gráfico da figura 75. Pela figura observou-se praticamente a mesma porcentagem de morte celular para os poços contendo as amostras e para os poços sem amostras (controle negativo), isso indica que as células morreram com o tempo, devido a fatores já mencionados e morte natural e que não foram influência do contato com os biocompósitos.



**Figura 74** Poços para contagem de morte celular pela revelação em azul pelo corante Trypan-blue contendo fragmentos (A) e de controle negativo (B).

### Citotoxicidade em Culturas de Macrófagos Raw 264.7

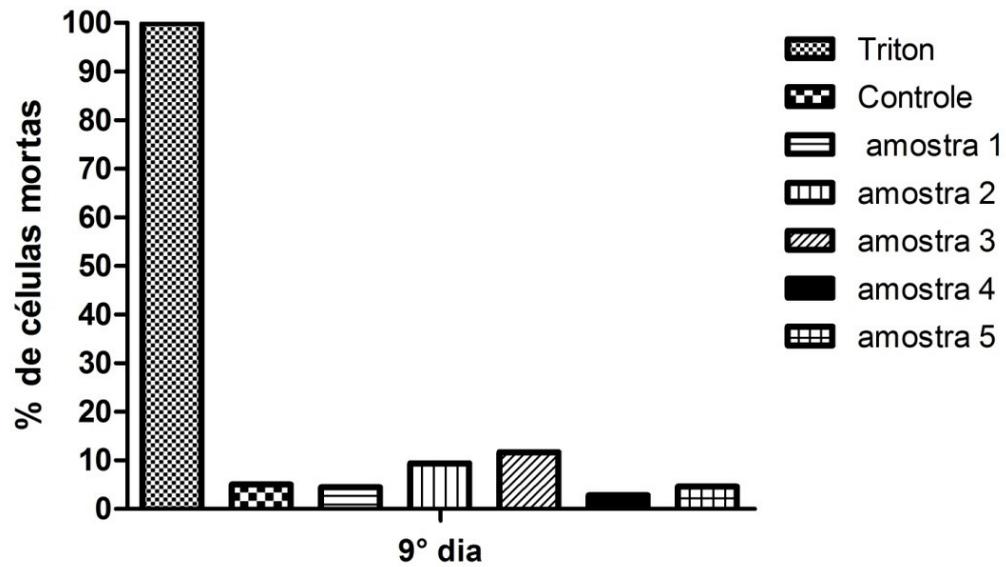


Figura 75 Gráfico com as porcentagens células mortas para os poços contendo as amostras 1, 2, 3, 4, 5, controle negativo e controle positivo para liberação de LDH.

## CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES

- A implementação de uma nova metodologia, no que se refere ao recobrimento dos nanodiamantes pelo poli(3-hidroxi-butirato), permitiu o encapsulamento das nanopartículas originando cápsulas com geometria esférica, que dependo da porcentagem (w/w) de nano diamantes utilizada possibilitou a obtenção de uma boa dispersão das fases e uma distribuição de tamanhos relativamente estreita;
- A partir das capsulas P3HB/ND foram preparados corpos de provas dos biocompósito com uma distribuição uniforme das nanopartículas de diamante;
- A adesão superficial dos nanodiamantes com a matriz polimérica, principalmente para a formulação com 9% m/m de carga, foi favorecida pela metodologia de preparação como foi devidamente sustentado com auxilio dos modelos mecânicos Voigt-Reuss, Nicolais-Narkis e Counto;
- A formulação P3HB-9%ND obteve as melhores propriedades mecânicas, em comparação as formulações (P3HB-12%ND, P3HB-14%ND e P3HB-20%ND) em consequência da ausência de aglomerados e uma melhor dispersão e distribuição das nanopartículas;
- Por meio dos testes *in vitro* os biocompósitos aqui desenvolvidos são biocompatíveis, não gerando respostas citotóxicas e inflamatórias nas células testadas;
- Os valores das propriedades mecânicas foram compatíveis com as propriedades do osso humano, tanto para trabécular ( $E_f=0,02-0,5$  GPa,  $E_c=50-500$ MPa) quanto para o cortical ( $E_f=3-30$  GPa). Isso unido a elevada homogeneidade do material e processabilidade estimula a continuidade deste estudo para o uso deste material no desenvolvimento de dispositivos ortopédicos que possam evitar a atrofia óssea causada pelos dispositivos existentes no mercado com elevado módulo  $4,27 \pm 0,628$  GPa e  $163,72 \pm 15,22$  Mpa, de flexão e compressivo, respectivamente.

## **CAPITULO 6: Sugestões de continuidade do trabalho de pesquisa.**

Com a finalidade da continuidade deste trabalho, algumas sugestões podem ser apreciadas:

- O uso de diferentes tamanhos de cargas para avaliar seu impacto na distribuição das fases e propriedades assim como sua semelhança específica com cada tipo de estrutura óssea (trabecular e cortical).
- Realização de ensaios de torção para a investigação dessas propriedades do biocompósito;
- Realização de testes *in vivo* após conformação de dispositivos específicos utilizando animais de laboratório.

## CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS

ABE, H. et al. Effects of residual zinc compounds and chain-end structure on thermal degradation of poly(epsilon-caprolactone). **Biomacromolecules**, v. 5, n. 4, p. 1480–1488, 2004.

ABE, H. Thermal degradation of environmentally degradable poly(hydroxyalkanoic acid)s. **Macromolecular bioscience**, v. 6, n. 7, p. 469–86, 14 jul. 2006.

ADAMS D; WILLIAMS D F; HILL J. Carbon fiber-reinforced carbon as a potential implant material. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 12, p. 35–42, 1978.

ALVES, E. G. L. et al. Avaliação Mecânica da Placa de Compósitos de poli-hidroxiacetato e Hidroxiapatita em Modelos Ósseos de Gato. **Arq Bras Med Zootec**, v. 62, n. 6, p. 1367–1374, 2010.

ALVES, O. L. **Nanotecnologia e desenvolvimento**. Campinas: [s.n.].

ANDERSON, J. Biocompatibility and bioresponse to biomaterials. In: **Biomaterials of regenerative medicine**. Elsevier, New York. [s.l: s.n.]. p. 704–723.

ANDRADE, L. R. DE. Biomateriais Utilizados em Bioengenharia Ortopédica. **Estud. Biol.**, v. 28, n. 63, p. 17–23, 2006.

ANSELME, K. et al. Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth. **Journal of biomedical materials research**, v. 60, n. 4, p. 529–40, 15 jun. 2002.

ARAKI, K. Estratégia supramolecular para a nanotecnologia. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1484–1490, 2007.

ASTM. **D790 - Standard Test Methods for Flexural Properties of Unreinforced and Reinforced Plastics and Electrical Insulating Materials**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Standard+Test+Methods+for+Flexural+Properties+of+Unreinforced+and+Reinforced+Plastics+and+Electrical+Insulating+Materials#0>>. Acesso em: 25 jan. 2013.

ASTM. **D695 - Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Plastics 1**. [s.l: s.n.].

ASTM. **Standard Test Method for Knoop and Vickers Hardness of Materials 1**. [s.l: s.n.].

BAKAR, M. S. A.; CHEANG, P.; KHOR, K. A. Tensile properties and microstructural analysis of spheroidized hydroxyapatite/poly (

etheretherketone ) biocomposites. **Materials Science and Engineering**, v. 345, p. 55–63, 2003.

BLACK, J.; HASTING, G. W. **Handbook of Biomaterials Properties**. London, UK: [s.n.].

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature immunology**, v. 2, n. 10, p. 907–16, out. 2001.

BONARTSEV, A. P. et al. Biosynthesis , biodegradation , and application of poly ( 3- hydroxybutyrate ) and its copolymers - natural polyesters produced by diazotrophic bacteria. **Communicationg Current Reasearch and Educational Topics and Trend in Applied Microbiology**, p. 295–307, 2007.

BOUILLAGUET S, WATAHA JC, TAY FR, BRACKETT MG, L. P. Initial in vitro biological response to contemporary endodontic sealers. **Journal Endod**, v. 32, n. 10, p. 989–992, 2006.

BOYAN, B. D. et al. Both cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mediate osteoblast response to titanium surface roughness. **Journal of biomedical materials research**, v. 55, n. 3, p. 350–9, 5 jun. 2001.

BRADLEY, D. **Plástico, naturalmente | Science in School**. Disponível em: <<http://www.scienceinschool.org/2007/issue5/plastics/portuguese>>. Acesso em: 22 fev. 2013.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. **Journal of biotechnology**, v. 65, n. 2-3, p. 127–61, 27 out. 1998.

BRONZINO J D. **Biomedical Engineering Handbook**. 2. ed. [s.l: s.n.]. p. 1656

BURNY, F.; DONKERWOLDKER, M.; MUSTER, D. Biomaterials education: a challenge for medicine and industry in the late 1990s. **Revista Materials Science and Engineering**, v. 199, n. 1, p. 53–59, 1995.

CARASCHI, J.; RAMOS, U.; LEÃO, A. Compósitos biodegradáveis de polihidroxibutirato (PHB) reforçado com farinha de madeira: propriedades e degradação. **Acta Scientiarum**. ..., v. 24, n. 6, p. 1609–1614, 2008.

CARMINATTI, CRISTIANE, FILIPE EL MESSANE, MARIA CECÍLIA ZANCHET BRANDÃO, V. R. P. **PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS ( PHAs )**. [s.l.] Universidade FEderal de Santa CAtarina, 2006.

CHEN, D. et al. Dynamic mechanical properties and in vitro bioactivity of PHBHV/HA nanocomposite. **Composites Science and Technology**, v. 67, n. 7-8, p. 1617–1626, jun. 2007.

- CHEN, L. J.; WANG, M. Production and evaluation of biodegradable composites based on PHB-PHV copolymer. **Biomaterials**, v. 23, n. 13, p. 2631–9, jul. 2002.
- CHRISTEL P; CLAES L; BROWN S A. High performance biomaterials: A comprehensive guide to medical and pharmaceutical applications. **Technomic**, p. 499–518, 1991.
- CHUN, A. L. et al. Helical rosette nanotubes: a more effective orthopaedic implant material. **Nanotechnology**, v. 15, n. 4, p. S234–S239, 1 abr. 2004.
- COELHO, M. DE B. **Desenvolvimento de metodologia para produção de estruturas tridimensionais porosas de vidro bioativo para aplicação em engenharia de tecidos**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.
- COELHO, N. S.; ALMEIDA, Y. M. B.; VINHAS, G. M. A Biodegradabilidade da Blenda de Poli (  $\beta$  - Valerato )/ Amido Anfótero na Presença de Microrganismos. **Polímero**, v. 18, n. 3, p. 270–276, 2008.
- EMERY, D. F.; CLARKE, H. J.; GROVER, M. L. Stanmore total hip replacement in younger patients: review of a group of patients under 50 years of age at operation. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, v. 79, n. 2, p. 240–6, mar. 1997.
- FARUK, O. et al. Biocomposites reinforced with natural fibers: 2000–2010. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 11, p. 1552–1596, nov. 2012.
- FERNANDES, M. F. M.; FILGUEIRA, C. Um panorama da nanotecnologia no Brasil (e seus macro-desafios). **Química nova**, v. 31, n. 8, p. 2205–2213, 2008.
- FU, S.-Y. et al. Effects of particle size, particle/matrix interface adhesion and particle loading on mechanical properties of particulate–polymer composites. **Composites Part B: Engineering**, v. 39, n. 6, p. 933–961, set. 2008.
- FUNG, Y. C. **Mechanical properties of living tissue**. 2nd. ed. New York: Springer-Verlag, 1993.
- GARCIA, E. E. C. Nanocompósitos: Novas opções em materiais de embalagem. **Boletim de tecnologia e desenvolvimento de embalagem**, v. 15, n. 1, p. 6, 2003.
- HAN, L.; DONG, L. Improving biodegradable polymer nanocomposites. **Plastic Research Online**, n. c, p. 1–2, 2011.
- HENCH, L. L. Bioceramics: From Concept to Clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 74, n. 7, p. 1487–1510, jul. 1991.
- HENCH LL, P. J. Third- Generation Biomedical Materials. **Science**, v. 95, p. 1014–17, 2002.

HENGESBERGER S; KULIK A; ZYSSET P A. A combined atomic force microscopy and nanoindentation technique to investigate the elastic properties of bone structural units. **Europa Cell Materials**, v. 1, p. 12–17, 2001.

HOLMES, P. Applications of PHB-a microbially produced biodegradable thermoplastic. **Physics in technology**, v. 32, 1985.

HOWARD GT. Biodegradation of polyurethane: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 49, p. 245–252, 2002.

JACK, K. S. et al. The fabrication and characterization of biodegradable HA/PHBV nanoparticle-polymer composite scaffolds. **Acta biomaterialia**, v. 5, n. 7, p. 2657–67, set. 2009.

JEE, A.-Y.; LEE, M. Thermal and mechanical properties of alkyl-functionalized nanodiamond composites. **Current Applied Physics**, v. 11, n. 5, p. 1183–1187, set. 2011.

KAHAR, P. et al. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. **Polymer Degradation and Stability**, v. 83, n. 1, p. 79–86, 2004.

KAY, S. et al. Nanostructured polymer/nanophase ceramic composites enhance osteoblast and chondrocyte adhesion. **Tissue engineering**, v. 8, n. 5, p. 753–61, out. 2002.

KLABUNDE, K. J. et al. Nanocrystals as Stoichiometric Reagents with Unique Surface Chemistry. v. 3654, n. Figure 1, p. 12142–12153, 1996.

KONING, G. DE. Physical properties of bacterial poly((R)-3-hydroxyalkanoates)le. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 13, p. 303–309, 1995.

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

LANGER R, V. J. Tissue engineering. **Science**, v. 14, p. 920–926, 1993.

LEE SJ, K. G. L. Y. L. H. Interaction of human chondrocytes and NIH/3T3 fibroblasts on chloric acid-treated biodegradable polymer surfaces. **J Biomater Sci Polym**, v. 13, n. 2, p. 197–212, 2002.

LEILA CORRÊA BARRETO SIQUEIRA. **FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS COMPÓSITOS COM HIDROXIAPATITA**. [s.l.] Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2009.

MACHADO, M.; PEREIRA, N. **Estudo das Propriedades Mecânicas e Térmicas do Polímero Poli-3-Hidroxi-butirato (PHB) e de Compósitos PHB/Pó de Madeira**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2010.

- MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. NITRIC OXIDE AND MACROPHAGE FUNCTION. **Annual Review Immunology**, v. 15, n. 1, p. 323–50, 1997.
- MILLER, N.; WILLIAMS, D. On the biodegradation of poly-phydroxybutyrate (PHB) homopolymer and poly-P-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers. **Biomaterials**, v. 8, 1986.
- MISRA, S. K. et al. Comparison of nanoscale and microscale bioactive glass on the properties of P(3HB)/Bioglass composites. **Biomaterials**, v. 29, n. 12, p. 1750–61, abr. 2008.
- MOONEY DJ. Biodegradable sponges for hepatocyte transplantation. **Biomedical Materials**, v. 29, p. 959–965, 1995.
- NEMATI HAYATI, A. et al. Characterization of poly(3-hydroxybutyrate)/nano-hydroxyapatite composite scaffolds fabricated without the use of organic solvents for bone tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 3, p. 416–422, abr. 2012.
- NEMATI HAYATI, A.; REZAIIE, H. R.; HOSSEINALIPOUR, S. M. Preparation of poly(3-hydroxybutyrate)/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Letters**, v. 65, n. 4, p. 736–739, fev. 2011.
- NGUYEN, S.; YU, G.; MARCHESSAULT, R. H. Thermal degradation of Poly(3-hydroxyalkanoates): Preparation of well-defined oligomers. **Biomacromolecules**, v. 3, n. 1, p. 219–224, 2002.
- OLIVEIRA, F. C. et al. Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation. **Bioresource technology**, v. 98, n. 3, p. 633–8, fev. 2007.
- P, M. et al. Mineralized membranes for bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research**, n. 254-256, p. 1091–2094, 2004.
- PANDIAN, S. R. K. et al. Biologically synthesized fluorescent CdS NPs encapsulated by PHB. **Enzyme and microbial technology**, v. 48, n. 4-5, p. 319–25, 7 abr. 2011.
- PEKTOK E, N. B. T. J. G. R. K. A. M. M. W. B. Degradation and healing characteristics of small-diameter poly(epsilon-caprolactone) vascular grafts in the rat systemic arterial circulation. **Circulation**, v. 24, p. 2563–70, 2008.
- PINTO, C. E. DA S. **Estudos do Efeito da Pressão e da Incorporação de Fibras de Cana-de-açúcar nas Propriedades do PHB**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2007.
- POLATO, T. DE A. **Estudo das propriedades do Nanocompósito de poli(hidroxibutirato) PHB com argila organofílica**. [s.l.] FACULDADE DE TECNOLOGIA DA ZONA LESTE, 2009.

PUPPI, D. et al. Polymeric materials for bone and cartilage repair. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 4, p. 403–440, abr. 2010.

RAMAKRISHNA, S. et al. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. **Composites Science and Technology**, v. 61, n. 9, p. 1189–1224, jul. 2001.

RAMIRES, E. C. **Biocompósitos a partir de matrizes poliméricas baseadas em lignina, tanino e glioxal reforçados com fibras naturais**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2010.

RANGEL, J. J. A. et al. Características microestruturais do diamante carbonado produzido com grafite brasileiro Microstructural characteristics of brazilian graphite produced carbonado diamond. **Revista Matéria**, v. 13, n. 1, p. 162–170, 2008.

RARE, T. The biological response to titanium and titanium-aluminium-vanadium alloy particles. **Biomaterials**, v. 7, p. 30–36, 1985.

RATNER, B. D. et al. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**. [s.l.: s.n.]. p. 484

RATNER BD. **Biomaterials Science : An Introduction to Materials in Medicine**. 2. ed. [s.l.: s.n.]. p. 864

REYNAUD, E. et al. Nanofillers in polymeric matrix : a study on silica reinforced PA6. **Polymer**, v. 42, p. 8759–8768, 2001.

RHO, J. Y. et al. Elastic properties of microstructural components of human bone tissue as measured by nanoindentation. **Journal of biomedical materials research**, v. 45, n. 1, p. 48–54, abr. 1999.

ROBBINS, S. L. et al. **Fundamentos de Robbins - Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 712

RODRÍGUEZ, R. J. S. et al. Medium-chain-length polyhydroxyalkanoic acids (PHAMCL) produced by *Pseudomonas putida* IPT 046 from renewable source. **European Polymer Journal**, v. 39, n. 7, p. 1385–94, 2003.

SAHOO S, C.-H. J. S.-L. T. Development of hybrid polymer scaffolds for potential applications in ligament and tendon tissue engineering. **Biomedic Materials**, v. 3, p. 169–173, 2007.

SATO, M.; WEBSTER, T. J. Nanobiotechnology: implications for the future of nanotechnology in orthopedic applications. **Expert review of medical devices**, v. 1, n. 1, p. 105–14, set. 2004.

SCHIMIDT, M. **PRODUÇÃO DE POLI ( 3-HIDROXIBUTIRATO ) POR *Cupriavidus necator* DSM 545 EM MEIO SUPLEMENTADO COM ÓLEO MINIEMULSIONADO**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

- SCHOLZ, M.-S. et al. The use of composite materials in modern orthopaedic medicine and prosthetic devices: A review. **Composites Science and Technology**, v. 71, n. 16, p. 1791–1803, nov. 2011.
- SILVA, L. F. DA et al. Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1732–1743, 2007.
- SILVA, L. FERREIRA DA et al. Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate (P3HB-co-3HV) production by *Burkholderia* sp. **Journal of biotechnology**, v. 76, n. 2-3, p. 165–174, 2000.
- SILVA, V. DA. **Desenvolvimento de biocompósitos de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (phbv) com resíduo de madeira**. [s.l.] Universidade da Região de Joinville, 2009.
- STEINMETZ, M. **Nanotecnologia**. [s.l.] Centro Universitário Feevale, 2006.
- TELLES, M. R.; SARAN, L. M.; UNÊDA-TREVISOLLI, S. H. **Produção, propriedades e aplicações de bioplásticos obtidos a partir da cana-de-açúcar**. Jaboticabal: [s.n.].
- TWEDEN KS, H. H. J. M. B. J. C. W. P. M. H. M. Accelerated healing of cardiovascular textiles promoted by an RGD peptide. **J Heart Valve Dis**, v. 4, p. 90–7, 1995.
- WALTER BORZANI et al. **Biotecnologia Industrial. Volume 3: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. 2. ed. São Paulo: [s.n.]. p. 593
- WEBSTER, T. J. et al. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. **Biomaterials**, v. 21, n. 17, p. 1803–10, set. 2000a.
- WEBSTER, T. J. et al. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. **Journal of biomedical materials research**, v. 51, n. 3, p. 475–83, 5 set. 2000b.
- WEBSTER, T. J.; SIEGEL, R. W.; BIZIOS, R. Nanoceramic surface roughness enhances osteoblast and osteoclast functions for improved orthopaedic/dental implant efficacy. **Scripta Materialia**, v. 44, n. 8-9, p. 1639–1642, maio 2001.
- WILLIAMS, D. . Definitions in biomaterials. **Progress in Biomedical Engineering**, v. 4, 1987.
- XIE, Y. et al. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) nanocomposites with optimal mechanical properties. **Polymer**, v. 50, n. 19, p. 4656–4670, set. 2009.
- ZHANG, Q. et al. Fluorescent PLLA-nanodiamond composites for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 32, n. 1, p. 87–94, jan. 2011.

ZHANG, R. et al. Preparation and characterization of bio-nanocomposites based on poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and CoAl layered double hydroxide using melt intercalation. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 43, n. 4, p. 547–552, abr. 2012.

ZHAO, Y.-Q. et al. Nanodiamond/poly (lactic acid) nanocomposites: Effect of nanodiamond on structure and properties of poly (lactic acid). **Composites Part B: Engineering**, v. 41, n. 8, p. 646–653, dez. 2010.