

FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCOMPÓSITOS A  
PARTIR DE P(HB-HV) REFORÇADOS COM NANODIAMANTES

**MARIANA VALINHOS BARCELOS**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

ABRIL-2018

FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCMPÓSITOS A  
PARTIR DE P(HB-HV) REFORÇADOS COM NANODIAMANTES

**MARIANA VALINHOS BARCELOS**

"Tese apresentada ao Centro de  
Ciência e Tecnologia, da  
Universidade Estadual do Norte  
Fluminense, como parte das  
exigências para obtenção de título de  
Doutor(a) em Engenharia e Ciência  
dos Materiais".

Orientador: Prof. Rubén J. Sánchez Rodríguez.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

ABRIL-2018

# FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCOMPÓSITOS A PARTIR DE P(HB-HV) REFORÇADOS COM NANODIAMANTES

## MARIANA VALINHOS BARCELOS

"Tese apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção de título de Doutor(a) em Engenharia e Ciência dos Materiais".

Comissão Examinadora:

---

D.Sc. André Gustavo de Sousa Galdino – Ifes

---

D.Sc. Gustavo Wagner de Menezes – IFF

---

D.Sc. Raúl Ernesto López Palacio – UENF/CCT- LAMAV

---

Ph.D. Rubén J. Sánchez Rodríguez – UENF/CCT- LAMAV (Orientador)

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar, consolar e dar forças para vencer esse desafio. Sem Sua presença em minha vida, esse trabalho não existiria.

Aos meus familiares e amigos por me apoiarem, torcerem e compreenderem minha ausência durante os últimos anos, espero um dia, ter a oportunidade de retribuir todo o carinho. Aos irmãos da igreja pelas orações e cobertura espiritual. Ao meu marido, Marcos, que sempre esteve ao meu lado e me ajudou em tudo.

Aos colegas e professores do LAMAV: Barbara, Claudia, Darlan, Djalma, Davi, Elaine, Ellen, Ester, Fernanda, Frirlei, Israel, Janine, Larissa, Laura, Leila, Katia, Magno, Marcia, Marlon, Mayara, Murilo, Tarcilia, Thereza, Raul, Rodrigo, Slavison, Vanilda e demais, que tornaram a minha rotina na UENF mais agradável.

Aos meus parceiros de grupo de pesquisa, Gabriel e Maria Eduarda, por toda ajuda e amizade. Ao meu orientador, Rubén, por mostrar a direção e apoiar durante toda a pesquisa.

Ao professor Gregório pela doação do polímero e análise de CG. Ao Foluke, pela disponibilidade para obter as micrografias do MEV FEG. Ao Fabrício, pela disponibilidade e realização das análises de citotoxicidade. Ao Carlos Mendes e professora Maria Fátima pela realização da análise de DMA. Ao professor Marcos Lopes pela disponibilidade em realizar a análise do GPC. À Rosane pela prontidão e ajuda realizando o DRX. Ao professor Marcelo pela realização das análises de XPS. Ao Romulo e professor Eduardo Atem pela realização dos ensaios de flexão. Ao Marcelo pela realização das análises de FTIR. A Giovana pelo auxílio na utilização dos fornos. Ao André, Kay e as empresas DpUnion e Sympatec pela realização das análises granulométricas dos nanodiamantes. Ao Gavin, Vesa, Asko e a empresa CarboDeon Oy pela retirada de dúvidas e desconto concedido na compra do nanodiamante. A Priscila e empresa SPLabor pela doação de amostra da mangueira Masterflex®. A Ligia e a empresa Contimetria pela doação do Diferencial Pressure INDICATOR da Wilkerson®.

Agradeço também a todos os outros que não foram mencionados aqui, mas de alguma forma contribuíram para esse estudo.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Área superficial específica em função do tamanho da partícula. A medida que o tamanho da partícula diminui, a quantidade de área interfacial (entre matriz-carga) aumenta (Adaptado de AJAYAN et al., 2003).....	23
Figura 2 - Área superficial específica em função do tamanho da partícula. Quando o diâmetro da partícula diminui, a quantidade de material interfacial aumenta. Destaque para formação da interfase (Adaptado de NEITZEL, 2012).....	23
Figura 3 - Esquema mostrando a formação dos nanocompósitos (Adaptado de SUN et al., 2014).....	25
Figura 4 - Observação de células bacterianas contendo grânulos de polímero biodegradável, da família dos poli-hidroxicanoatos (PHA) no seu interior (SILVA; GOMEZ, 2007).....	27
Figura 5 - Fórmula geral dos PHAs (Adaptado de VERHOOGT et al., 1994).....	27
Figura 6 - Escala/tamanho das moléculas biológicas (Adaptado de BOISSEAU; LOUBATON, 2011).....	32
Figura 7 - Tratamentos superficiais realizados em nanodiamantes com técnica de gás a alta temperatura (A) e tratamentos químicos a temperatura ambiente (B) (Adaptado de MOCHALIN et al., 2012).....	34
Figura 8 - Grupos funcionais normalmente presentes na superfície do nanodiamante (KRUEGER, 2008-B).....	35
Figura 9 - Superfície dos nanodiamantes após tratamento oxidativo de purificação. (a) A nanopartícula foi cortada para mostrar o núcleo estável e a superfície. (b,c) Visão aproximada da superfície, onde destacam-se na superfície em preto carbono $sp^2$ , em vermelho a maior parte da superfície com terminações de oxigênio, em azul nitrogênio, em verde hidrocarbonetos e em branco hidrogênio. (d) Alta ordenação do núcleo mostrada através de MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão) (MOCHALIN et al., 2012).....	35
Figura 10 - Grupos funcionais após tratamento oxidativo (Adaptado de KRUEGER, 2008-B).....	36
Figura 11 - Grupos funcionais C-H (Adaptado de KRUEGER, 2008-B).....	36
Figura 12 - Espectro de FTIR realizado em três amostras diferentes de nanodiamantes (UD50, UD90 e UD98) antes e após tratamento de oxidação com ar a 425°C por 5 h.	

E espectro da amostra UD90 após tratamento com hidrogênio a 800°C por 2 h para mostrar a possibilidade de mudança da superfície após a oxidação (Adaptado de OSSWALD et al., 2006).....	37
Figura 13 - Tipos de morfologias de nanopartículas (formato de fibra, formato tipo placa e formato tridimensional/isodimensional) (Adaptado de AJAYAN et al., 2003)..	38
Figura 14 - Esquema que ilustra a diferença entre dispersão e distribuição. (a) dispersão não homogênea e distribuição homogênea; (b) dispersão e distribuição não homogênea; (c) dispersão homogênea e distribuição não homogênea; (d) dispersão e distribuição homogêneas (AJAYAN et al., 2003; OPELT, 2013).....	39
Figura 15 - Estrutura dos nanocompósitos com partículas com formato de tipo placas (PAIVA et al., 2006).....	40
Figura 16 - (a) Polissiloxianos reforçados com SiO <sub>2</sub> e (b) Propileno reforçado com CaCO <sub>3</sub> (adaptado de FU et al., 2008).....	40
Figura 17 - Resultados de E, tensão e deformação no ensaio do n-ND-PLA (a, b) e n-ND-BQ (Adaptado de SUN et al., 2014).....	41
Figura 18 - Imagens MEV 0-50% de n-DP-PLA / poli (LLA-co-CL). Superfície das amostras (a, c, e, g, i). Fratura transversal (b, d, f, h, j) (SUN et al., 2014).....	42
Figura 19 - Imagens MEV 0-50% de n-DP-BQ / poli (LLA-co-CL) da fratura transversal (a, b, c, d, f) e zoom da fratura transversal para amostra com 50% de n-ND-BQ (SUN et al., 2014).....	43
Figura 20 - Módulo de elasticidade de um compósito formado com copolímero Poli (LLA-co-CL) e nanopartículas de diamante (Adaptado de SUN et al., 2014).....	45
Figura 21 - Comparação entre o módulo de elasticidade experimental (ensaio de nanoindentação) e o calculado através do modelo proposto por Lewis-Nielson (Adaptado NEITZEL, 2012).....	46
Figura 22 - Fluxograma da metodologia utilizada no presente trabalho .....	48
Figura 23 - Equipamento utilizado para análise de XPS (A), e entrada do canhão de raio-X (B).....	51
Figura 24 - Processo de purificação: sistema de refluxo (A), centrífuga (B) e estufa (C) .....	52
Figura 25 - Polímero antes (A) e após (B) o processo de purificação .....	52
Figura 26 - Prensa (A), aquecimento lateral (B), molde (C) e injetora (D) .....	54
Figura 27 - Equipamento para análise de TGA.....	56
Figura 28 - Forno (A) e amostras para queima (B) .....	57

Figura 29 - Máquina Universal de Ensaios com a amostra durante o ensaio.....	59
Figura 30 - Ultra-microdurômetro com a amostra durante o ensaio .....	60
Figura 31 - Valores % de 3HB e 3HV na composição do P(HB-HV).....	64
Figura 32 - Cromatografia de permeação em gel (GPC). Tempo de eluição e cálculo dos valores de Mw e Mw/Mn para o P(HB-HV) .....	64
Figura 33 - Granulometria do nanodiamante Hydrogen P® com medição para pressão aplicada durante o ensaio de 1 bar e 3 bar .....	65
Figura 34 - Granulometria do nanodiamante Molto® com medição para pressão aplicada durante o ensaio de 1 bar e 3 bar .....	66
Figura 35 - Granulometria do nanodiamante Hydrogen P® .....	67
Figura 36 - Granulometria do nanodiamante Molto® .....	67
Figura 37 - Micrografia obtida através do MEV FEG com aumentos de 50000x, 40000x e 30000x para os nanodiamantes Molto® (A, B, e C) e Hydrogen P® (D, E e F) .....	68
Figura 38 - Difratoograma de raio-X das partículas de nD .....	69
Figura 39 - Espectro de FTIR do nD Molto® .....	70
Figura 40 - Espectro de FTIR do nD Hydrogen P® .....	71
Figura 41 - XPS do nD Molto® mostrando picos C1s, O1s e N1s .....	72
Figura 42 - XPS do nD Hydrogen P® mostrando picos C1s, O1s e N1s .....	73
Figura 43 - Deconvolução da curva O1s para o nD Molto® .....	73
Figura 44 - Deconvolução da curva O1s para o nD Hydrogen P® .....	74
Figura 45 - Deconvolução da curva C1s para o nD Molto® .....	75
Figura 46 - Deconvolução da curva C1s para o nD Hydrogen P® .....	75
Figura 47 - Deconvolução da curva N1s para o nD Molto® .....	76
Figura 48 - Deconvolução da curva N1s para o nD Hydrogen P® .....	77
Figura 49 - Pó formado pelas microcápsulas obtido através da metodologia de encapsulamento.....	78
Figura 50 - Microcápsulas formadas pelo processo de encapsulamento. M10:1 (A), M20:1 (B), H10:1 (C) e H20:1 (D). Aumento 2000x.....	79
Figura 51 - Curva de domínios do P(HB-HV) e das formulações M10:1, M20:1, H10:1 e H20:1 .....	81
Figura 52 - Difratoogramas do P(HB-HV) e das formulações M10:1, M20:1, H10:1 e H20:1(Adaptado de BARCELOS et al., 2017).....	82

Figura 53 - Corpos de prova produzidos dos nanocompósitos na prensa (A), na injetora para comparação do tipo e quantidade de carga (B) e do polímero puro na injetora (C) .....	84
Figura 54 - Curvas termogravimétricas de três regiões distintas do corpo de prova do nanocompósito M10:1-P .....	85
Figura 55 - Curvas termogravimétricas de três regiões distintas do corpo de prova do nanocompósito M10:1-I .....	86
Figura 56 - Curvas termogravimétricas de três regiões distintas do corpo de prova do nanocompósito M20:1-I .....	86
Figura 57 - Curvas termogravimétricas de três regiões distintas do corpo de prova do nanocompósito H10:1-I .....	87
Figura 58 - Curvas termogravimétricas de três regiões distintas do corpo de prova do nanocompósito H20:1-I .....	87
Figura 59 - Teores de nD residual obtidos por perda ao fogo .....	88
Figura 60 - Teores de nD residual no material encapsulado e no corpo de prova .....	89
Figura 61 - Curvas termogravimétricas dos insumos puros e dos nanocompósitos .....	90
Figura 62 - Curvas DTG do P(HB-HV) e dos nanocompósitos.....	91
Figura 63 - Aproximação das curvas DTG do P(HB-HV) e dos nanocompósitos.....	91
Figura 64 - Curvas referente ao 1º aquecimento obtido através do ensaio de DSC para o P(HB-HV) e os nanocompósitos M10:1-P, M10:1-I, M 20:1-I, H10:1-I e H20:1-I .....	94
Figura 65 - Curvas referente ao resfriamento obtido através do ensaio de DSC para o P(HB-HV) e os nanocompósitos M10:1-P, M10:1-I, M20:1-I, H10:1-I e H20:1-I .....	96
Figura 66 - Curvas referente ao 2º aquecimento obtido através do ensaio de DSC para o P(HB-HV) e os nanocompósitos M10:1-P, M10:1-I, M20:1-I, H10:1-I e H20:1-I .....	97
Figura 67 - Exemplo do comportamento do gráfico tensão versus deformação para corpos de prova preparados na injetora obtidos nos ensaios de flexão .....	99
Figura 68 - Exemplo do comportamento do gráfico tensão versus deformação para corpos de prova preparados na injetora e prensa obtidos nos ensaios de flexão .....	99
Figura 69 - Valores do módulo de elasticidade obtidos através dos ensaios de flexão para as formulações M10:1-P e M10:1-I .....	100
Figura 70 - Valores de tensão e deformação obtidos através dos ensaios de flexão para as formulações M10:1-P e M10:1-I .....	101
Figura 71 - Micrografias da superfície de fratura das amostras com aumentos de 200x, 1000x da primeira para segunda coluna. As micrografias (A) e (B) correspondem ao	

M10:1-I; (C) e (D) correspondem ao M10:1-P. Vazios e descolamento de partículas estão indicados por setas .....	101
Figura 72 - Valores do módulo de elasticidade obtidos através dos ensaios de flexão para as formulações P(HB-HV), M10:1-I, M20:1-I, H10:1-I e H20:1-I .....	102
Figura 73 - Valores de tensão e deformação obtidos através dos ensaios de flexão para as formulações P(HB-HV), M10:1-I, M20:1-I, H10:1-I e H20:1-I .....	102
Figura 74 - Micrografias da superfície de fratura das amostras com aumentos de 200x (A), 1000x (B) para o P(HB-HV) .....	104
Figura 75 - Micrografias da superfície de fratura das amostras com aumentos de 200x, 2000x da primeira para segunda coluna. As micrografias (A), (B) correspondem ao M10:1-I e (C), (D) ao M20:1-I .....	104
Figura 76 - Micrografias da superfície de fratura das amostras com aumentos de 200x, 2000x da primeira para segunda coluna. As micrografias (A), (B) correspondem ao H10:1-I e (C), (D) ao H20:1-I .....	105
Figura 77 - Micrografias da superfície de fratura das amostras com aumentos de 200x para H10:1-I (A) e H20:1-I (B). Trincas indicadas por setas.....	105
Figura 78 - Micrografias da superfície de fratura das amostras com aumento de 30000x. Sendo M10:1-I (A), M20:1-I (B), H10:1-I (C) e H20:1-I (D). As setas indicam os aglomerados de nanodiamante e o círculo uma trinca .....	106
Figura 79 - Comparação dos valores calculados (modelo Lewis-Nielson) e determinados de forma experimental (ensaio de flexão) para os nanocompósitos...	107
Figura 80 - Valores do módulo de elasticidade obtidos através dos ensaios de indentação para as formulações P(HB-HV), M10:1-P, M10:1-I, M20:1-I, H10:1-I e H20:1-I.....	108
Figura 81 - Curvas de tan Delta obtidas através do ensaio de DMA para as formulações M10:1-I, M20:1-I, H10:1-I e H20:1-I. Obs.: A temperatura indicada na curva se refere a Tg .....	111
Figura 82 - Curvas do módulo de armazenamento obtido através do ensaio de DMA para as formulações M10:1-I, M20:1-I, H10:1-I e H20:1-I .....	112
Figura 83 - Comparativo da produção de NO pelas células na presença dos nanocompósitos, controle negativo (CTL), controle positivo (LPS 24H), avaliados após 1, 2, 6 e 7 dias (Adaptado de Barcelos et al., 2017).....	114
Figura 84 - Imagens da cultura após 1 dia, controle sem material (A), M10:1-P (B), M10:1-I (C), M20:1-I (D), H10:1-I (E), H20:1-I (F). As regiões escuras na imagem	

correspondem aos corpos de prova. O círculo vermelho na imagem C mostra os macrófagos aderidos a um pequeno fragmento do nanocompósito (Adaptado de BARCELOS et al., 2017).....115

Figura 85 - Imagens da cultura após 7 dias, controle sem material (A), M10:1-P (B), M10:1-I (C), M20:1-I (D), H10:1-I (E), H20:1-I (F). As regiões escuras na imagem correspondem aos corpos de prova. As células mortas estão em azul (Adaptado de BARCELOS et al., 2017).....115

## LISTA TABELAS

Tabela 1 - Características e/ou propriedades do PHB e P(HB-HV) com 4-20 mol% HV (Adaptado de VERHOOGT et al., 1994).....	29
Tabela 2 - Materiais utilizados nos experimentos .....	47
Tabela 3 - Valores de $T_1H$ para o P(HB-HV) e as formulações M10:1, M20:1, H10:1 e H20:1 .....	80
Tabela 4 - Cristalinidade das formulações obtidas através as curvas do DRX (Adaptado de Barcelos et al., 2017).....	83
Tabela 5 – Teores médios e dispersão de nD para todas as formulações.....	84
Tabela 6 - Valores de temperatura de início de degradação e temperatura da máxima taxa de degradação para os insumos puros e os nanocompósitos.....	92
Tabela 7 - Valores de $T_{f1}$ , $T_{f2}$ , $\Delta H_f$ e $X_c$ (%) para o P(HB-HV) e nanocompósitos referentes ao 1º aquecimento .....	94
Tabela 8 - Valores de $T_c$ , $\Delta H_c$ e para o P(HB-HV) e nanocompósitos referentes ao resfriamento .....	96
Tabela 9 - Valores de $T_{f1}$ , $T_{f2}$ , $\Delta H_f$ , $T_c$ , $\Delta H_c$ para o P(HB-HV) e nanocompósitos referentes ao 2º aquecimento .....	97
Tabela 10 - Comparação do módulo do P(HB-HV) e nanocompósitos com o módulo do osso humano (amostra retirada da tíbia) .....	109

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

BQ - Bensoquinona

CS - Quitosana

DMA - Análise dinâmico mecânica

DRX - Difração de raio-X

DSC - Análise de calorimetria exploratória diferencial

FTIR - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

GPC - Cromatografia de permeação em gel

HA - Hidroxiapatita

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

nD - Nanodiamante

nHA - Nanohidroxiapatita

NCD - Filmes de diamante nanocristalino

NO - Óxido nítrico

PCL - Poli ( $\epsilon$ -caprolactona)

PHA - Polihidroxialcanoato

PHB - Poli(3-hidroxi butirato)

P(HB-HV) - Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato)

PLA - Polilático

P(LLA-co-CL) - Polilático-co-poli( $\epsilon$ -caprolactona)

RMN - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

SBF - Fluido corporal simulador

$T_c$  - Temperatura de cristalização

$T_f$  - Temperatura de fusão

$T_g$  - Temperatura de transição vítrea

$\Delta H_c$  - Entalpia de cristalização

$\Delta H_f$  - Entalpia de fusão

XPS - Espectroscopia de fótons elétrons excitados por raio-X

# SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>iv</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS</b> .....	<b>xii</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xvii</b>
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
1.1 OBJETIVOS.....	20
1.1.1 Objetivos gerais.....	20
1.1.2 Objetivos específicos.....	20
1.2 JUSTIFICATIVA.....	20
<b>CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>22</b>
2.1 MATERIAIS COMPÓSITOS.....	22
2.1.1 Biomateriais.....	24
2.2 BIOPOLÍMEROS.....	25
2.2.1 Polihidroxicanoatos (PHAs).....	26
2.2.1.1 Propriedades e aplicações dos PHB e P(HB-HV).....	28
2.3 TERMINOLOGIA NANO.....	30
2.3.1 Nanodiamantes.....	32
2.3.2 Tratamentos superficiais em nanodiamantes.....	34
2.3.3 Compósitos com cargas nanométricas.....	38
2.4 MODELOS PARA PREVISÃO DO MÓDULO DE ELASTICIDADE PARA NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS.....	44
<b>CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
3.1 MATERIAIS.....	47
3.2 MÉTODOS.....	48
3.2.1 Caracterização preliminar P(HB-HV).....	48
3.2.1.1 Composição.....	48
3.2.1.2 Determinação da massa molar.....	49
3.2.2 Caracterização preliminar dos nanodiamantes.....	49
3.2.2.1 Dispersão granulométrica dos aglomerados.....	49
3.2.2.2 Caracterização morfológica.....	49

3.2.2.3 Avaliação da estrutura, pureza e tamanho do cristalito.....	50
3.2.2.4 Composição e grupos funcionais da superfície.....	50
<b>3.2.2.4.1 Espectrometria de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR).....</b>	<b>50</b>
<b>3.2.2.4.2 Espectroscopia de fótons elétrons excitados por raio-X (XPS).....</b>	<b>51</b>
<b>3.2.3 Metodologia de preparação dos nanocompósitos.....</b>	<b>52</b>
3.2.3.1 Purificação do P(HB-HV).....	52
3.2.3.2 Encapsulamento das partículas de nanodiamante para formação do biocompósito P(HB-HV)/nD.....	53
3.2.3.3 Confeção dos corpos de prova.....	53
<b>3.2.4 Caracterização dos nanocompósitos.....</b>	<b>54</b>
3.2.4.1 Análises realizadas nas microcápsulas e nos corpos de prova.....	54
<b>3.2.4.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....</b>	<b>54</b>
3.2.4.2 Análises realizadas nas microcápsulas.....	55
<b>3.2.4.2.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....</b>	<b>55</b>
<b>3.2.4.2.2 Difração de raio-X (DRX).....</b>	<b>55</b>
3.2.4.3 Análises realizadas nos corpos de prova.....	56
<b>3.2.4.3.1 Avaliação das propriedades térmicas.....</b>	<b>56</b>
3.2.4.3.1.1 Análise termogravimétrica (TGA).....	56
3.2.4.3.1.2 Perda ao fogo.....	56
3.2.4.3.1.3 Análise térmica por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	57
<b>3.2.4.3.2 Avaliação das propriedades mecânicas.....</b>	<b>58</b>
3.2.4.3.2.1 Ensaio de flexão.....	58
3.2.4.3.2.2 Ensaio de indentação.....	60
<b>3.2.4.3.3 Análise dinâmico mecânico (DMA).....</b>	<b>61</b>
<b>3.2.4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (MEV-FEG).....</b>	<b>61</b>
<b>3.2.5 Ensaio biológicos “in vitro”.....</b>	<b>62</b>
3.2.5.1 Cultura de macrófagos RAW 264.7 e experimentação.....	62
3.2.5.2 Quantificação NO pela Reação de Griess.....	63
<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>64</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DO P(HB-HV).....	64
4.2 CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DO NANODIAMANTE MOLTO® E HYDROGEN P®.....	65

<b>4.2.1 Morfologia e granulometria.....</b>	<b>65</b>
<b>4.2.2 Avaliação da estrutura, pureza e tamanho do cristal.....</b>	<b>68</b>
<b>4.2.3 Composição e grupos funcionais da superfície.....</b>	<b>70</b>
<b>4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS.....</b>	<b>77</b>
<b>4.3.1 Caracterização das microcápsulas P(HB-HV)/nD.....</b>	<b>77</b>
<b>4.3.2 Caracterização dos corpos de prova P(HB-HV)/nD.....</b>	<b>83</b>
4.3.2.1 Avaliação das propriedades térmicas.....	84
4.3.2.2 Avaliação das propriedades mecânicas.....	98
4.3.2.3 Avaliação do comportamento dinâmico mecânico.....	109
<b>4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS “IN VITRO”.....</b>	<b>113</b>
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES.....</b>	<b>117</b>
<b>CAPÍTULO 6: SUGESTÕES.....</b>	<b>119</b>
<b>CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>120</b>

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo desenvolver um biocompósito para ser utilizado como um dispositivo ortopédico, usando poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) P(HB-HV), um copolímero biodegradável, com 94% HB e 6% HV, como matriz e nanodiamantes (nD) com tamanho do cristal de  $4,2 \pm 0,5$  nm como reforço. Os nanodiamantes foram previamente encapsulados por P(HB-HV), a fim de promover melhor distribuição da carga. Foram avaliadas duas quantidades de adição de nD, com fração mássica polímero:carga de 10:1 e 20:1 e nanodiamantes com diferente funcionalização na superfície (Molto® e Hydrogen P®). Duas metodologias distintas de preparação de corpos de prova foram utilizadas: prensa e injetora. Análises preliminares dos nanodiamantes (granulometria, MEV-FEG, DRX, FTIR e XPS) demonstraram que o nD Hydrogen P® apresenta superfície mais hidrofóbica e portanto mais compatível com o polímero. No entanto, o nD Molto® é de mais fácil dispersão e possui menor aglomeração, além de maior pureza. As propriedades mecânicas foram avaliadas por meio de ensaio de flexão e indentação. Os corpos de prova confeccionados por injeção apresentaram melhores propriedades quando comparados aos confeccionados por prensagem, devido à estrutura contínua, isto é, melhor compactação do polímero que foi obtida na injetora. Não houve diferença significativa das propriedades em relação à variação da quantidade de carga no nanocompósito, mas as formulações com nD Hydrogen P® apresentaram uma leve tendência de queda nos valores quando comparado com o nD Molto®, devido a maior aglomeração. Os valores encontrados estão de acordo com o reportado em outro estudo para o osso humano. As curvas de DMA indicaram melhor interface entre o reforço e o P(HB-HV) para as formulações com nD Molto®. A cristalinidade dos nanocompósitos foi inferior para todas as formulações em comparação com o P(HB-HV), indicando um bloqueio no movimento das cadeias poliméricas pela adição dos nanodiamantes, conforme confirmado também por RMN. A análise de TGA demonstrou que o processo de encapsulamento proporcionou distribuição homogênea da carga na matriz e que todas as formulações retardaram o processo de decomposição do polímero. Análises de indução inflamatória indicaram comportamentos não citotóxico e citostático para as formulações.

**Palavras-chave:** Biocompósito, Nanodiamante, P(HB-HV).

## ABSTRACT

The present study has as its aim to develop a biocomposite to be used as orthopedic device, using poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P(HB-HV), a biodegradable copolymer, with 94% HB and 6% HV, as matrix and nanodiamonds (nD) with crystal size of  $4,2 \pm 0,5$  nm as filler. The nanodiamonds were previously encapsulated by P(HB-HV), in order to promote a better filler distribution. Two nD concentration were evaluated, with polymer:filler weight ratio of 10:1 and 20:1 and nanodiamonds with different surface functionalization (Molto® and Hydrogen P®). Two distinct methodologies for the preparation of the specimens were used: press and injection molding. Preliminary analyses of the nanodiamonds (granulometry, SEM-FEG, XRD, FTIR and XPS) showed that the nD Hydrogen P® presents more hydrophobic surface and therefore it is more compatible to the polymer. However, nD Molto® is easier to disperse and presents less agglomeration, in addition to higher purity. The mechanical properties were analyzed by means of flexural and indentation tests. The injection molded specimens presented better properties compared to the press molded, due to its continuous structure, that is, better polymer compaction that was obtained through the injection. There was no significant difference of the nanocomposites properties regarding the filler concentration, but the formulations with nD Hydrogen P® showed a slight downward trend in the values comparing to nD Molto®, due to the higher agglomeration. The values found are in accordance to the reported in another studie for human bone. The DMA curves indicate better interface between the filler and P(HB-HV) for the formulations with nD Molto®. The nanocomposites crystallinity were inferior for all formulation in comparison to the P(HB-HV), suggesting that the nanodiamonds hindered the polymeric chains mobility, in accordance to the observed by NMR. The thermogravimetric analyses (TGA) demonstrated that the encapsulation process yielded homogeneous filler distribution in the matrix and that all formulations retarded the polymer decomposition. Inflammatory induction analyses indicated non-cytotoxic and non-cytostatic behavior for the formulations.

**Keywords:** Biocomposite, Nanodiamonds, P(HB-HV)

## CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

Os materiais compósitos pertencem a uma classe de materiais com alta importância tecnológica. Quando um material é preparado usando materiais de natureza distinta é possível obter atributos que não estão presentes a partir dos componentes individuais. Assim, fica evidente a infinidade de estruturas com propriedades diferentes que podem ser desenvolvidas. Eles podem ser encontrados na natureza (madeiras, ossos, tecidos musculares) ou produzidos artificialmente (MANO, 1991; CHAWLA, 1998; CALLISTER Jr., 2002; NETO; PARDINI, 2006). Dentre suas inúmeras aplicações, podemos destacar o uso na área de biomateriais, onde são empregados no corpo humano (RAMAKRISHNA et al., 2001), podendo ser confeccionados a partir da junção de dois ou mais materiais, formando compósitos biocompatíveis.

Nas últimas décadas, diversos estudos com polímeros e copolímeros biodegradáveis e biocompatíveis têm sido realizados para o uso em diversas aplicações na indústria e biomédicas, nos quais pode-se destacar o uso de PHB (BARROS Jr., 2014; ROSA et al., 2001), blendas PCL/PSPE (BALDIN; OLIVEIRA, 2013), PCL (ROSA et al., 2001), PLLA (ZHANG et al., 2011), Poli(LLA-co-CL) (SUN et al., 2014), P(HB-HV) (ROSA et al., 2001) e PHB e P(HB-HV) (GALEGO et al., 2000).

No entanto, os polímeros apresentam limitações, como por exemplo, baixa rigidez e baixa resistência, e para expandir suas aplicações em diferentes setores, cargas particuladas inorgânicas, tais como partículas de micro / nano de SiO<sub>2</sub>, vidro, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Mg(OH)<sub>2</sub> e CaCO<sub>3</sub>, nanotubos de carbono, silicatos (FU et al., 2008) e nanodiamantes (SUN et al., 2014) são frequentemente adicionados formando compósitos poliméricos.

Entre as várias nanopartículas orgânicas e inorgânicas utilizadas, as partículas de nanodiamantes apresentam propriedades únicas, como elevada resistência mecânica, biocompatibilidade, alta condutividade térmica, elevada estabilidade química e uma superfície quimicamente rica, o que tem atraído seu uso em biomateriais (ZHANG et al., 2011; MOCHALIN et al., 2012).

Uma boa interação entre as nanopartículas e a matriz polimérica para a produção dos materiais compósitos, tem como benefício uma distribuição mais homogênea das nanopartículas na matriz e melhores propriedades mecânicas (SUN et al., 2014). Vários trabalhos relatam mudanças nas superfícies de nanopartículas

(SPITSYN et al., 2006; KOROLKOV et al., 2007; ARNAULT et al., 2011; NEITZEL, 2012). Essa modificação da superfície dos nanodiamantes (nDs) pode melhorar a interação matriz com a carga (SUN et al., 2014).

Neste trabalho foi formulado um material biocompósito visando seu uso como dispositivos ortopédicos, que apresentou boas propriedades mecânicas utilizando uma matriz bioabsorvível e uma carga biocompatível com dimensões nanométricas para garantir maior área superficial específica, originando um reforço significativo com a menor percentagem possível deste material. Para isso foram utilizados nanodiamantes com superfície modificada e não modificada e uma matriz polimérica do copolímero poli (3-hidroxi butirato-co-hidroxi valerato) (P(HB-HV)). Adicionalmente foi avaliada a influência da interação matriz com a partícula nas propriedades do biomaterial.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da adição de nanodiamantes superficialmente modificados e não modificados nas propriedades de biocompósitos formulados com matriz do poliéster biodegradável P(HB-HV), visando sua aplicação como biomaterial.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os componentes que serão utilizados para formulação do biocompósito;
- Confeccionar misturas com diferentes proporções de carga, utilizando nanodiamantes superficialmente modificados (HYDROGEN P®) e não modificados (MOLTO®), visando atingir uma boa distribuição do nanodiamante na matriz de P(HB-HV);
- Utilizar e comparar a influência de diferentes métodos de preparação (prensa e injetora) de corpos de prova nas propriedades do material formulado;
- Avaliar influência da quantidade e tipo de carga nas propriedades do material, analisando a interação da carga com a matriz polimérica através resultados da análise dinâmico mecânica (DMA) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN);
- Avaliar as propriedades citotóxicas e citostáticas apresentadas pelas diferentes formulações.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

Estudos por materiais compósitos estão em constante crescimento nas últimas décadas e isso tem chamado a atenção de diversos grupos de pesquisa, como por exemplo o uso de PHB, P(HB-HV) reforçado com hidroxiapatita (GALEGO et al., 2000; SIQUEIRA, 2009). No entanto, algumas aplicações ficam limitadas devido às dimensões das cargas na faixa micrométrica, à fraca interface e ao uso de elevadas percentagens de carga para alcançar as propriedades desejadas.

Assim, houve o surgimento de estudos com reforços em tamanho nanométrico, os nanocompósitos, que apresentam grande área superficial em relação ao tamanho da partícula, aumentando o contato matriz com a carga, o qual possibilita uma capacidade superior de reforço, atingindo melhores propriedades mecânicas (MATHEW et. al., 2005; NEITZEL, 2012), mesmo com o uso de baixas concentrações de carga (GARCIA, 2003).

Os nanodiamantes são bastante promissores na área de biomateriais devido, principalmente à sua boa compatibilidade com o tecido vivo (ZHANG et al., 2011). No entanto, para evitar a aglomeração e melhorar a distribuição dentro da matriz polimérica, é necessário que a superfície dos nanodiamantes apresentem uma estrutura química e física compatível com o polímero, possibilitando uma homogeneidade das propriedades do compósito.

Além dos fatos descritos acima, esta pesquisa também é justificada devido à carência de estudos da influência que nanodiamantes com superfície modificadas podem causar nas propriedades de dispositivos ortopédicos poliméricos com matriz de P(HB-HV).

## CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MATERIAIS COMPÓSITOS

Materiais compósitos representam um grupo de particular importância na classificação dos materiais de engenharia, correspondendo à junção de materiais com características físicas ou químicas distintas (SMITH, 1998). Normalmente um dos materiais forma uma fase descontínua, chamada de reforço ou fase dispersa, responsável por fornecer principalmente resistência ao compósito. Já a outra fase é contínua, chamada de matriz, correspondendo ao meio de transferência desse reforço (MANO, 1991; CALLISTER Jr., 2002; NETO; PARDINI, 2006). Assim, as características finais do material compósito são influenciadas pelas propriedades e quantidades dos seus constituintes, pela forma de como é distribuído o reforço na matriz e pela interação existente entre eles. O objetivo de combinar materiais com características distintas para cada tipo de aplicação desejada é obter um material com propriedades específicas que não seriam conseguidas com seus constituintes separadamente (PADILHA, 1997; NETO; PARDINI, 2006).

Os reforços particulados, também denominados cargas, possuem dimensões que são aproximadamente as mesmas em todas as direções, e podem ser aplicados para reforçar compósitos (CALLISTER Jr., 2002).

Interações na interface podem levar à formação de uma região de interfase perto da superfície de enchimento com propriedades diferente da matriz polimérica. As propriedades e a natureza da interfase também estão de modo bastante natural qualitativamente ligados ao grau de adesão entre as duas fases (KUBÁT et al., 1990; NEITZEL, 2012).

Quanto maior a área superficial disponível do reforço usado, maior será a interação com a matriz e melhores serão as propriedades obtidas (MATHEW et. al., 2005). Como mostra a figura 1, a área superficial será tanto maior, quanto menor for o tamanho do reforço utilizado, assim a quantidade de material da matriz em contato, ou seja, interagindo com carga, será maior também. Já a figura 2 mostra que dependendo da quantidade de reforço utilizado, a área de interfase (entre as fases da matriz e da carga) pode se tornar a fase dominante do compósito quando se usa partículas bem pequenas, de ordem nanométrica (NEITZEL, 2012).

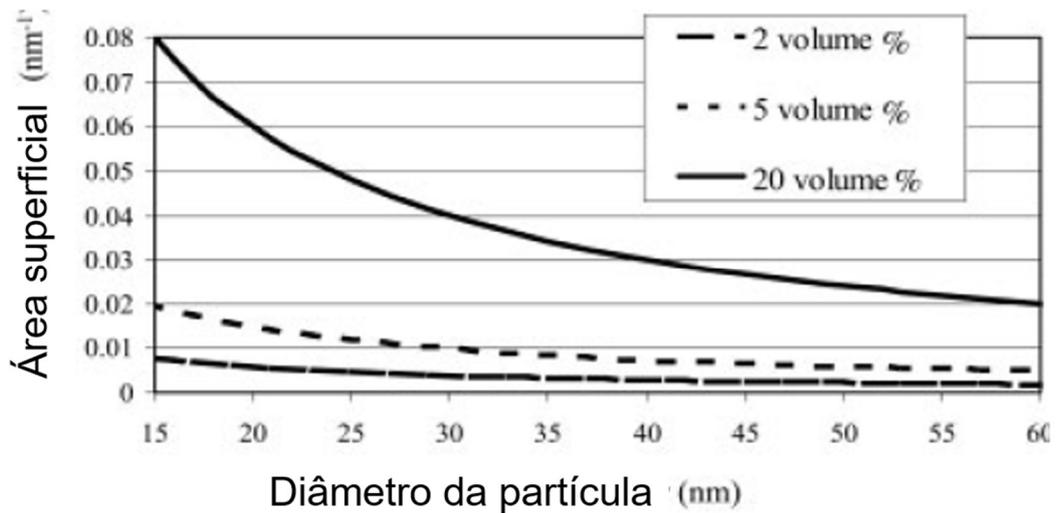


FIGURA 1 – Área superficial específica em função do tamanho da partícula. A medida que o tamanho da partícula diminui, a quantidade de área interfacial (entre matriz-carga) aumenta (Adaptado de AJAYAN et al., 2003).

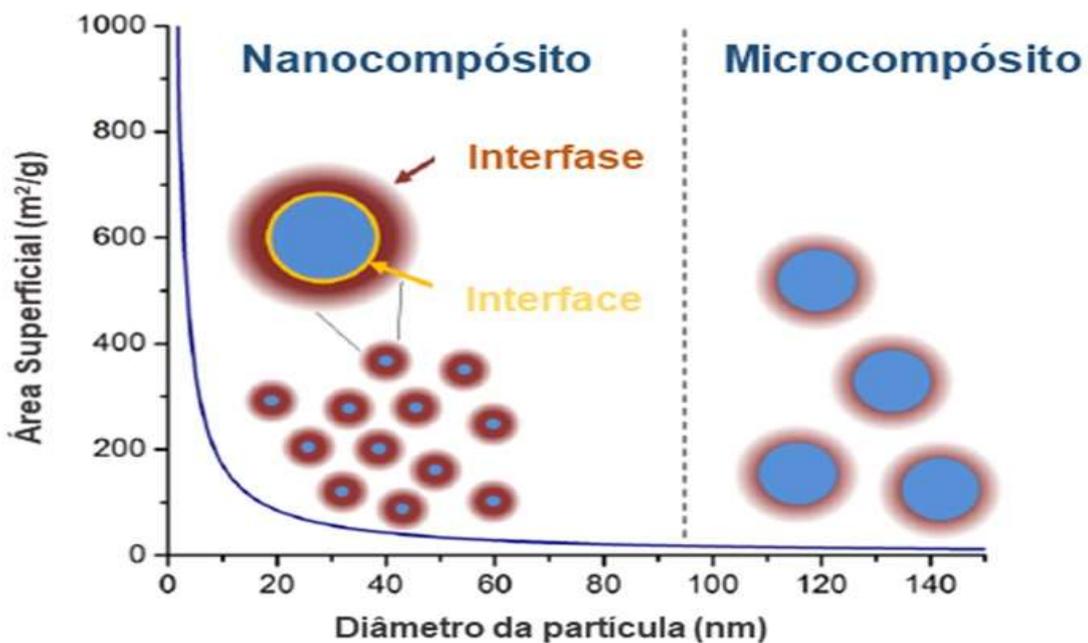


FIGURA 2 – Área superficial específica em função do tamanho da partícula. Quando o diâmetro da partícula diminui, a quantidade de material interfacial aumenta. Destaque para formação da interfase (Adaptado de NEITZEL, 2012).

Dessa forma, esses materiais podem ser usados em diversas aplicações como liberação controlada de fármaco, isoladores elétricos, condutores térmicos, e compósitos de alto desempenho para uso em aeronaves, dentre outras (AJAYAN et al., 2003) e também biomédicas (RAMAKRISHNA et al., 2001), já que analisando a

estrutura de diversos tecidos humanos, os mesmo são tipicamente compósitos. Como exemplo, podemos citar o tecido ósseo, que é basicamente formado pela interação bem sucedida de partículas de hidroxiapatita carbonatada com fibras de colágeno (CHAWLA, 1998; ORÉFICE et al., 2006). Diante desta realidade pode-se dizer que existe uma indicação que o uso de materiais compósitos sintéticos com propriedades similares seriam capazes de reproduzir a estrutura dos tecidos vivos.

Pesquisas têm mostrados resultados satisfatórios com a junção de uma grande variedade de materiais para este fim, como no caso de Tavares, 2011, que fabricou membranas biocompatíveis de PCL e CS (quitosana) para o uso na engenharia de tecidos. Como a PCL permite obter membranas com características mecânicas semelhantes às dos enxertos naturais e a CS promove boa adesão celular, o objetivo foi desenvolver um material que unisse as propriedades de ambos. As propriedades mecânicas do compósito foram similares às obtidas com a PCL pura, no entanto devido à dificuldade de incorporar a CS na superfície da membrana a adesão celular foi dificultada. Já BARROS Jr., 2014 adicionou a uma matriz de PHB uma carga de nanodiamantes para o uso como implante ortopédico. Os valores do módulo de elasticidade do material compósito foram compatíveis com as do osso humano e os ensaios *in vitro* mostraram ausência de respostas citotóxicas e inflamatórias nas células testadas. Isso mostra que além de resultados com as propriedades mecânicas satisfatórias, avaliar a biocompatibilidade do material compósito é fundamental para seu uso efetivo. Assim, surgiu uma classe específica de estudo chamada Biomateriais.

### **2.1.1 Biomateriais**

Os biomateriais têm como um dos principais requisitos apresentar biocompatibilidade, ou seja, exibir uma resposta biológica positiva ao entrar em contato com o organismo vivo (MARCONI; PIOZZI, 2002).

Para serem desenvolvidos, é necessário combinar conhecimentos de diversas áreas distintas, como ciências biológicas, médicas e engenharia (ORÉFICE et al., 2006).

Podem ser classificados como qualquer material (natural ou sintético), com exceção de remédios, que são usados para tratar, reparar, restaurar, substituir órgão, etc (RAMAKRISHNA et al., 2001; ORÉFICE et al., 2006; MARCONI; PIOZZI, 2002). Atualmente é possível encontrar biomateriais metálicos, cerâmicos, poliméricos e

compósitos (ORÉFICE et al., 2006). Nesse último, destaca-se os nanocompósitos obtidos pela inserção de nanodiamantes em uma matriz polimérica, pois já foram reportados melhorias substanciais nas propriedades mecânicas (MOCHALIN et al., 2012). Como exemplo, SUN et al., 2014 desenvolveram *scaffolds* com uma matriz polimérica de P(LLA-co-CL) e nanocarga de diamantes oxidados que tiveram sua superfície recoberta previamente com PLA e BQ (benzoquinona), como ilustrado na figura 3. Os resultados mostraram que o nanodiamante recoberto com a superfície PLA evitou a agregação da carga, melhorou a distribuição na matriz, aumentou o módulo de elasticidade, enquanto aqueles que foram recobertos com BQ apresentaram resultados opostos. Isso foi devido à similaridade estrutural do recobrimento de PLA com o polímero da matriz, causando forte interação entre ambos (SUN et al., 2014).

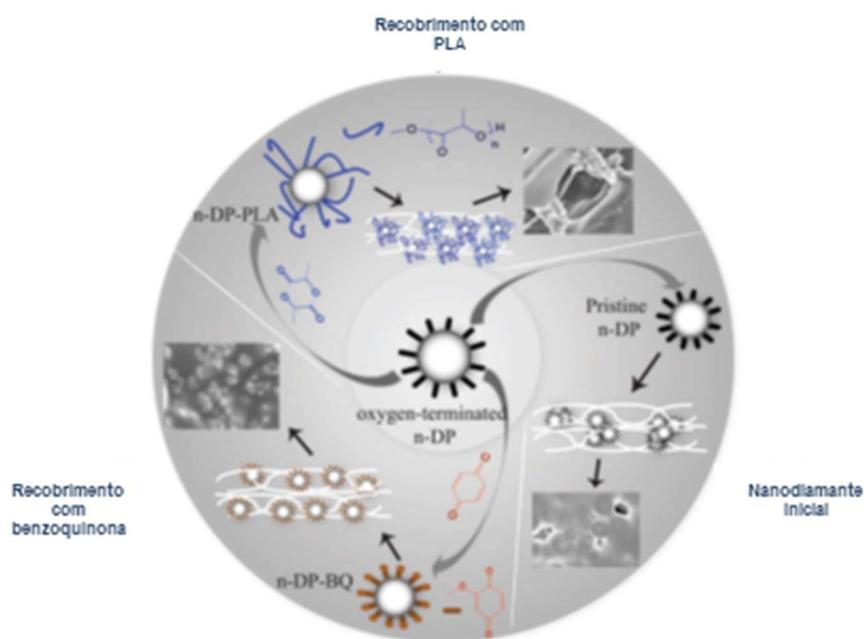


Figura 3 – Esquema mostrando a formação dos nanocompósitos (Adaptado de SUN et al., 2014).

## 2.2 BIOPOLÍMEROS

Os polímeros biodegradáveis são aqueles nos quais a degradação resulta da ação de microorganismos de ocorrência natural como bactérias, fungos e algas (ASTM D6400-12). A degradação irá depender de condições favoráveis de pH, umidade, oxigenação e a presença de determinados metais para ocorrer de forma bem sucedida. (RAY; BOUSMINA, 2005).

Polímeros biodegradáveis têm uso difundido na medicina. Tais materiais são concebidos para se degradarem *in vivo* de uma maneira controlada durante um período de implantação predeterminado, de tal modo que a degradação ajude a alcançar uma função particular, tal como a liberação de um fármaco ou o enfraquecimento mecânico de suturas e placas ósseas. O ideal é que os polímeros biodegradáveis sejam reabsorvidos pelo organismo de maneira previsível, tornando-se desnecessária a remoção subsequente (MILLER; WILLIAMS, 1986).

Esses polímeros podem ser obtidos utilizando fontes naturais renováveis como milho, celulose, batata, cana de açúcar, ou serem sintetizados por bactérias a partir de pequenas moléculas como o ácido butírico ou o ácido valérico, que dão origem ao polihidroxibutirato (PHB) e ao polihidroxibutirato-co-valerato (P(HB-HV)) respectivamente (RAY; BOUSMINA, 2005)

### **2.2.1 Polihidroxicanoatos (PHAs)**

São polímeros termoplásticos biodegradáveis produzidos por até 75 diferentes espécies de bactérias (REDDY et al., 2003), e por algumas plantas (POIRIER et al., 1992). Sua síntese ocorre por bactérias e microrganismos, quando no meio nutritivo existe excesso de carbono e falta de nutrientes necessários ao crescimento da bactéria, como nitrogênio, fósforo, manganês, ferro, etc (SILVA; GOMEZ, 2007).

Havendo um meio que apresente essas características, o polímero é, então, acumulado em forma de grão pelas bactérias; este acúmulo pode chegar a cerca de 80% da massa seca total da célula (HOLMES, 1985; BRAUNEGG et al., 1998), como mostrado na figura 4.

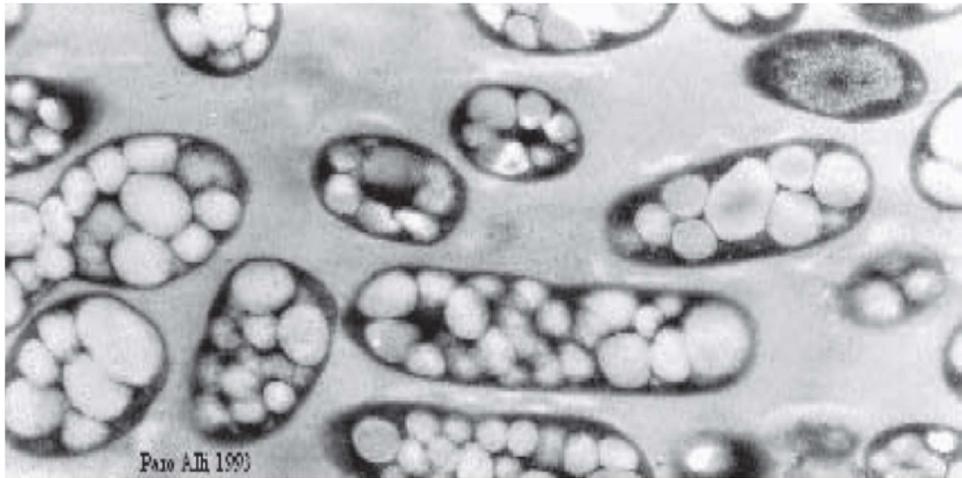


Figura 4 – Observação de células bacterianas contendo grânulos de polímero biodegradável, da família dos poli-hidroxicanoatos (PHA) no seu interior (SILVA; GOMEZ, 2007).

Já foram identificadas mais de 100 diferentes unidades monoméricas como constituintes dos PHAs, possibilitando a criação de diferentes tipos de polímeros e aumentando a gama de utilizações deste material (REDDY et al., 2003). A figura 5 mostra a estrutura geral dos PHAs, em que o alceno substituído na posição “R” determina as propriedades do polímero formado. Quando um metil substitui a posição “R”, tem-se o Poli-3-hidroxi-butirato (P3HB) ou (PHB) (VERHOOG et al., 1994). Já quando um etil substitui temos o Poli-3-hidroxi-butirato-co-valerato (P(HB-HV)) (TAN et al., 2014).

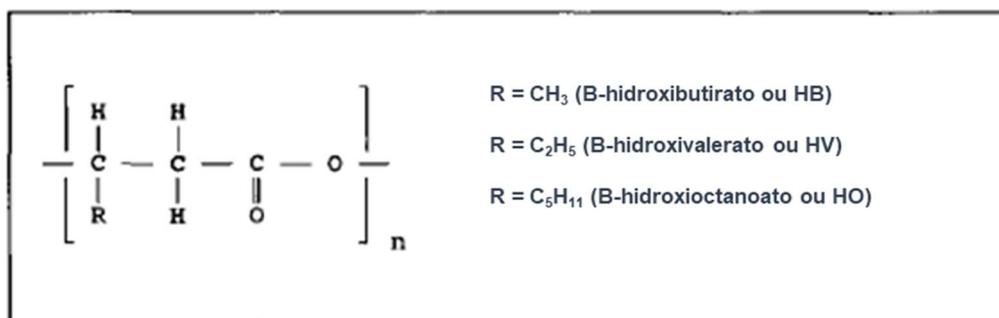


Figura 5 – Fórmula geral dos PHAs (Adaptado de VERHOOGT et al., 1994).

Ter domínio sobre o processo de síntese é o que garante a produção de um material com características para as aplicações pretendidas. O primeiro polímero da família dos PHAs pesquisado foi o PHB, no entanto, logo em seguida suas características termoplásticas foram modificadas através da produção do copolímero P(HB-HV) (SILVA; GOMEZ, 2007).

Embora o PHB seja um material biodegradável de ocorrência natural, o mesmo apresenta uma elevada cristalinidade e degrada a uma temperatura próxima ao seu ponto de fusão. Devido à estreita janela de processamento, as aplicações comerciais deste polímero são extremamente limitadas. Por essa razão, estudos com poli 3-hidroxiacrilatos contendo na estrutura o co-mônômero 3HV, Poli(3-hidroxiacrilato-co-3-hidroxiacrilato) (P(HB-HV)), têm sido feitos com o intuito de melhorar as propriedades físicas e químicas em relação ao P3HB para abranger diversas aplicações (RAY; BOUSMINA, 2005; SILVA; GOMEZ, 2007). Esse copolímero possui menor cristalinidade e propriedades mecânicas melhoradas (diminuição da rigidez e fragilidade, aumento da resistência à tração) em comparação com o PHB, enquanto ainda é facilmente biodegradável. Também possui maior viscosidade de fusão, que é uma propriedade desejável para o processamento por extrusão e injetora. Além disso, é termoplástico e pode ser processado através de moldagem por injeção, extrusão, moldagem por sopro, formação de filme e fibra, e técnicas de laminação (RUDNIK, 2008).

#### 2.2.1.1 Propriedades e aplicações dos PHB e P(HB-HV)

O PHB possui estrutura cristalina ortorrômbica, com dimensão da célula cristalina ( $a=5,76\text{\AA}$ ,  $b=13,20\text{\AA}$  e  $c=5,96\text{\AA}$ ), é formado por cristais lamelares extremamente finos com tamanho em torno de 4 - 7 nm (GANDINI; BELGACEM, 2008). De maneira geral pode ser considerado completamente biodegradável, altamente hidrofóbico, termoplástico, com elevada cristalinidade, elevada temperatura de fusão, boa resistência aos solventes orgânicos, excelente resistência mecânica e de módulo de elasticidade, assemelhando-se ao polipropileno. Para aplicações em grande volume seu uso é prejudicado em função de suas características como fragilidade, baixa deformabilidade, alta suscetibilidade à degradação térmica, processamento difícil pelas tecnologias de termoplásticos convencionais (principalmente devido à degradação térmica) e alto custo em comparação com outros polímeros (HOLMES, 1995; GANDINI; BELGACEM 2008). Um resumo de suas principais características e/ou propriedades pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1 – Características e/ou propriedades do PHB e P(HB-HV) com 4-20 mol% HV (Adaptado de VERHOOGT et al., 1994).

Propriedades	PHB	P(HB-HV)
Temperatura de Fusão (Tf) (°C)	175	157-102
Temperatura de transição vítrea (Tg) (°C)	4	2 a -8
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,25	1,2
Cristalinidade (%)	80	69-39
Alongamento até rompimento (%)	6	8-10

Essas características permitem sua aplicação em uma grande variedade de produtos, como recipientes, garrafas, aparelhos de barbear, materiais para embalagem de alimentos, dentre outras. No entanto, o homopolímero PHB é relativamente rígido e quebradiço, o que acaba por restringir seu uso. Já os copolímeros do PHA, compostos principalmente de HB com uma fração de monômeros de cadeia mais longa, como HV, HH ou HO, são mais flexíveis e mais resistentes (SURIYAMONGKOL et al., 2007).

Embora sejam usados para confecção de artigos em geral, como no caso de Vogelsanger et al., 2002 que aplicaram blendas de P3HB e PCL para uso em embalagens de produtos agrícolas, diversas pesquisas para aplicação médica e farmacêutica tem sido realizada. Podendo ser aplicado como implantes, gazes, materiais osteossintéticos, suturas, placas ósseas, talas, microcápsulas, material de matriz para fármacos de liberação lenta e culturas de células *in vitro* e na forma de pó fino, como lubrificante para as luvas dos cirurgiões (HOLMES, 1985; MILLER; WILLIAMS, 1986; SURIYAMONGKOL et al., 2007).

No entanto, uma aplicação mais tecnológica seria como enxerto vascular composto de fibras muito finas dispostas para formar um tubo impermeável à água de diâmetro interno adequado, que iria funcionar como um substrato temporário para o crescimento de um novo tecido e, eventualmente, seria totalmente substituído por tecido natural. Assim, seria evitado o problema da formação de trombos e eventual bloqueio em artérias que podem acontecer devido à resposta do corpo à matéria estranha não degradante da parede do vaso (HOLMES, 1985). Estudos mais recentes usaram PHB para formulação de compósitos com foco em desenvolver materiais para reparação óssea, como por exemplo PHB, HA e nHA (hidroxiapatita) (NI; WANG, 2002; SIQUEIRA, 2009; SIQUEIRA, 2017) e PHB e nanodiamante (BARROS Jr., 2014; NETO et al., 2017). Ni e Wang, 2002 avaliaram o comportamento *in vitro* do compósito utilizando um fluido corporal simulado (SBF), variando o tempo de

exposição ao SBF e a composição da carga. Neste estudo os autores observaram que dentro de um curto período de tempo após sua imersão em SBF, houve formação de uma camada de apatita biologicamente ativa sobre o compósito de HA/PHB, demonstrando alta bioatividade *in vitro*. Além disso, foi observado que o módulo de elasticidade aumentou inicialmente com o tempo de imersão em SBF, devido à formação da camada de apatita na superfície do compósito e sua diminuição após imersão prolongada, exibindo degradação do compósito em um ambiente corporal. Já Neto et al., 2017 em seu avaliou as propriedades mecânicas do compósito variando o percentual em massa da carga em 3,8, 4,6, 7,2%. Seu estudo demonstrou que os melhores de módulo de armazenamento foram obtidos com 4,6% de carga, pois acima deste valor foi observado aglomeração das partículas. Através de testes *in vitro* (SIQUEIRA, 2009) e *in vivo* (SIQUEIRA, 2017) observou que os compósitos produzidos com PHB/HA e PHB/nHA em seu estudo tem um comportamento biocompatível e não apresentaram resposta citotóxicas e inflamatórias nas células e cobaias testadas. BARROS Jr., 2014 produziu compósitos com formulação com 9, 12, 14 e 20% de nanodiamantes em uma matriz de PHB. As melhores propriedades mecânicas foram obtidas para o material com menor quantidade de nanodiamante em consequência da ausência de aglomerados e uma melhor dispersão e distribuição da carga. Por meio dos testes *in vitro* verificou que o material produzido era biocompatível e não gerou respostas citotóxicas e inflamatórias nas células testadas.

## 2.3 TERMINOLOGIA NANO

O termo "Nanotecnologia" foi utilizado pela primeira vez em 1974 pelo professor Norio Taniguchi para descrever a respeito da precisão que envolvem as tolerâncias na construção e acabamento de materiais. Mas mesmo sem ter usado essa palavra, quem iniciou esse conceito foi Richard P. Feynman no *CalTech (California Institute of Technology)* em 1959, quando na reunião anual da *American Physical Society*, ele proferiu a palestra "*There's plenty of room at the bottom*" ("Há mais espaços lá embaixo"), falando sobre as limitações de se trabalhar e controlar coisas em pequena escala (GOGOTSI, 2006; ASHBY, 2009).

No entanto, foi em 1981 que K. Eric Drexler, no *Foresight Nanotech Institute for Molecular Manufacturing*, usou uma nova abordagem para descrever a manipulação e engenharia molecular usadas na construção de máquinas e equipamentos com

precisão atômica. Já em 1986 publicou seu livro “*Engines of Creation*”, onde o finalmente popularizou o termo nanotecnologia (ASHBY, 2009).

O prefixo nano deriva da palavra grega *dwarf*, que quer dizer anão. É usado para designar tamanho e/ou comprimento. Se alguma coisa é classificado como “nano” sua medida será um bilionésimo de metro ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m} = 0,000000001 \text{ m}$ ). Sendo assim, um bilionésimo de metro chama-se “nanômetro”. Dessa forma, pode se dizer que a nanotecnologia lida principalmente com a síntese, caracterização e exploração de materiais nanoestruturados, de 1-100 nm (GOGOTSI, 2006; ASHBY, 2009).

As características únicas estruturais, energéticas e químicas das nanoestruturas constituem a base da nanociência, pois suas propriedades podem diferir significativamente dos demais materiais de mesma composição. O controle adequado dessas propriedades pode levar a fabricação de novos dispositivos e novas tecnologias (GOGOTSI, 2006).

Uma área de atuação que vem obtendo grande destaque é a área médica. Ao interagir com moléculas biológicas, ou seja, em tamanho nanométrico (Figura 6), abre-se uma grande área para pesquisa e aplicação, pois em nanoescala é possível explorar propriedades físicas diferentes das observados em microescala. As interações entre agrupamentos moleculares artificiais ou nano-dispositivos e as biomoléculas passam a ser analisadas e compreendidas, tanto no interior das células, como no meio extracelular (BOISSEAU; LOUBATON, 2011).

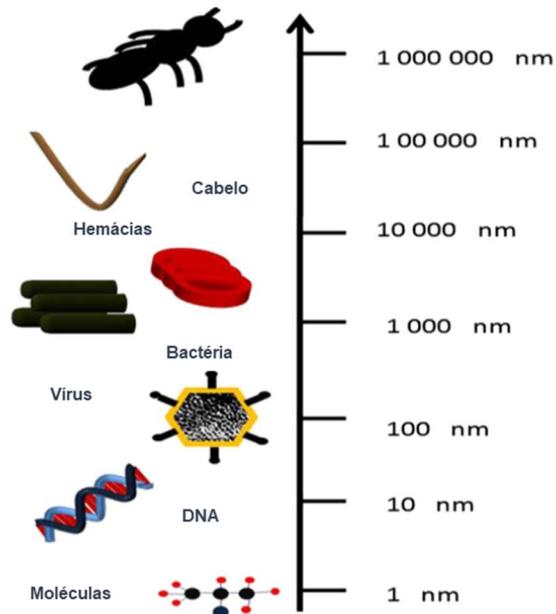


Figura 6 – Escala/tamanho das moléculas biológicas (Adaptado de BOISSEAU; LOUBATON, 2011).

A nanomedicina é uma área da ciência ainda pouco explorada. Na verdade, o uso do termo “nanomedicina” surgiu há poucos anos, mas nada mais é que a nanotecnologia aplicada na medicina (BOISSEAU; LOUBATON 2011). Diversos materiais em escalas nanométricas e micrométricas tem sido recentemente estudados para este fim, como alumina, titânia e hidroxiapatita (WEBSTER et al., 2001; SIQUEIRA, 2009; GALDINO, 2011; SIQUEIRA, 2017), nanomagnetita (TUDORACHI et al., 2015) e os nanodiamantes (NEITZEL, 2012; SUN et al., 2014; BARROS Jr., 2014; NETO et al., 2017).

### 2.3.1 Nanodiamantes

A palavra diamante tem origem do grego adamas, que quer dizer invencível. Realmente se trata do material mais duro que se tem conhecimento na atualidade, pois inclusive é usado como o material que representa a dureza máxima na escala de Mohs (GARCIA et al., 2000; ARAUJO, 2010). Os nanodiamantes são portanto, diamantes em dimensões nanométricas.

Foi no início da década de 1960 que a DuPont de Nemours desenvolveu métodos para a síntese de diamante em pó, em formato de partículas individuais com dimensões micro e nanométricas, no entanto só ficaram comercialmente disponíveis a partir de 1970. Já em 1983, foi fundada uma fundição de produção em grande escala, a “ALTAI” na Rússia para comercializar o processo de produção de diamantes

por detonação em grande escala (GOGOTSI, 2006). Mas foi somente a partir do final da década de 1990, que vários avanços importantes levaram a um interesse mais amplo por essas partículas (MOCHALIN et al., 2012).

O termo “nanodiamante” é utilizado para se referir a materiais à base de diamante em nanoescala (~ 1 a 100 nm), como por exemplo, filmes de diamante, partículas de diamante e seus conjuntos estruturais, tais como aglomerados de partículas ligadas livremente ou partículas incorporadas em outras matrizes. No entanto, existe uma classe de nanodiamante que é conhecida como diamantes “ultrananocristalinos”, que são na ordem de poucos nanômetros. São chamados assim, para diferenciar de outras nanoestruturas baseadas em diamante acima de ~ 10 nm (GOGOTSI, 2006).

Desde então, tem sido um material bem promissor para aplicações médicas, devido suas características como não toxicidade, estabilidade química, alta condutividade térmica, ótimas propriedades mecânicas e óticas (KRUEGER, 2008 - A; MOCHALIN et al., 2012).

Além dessas, uma das características mais interessantes dos nanodiamantes e que o diferencia das demais nanopartículas de carbono é a presença de um grande número de grupos funcionais em sua superfície (MOCHALIN et al., 2012).

Apesar da estabilidade química do cristal, sua superfície apresenta alta reatividade, devido aos planos de clivagem. Como por exemplo, acontece com o plano (001), que faz com que os átomos de carbono (C) presentes na superfície que realizariam quatro ligações, fiquem com duas rompidas/livres, que são chamadas de *dangling bonds*. Outros planos também geram ligações livres e essa característica faz deste material um candidato para aplicações que necessitam de modificação de superfície (KAWARADA, 1996; TACHIKI et al., 2003; RISTEIN, 2006; ARAUJO, 2010).

Sua superfície é quimicamente rica em grupos funcionais e a sua funcionalização pode ser realizada sem comprometer as propriedades intrínsecas do núcleo de diamante. Portanto controlar e adequar quimicamente a superfície é de suma importância para melhorar a interação das nanopartículas com o meio desejado (KUBÁT et al., 1990; MOCHALIN et al., 2012).

### 2.3.2 Tratamentos superficiais em nanodiamantes

Como as interações na interface polímero/carga tem efeito sobre as propriedades mecânicas, térmicas e outras propriedades do compósito, para obter uma boa interação com a matriz visando melhores propriedades, é de extrema importância selecionar um tratamento superficial adequado (KUBÁT et al., 1990). A variedade de técnicas disponíveis de modificação química pode ser dividida em tratamentos com gás e tratamentos químicos úmidos (MOCHALIN et al., 2012), conforme mostrado na figura 7.

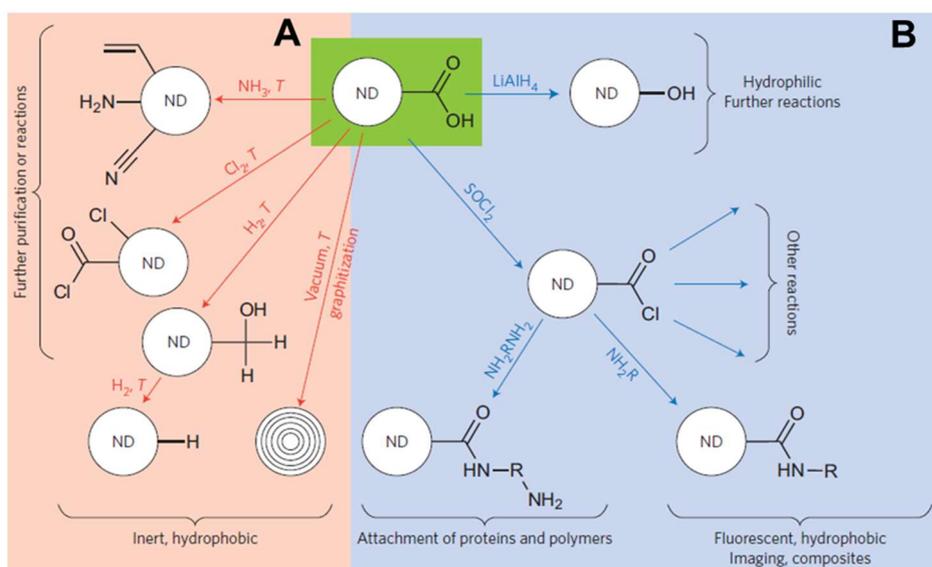


Figura 7 – Tratamentos superficiais realizados em nanodiamantes com técnica de gás a alta temperatura (A) e tratamentos químicos a temperatura ambiente (B) (Adaptado de MOCHALIN et al., 2012).

Dependendo do fornecedor dos nanodiamantes, a natureza da superfície pode ser muito variada e por esse motivo é de extrema importância realizar primeiramente um tratamento de purificação. Sabe-se que geralmente os nanodiamantes como recebido/comprados podem conter em sua superfície uma mistura de carbono não diamante, vários grupos funcionais e impurezas metálicas (Figura 8) (KRUEGER, 2008-B; MOCHALIN et al., 2012).

No caso dos diamantes produzidos por detonação com explosivos, grupos contendo oxigênio são normalmente presentes da superfície. Estes grupos resultam da reação do cristal recém formado com o arrefecimento no reator ou a partir da purificação do processo com a utilização de ácidos minerais concentrados. Por isso a maior parte destes grupos são carboxilas, hidroxilas, cetonas e ésteres (KRUEGER, 2008-B).

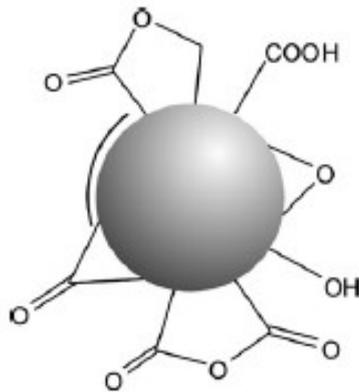


Figura 8 – Grupos funcionais normalmente presentes na superfície do nanodiamante (KRUEGER, 2008-B).

Após o tratamento de purificação e/ou oxidação, a superfície do nanodiamante irá apresentar em sua maioria grupos funcionais com terminações em oxigênio como mostrado nas figuras 9 e 10 (KRUEGER, 2008-B; MOCHALIN et al., 2012).

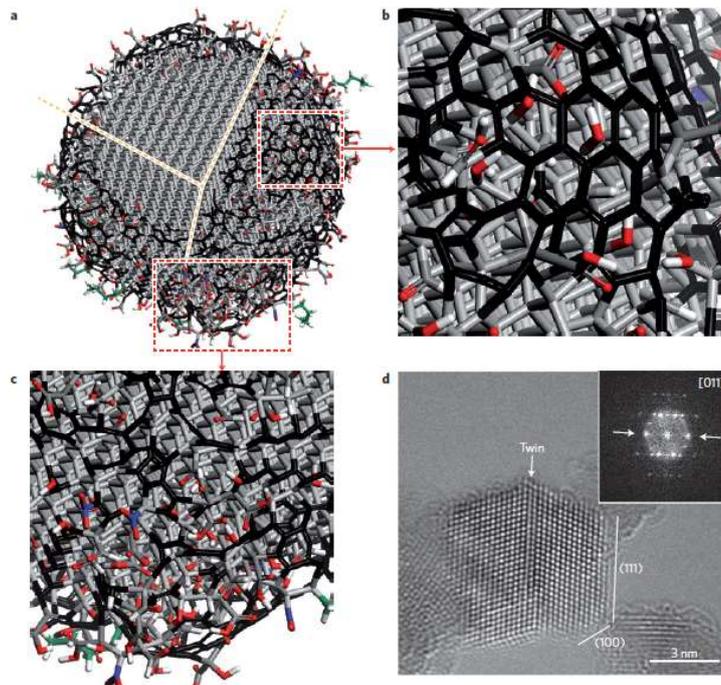


Figura 9 – Superfície dos nanodiamantes após tratamento oxidativo de purificação. (a) A nanopartícula foi cortada para mostrar o núcleo estável e a superfície. (b,c) Visão aproximada da superfície, onde destacam-se na superfície em preto carbono  $sp^2$ , em vermelho a maior parte da superfície com terminações de oxigênio, em azul nitrogênio, em verde hidrocarbonetos e em branco hidrogênio. (d) Alta ordenação do núcleo mostrada através de MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão) (MOCHALIN et al., 2012).

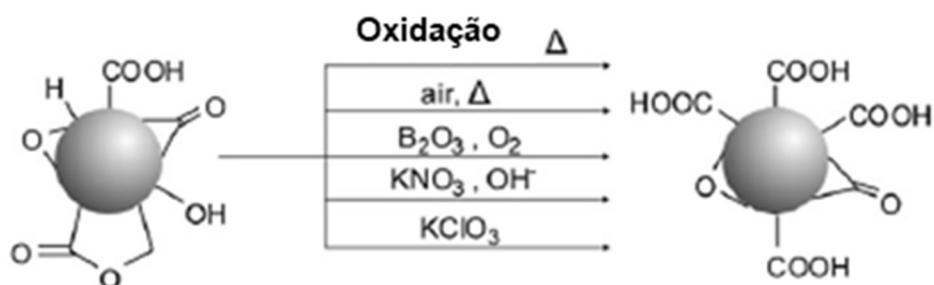


Figura 10 – Grupos funcionais após tratamento oxidativo (Adaptado KRUEGER, 2008-B).

O tratamento de purificação com oxigênio normalmente é executado em duas etapas. Na primeira é realizada uma oxidação da superfície com ar quente com objetivo de aumentar a razão  $sp^3/sp^2$ , diminuindo assim a quantidade de carbono (não diamante) na superfície (OSSWALD et al., 2006; NEITZEL, 2012). Na segunda etapa, é realizado um tratamento com uma mistura de ácido e água para remover as impurezas não carbonosas, como metais, óxidos metálicos, dentre outros provenientes da câmara de detonação ou dos explosivos usados (PICHOT et al., 2008; NEITZEL, 2012).

Após o tratamento de purificação, a superfície do nanodiamante se encontra pronta para realização de uma grande variedade de funcionalização/modificação dependendo da aplicação final (NEITZEL, 2012). O tratamento gasoso com hidrogênio é conhecido como hidrogenação, e tem como objetivo criar grupos funcionais C-H na superfície, conforme mostrado na figura 11. Após essa modificação, a superfície do nanodiamante irá apresentar um caráter hidrofóbico (MOCHALIN et al., 2012). Terminações de hidrogênio são importantes para estabilizar a estrutura da superfície do cristal, conseqüentemente manter seu volume evitando as transformações de fase (KAWARADA, 1996).

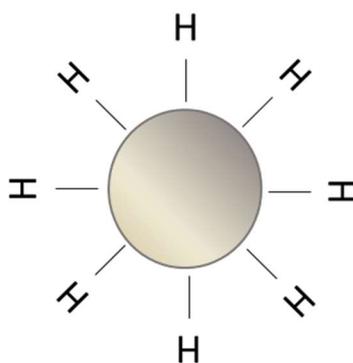


Figura 11 – Grupos funcionais C-H (Adaptado de KRUEGER, 2008-B).

Trabalhos mostram que tratamentos gasosos com hidrogênio são realizados tanto em nanodiamantes, como para filmes de diamante (NDC) (KOROLKOV et al., 2007; POPOV et al., 2008; ARNAULT et al., 2011). O tratamento com hidrogênio causa a formação de novos grupos de hidreto principalmente devido à redução e destruição de grupos contendo oxigênio (KOROLKOV et al., 2007). Apesar da dificuldade em se obter uma completa hidrogenação da superfície, Girard et al., 2010 conseguiram esse resultado através de um tratamento realizado com micro-ondas de plasma de hidrogênio.

Antes e após os tratamentos descritos acima, os grupos funcionais da superfície de nanodiamante podem ser determinados através da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros característicos mais comumente encontrados em nanodiamantes são C=O ( $1740-1757\text{cm}^{-1}$ ), C-H ( $2853-2962\text{cm}^{-1}$ ), O-H ( $3280-3675\text{cm}^{-1}$  *stretch* e  $1640-1660\text{cm}^{-1}$  *bend*), conforme mostrado na figura 12 (OSSWALD et al., 2006).

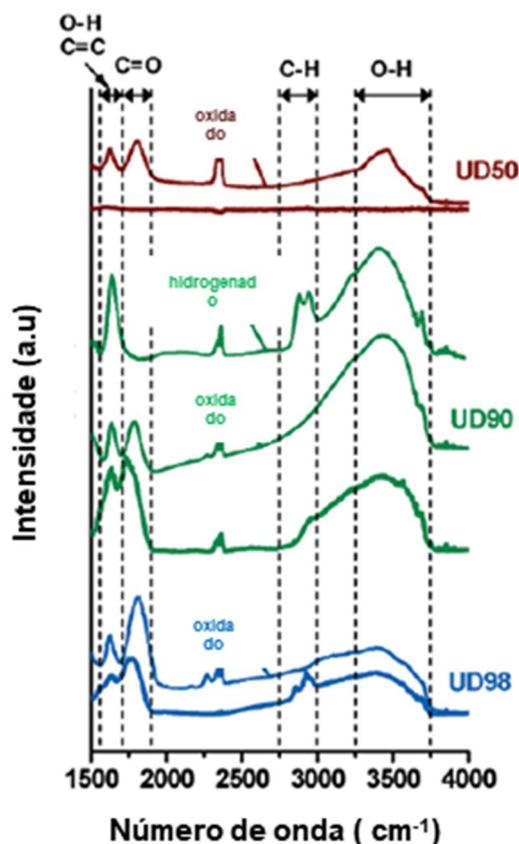


Figura 12 - Espectro de FTIR realizado em três amostras diferentes de nanodiamantes (UD50, UD90 e UD98) antes e após tratamento de oxidação com ar a  $425^{\circ}\text{C}$  por 5 h. E espectro da amostra UD90 após tratamento com hidrogênio a  $800^{\circ}\text{C}$  por 2 h para mostrar a possibilidade de mudança da superfície após a oxidação (Adaptado de OSSWALD et al., 2006).

### 2.3.3 Compósitos com cargas nanométricas

Segundo Ajayan et al., 2003, nos últimos anos a otimização das propriedades compósitos poliméricos com carga em escala micrométrica atingiu seu limite, porque as propriedades alcançadas geralmente envolvem perdas de outras, como por exemplo, para melhorar a rigidez se perde em tenacidade. Além disso, defeitos macroscópicos devido a regiões de alta ou baixa fração volumétrica de enchimento, pode levar a avaria ou falha. No entanto, com o uso de carga nanométrica, onde o material apresenta tamanhos menores que 100 nm em pelo menos uma dimensão (Figura 13), abriu-se uma grande janela de oportunidade.

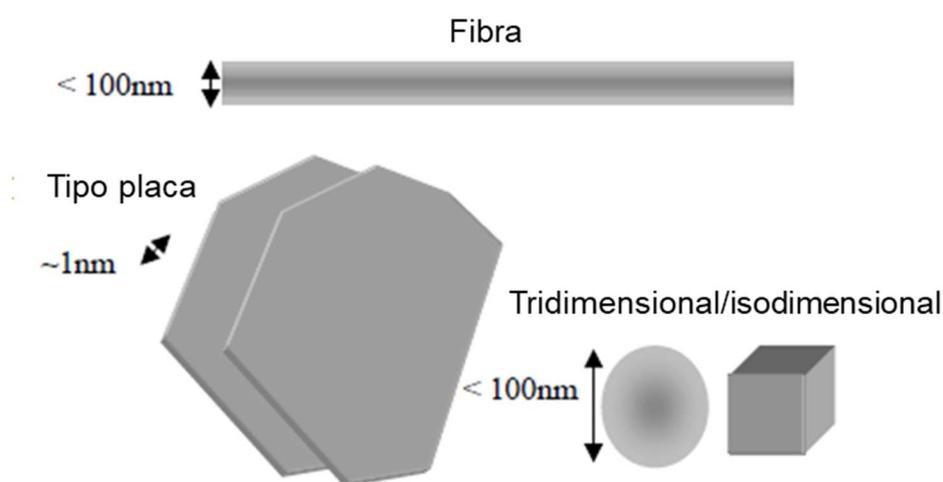


FIGURA 13 – Tipos de morfologias de nanopartículas (formato de fibra, formato tipo placa e formato tridimensional/isodimensional) (Adaptado de AJAYAN et al., 2003).

Um dos benefícios de se usar cargas em tamanho nanométrico é o fato de ser possível formar compósitos com carga em quantidade de massa base bem inferior (2 a 10%) aos formados com carga em escala micrométrica (20 a 35%) com melhoria de propriedades igual ou superior (GARCIA, 2003).

Essa redução de peso é muito vantajosa para diversas aplicações, como por exemplo é possível obter uma melhor barreira para uma mesma espessura ou uma redução de peso da embalagem mantendo ou melhorando a proteção do produto acondicionado, além de não comprometer a transparência (GARCIA, 2003).

Diversos estudos mostraram que os compósitos de matriz termoplástica com cargas nanométricas apresentam vantagens significativas em relação à resina base, como por exemplo, aumento da rigidez, da resistência à tração e da temperatura de

distorção térmica, sem variar significativamente a densidade do material, o que possibilita um aumento pequeno de peso (GARCIA, 2003).

A habilidade de se dispersar as cargas na matriz pode ser um dos parâmetros mais críticos para controlar as propriedades, como no caso de nanotubos (Ajayan et al., 2003). A figura 14 mostra uma ilustração das diferenças entre dispersão e distribuição da carga na matriz (AJAYAN et al., 2003).

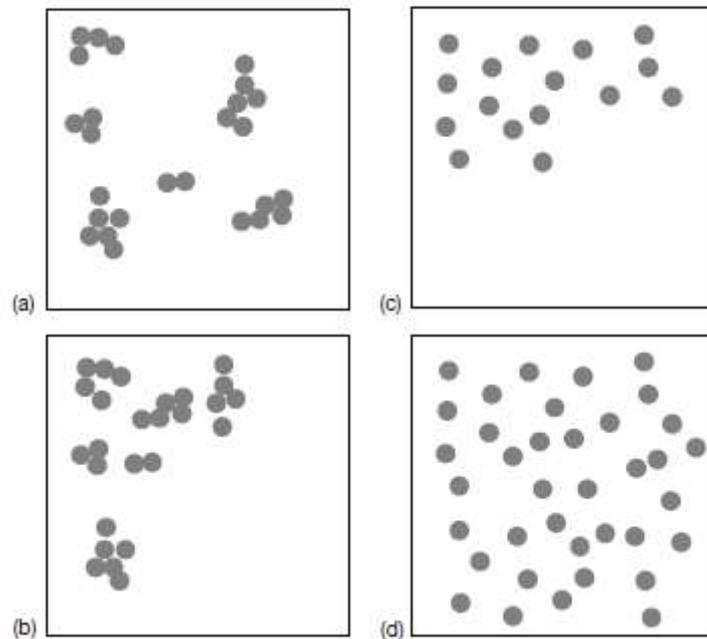


FIGURA 14 – Esquema que ilustra a diferença entre dispersão e distribuição. (a) dispersão não homogênea e distribuição homogênea; (b) dispersão e distribuição não homogênea; (c) dispersão homogênea e distribuição não homogênea; (d) dispersão e distribuição homogêneas (AJAYAN et al., 2003; OPELT, 2013).

No caso específico das partículas com formato tipo placas, pode-se reclassificar o estado de dispersão como tactóide, intercalado ou esfoliado (Figura 15).

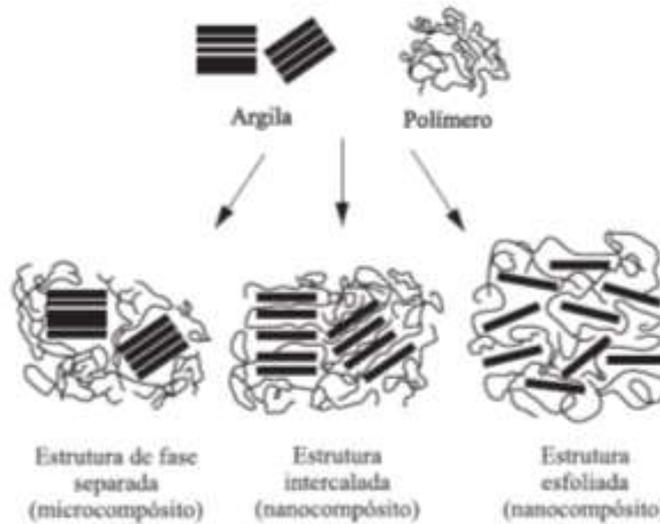


FIGURA 15 – Estrutura dos nanocompósitos com partículas com formato de tipo placas (PAIVA et al., 2006).

A influência do tipo, quantidade, distribuição e interfase formada (entre matriz-nanocarga) na variação das propriedades como módulo de Young, módulo de compressão, resistência à compressão, dureza, alongamento, tenacidade à fratura entre outras tem sido estudadas por diversos autores.

Fu et al., 2008 fez um levantamento a respeito do efeito do tamanho das nanopartículas no módulo de elasticidade de diversos compósitos.

De uma maneira geral Fu et al., 2008 concluiu que quando as partículas utilizadas apresentam um tamanho crítico (ordem nanométrica), a variação do tamanho influencia no módulo, como pode ser visto na figura 16.

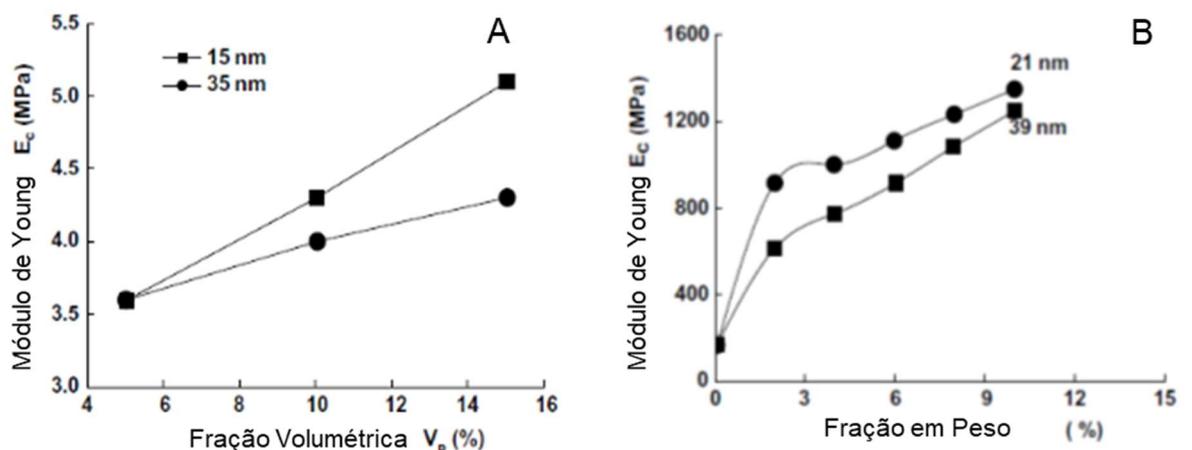


FIGURA 16 – (a) Polissiloxianos reforçados com SiO<sub>2</sub> e (b) Propileno reforçado com CaCO<sub>3</sub> (adaptado de FU et al., 2008).

Outro estudo, dessa vez realizado por Sun et al., 2014 desenvolveu *scaffolds* com uma matriz polimérica de P(LLA-co-CL) em razão molar de 75/25 e nanocarga de diamantes oxidados que tiveram sua superfície recoberta previamente com PLA e BQ (benzoquinona) com objetivo de relacionar as propriedades com as modificações e interações partícula-polímero.

A figura 17 mostra o resultado obtido nos ensaios de tração. Nota-se aumento de E com aumento de partículas de n-DP-PLA provavelmente influenciado pelas propriedades de interação do recobrimento com a matriz, já que o PLA tem uma estrutura similar ao copolímero da matriz ocasionando uma boa miscibilidade. No entanto, o mesmo não é observado no n-DP-BQ.

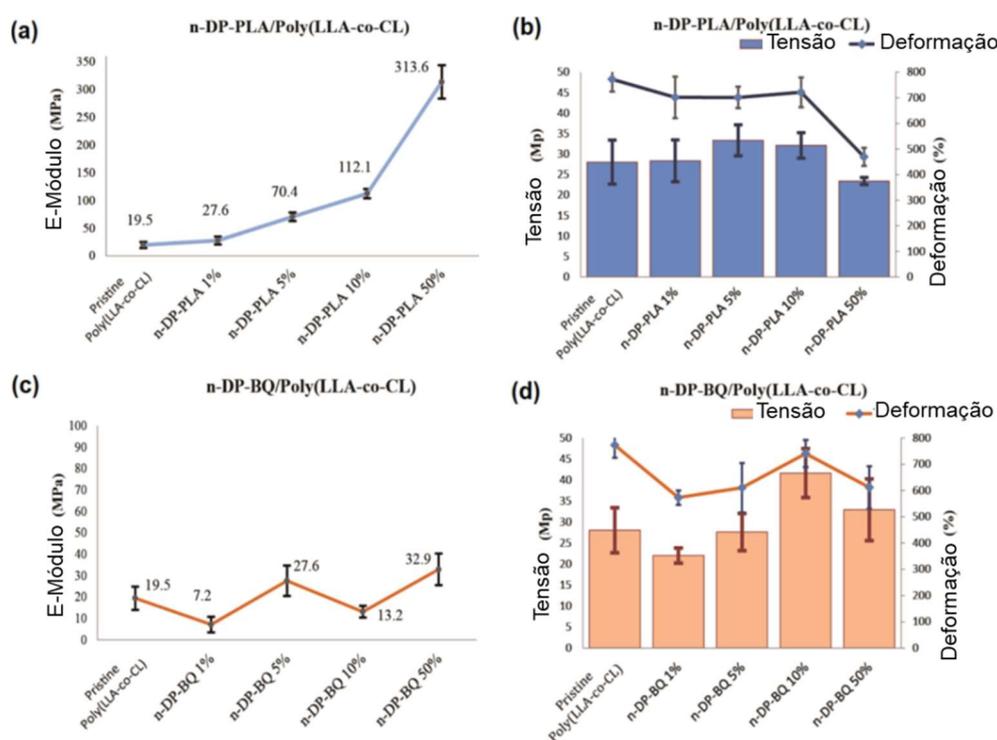


FIGURA 17 – Resultados de E, tensão e deformação no ensaio do n-DP-PLA (a, b) e n-DP-BQ (c, d). (Adaptado de SUN et al., 2014).

Na Figura 18 são mostrados resultados de análises por MEV para as partículas n-DP-PLA. Nota-se:

**c, e, g:** Presença partículas separadas, com distribuição uniforme e sem agregação provavelmente responsáveis pelo aumento significativo de E.

**b, d, f, h, j:** Superfícies das fraturas com aumento das concentrações das partículas.

**borda j:** Aglomeração de partículas observado com 50% em peso n-DP-PLA explicando resultados insatisfatórios de tensão e sugerindo utilização de teores inferiores à 50%.

**d, f, h, j:** Aumento de estrutura fibrosa devido aumento de n-DP-PLA.

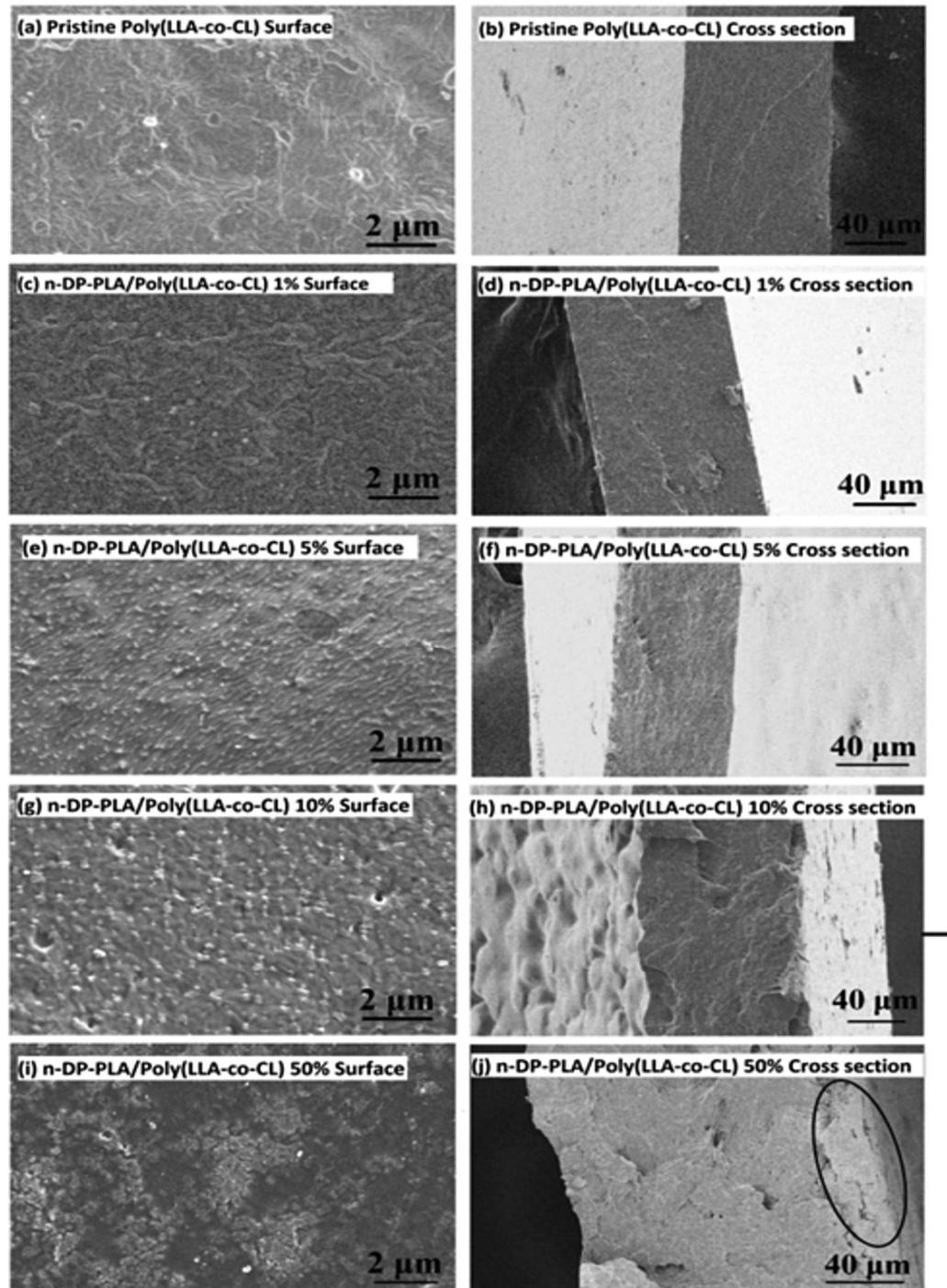


FIGURA 18 – Imagens MEV 0-50% de n-DP-PLA / poli (LLA-co-CL). Superfície das amostras (a, c, e, g, i). Fratura transversal (b, d, f, h, j) (SUN et al., 2014).

Na figura 19 são mostrados resultados de análises por MEV para as partículas n-DP-BQ possibilitando fazer as seguintes ponderações.

**a, b, c, d:** Superfícies das fraturas com aumento das concentrações das partículas, mas não foi observada estrutura fibrosa.

**e, f:** Aglomeração de partículas observado com 50% em peso n-DP-BQ.

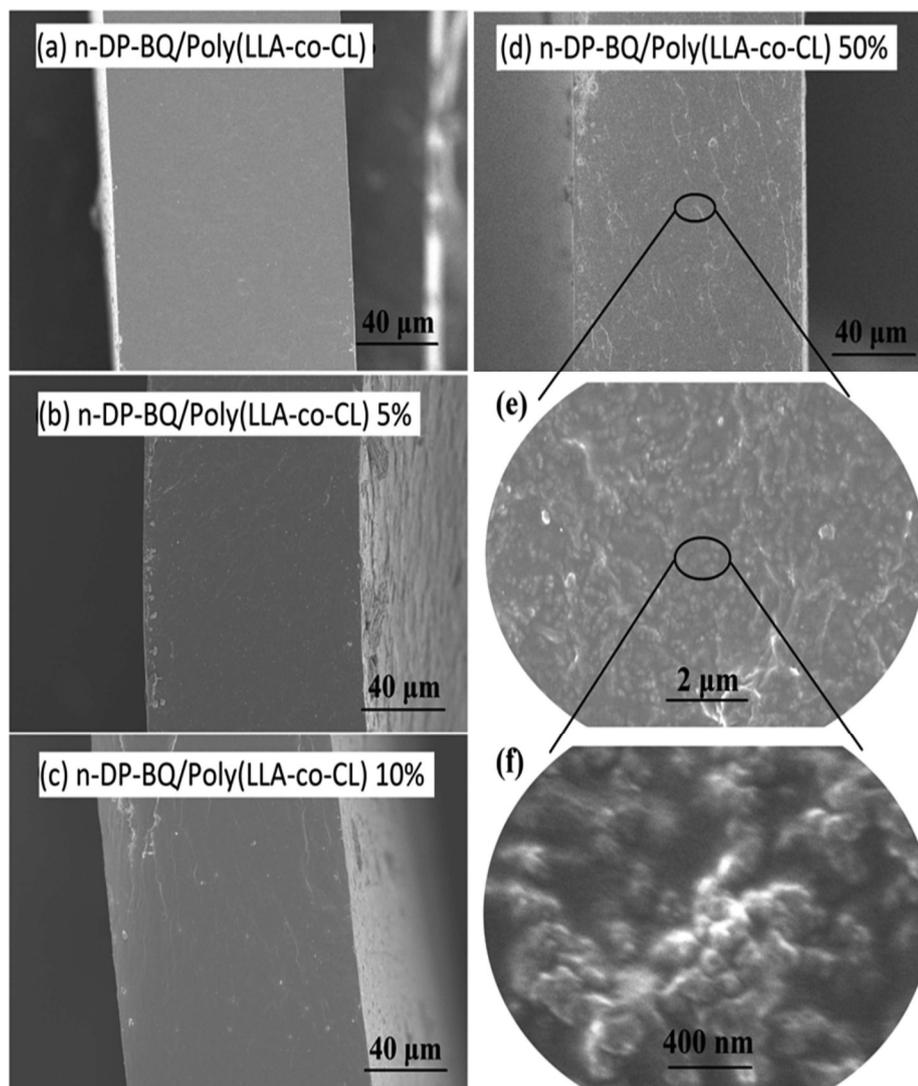


FIGURA 19 – Imagens MEV 0-50% de n-DP-BQ / poli (LLA-co-CL) da fratura transversal (a, b, c, d, f) e zoom da fratura transversal para amostra com 50% de n-DP-BQ (SUN et al., 2014).

Os resultados mostraram que o nanodiamante recoberto com a superfície PLA evitou a agregação da carga, melhorou a distribuição na matriz, aumentou o módulo de elasticidade, enquanto aqueles que foram recobertos com BQ apresentaram resultados opostos. Isso foi devido à similaridade estrutural do recobrimento de PLA com o polímero da matriz, causando uma forte interação entre ambos (SUN et al., 2014).

## 2.4 MODELOS PARA PREVISÃO DO MÓDULO DE ELASTICIDADE PARA NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS

Quando mistura-se dois componentes, de natureza química diversa, de qualquer dimensão ou forma, é necessário a existência de áreas de contato entre eles. Quanto maior for essa área, tanto maior será a possibilidade de ocorrer uma interação de natureza física, química ou físico-química (MANO, 1991). As propriedades mecânicas de um compósito “particulado-polímero” dependem basicamente do tamanho, quantidade da partícula e da interação/adesão na interface matriz-carga (FU et al., 2008), sendo a última extremamente importante quando se utiliza carga nanométrica.

O uso de modelos para prever as propriedades mecânicas pode ajudar a projetar um material compósito, pois é possível selecionar os materiais e as quantidades que correspondem aos requisitos e propriedades para uma aplicação específica (NEITZEL, 2012), além de diminuir a quantidade de amostras necessárias para realização de ensaios mecânicos.

O módulo de elasticidade representa a rigidez do material a deformação elástica. Matematicamente é determinado pela divisão da variação da tensão pela variação da deformação na fase de deformação elástica do material (GARCIA et al., 2000). Como o módulo de elasticidade das partículas são geralmente muito maiores que da matriz polimérica (Figura 20), o valor final do compósito aumenta com adição da carga desde que tenha uma distribuição uniforme na matriz, conforme assumido na equação 1 (FU et al., 2008).

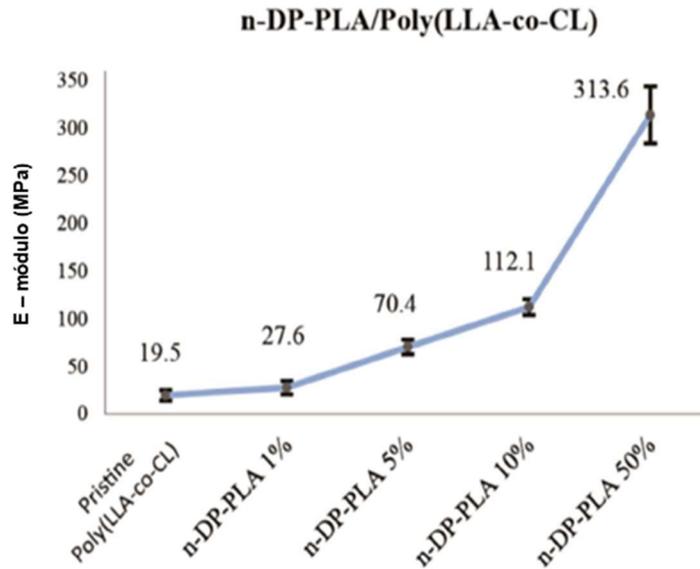


Figura 20 – Módulo de elasticidade de um compósito formado com copolímero Poli (LLA-co-CL) e nanopartículas de diamante (Adaptado de SUN et al., 2014).

Várias equações empíricas e semi-empíricas foram propostas para prever o módulo de elasticidade. Com base no pressuposto da partícula ser rígida, Einstein em 1905 propôs a seguinte equação (Fu et al., 2008):

$$\frac{E_c}{E_m} = 1 + 2,5 V_p \quad (1)$$

Onde  $E_c$  e  $E_m$  são os módulos de elasticidade do compósito e da matriz respectivamente e  $V_p$  é a fração volumétrica da partícula. No entanto, essa equação é válida somente para baixas concentrações de partículas, onde assume-se uma interação perfeita matriz-carga, uma distribuição homogênea da carga na matriz e não leva em consideração o tamanho da partícula, mostrando uma relação linear entre  $E_c$  e  $V_p$ . Por esse motivo, diversos estudos propõem modificações nas equações de Einstein (FU et al., 2008).

Alguns autores utilizaram o modelo proposto por “Lewis-Nielson”, que foi adaptado por McGee; McCullough, 1991. Como no caso de Neitzel, 2012 para prever o módulo de elasticidade de compósitos epóxi-nanodiamante e comparar com os resultados obtidos experimentalmente e Johnsen et al., 2007 que utilizaram para prever o módulo de nanocompósitos epóxi-nanosilica. O módulo de elasticidade é dado por (JOHNSEN et al., 2007; NEITZEL, 2012):

$$E_c = \frac{1+(Ke-1)\beta Vf}{1-\beta\mu Vf} E_m \quad (2)$$

Onde  $E_c$  e  $E_m$  são respectivamente os módulos do compósito e do polímero,  $V_f$  é fração volumétrica da carga,  $\beta$  representa as diferenças entre o módulo do polímero e da carga,  $\mu$  depende da forma e quantidade da carga e  $Ke$  representa a força da interface. Para matrizes poliméricas com coeficiente de Poisson  $\leq 0,5$ ,  $Ke = 0,867$  e  $Ke = 2,167$  para interfaces fracas e fortes respectivamente.  $\beta$  e  $\mu$  podem ser calculados pelas seguintes equações. Onde  $V_{max} = 0,74$  para cargas esféricas (NEITZEL, 2012).

$$\beta = \frac{\left(\frac{E_f}{E_m} - 1\right)}{\left(\frac{E_f}{E_m} + (Ke - 1)\right)} \quad (3)$$

$$\mu = 1 + \frac{(1-V_f)}{V_{max}} [V_{max} V_f + (1 - V_{max})(1 - V_f)] \quad (4)$$

A figura 21 mostra os resultados obtidos por Neitzel, 2012 comparados com o modelo considerando uma interface forte entre matriz e carga ( $Ke=2,167$ ).

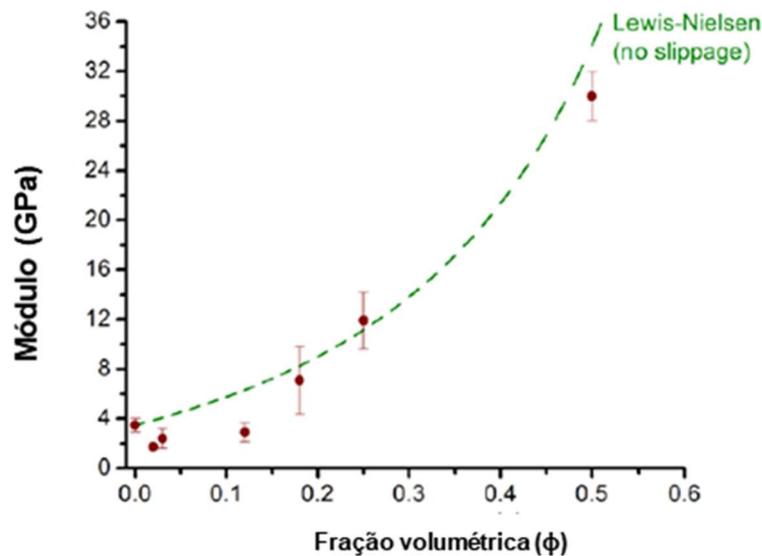


Figura 21 – Comparação entre o módulo de elasticidade experimental (ensaio de nanoindentação) e o calculado através do modelo proposto por Lewis-Nielsen (Adaptado NEITZEL, 2012).

Neste trabalho, também foi utilizado o modelo de Lewis-Nielsen para comparar o módulo de elasticidade dos nanocompósitos obtido experimentalmente com o valor calculado através do modelo.

## CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados com suas respectivas especificações são mostrados na tabela 2.

Tabela 2 – Materiais utilizados nos experimentos.

Material	P(HB-HV)	Nanopartículas de diamante sintético MOLTO®	Nanopartículas de diamante sintético HYDROGEN P®	Álcool Etilico (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O)	Clorofórmio (CHCl <sub>3</sub> )
Fornecedor	PHB Industrial	Carbodeon Ltd Oy	Carbodeon Ltd Oy	VETEC	VETEC
Mw-Mw/Mn	52.575 g/mol - 2,36	--	--	--	--
Peso Molecular	--	--	--	46,07 g/mol	119,38 g/mol
Temp. de fusão	163 – 177°C	--	--	--	--
Densidade	1,25 g/cm <sup>3</sup> (GANDINI; BELGACEM, 2008)	3,1-3,2 g/cm <sup>3</sup>	3,1-3,2 g/cm <sup>3</sup>	--	--
Tamanho do cristal	--	4,2 ± 0,5 nm	4,2 ± 0,5 nm	--	--
Pureza	--	97%	97%	95 %	99,8 %

## 3.2 MÉTODOS

A figura 22 mostra o fluxograma descrevendo a sequência e atividades desenvolvidas para realização deste trabalho.

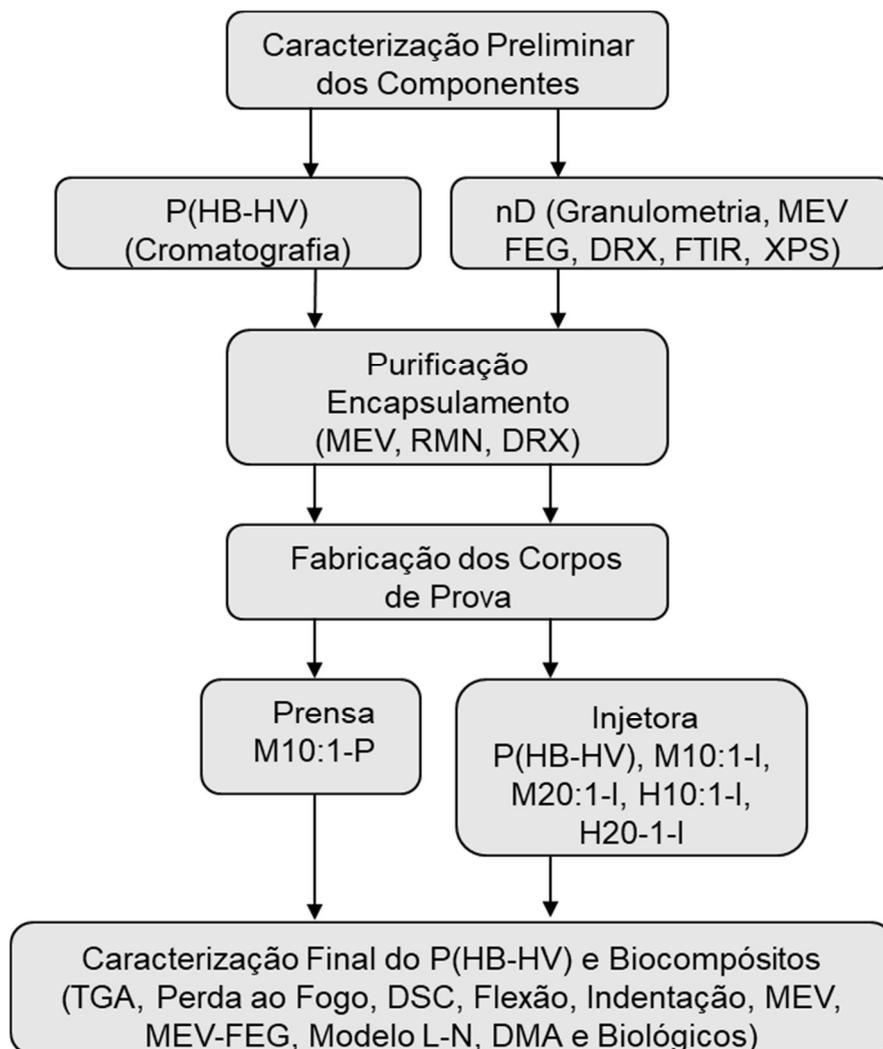


Figura 22 – Fluxograma da metodologia utilizada no presente trabalho.

### 3.2.1 Caracterização preliminar do P(HB-HV)

#### 3.2.1.1 Composição

A composição de P(HB-HV) foi determinada por cromatografia gasosa, a partir dos produtos da propanolises, no laboratório de Bioprodutos da USP, conforme metodologia descrita anteriormente (MENDONÇA et al., 2017).

### 3.2.1.2 Determinação da massa molar

A determinação da massa molar ( $M_w$ ) e a polidispersividade ( $M_w/M_n$ ) foi realizada por um Cromatógrafo Shimadzu, modelo LC-20AD do laboratório da IMA/UFRJ com detector de índice de refração diferencial. Foram utilizadas duas colunas estireno-divinilbenzeno (1 Ultramicrostyrigel Waters linear e 1 Shimadzu GPC 803), o solvente foi o THF, temperatura da coluna 30°C e do detector de 40°C, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção 20  $\mu$ L e concentração de 0,2% (p/v).

### 3.2.2 Caracterização preliminar dos nanodiamantes

#### 3.2.2.1 Dispersão granulométrica dos aglomerados

O tamanho dos aglomerados de nanodiamante foi determinada utilizando dois equipamentos distintos da SYMPATEC, o primeiro, HELOS, utiliza pressão de ar para separar as partículas e tem capacidade de medição de 1 nm. As pressões utilizadas foram de 1 e 3 bar de acordo com a capacidade do compressor que estava ligado ao equipamento. O ensaio foi realizado no laboratório da dpUnion em São Paulo. Devido à restrição de pressão por parte do compressor, foi feita uma segunda análise a fim de observar melhor o tamanho dos aglomerados utilizando o NANOPHOX, que utiliza a aquisição de intensidades de luzes dispersas das partículas sob movimento térmico (princípio da dispersão de luz dinâmica), com capacidade de medição de 0,5 nm. A tecnologia utilizada é a espectroscopia de correlação cruzada de fótons (PCCS), que permite a análise de tamanho de nanopartículas com alta resolução em suspensões e emulsões. O ensaio foi realizado no laboratório do SYMPATEC nos EUA.

#### 3.2.2.2 Caracterização morfológica

As nanopartículas de diamante (Molto® e Hydrogen P®) foram caracterizadas por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo MEV-FEG, de forma a obter-se micrografias com maior aumento e visualizar suas dimensões e geometrias. Para isso foi utilizado um MEV-FEG QUANTA 250 da FEI localizado no Instituto Militar de Engenharia (IME).

### 3.2.2.3 Avaliação da estrutura, pureza e tamanho do cristalito

A estrutura e pureza dos nanodiamantes foram avaliados através do difratograma de raios-X (DRX). O tamanho do cristalito foi calculado utilizando a equação de Scherrer (equação 5).

$$d_{hkl} = \frac{K\lambda}{FWHM \times \cos \theta} \quad (5)$$

Onde  $d_{hkl}$  é o tamanho do cristalito para o plano (hkl), K constante que depende da forma do esferulitos (esfera=0,94),  $\lambda$  comprimento de onda da radiação utilizada na análise, FWHM largura do pico à meia altura,  $\theta$  o ângulo do pico difratado mais intenso.

O equipamento utilizado é da marca Rigaku Ultima IV, equipado com radiação de Cu-K $\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ), com passo de  $0,02^\circ$ , tempo de contagem de 4 s por passo, variação  $2\theta$  de  $10$  a  $100^\circ$  e potência de 40 kV por 30 mA, localizado no anexo do CCT/UENF.

### 3.2.2.4 Composição e grupos funcionais da superfície

#### **3.2.2.4.1 Espectrometria de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR)**

A análise foi realizada no laboratório de química da UENF em um equipamento Modelo da Shimadzu modelo IRaffinity-1 pelo método de pastilhas de Brometo de potássio. Inicialmente, o equipamento foi calibrado com uma pastilha de KBr (secado previamente a  $100^\circ\text{C}$  por 2 h), no modo transmitância, faixa de número de onda de  $400$  a  $4000 \text{ cm}^{-1}$  com 40 scans. As pastilhas das amostras foram preparadas misturando uma pequena quantidade da amostra (cerca de 5 mg) com cerca de 20 mg de Brometo de potássio espectroscópico. A mistura foi, então, homogeneizada com auxílio de almofariz e pistilo (feitos de ágata) e prensadas em prensa mecânica manual.

As pastilhas prontas foram colocadas nos porta amostras e analisadas uma de cada vez no espectrômetro. O software IR Solution® foi utilizado para registrar e tratar os espectros obtidos.

Os espectros característicos foram principalmente avaliados na região infravermelho de ligações C=O ( $1740\text{-}1757\text{cm}^{-1}$ ), C-H ( $2853\text{-}2962\text{cm}^{-1}$ ), O-H ( $3280\text{-}3675\text{cm}^{-1}$  *stretch* e  $1640\text{-}1660\text{cm}^{-1}$  *bend*) (OSSWALD et al., 2006).

#### **3.2.2.4.2 Espectroscopia de fótons elétrons excitados por raio-X (XPS)**

A análise de XPS teve como objetivo analisar as ligações químicas na superfície dos nanodiamantes e correlacionar a características superficiais com as propriedades dos biocompósitos. Foi utilizado o equipamento (Figura 23) composto de uma câmara de análise de superfícies com um canhão de raios-X com possibilidade de produzir feixes de Mg ou Al não monocromatizado da VG Thermo e o analisador de elétrons hemisférico modelo Alpha 110 da VG Thermo, localizado na PUC.

Para realização das análises, as amostras foram coladas em fita dupla face de cobre e o feixe utilizado foi de Al (energia de  $1486,6\text{ eV}$ ) e para a detecção foi empregada no survey a energia de passagem de  $50\text{ eV}$  e para os espectros específicos de cada região a energia de  $20\text{ eV}$ .

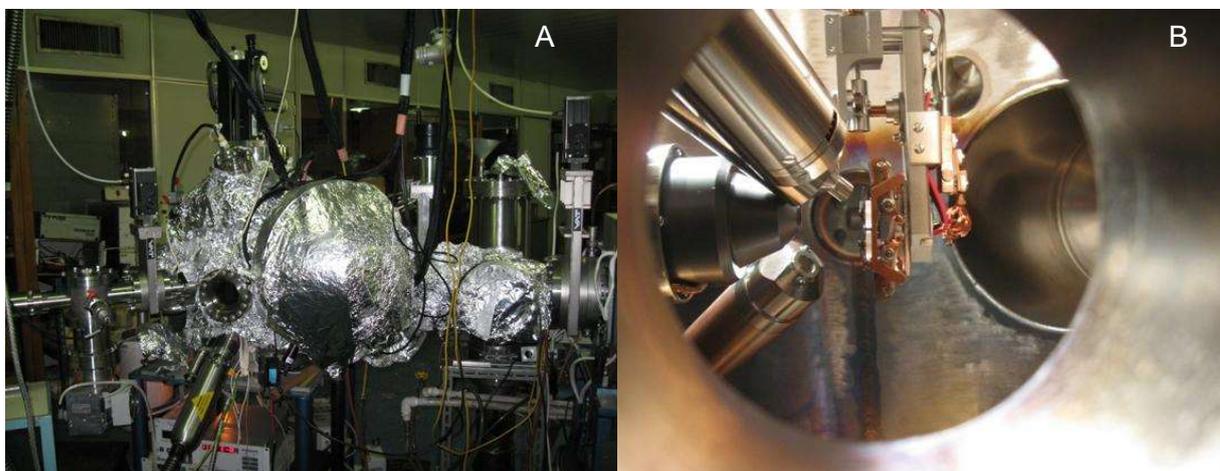


Figura 23 – Equipamento utilizado para análise de XPS (A), e entrada do canhão de raio-X (B).

### 3.2.3 Metodologia de preparação dos nanocompósitos

#### 3.2.3.1 Purificação do P(HB-HV)

A purificação foi realizada a partir da precipitação do P(HB-HV) em solução. O clorofórmio foi utilizado como solvente em uma proporção de 160 mL para cada 10 g de polímero (SIQUEIRA, 2009; BARROS Jr., 2014; NETO, 2016; SIQUEIRA, 2017). A mistura foi colocada em balão volumétrico em refluxo até completa dissolução do polímero e posteriormente precipitado em álcool etílico resfriado em freezer alcançando um temperatura de aproximadamente 0°C. Após a precipitação, a solução foi deixada em freezer por 24 h e depois centrifugada para separação líquido/sólido em centrífuga da marca Macro EV:025-M (Figura 24) por 3 min. O material sólido foi colocado em estufa a 60°C até completa secagem do polímero (Figura 25).

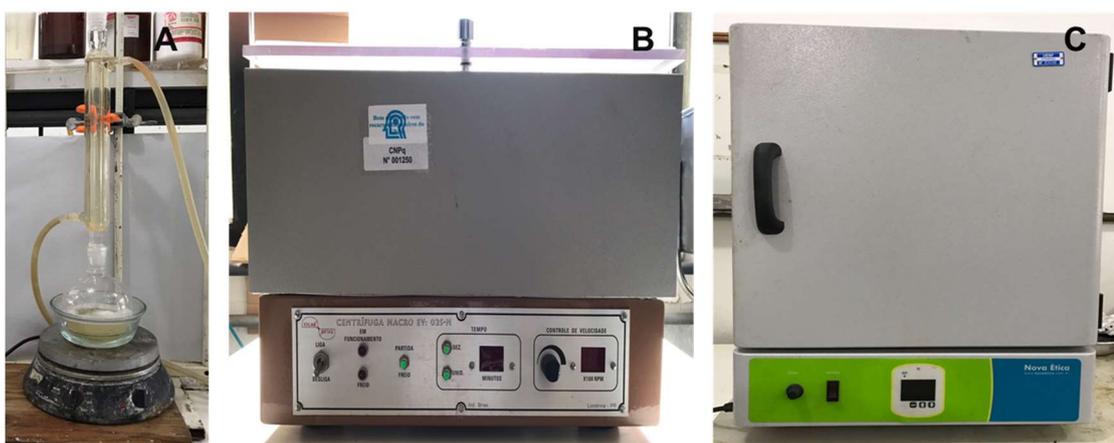


Figura 24 – Processo de purificação: sistema de refluxo (A), centrífuga (B) e estufa (C).



Figura 25 – Polímero antes (A) e após (B) o processo de purificação.

### 3.2.3.2 Encapsulamento das partículas de nanodiamante para formação do biocompósito P(HB-HV)/nD

Os nanodiamantes foram encapsulados no laboratório de polímeros do SEPOL/LAMAV/UENF. Antes de realizar o encapsulamento, o P(HB-HV) foi dissolvido em clorofórmio e posteriormente o nanodiamante foi adicionado. A mistura (P(HB-HV), nD e clorofórmio) foi colocada em refluxo por 4 h para melhorar a dispersão da carga na solução. A metodologia de encapsulamento encontra-se em processo de reivindicação de patente.

Foram preparadas duas composições com cada nanodiamante (MOLTO® e HYDROGEN P®). O material encapsulado produzido foi chamado de M10:1, M20:1, H10:1 e H20:1. A letra significa o tipo de nanodiamante, o primeiro decimal significa a proporção de polímero e o segundo a proporção de carga na mistura.

### 3.2.3.3 Confeccção dos corpos de prova

As amostras para realização dos ensaios termomecânicos foram confeccionadas no laboratório SEPOL/LAMAV/UENF de duas formas distintas para avaliação da influência do método de preparação (Injetados x Prensados) e também avaliação da influência da natureza da superfície das cargas e quantidade de cargas nas propriedades (Injetados).

- Em injetora

Foi utilizada uma mini injetora da marca Ray-Ran, modelo RR/TSMP (Figura 26 (D)) a uma temperatura de 174°C no barril e 100°C no molde. O material foi mantido no barril por 15 min para completa homogeneização da temperatura antes da injeção realizada a uma pressão de 6 bar.

Foram feitas amostras do polímero puro e dos biocompósitos produzidos com ambos os nanodiamantes (Molto® e Hydrogen P®) nas dimensões de 60x13x3 mm. As amostras foram nomeadas da seguinte maneira: (P(HB-HV), M10:1-I, M20:1-I, H10:1-I e H20:1-I), sendo a primeira do polímero puro e as demais dos biocompósitos, onde a primeira letra representa o tipo de nanodiamante, o primeiro decimal a fração de polímero, o segundo decimal a fração de carga e a última letra o método de preparação das amostras.

- Em prensa utilizando um molde fabricado em aço inoxidável

Os corpos de prova foram prensados em molde de aço inoxidável no equipamento da marca Marcone Ero Electronic, com uso de aquecimento uniforme (forma anelar) da marca Marcone na lateral do molde a temperatura de 105°C e força de duas toneladas por 10 minutos formando corpos de prova nas dimensões de 35x10x3 mm (Figura 26 (A, B e C)). Foram feitas amostras utilizando a formulação do biocompósito polímero/nanodiamante Molto® com fração 10:1, que foi chamada de M10:1-P.

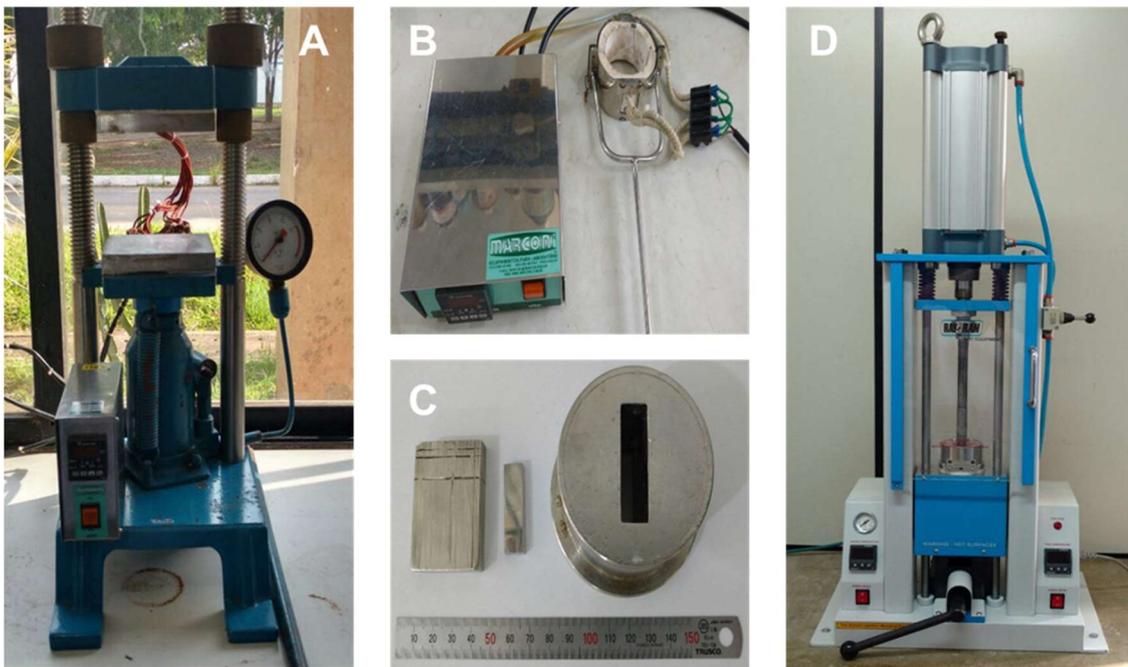


Figura 26 – Prensa (A), aquecimento lateral (B), molde (C) e injetora (D).

### 3.2.4 Caracterização dos nanocompósitos

#### 3.2.4.1 Análises realizadas nas microcápsulas e nos corpos de prova

##### 3.2.4.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

No MEV foram analisados a morfologia do material encapsulado e da área de fratura dos corpos de prova. Foram utilizados diferentes equipamentos conforme disponibilidade: marca Shimadzu, modelo SSX-550, disponível no CCT/LAMAV/UENF; marca Zeiss, modelo EVO MA10, disponível no Ifes *Campus* Vitória; e marca JEOL, modelo JSM-7100F disponível na ArcelorMittal Tubarão.

As amostras foram colocadas em porta amostra e revestidas por uma camada fina de ouro, evitando assim que as amostras sofressem descargas durante a análise.

#### 3.2.4.2 Análises realizadas nas microcápsulas

##### **3.2.4.2.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)**

O objetivo da análise foi determinar a influência das nanocargas no tempo de relaxação das moléculas do P(HB-HV). Com isso, foi possível avaliar o comportamento da interface polímero/carga, já que interações fortes entre eles tendem a reduzir a mobilidade macromolecular na vizinhança da superfície do reforço em comparação com o restante da matriz (KUBÁT et al., 1990).

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Soluções em Relaxometria do IMA/UERJ. O equipamento utilizado foi MARAN Ultra 0,54 T (23,4 MHz para o  $^1\text{H}$ ) da Oxford Instruments com diâmetro de sonda de 18 mm. As condições experimentais foram temperatura de 30°C, sequência de pulso de inversão-recuperação (p180 - t - p90 - acq), 7,5 us de duração do pulso de 90°, tempos de espera na recuperação de 0,1-10000 ms, número de valores de tempo de espera de 40, 4 escaneamentos, 1s de reciclo e 4% de ganho de receptor.

##### **3.2.4.2.2 Difração de raio-X (DRX)**

O percentual de cristalinidade do material encapsulado (M10:1, M20:1, H10:1 e H20:1) foi comparado com o polímero puro P(HB-HV).

O equipamento utilizado foi da marca Rigaku Ultima IV, equipado com radiação de Cu-K $\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ), com passo de 0,02°, tempo de contagem de 4s por passo, variação de  $2\theta$  de 10 a 70° e potência de 40 kV por 30 mA, localizado no anexo do CCT/UENF.

### 3.2.4.3 Análises realizadas nos corpos de prova

#### **3.2.4.3.1 Avaliação das propriedades térmicas**

##### *3.2.4.3.1.1 Análise termogravimétrica (TGA)*

A análise termogravimétrica visou acompanhar a variação da massa da amostra em função da temperatura e teve como objetivo avaliar o efeito da adição de nanodiamante na estabilidade térmica da matriz polimérica, assim como a quantidade de nanocarga efetiva nos corpos de prova. Foi utilizado o equipamento TGA Q5000 da TA Instruments, localizado na Unidade de Caracterização Térmica e Superficial (UCTS/SEPOL/UENF) com temperatura entre 25 e 900°C e taxa de aquecimento de 10°C/min e fluxo de ar de 25 mL/min (Figura 27).



Figura 27 – Equipamento para análise de TGA.

##### *3.2.4.3.1.2 Perda ao fogo*

A análise de perda ao fogo teve como objetivo avaliar a quantidade de nanocarga nos biocompósitos para complementar as informações obtidas na análise de TGA, uma vez que a quantidade de material utilizado para esta análise será maior

e mais representativa do volume como um todo do corpo de prova. Cerca de 1 g dos biocompósitos provenientes tanto do processo de encapsulamento como dos corpos de prova, juntamente com a proporção relativa teórica de P(HB-HV) e nanodiamante foram aquecidos a 430°C e mantidos nessa temperatura por 2 h no forno da marca EDG, modelo EDG3P-S (Figura 28). O material foi pesado antes e depois do processo e então comparado os valores para obtenção do teor de nanodiamante.

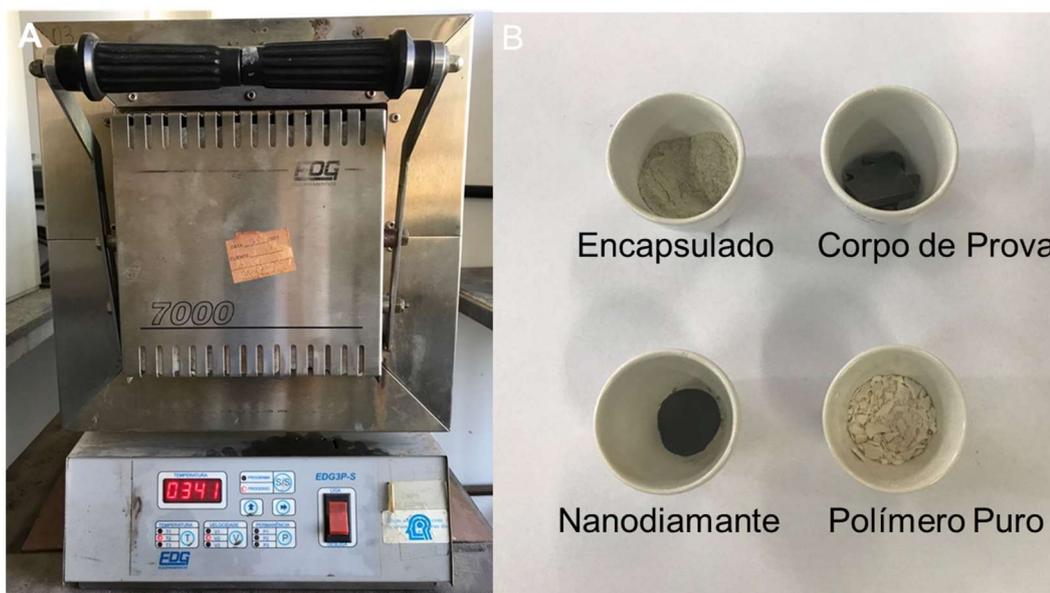


Figura 28 – Forno (A) e amostras para queima (B).

#### 3.2.4.3.1.3 Análise térmica por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A avaliação do comportamento térmico do P(HB-HV) e dos nanocompósitos foram realizados pelo uso da técnica de DSC. Através dessas análises SADAT-SHOJAI et al., 2013, correlacionaram a influência das partículas na nucleação e crescimento dos cristais poliméricos.

Para realização da análise, foram retirados pequenos pedaços dos corpos de prova e colocados em um cadinho de alumínio selado com orifício. O equipamento utilizado foi o DSC 214 Polyma da Netzsch, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min e um fluxo de nitrogênio de 20 mL/min. O processo foi realizado em três seguimentos distintos: 1º Aquecimento, resfriamento e 2º aquecimento com variação de temperatura de -40 a 220°C. Através do DSC foram analisadas as possíveis correlações entre as temperaturas, entalpias de cristalização e fusão ( $T_c$ ,  $\Delta H_c$ ,  $T_f$  e  $\Delta H_f$ ) e cristalinidade com a composição, tipo de nanodiamante e morfologia dos

nanocompósitos. Com a entalpia de fusão foi calculada a cristalinidade do material através da equação 6:

$$X_c(\%) = \frac{\Delta H_f}{f\Delta H_f^0} \quad (6)$$

Onde  $X_c$  (%) é a fração cristalina,  $\Delta H_f$  a entalpia de fusão encontrada para a amostra,  $\Delta H_f^0$  a entalpia de fusão do polímero 100% cristalino, que será considerado 146 J/g (BARHAM et al., 1984) e  $f$  a fração de P(HB-HV) no compósito.

### **3.2.4.3.2 Avaliação das propriedades mecânicas**

#### **3.2.4.3.2.1 Ensaio de flexão**

A avaliação do desempenho mecânico (flexão no sistema de três pontos) das amostras foi realizada na máquina universal de ensaios Instron, modelo 5582s (Figura 29), localizada no SEPOL/LAMAV/UENF. O módulo de flexão/elasticidade ( $E$ ), a tensão máxima ( $\sigma_m$ ) e deformação máxima ( $\varepsilon_m$ ) de flexão foram calculados conforme as equações 7, 8 e 9:

$$E = \frac{L^3 m}{4bd^3} \quad (7)$$

$$\sigma_m = \frac{3PL}{2bd^2} \quad (8)$$

$$\varepsilon_m = \frac{6Dd}{L^2} \quad (9)$$

Onde:

b: largura do corpo de prova

d: espessura do corpo de prova

L: distância entre os apoios

D: extensão máxima

P: carga aplicada no ponto máximo da curva

m: inclinação da parcela inicial da linha reta da curva de carga por extensão (Nxmm)

Para determinação do valor de “m” foi utilizado o programa Microsoft Excel na construção da curva carga versus extensão e calculado o valor do coeficiente angular.



Figura 29 – Máquina Universal de Ensaio com a amostra durante o ensaio.

As condições de ensaios foram baseadas na norma ASTM D790 - 17. Foram ensaiados quatro corpos de prova de cada formulação a uma velocidade de 0,5 mm/min. Os ensaios foram realizados em duas baterias com objetivos distintos:

- A primeira visou avaliar a influência do modo de preparação dos corpos de prova (amostras M10:1-P e M10:1-I);
- A segunda avaliar a influência da quantidade e da natureza da superfície das cargas nas propriedades (amostras P(HB-HV), M10:1-I, M20:1-I, H10:1-I e H20:1-I).

Os resultados obtidos foram comparados com o previsto através do modelo “Lewis-Nielson” (equações 2, 3 e 4), utilizado por Johnsen et al., 2007 e Neitzel, 2012. Para os cálculos foi utilizado o valor do módulo de elasticidade do P(HB-HV) obtido através desse trabalho e o módulo de elasticidade do nanodiamante obtido na literatura. Foram feitas simulações com diferentes valores de módulo de elasticidade para o nanodiamante: 560 GPa (POPOV et al., 2017), 967 GPa (ZHAO et al., 2010) e

1220 GPa (NEITZEL, 2012) e notou-se que houve pequena variação no valor de beta, somente a partir da terceira casa após a vírgula. Variações expressivas só ocorriam se o módulo da carga e matriz não possuissem ordens tão distantes como no caso do nanodiamante e P(HB-HV). Zhao et al., 2010 estudaram o efeito da adição de nanodiamante até 5% em uma matriz de PLLA. Eles utilizaram o modelo de Reuss and Voigt para prever o módulo de elasticidade. Como a quantidade de carga, a granulometria e densidade dos nanodiamantes utilizados neste trabalho são similares às utilizadas por eles, foi adotado o mesmo valor de módulo de elasticidade (967 GPa) para fins de simulação.

#### 3.2.4.3.2.2 Ensaio de indentação

A avaliação da módulo de elasticidade também foi realizada por meio de 7 pequenas indentações na superfície de um corpo de prova de cada formulação, através do ensaio de dureza, utilizando o equipamento ultra-microdurômetro, modelo DUH 201S, da Shimadzu com carga de 30 mN e indentador Vickers localizado no Ifes Campus Vitória (Figura 30).



Figura 30 – Ultra-microdurômetro com a amostra durante o ensaio.

### **3.2.4.3.3 Análise dinâmico mecânico (DMA)**

A avaliação das propriedades termomecânicas foi realizada por meio de análise dinâmico mecânica, no equipamento DMA Q800 TA instruments, localizado no Instituto de Macromoléculas (IMA) da UERJ, com parâmetros de trabalho de 1 Hz de frequência, amplitude de 10 µm, força estática de 0,1 N. A análise foi realizada a partir de -120°C até 150°C, com uma taxa de aquecimento de 3°C/min.

Foram determinados módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e módulo de amortecimento (tan Delta). E' está associado à absorção de energia e o E'' à dissipação de energia pelo material. Tan Delta, é dada pela razão entre o E'' pelo E'.

A efetividade do reforço na rigidez do material foi calculada baseada na metodologia usada por Pothan et al., 2003 em compósitos de poliéster reforçados com fibra de banana através do coeficiente C (equação 10), onde E'<sub>v</sub> é o módulo de armazenamento em uma temperatura da região vítrea e E'<sub>b</sub> módulo de armazenamento em uma temperatura na região "borrachosa" tanto para o compósito (numerador) e polímero (denominador). Quanto menor o valor, maior será a efetividade (POTHAN et al., 2003). Como o polímero usado para todas as formulações é o mesmo, logo o denominador será igual para todos. Assim, a avaliação da efetividade foi realizada usando somente o numerador.

$$C = \frac{E'_{v}/E'_{b \text{ compósito}}}{E'_{v}/E'_{b \text{ polímero}}} \quad (10)$$

### **3.2.4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (MEV-FEG)**

As superfícies de fratura foram caracterizadas por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo MEV-FEG, de forma a obter micrografias com maior aumento e visualizar a distribuição e interação da carga com matriz. Foi utilizado o equipamento MEV-FEG QUANTA 250 da FEI localizado no Instituto Militar de Engenharia (IME).

### 3.2.5 Ensaios biológicos “*in vitro*”

Os ensaios *in vitro* foram realizados para verificar se o biocompósito formulado apresenta características tóxicas ou induz alguma resposta inflamatória no meio de cultura celular onde foi adicionado; os testes foram realizados no Laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR/CBB/UENF).

#### 3.2.5.1 Cultura de macrófagos RAW 264.7 e experimentação

As células da linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7(ATCC, TIB-71) foram cultivadas em garrafa de 25 cm<sup>2</sup> com meio Dulbecco's Modified Medium F-12 (DMEM/ F12, Gibco BRL), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL) em estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, com troca de meio a cada dois dias. Quando a cultura atingiu 90% de confluência celular, os macrófagos foram usados para os experimentos.

Nos experimentos, os macrófagos foram plaqueados na concentração de 4x10<sup>5</sup> células por poço em placas de 24 poços (Costar) contendo 1 mL de meio de cultura, na presença ou não de fragmentos dos compostos. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por sete dias. O meio de cultura não foi trocado durante o período de experimentação. Nos dias 1, 2, 6 e 7 de cultivo, 50 µL de sobrenadante da cultura foi coletado de 4 diferentes poços para análise da indução de produção de NO (óxido nítrico) pelos compósitos. Alguns poços da placa foram tratados com 1 µg/mL de LPS e coletados os sobrenadantes após 24 h, estes foram usados como controle positivo da produção de NO. Os sobrenadantes coletados foram mantidos congelados a -80°C até o momento da análise.

Para avaliar a citotoxicidade dos materiais, as culturas foram observadas por microscopia óptica utilizando microscópio invertido Nikon TS100 e as imagens foram capturadas em 1 e 7 dias após o início do experimento, foram capturadas com a câmera AxioCam (Zeiss) e analisadas com o programa AxionVision (Zeiss), de forma a analisar a influência dos compósitos no crescimento celular. Para o controle e as amostras M10:1-P e M10:1 I (BARCELOS et al., 2017) foi feita também a análise da viabilidade celular através de coloração com solução de 2% de *tripan blue*, corante de células necróticas, para avaliar a citotoxicidade dos compósitos.

### 3.2.5.2 Quantificação de NO pela Reação de Griess

A quantificação de NO foi feita pela reação de Griess. O volume de 50  $\mu\text{L}$  foi misturado com 50  $\mu\text{l}$  da solução A (2,5 mL de ácido fosfórico, 0,5 g de sulfanilamida, 47,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  de milliQ) e solução B (0.05 g de N-1-naphitiletilenodiamida, 50 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  de milliQ) de Griess (vol/vol) numa placa de 96 poços e incubado por 10 minutos na estufa a 37°C. A leitura foi feita em leitor de microplacas (leitor de ELISA (Dynatech MR5000), no comprimento de onda de 570 nm. A curva padrão foi feita utilizando diluições de  $\text{NaNO}_3$  de 200  $\mu\text{M}$  a 1.56  $\mu\text{M}$ .

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DO P(HB-HV)

Foram analisadas cinco amostras e conforme observado na figura 31 o polímero possui alta pureza (> 95%) e uma média de 6,2 mol% de 3HV, caracterizando um copolímero P3(HB-co-6,2%HV) indicado no texto como P(HB-HV). Já através do ensaio de GPC (Figura 32) após purificação do copolímero foi determinada uma massa molar ponderal média ( $M_w$ ) de 52.575 g/mol e polidispersividade ( $M_w/M_n$ ) de 2,36.

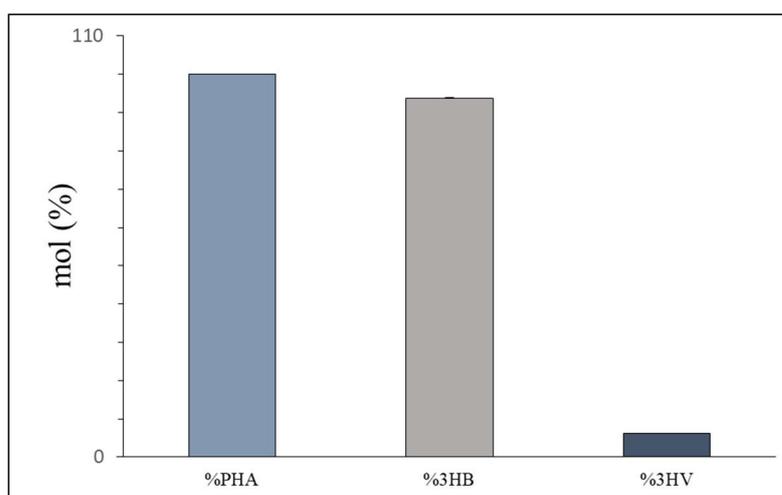


Figura 31 – Valores % de 3HB e 3HV na composição do P(HB-HV).

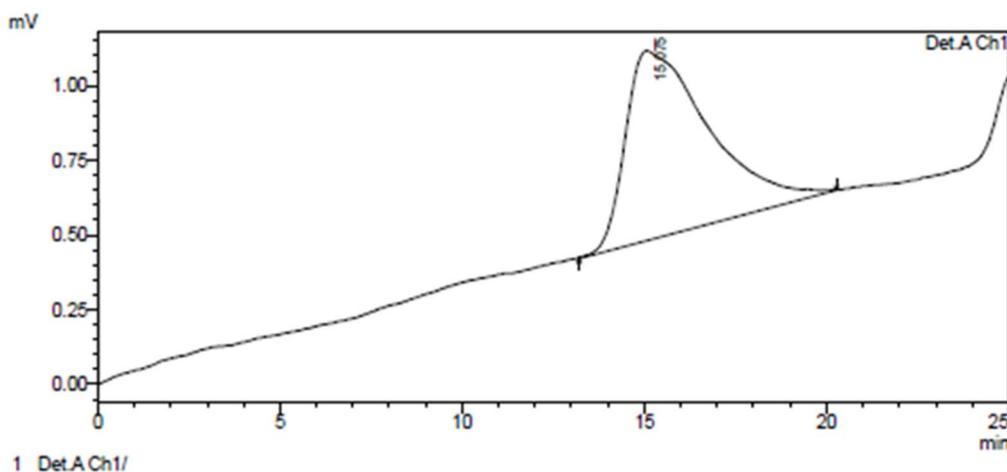


Figura 32 – Cromatografia de permeação em gel (GPC). Tempo de eluição e cálculo dos valores de  $M_w$  e  $M_w/M_n$  para o P(HB-HV).

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DO NANODIAMANTE MOLTO® E HYDROGEN P®

### 4.2.1 Morfologia e granulometria

Os resultados de granulometria foram obtidos primeiramente pelo HELOS (Figuras 33 e 34). Percebe-se que naturalmente os grãos do nanodiamante Hydrogen P® tendem a ser menos aglomerados que o Molto®. No entanto, com o aumento da pressão, a desaglomeração se mostra mais efetiva com os nanodiamantes Molto®, pois os mesmos apresentaram uma redução dos aglomerados  $X_{50}$  de 3,81 para 2,22  $\mu\text{m}$ , ou seja uma redução de 41% que foi mais efetiva em comparação com o Hydrogen P® que apresentou uma redução de  $X_{50}$  de 2,42 para 2,02  $\mu\text{m}$ , ou seja, 16%. Ainda que os nanodiamantes apresentem tamanho que correspondem à nanopartículas (tamanho do cristal de  $4,2 \pm 0,5$  nm conforme informado pelo fabricante), percebe-se que ambos encontram-se bastante aglomerados.

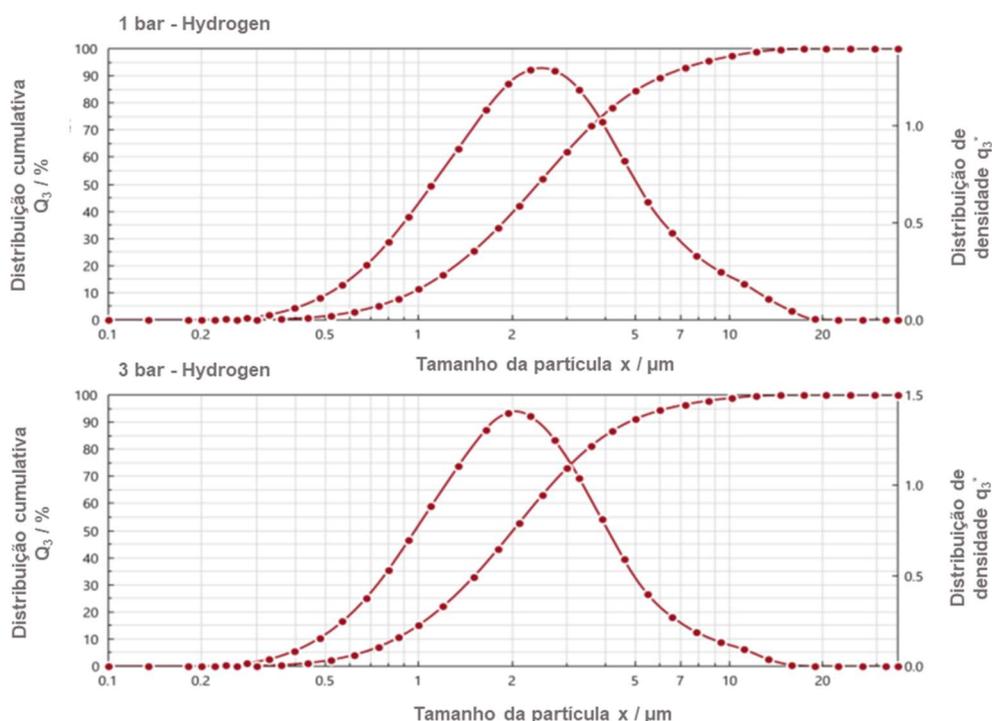


Figura 33 – Granulometria do nanodiamante Hydrogen P® com medição para pressão aplicada durante o ensaio de 1 bar e 3 bar.

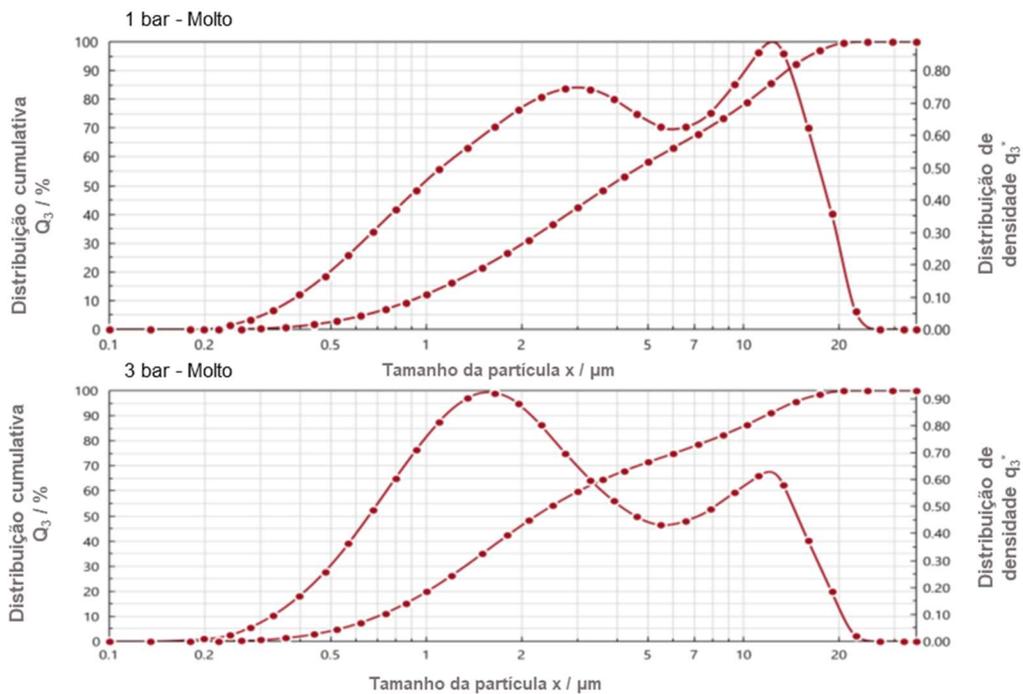


Figura 34 – Granulometria do nanodiamante Molto® com medição para pressão aplicada durante o ensaio de 1 bar e 3 bar.

O segundo método utilizado para avaliação da granulometria (NANOPHOX), mostrou os aglomerados em dimensões nanométricas para ambos os nanodiamantes, no entanto o Molto® apresentou aglomerados em dimensões menores que o Hydrogen P®, como também foi observado através das micrografias (Figura 37) e com as medições de granulometria feitas pelo HELOS. Conforme pode ser observado nas figuras 35 e 36, o diamante Molto® apresentou 90% do material analisado com aglomerados menores que 412,9 nm, já o nD Hydrogen P® apresentou 90% do material com aglomerados menores que 2031,3 nm.

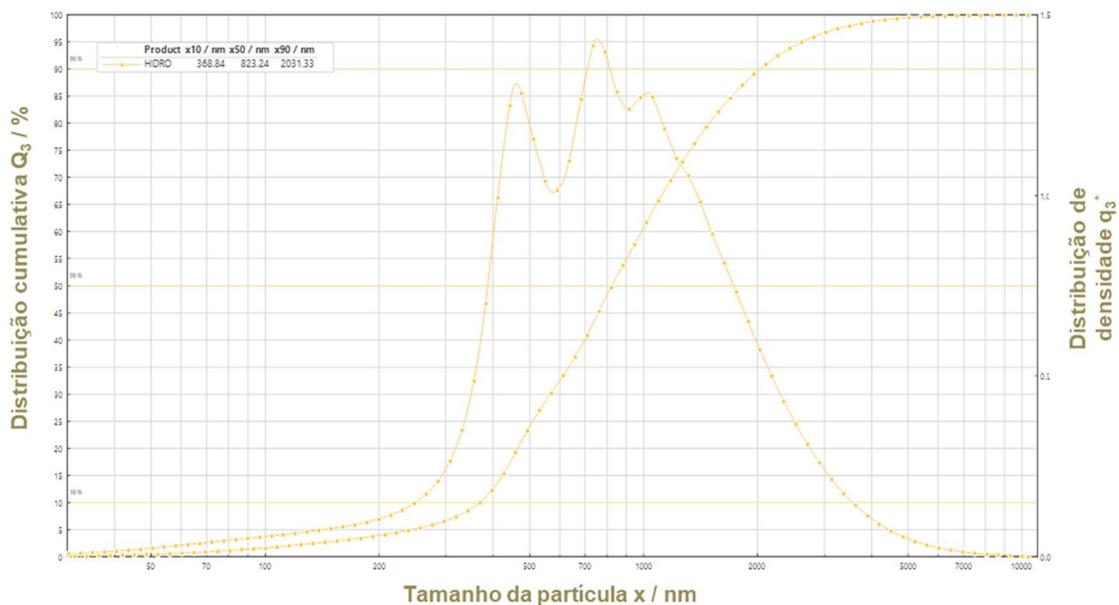


Figura 35 – Granulometria do nanodiamante Hydrogen P®.

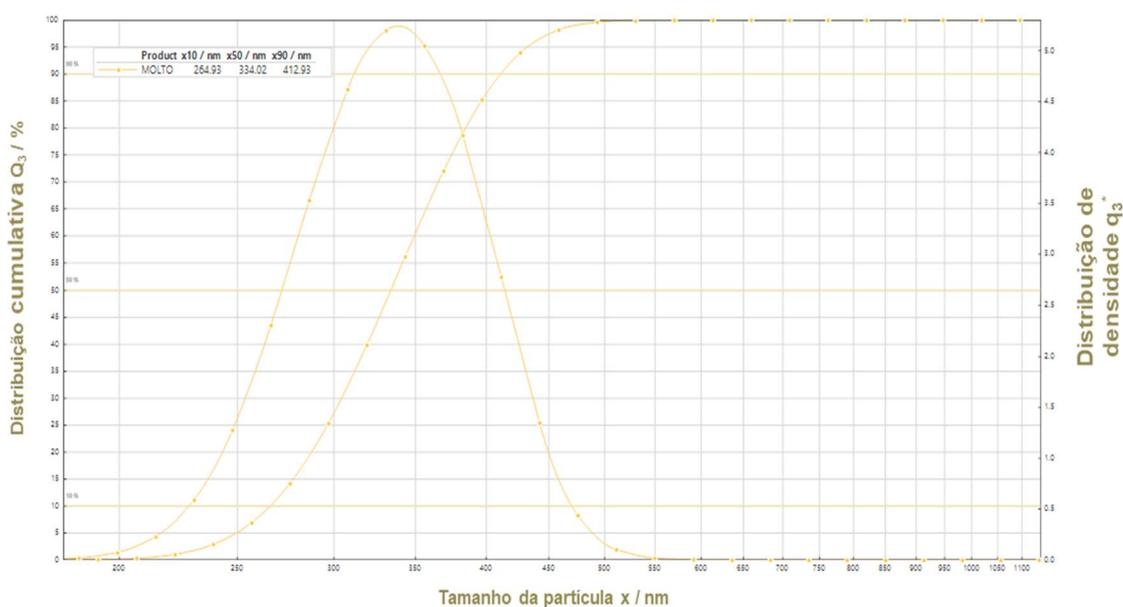


Figura 36 – Granulometria do nanodiamante Molto®.

Como os nanodiamantes tem uma alta tendência de aglomeração, devido à sua grande área de superfície/volume e muitos grupos funcionais na sua superfície (hidroxilo, carbonilo, éter, amina, amida, etc.) (KULAKOVA, 2004), isso explica o fato de ambos se apresentarem com aglomerados micrométricos (Figuras 33 e 34) e nanométricos (Figuras 35 e 36).

De acordo com o fabricante, o nD Hydrogen P® apresenta densidade de empacotamento maior que nD Molto®. Isso provavelmente pode ser causado pela

afinidade maior entre as partículas após a hidrogenação, o que pode ter contribuído para uma maior aglomeração.

Através das micrografias obtidas pelo MEV FEG (Figura 37) observa-se que ambos os nanodiamantes possuem grãos iniciais em ordem nanométrica, no entanto, estão aglomerados. O nanodiamante Hydrogen P® apresenta uma aglomeração bem evidente, formando “placas” conforme mostrado pelas setas em vermelho. Já o diamante Molto® se mostra mais disperso, mesmo com presença de um aglomerado em destaque no centro da figura 37 B e C.

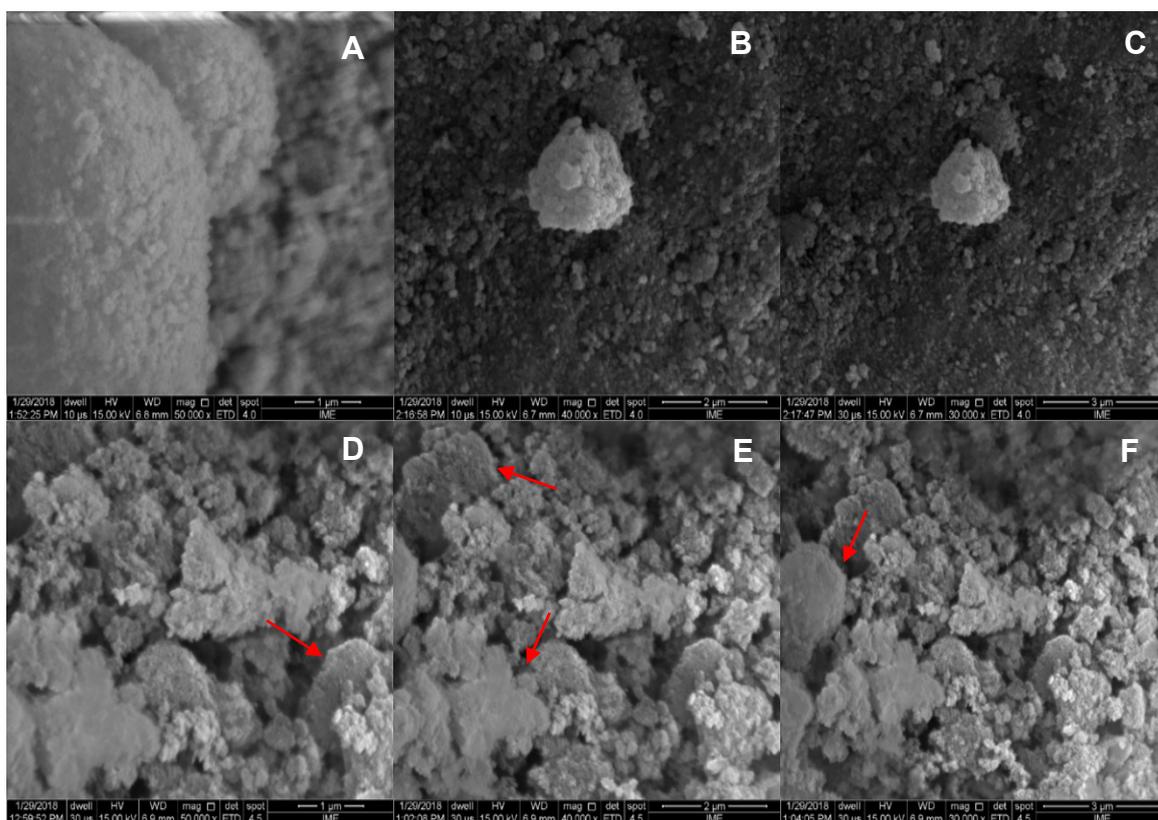


Figura 37 – Micrografia obtida através do MEV FEG com aumentos de 50000x, 40000x e 30000x para os nanodiamantes Molto® (A, B, e C) e Hydrogen P® (D, E e F).

#### 4.2.2 Avaliação da estrutura, pureza e tamanho do cristal

A pureza e tamanho dos cristais foram obtidos pelo DRX. Os difratogramas dos nDs utilizados neste estudo são mostrados na figura 38. Foram identificados três picos nas posições  $2\theta$ : 43,66, 75,06 e 91,22° para o nD Molto® e nas posições  $2\theta$ : 43,74, 75,24 e 91,52° para o nD Hydrogen P® correspondentes aos planos (111), (220) e (311), respectivamente, que de acordo com Tomita et al., 2002 e Huang et al., 2012

são picos típicos da estrutura cristalina do diamante. No entanto, especificamente para nD Hydrogen P® também é possível notar a presença de um halo amorfo largo e de intensidade mais baixa que o primeiro pico entre os ângulos  $2\theta$  de 15 e 38° referente à presença de carbono amorfo (MANOJ; KUNJOMANA, 2012; HUANG et al., 2012). Percebe-se também um pico cristalino de baixa intensidade na posição  $2\theta$  em 31,64° que pode estar associado ao plano cristalino (002), característico do grafite (BARNAKOV et al., 2015). Silva et al., 2013 também observaram um pico cristalino de baixa intensidade (002) para nanocompósitos epoxidicos com 0,1% de grafite natural. A ausência de picos relacionados à estrutura gráfitica ou outras estruturas/substâncias para o nD Molto® demonstra se tratar de um diamante de alto grau de pureza. Usando a equação de Scherrer (equação 5) foi possível obter o tamanho do cristal através da posição do pico e sua largura a meia altura (FWHM). Usando o plano (111) para esses cálculos, por ser o mais intenso, foi calculado um cristal de 3,7 e 3,8 nm para nD Molto® e Hydrogen®, respectivamente. O valor encontrado é próximo de  $4,2 \pm 0,5$  nm, que foi informado pelo fabricante.

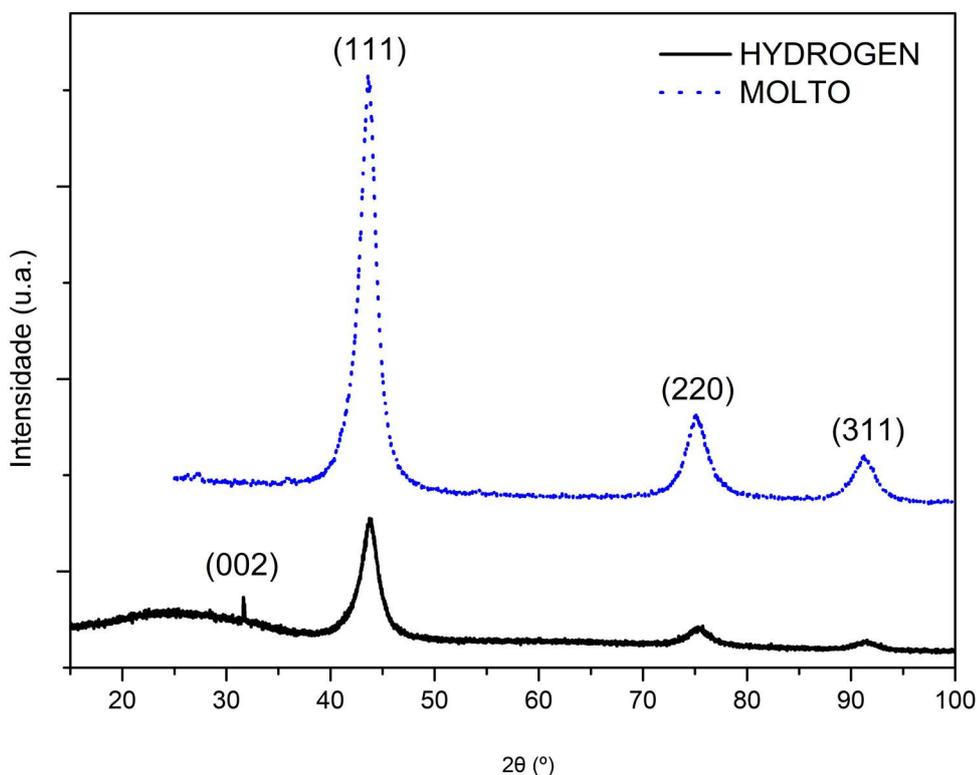


Figura 38 – Difratoograma de raio-X das partículas de nD.

### 4.2.3 Composição e grupos funcionais da superfície

Os resultados obtidos pelos espectros gerados com a análise de FTIR, são mostrados nas figuras 39 e 40.

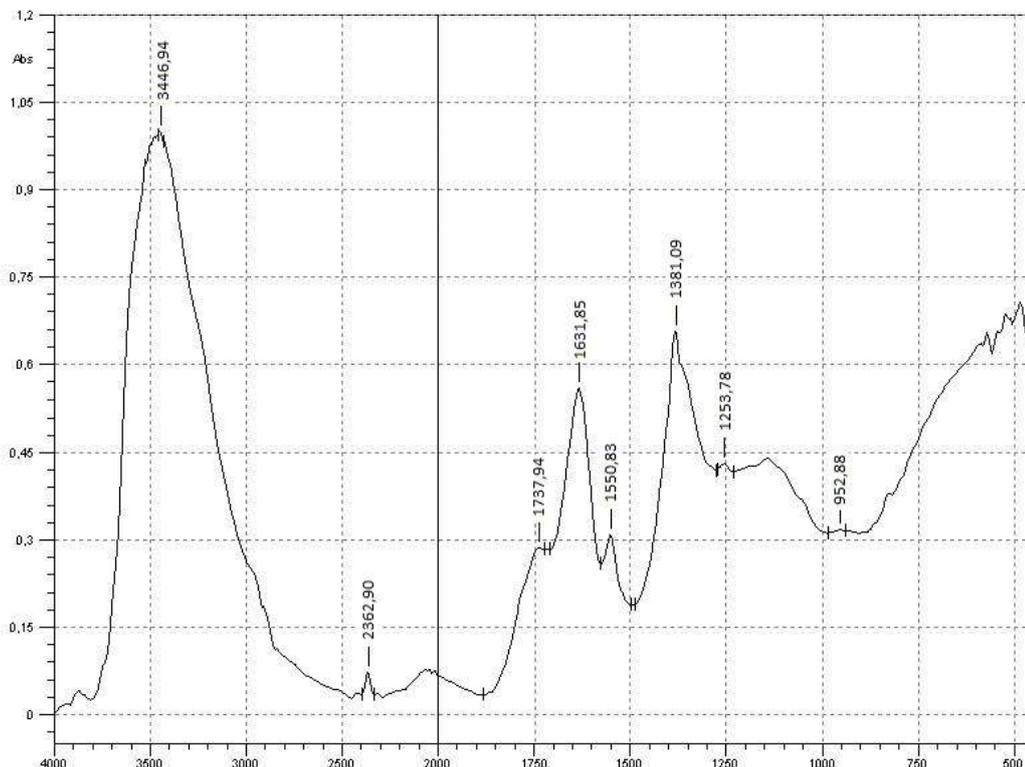


Figura 39 – Espectro de FTIR do nD Molto®.

De acordo com os resultados encontrados (Figura 39) no espectro do nanodiamante Molto®, os picos atribuídos foram em  $3447\text{ cm}^{-1}$  correspondendo às vibrações da ligação O-H, oriunda da água adsorvida e também devido a contribuição de hidroxilas (OSSWALD et al., 2006; MITEV et al., 2007); a faixa de  $2540\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ , não são relacionados a nenhuma ligação presente na superfície, mas causados por interferências devido a subtração do  $\text{CO}_2$  atmosférico pelo software; em  $1737\text{ cm}^{-1}$  relativo à ligação C=O do grupo COOH (OSSWALD et al., 2006; MA et al., 2016); na faixa de  $1631\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$  o mais intenso corresponde ao modo de dobramento de O-H e o outro ao modo de vibração da N-H da amida (JEE; LEE, 2009; MITEV et al., 2007; OSSWALD et al., 2006); em  $1381\text{ cm}^{-1}$  corresponde a absorção intrínseca do diamante; entre  $1000\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$  relacionados à vibração C-O do grupo hidroxila (SHENDEROVA et al., 2011) e em  $952\text{ cm}^{-1}$  é relativo ao modo de dobramento da amina primária (JEE; LEE, 2009).

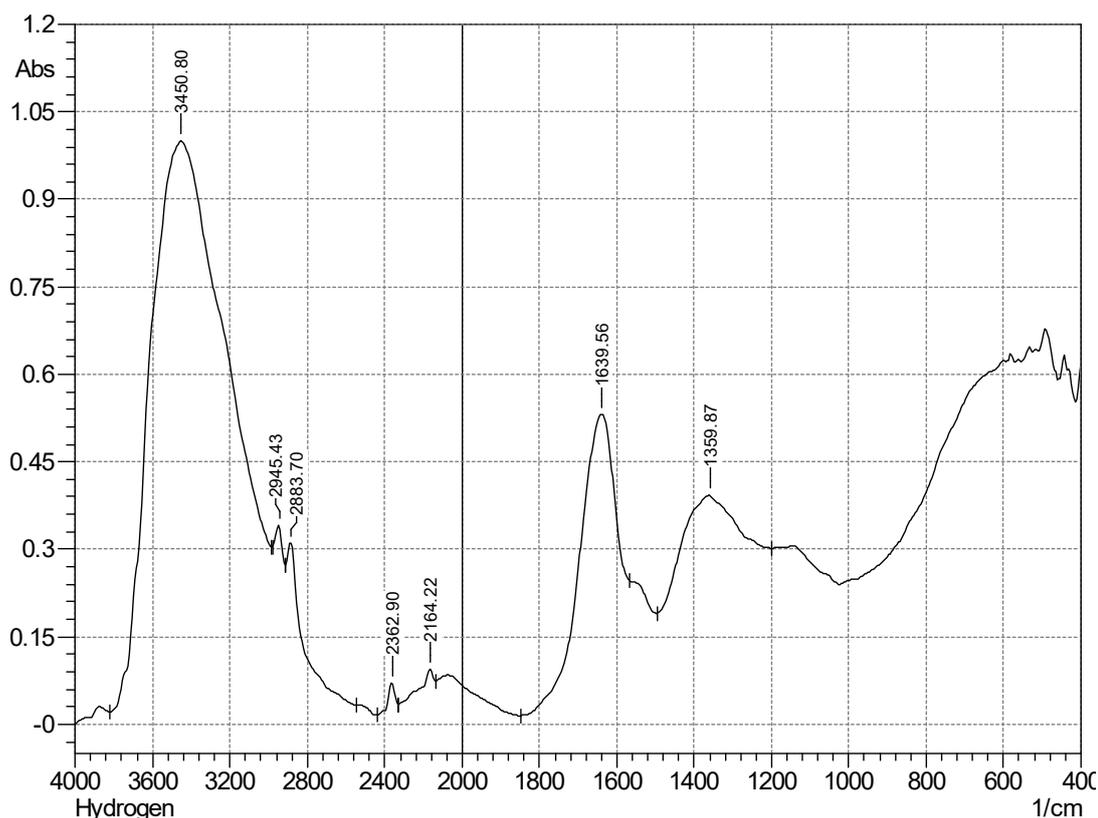


Figura 40 – Espectro de FTIR do nD Hydrogen P®.

No caso do nanodiamante Hydrogen P® (Figura 40), é possível ver os mesmos picos do Molto®, com exceção em  $1737\text{ cm}^{-1}$ ,  $1550\text{ cm}^{-1}$  e  $950\text{ cm}^{-1}$ ). No entanto, o espectro mostra o acréscimo de dois picos em  $2945\text{ cm}^{-1}$  e  $2884\text{ cm}^{-1}$  referentes às vibrações C-H que são presumivelmente a superposição de várias vibrações de alongamento de diferentes grupos de hidreto (SHENDEROVA et al., 2011; KOROLKOV et al., 2007). OSSWALD et al., 2006 encontrou os mesmos picos após hidrogenação dos nanodiamantes. O desaparecimento das bandas de absorção a  $1740\text{ cm}^{-1}$  e  $1560\text{ cm}^{-1}$  e o aumento das intensidades das bandas C-H ( $2942$  e  $2878\text{ cm}^{-1}$ ) são as alterações mais evidentes no espectro de FTIR após a hidrogenação (KOROLKOV et al., 2007).

Portanto, ambos os nanodiamantes apresentam superfície rica em grupos funcionais, sendo que o nanodiamante Hydrogen P® apresenta bandas características de tratamento superficial de hidrogenação, o que remete a ele um caráter superficial mais hidrofóbico (MOCHALIN et al., 2012).

Completando a análise superficial, podemos observar que os espectros XPS (Figuras 41 a 48) exibem a presença de carbono, oxigênio e nitrogênio para ambos os nanodiamantes. As áreas de níveis principais são de C1s, O1s e N1s, com

concentrações atômicas para o nD Molto® 90,64%, 7,57% e 1,80% (Figura 41) e nD Hydrogen P® 96,23%, 2,64% e 1,23% (Figura 42), respectivamente. Nota-se um decréscimo na intensidade do pico de oxigênio para o nD Hydrogen P® (Figuras 43 e 44). Essa redução também foi observada por Girard et al., 2010 após realizar hidrogenação em nanodiamantes. Isso é esperado uma vez que o tratamento com hidrogênio causa a formação de novos grupos de hidretos principalmente devido à redução e destruição de grupos contendo oxigênio (KOROLKOV et al., 2007), que são basicamente os grupos hidroxila, éter, carbonila e ácido carboxílico (SHENDEROVA et al., 2011).

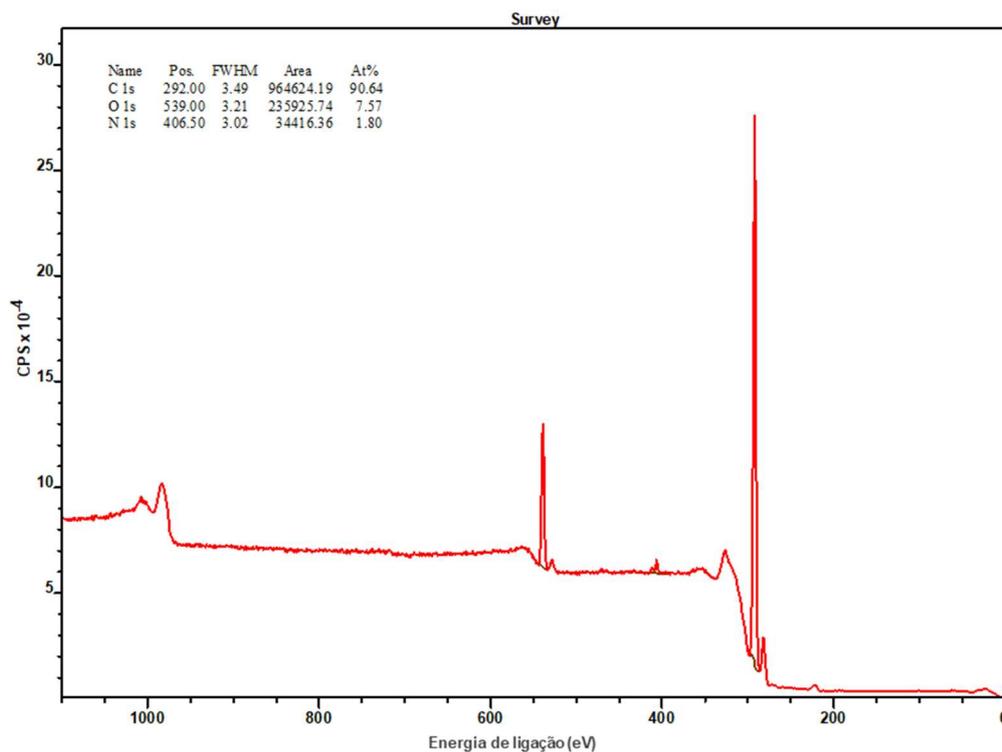


Figura 41 – XPS do nD Molto® mostrando picos C1s, O1s e N1s.

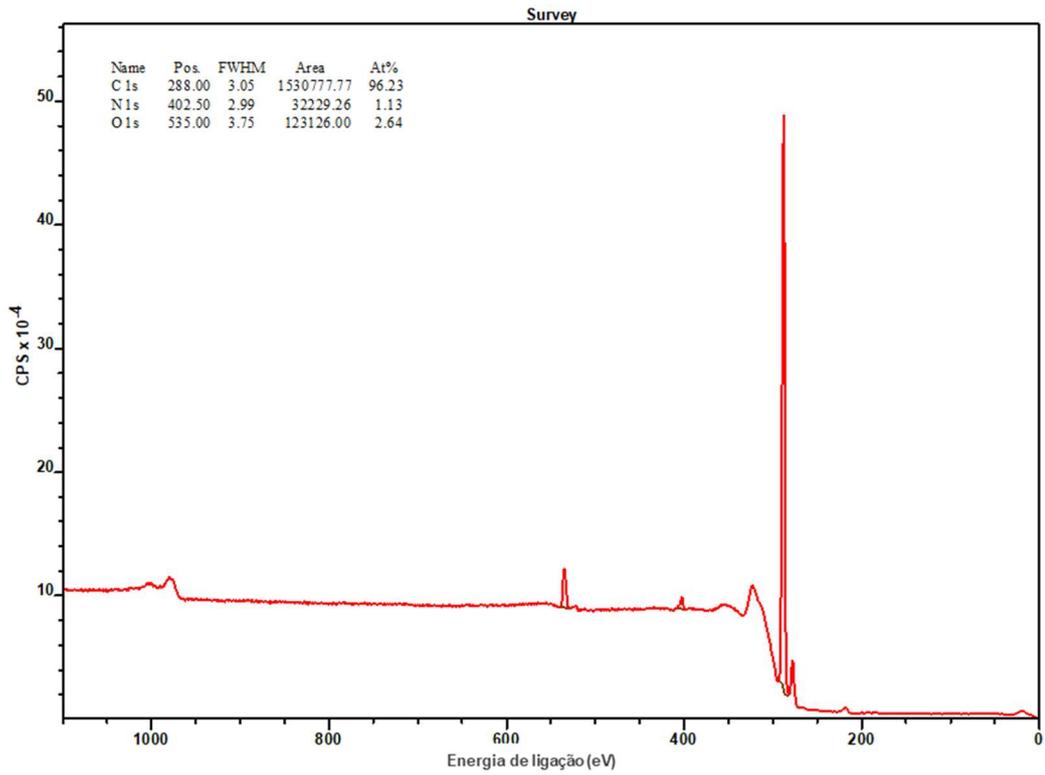


Figura 42 – XPS do nD Hydrogen P® mostrando picos C1s, O1s e N1s.

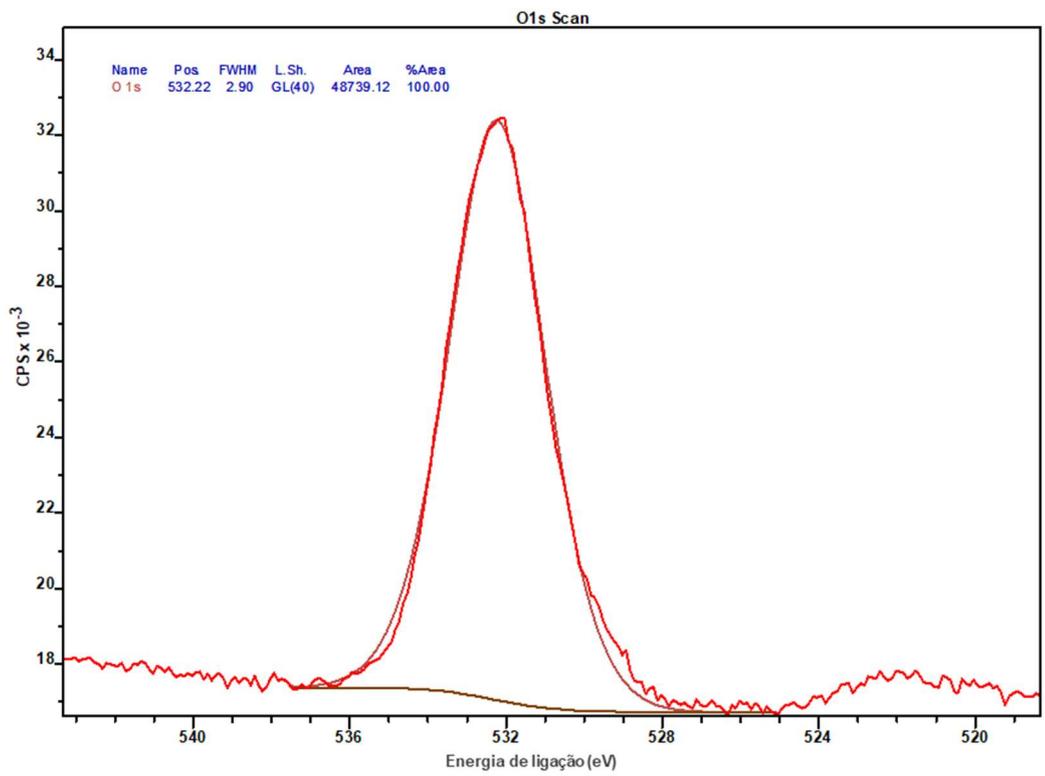


Figura 43 – Deconvolução da curva O1s para o nD Molto®.

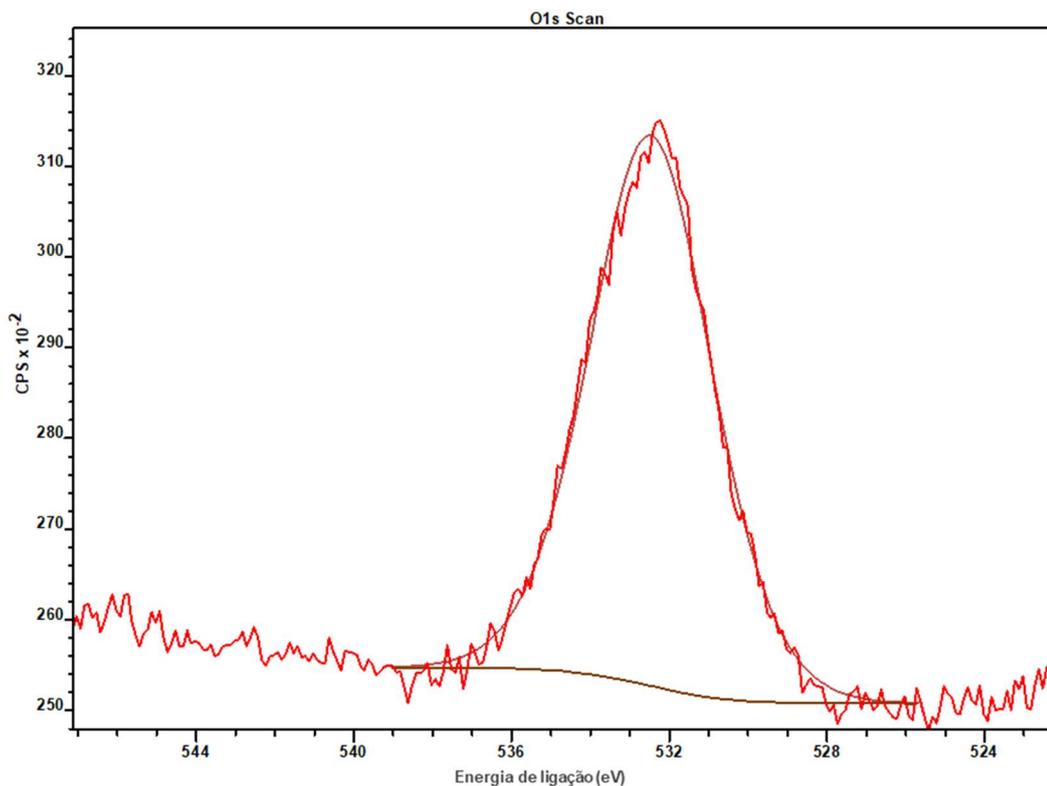


Figura 44 – Deconvolução da curva O1s para o nD Hydrogen P®.

As figuras 45 e 46 mostram respectivamente as deconvoluções das curvas C1s para o nD Molto® e Hydrogen P®. Em função da assimetria dos picos, as contribuições podem ser atribuídas principalmente às ligações C-C, e em menor escala provavelmente as ligações C-O, C=O, C-N, COOH (ZHAO et al., 2015; GIRARD et al., 2010; NIEDZIAŁKOWSKI et al., 2015-A; NIEDZIAŁKOWSKI et al., 2015-B).

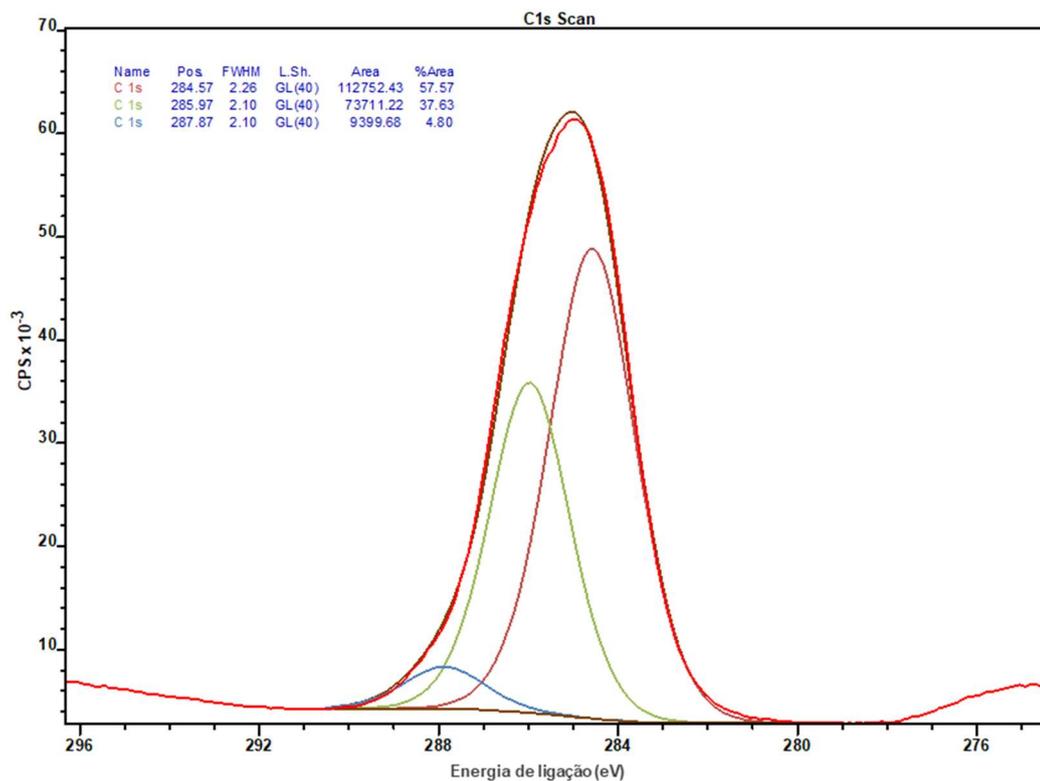


Figura 45 – Deconvolução da curva C1s para o nD Molto®.

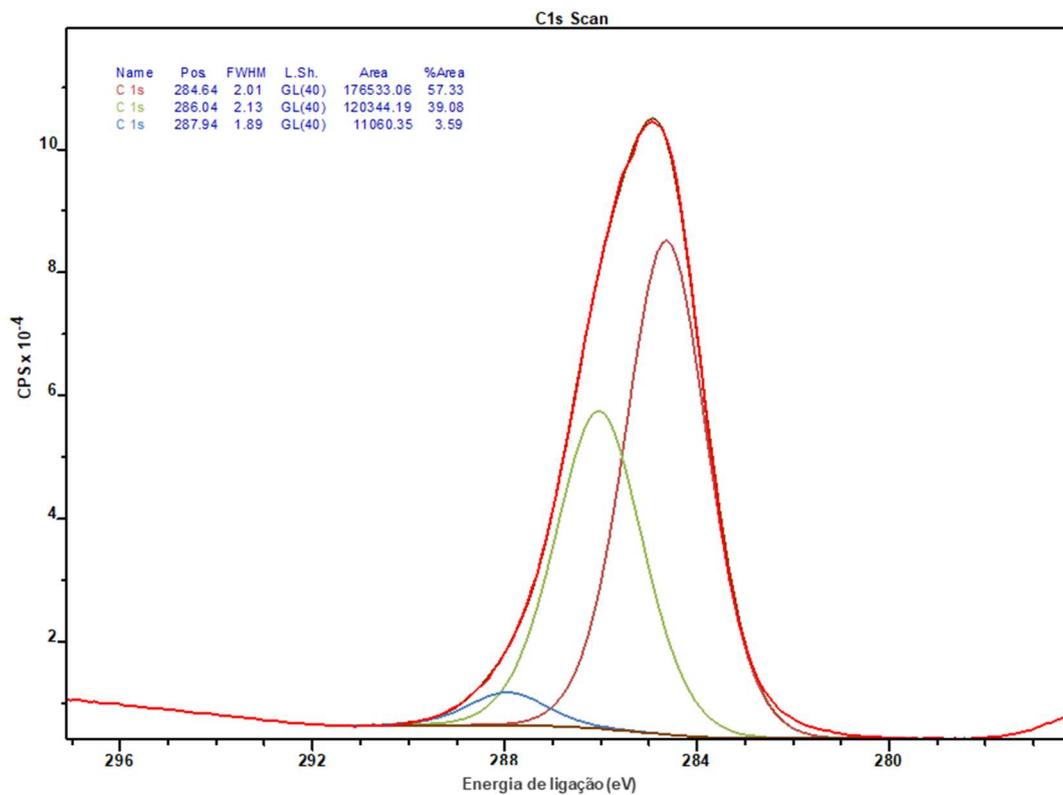


Figura 46 – Deconvolução da curva C1s para o nD Hydrogen P®.

As figuras 47 e 48, mostram respectivamente as deconvoluções das curvas N1s para o nD Molto® e Hydrogen P®. No caso do nD Molto® observa-se um pico em 399,5 eV e para o nD Hydrogen P® três picos, sendo o principal em 400,1 eV, o segundo em 403,4 eV e o menor em 397,6 eV que provavelmente podem ser atribuídos as ligações do nitrogênio com hidrogênio, carbono, oxigênio (NIEDZIAŁKOWSKI et al., 2015-A; NIEDZIAŁKOWSKI et al., 2015-B; KIRMANI et al., 2015).

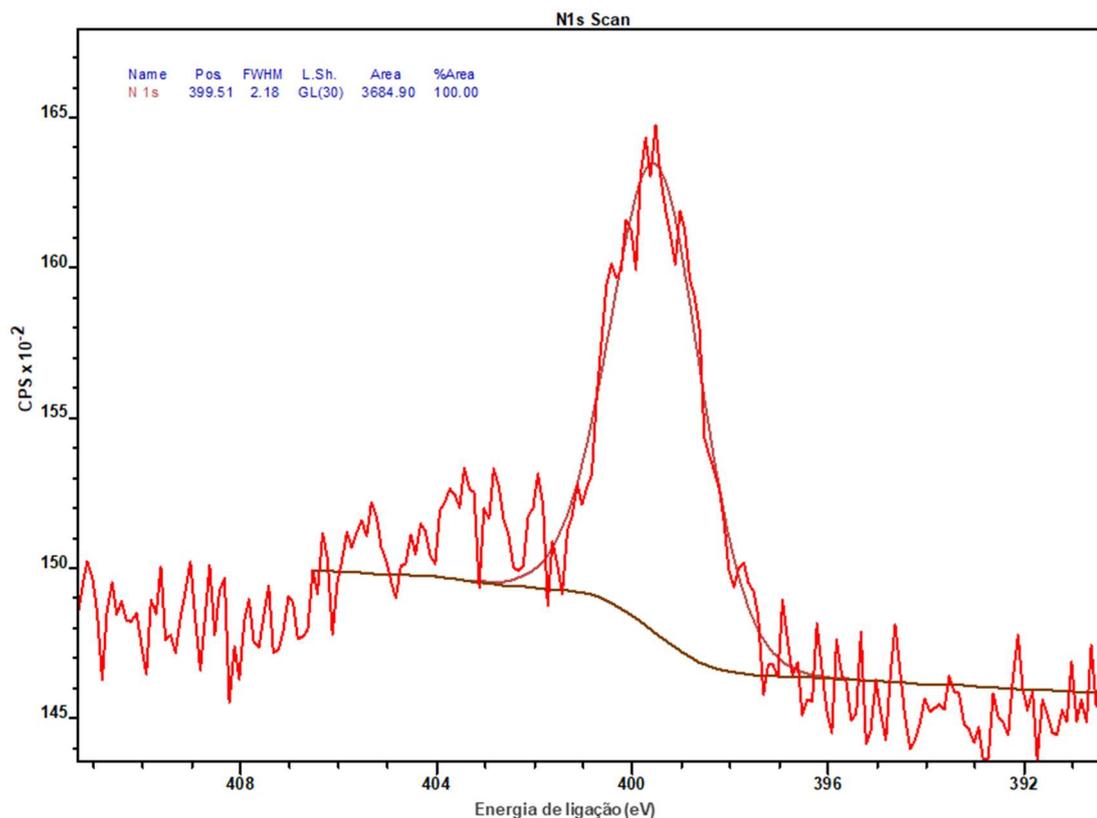


Figura 47 – Deconvolução da curva N1s para o nD Molto®.

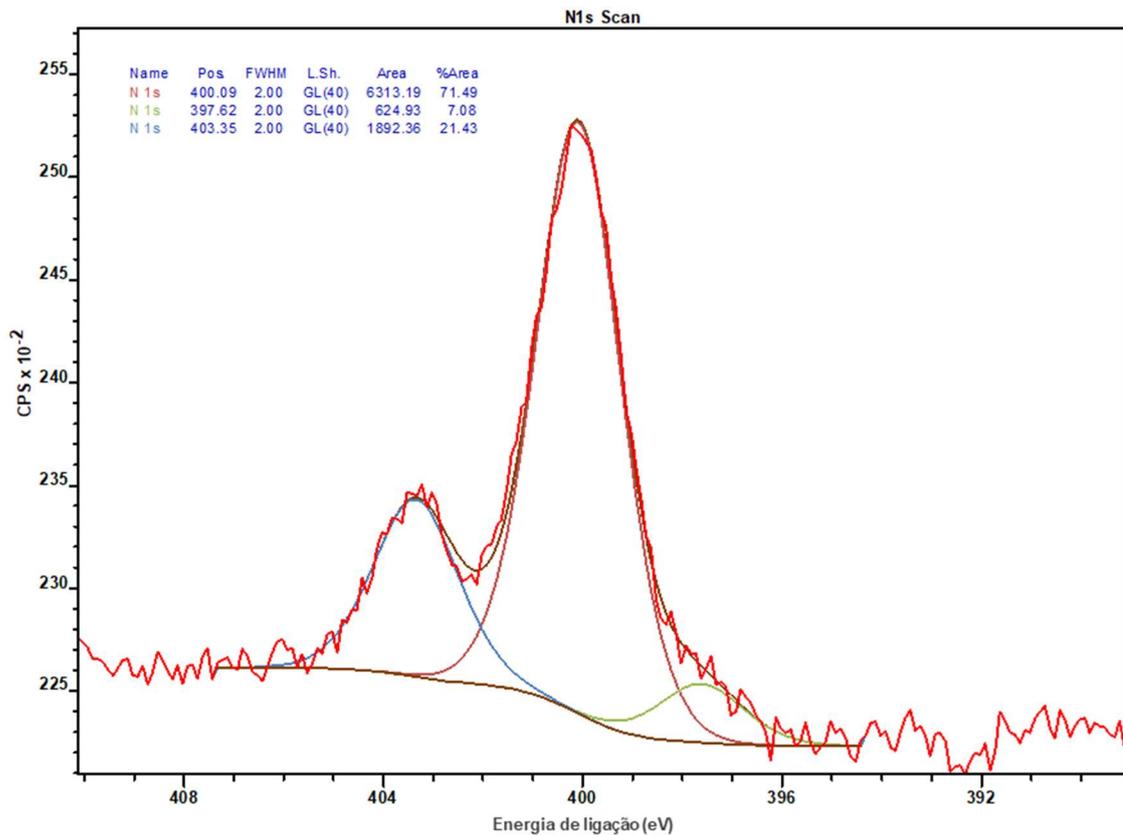


Figura 48 – Deconvolução da curva N1s para o nD Hydrogen P®.

Os resultados demonstram que os nanodiamantes são superficialmente diferentes, uma vez que o pico principal de oxigênio do nD Hydrogen P® mostra queda se comparado com Molto®, caracterizando que o tratamento superficial de hidrogenação foi eficiente.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS

#### 4.3.1 Caracterização das microcápsulas P(HB-HV)/nD

Após o processo de encapsulamento, o material obtido apresentou coloração mais escura que o P(HB-HV) puro, devido à adição dos nDs e uma aparência de um pó extremamente fino para todas as formulações (Figura 49).

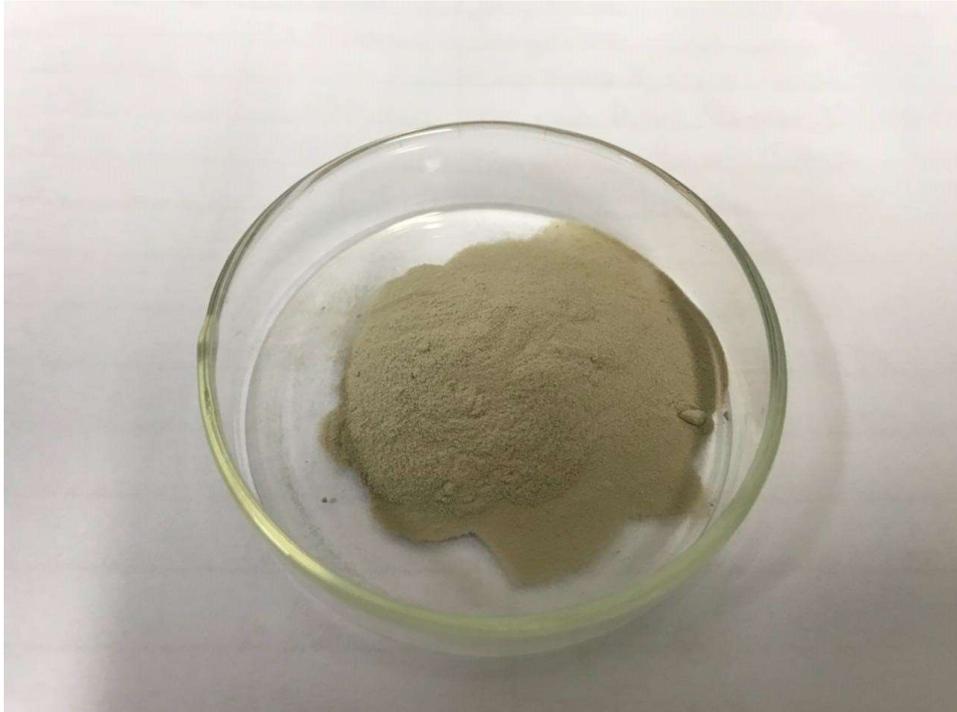


Figura 49 – Pó formado pelas microcápsulas obtido através da metodologia de encapsulamento.

Ao analisar no MEV, nota-se que em todas as formulações foram formadas microcápsulas de geometria esféricas com diâmetros variando na faixa de 1-15  $\mu\text{m}$  (Figura 50). Isso mostra que o processo de encapsulamento foi eficaz propiciando a distribuição dos nanodiamantes na matriz de P(HB-HV) e favorece o contato matriz-carga.

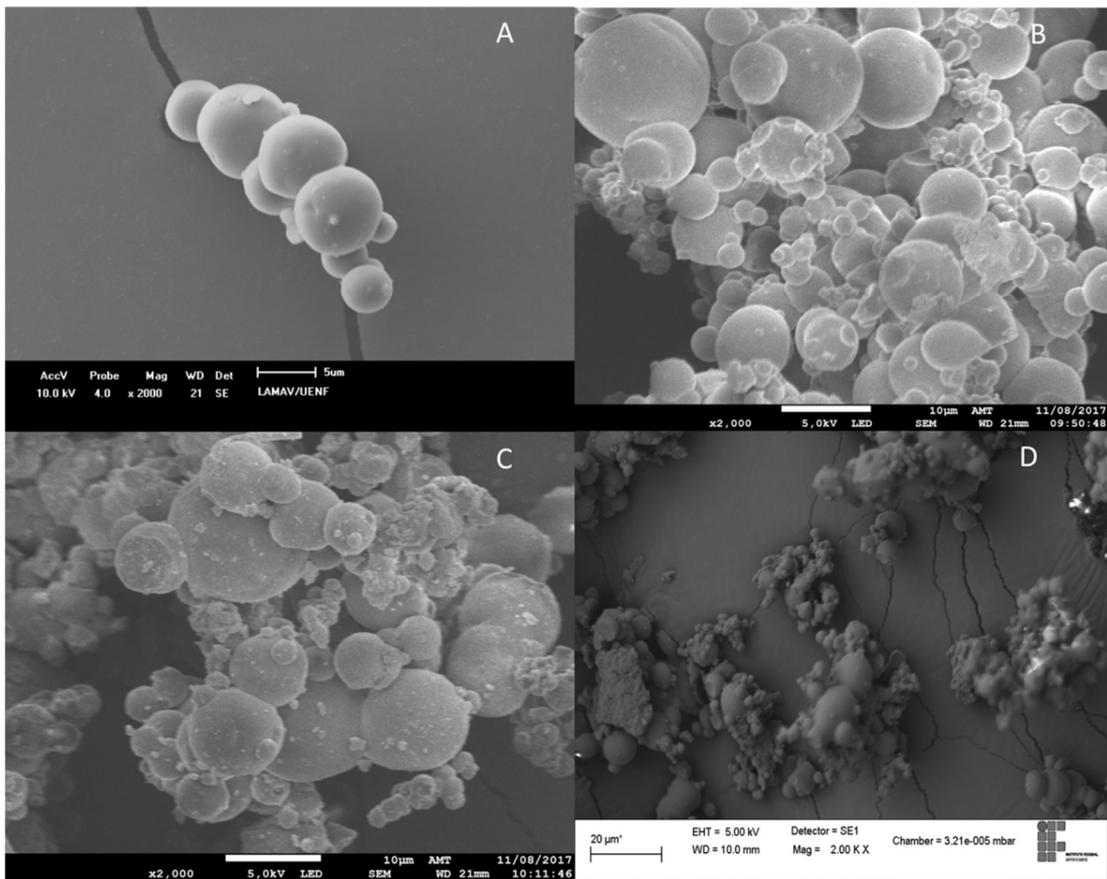


Figura 50 – Microcápsulas formadas pelo processo de encapsulamento. M10:1 (A), M20:1 (B), H10:1 (C) e H20:1 (D). Aumento 2000x.

O encapsulamento realizado dos nanodiamantes, assim como a eficiência do contato entre estes e a matriz, foi objeto de estudo com auxílio da técnica de análise de ressonância magnética de baixo ângulo (RMN), na qual foi possível obter os valores de relaxação spin-rede, indicado pelos valores de  $T_{1H}$ . Esses dados geram respostas sobre a mobilidade molecular do polímero no seu estado sólido, neste caso na microcápsula. Os valores descritos na tabela 3 trazem o ajuste das curvas de relaxação com apenas 1 exponencial. A curva de distribuição (Figura 51) traz a inversa de Laplace das curvas de relaxação, com o melhor ajuste exponencial possível, que pode ser de uma ou mais exponenciais. Logo na tabela 3 observa-se o valor médio de  $T_{1H}$  que é fruto da combinação ponderal dos domínios mostrados na figura 51.

Baseado nos valores obtidos para  $T_{1H}$ , o tipo de nanodiamante e as diferentes proporções inseridas na matriz P(HB-HV) capsular promoveram diferentes mudanças na mobilidade molecular dos sistemas. Essas alterações estão relacionadas aos diferentes graus de interação nanopartícula/matriz, refletida na homogeneidade dos sistemas (KUBÁT et al., 1990). O aumento do valor de  $T_{1H}$  está associado a menor

mobilidade das cadeias de polímero (IULIANELLI et al., 2016). Nota-se que as amostras H10:1 e H20:1, apesar de terem a superfície mais hidrofóbica que favorece a interação com a matriz, apresentaram valores menores de  $T_1H$  se comparado ao P(HB-HV) e as amostras M10:1 e M20:1. A maior redução é observada para amostra H10:1, inclusive em relação a H20:1. Isso evidencia que esse efeito é devido aos aglomerados em maior tamanho observado no nanodiamante Hydrogen P® conforme detectado no ensaio de granulometria (Figuras 33 a 36). Os aglomerados encapsulados acabam impedindo o contato da matriz de P(HB-HV) com todas as nanopartículas prejudicando o aumento da rigidez do nanocompósito. Zhao et al., 2010 observaram que quanto maior a quantidade de diamantes adicionada numa matriz de PLA, maiores tamanhos de aglomerados foram observados. Sendo assim, com o aumento da carga na amostra H10:1, aumentou também a quantidade e tamanho dos aglomerados disperso pela matriz impedindo uma diminuição efetiva da mobilidade das cadeias. Isso também explica o fato da amostra M20:1 apresentar maior valor de  $T_1H$ , já que a mesma possui menor quantidade de carga que a amostra M10:1 e o no caso dos nanocompósitos com nD Molto® os maiores valores podem ser associados ao fato de apresentarem suas partículas menos aglomeradas.

Tabela 3 – Valores de  $T_1H$  para o P(HB-HV) e as formulações M10:1, M20:1, H10:1 e H20:1.

Material		$T_1H$ (ms)
Polímero	P(HB-HV)	463
Formulações	M10:1	471
	M20:1	476
	H10:1	395
	H20:1	462

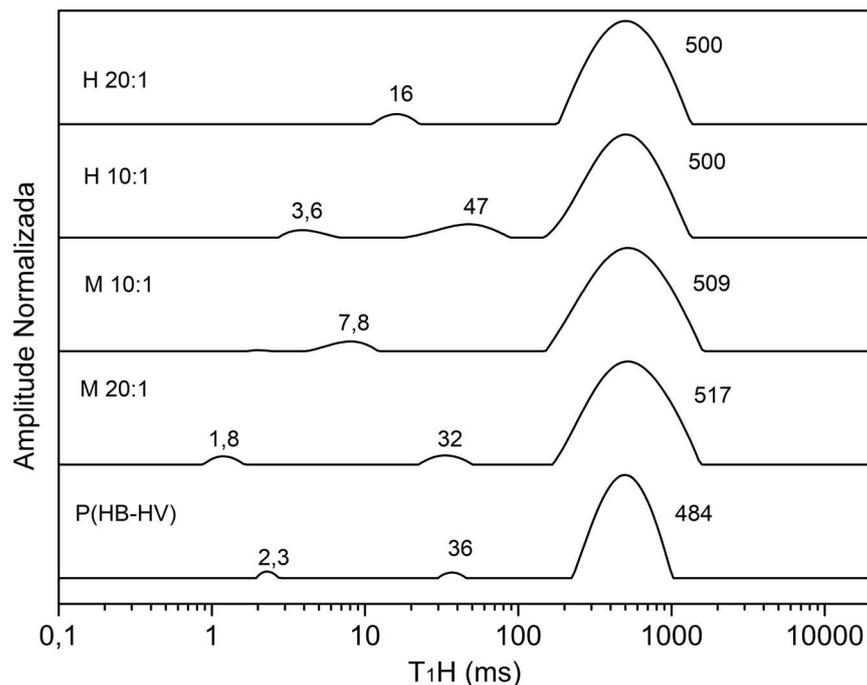


Figura 51 – Curva de domínios do P(HB-HV) e das formulações M10:1, M20:1, H10:1 e H20:1.

Complementando a análise dos nanocompósitos com o DRX, nota-se na figura 52, que de acordo com os picos, o perfil de difração da amostra de P(HB-HV) é muito similar e com mesmos picos típicos do homopolímero PHB, que apresenta os planos de reflexão (020), (110), (021), (101), (111), (121), (040), (002) (200) (SANTOS et al., 2017). Essa similaridade já era esperada devido ao baixo conteúdo de 3HV do P(HB-HV) utilizado no polímero em estudo, já que que o P(HB-HV) com até 30% mol de HV cristaliza com a mesma estrutura do PHB, pois até essa composição as unidades de HV são ordenadas pela rede do PHB (BLUHM et al., 1986). Galego et al., 2000 verificaram que o P(HB-HV) com 8, 12 e 24% em mol de 3HV apresentou estrutura cristalina similar ao PHB (ortorrômbica). O mesmo resultado também foi verificado por Thiré et al., 2011 para o P(HB-HV) com 3% em mol de 3HV.

As formulações M10:1, M20:1, H10:1 e H20:1 não tiveram alterações significativas na posição dos picos, permanecendo com a mesma estrutura cristalina do polímero puro. Pequenas mudanças são percebidas somente na intensidade dos picos, o que fez que com que a cristalinidade fosse alterada (Figura 52).

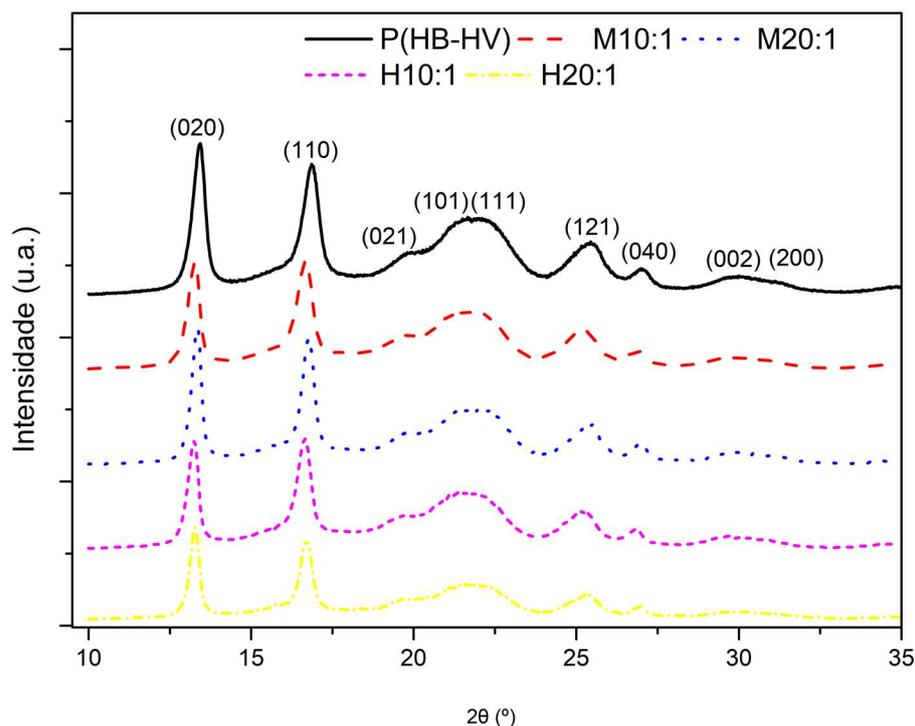


Figura 52 - Difratogramas do P(HB-HV) e das formulações M10:1, M20:1, H10:1 e H20:1 (Adaptado de BARCELOS et al., 2017).

Na tabela 4 são apresentadas as cristalinidades calculadas para as formulações. Todas as formulações dos nanocompósitos apresentaram diminuição da cristalinidade em comparação com o P(HB-HV), principalmente para a formulação H10:1. Chen e Wang, 2002 também verificaram diminuição da cristalinidade de compósitos com cargas de fosfato de cálcio (TCP) e hidroxiapatita (HA) em uma matriz de P(HB-HV) para todas as formulações testadas (10, 20 e 30% em volume de carga). Já Jee e Lee, 2011 verificaram que ao adicionar nanodiamante de 5 nm em uma matriz de polietileno de baixa densidade (PEBD), as cristalinidades dos compósitos aumentaram em relação ao polímero puro para quantidades de até 5% em massa de carga. Acima desse valor, foi registrada uma queda crescente com o aumento de carga na cristalinidade. De acordo com os autores, esse efeito aconteceu devido à competição entre os efeitos de nucleação e retardo (bloqueio) da cristalização.

Ou seja, as partículas de nanodiamante em baixos teores atuam principalmente como um agente nucleante para a cristalização do polímero, aumentando a cristalinidade. No entanto, com cargas mais elevadas, mesmo atuando como agentes de nucleação, agem ao mesmo tempo impedindo o movimento dos segmentos da cadeia polimérica, atrapalhando o crescimento dos cristais (JEE; LEE, 2011). Como a quantidade efetiva de nanodiamante utilizada para obtenção das formulações neste

estudo foram superiores a 4,7% em massa, valor obtido pelo ensaio de perda ao fogo (Figura 59), pode-se deduzir que a queda na cristalinidade foi influenciada pela restrição do movimento dos segmentos das cadeias poliméricas.

Os resultados de RMN demonstraram maior restrição no movimento das cadeias poliméricas para os compósitos formulados com o nD Molto® e isso pode ter contribuído para queda na cristalinidade se comparado com o polímero puro. No entanto, apesar da mobilidade não ter sido restringida na mesma intensidade para os compósitos formulados com nD Hydrogen P®, já que a carga se apresenta mais aglomerada que o nD Molto®, isso fez com que a melhor dispersão das nanocargas nos compósitos M10:1 e M20:1, atuassem mais efetivamente como agentes nucleantes, o que explica apresentarem maiores valores cristalinidade se comparados com os compósitos H10:1 e H20:1.

Tabela 4 – Cristalinidade das formulações obtidas através as curvas do DRX (Adaptado de Barcelos et al., 2017).

Material		% X <sub>c</sub>
Polímero	P(HB-HV)	60,97
Formulações	M10:1	57,59
	M20:1	58,24
	H10:1	56,84
	H20:1	57,67

#### 4.3.2 Caracterização dos corpos de prova P(HB-HV)/nD

Os corpos de prova utilizados para as análises de TGA, perda ao fogo, DSC, DMA, flexão e indentação foram confeccionados em prensa e injetora com as microcápsulas obtidas após o processo de encapsulamento (Figura 50).

É mostrado na figura 53 corpos de prova de diferentes tamanhos produzidos na prensa e na injetora.

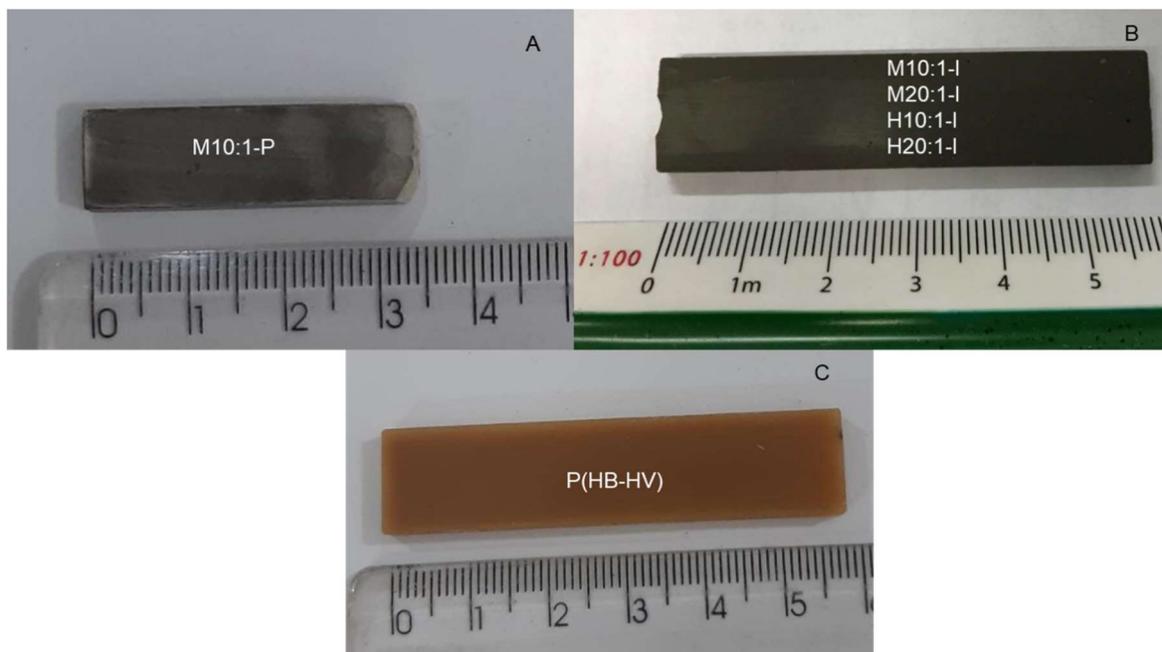


Figura 53 – Corpos de prova produzidos dos nanocompósitos na prensa (A), na injetora para comparação do tipo e quantidade de carga (B) e do polímero puro na injetora (C).

#### 4.3.2.1 Avaliação das propriedades térmicas

Pequenas partes de três regiões diferentes dos corpos de prova foram retirados para realizar as análises termogravimétricas (TGA), com objetivo de associar o comportamento térmico dos nanocompósitos produzidos às interações com a matriz dos nanodiamantes com superfícies contendo funcionalidades diferentes e avaliar a distribuição deste na matriz para cada formulação.

Os valores referentes às quantidades de nanodiamantes presentes nos fragmentos analisados de cada formulação estão indicados nas figuras 54 a 58 e os teores médios de nD residual obtidos foram listados na tabela 5.

Tabela 5 – Teores médios e dispersão de nD para todas as formulações.

Material		nD residual (%)
Nanocompósitos	M10:1-P	7,9 ± 0,6
	M10:1-I	7,2 ± 0,2
	M20:1-I	4,4 ± 0,1
	H10:1-I	8,4 ± 0,1
	H20:1-I	5,0 ± 0,8

Há uma diminuição no teor de nD em relação às soluções iniciais preparadas com proporções polímero/carga de 10:1 e 20:1 para ambos nD, Molto® e Hydrogen P®. Essa diferença é justificada pela perda de material nas parede do equipamento durante o processo de encapsulamento. Nota-se também que para todas as formulações não houve variação significativa na quantidade de nanocarga presente nas regiões distintas dos corpos de prova. Tal observação descreve uma homogeneidade na distribuição das cargas ao longo dos corpos de prova utilizando a metodologia de encapsulamento prévio a sua conformação.

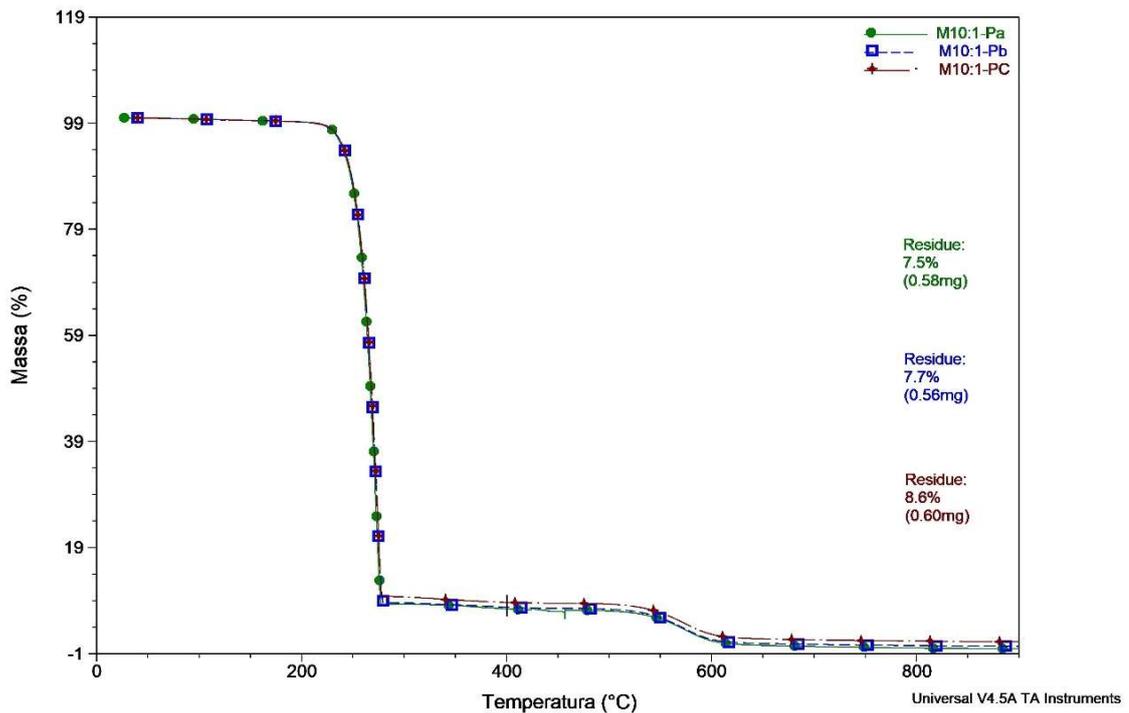


Figura 54 – Curvas termogravimétricas de três regiões distintas do corpo de prova do nanocompósito M10:1-P.

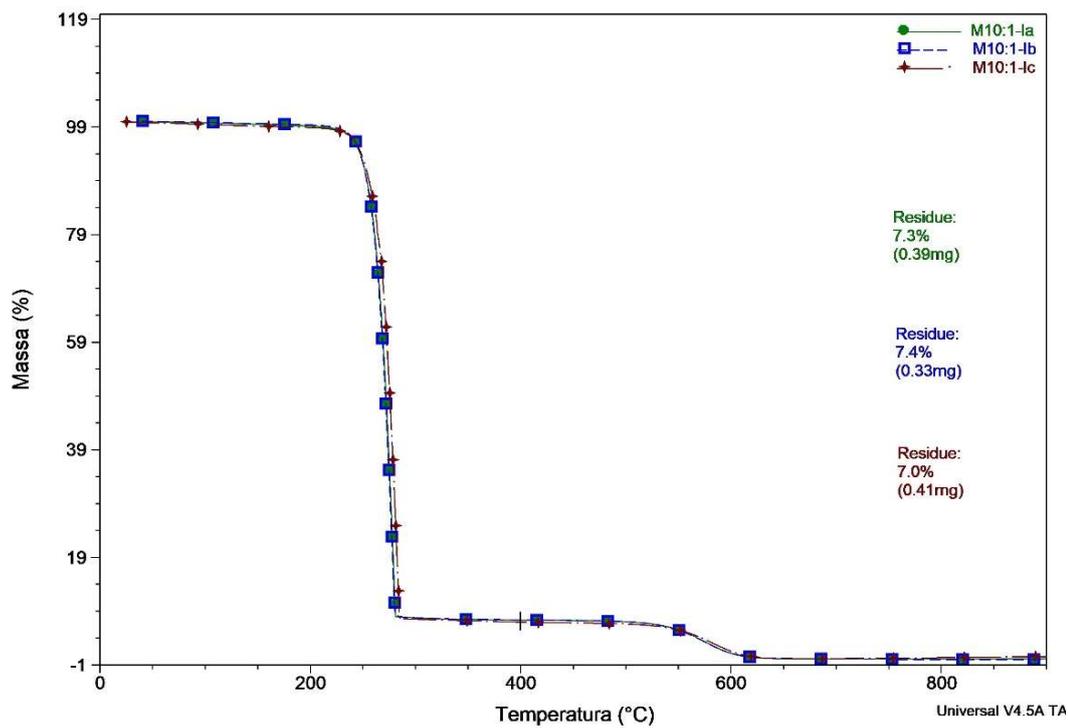


Figura 55 – Curvas termogravimétricas de três regiões distintas do corpo de prova do nanocompósito M10:1-I.

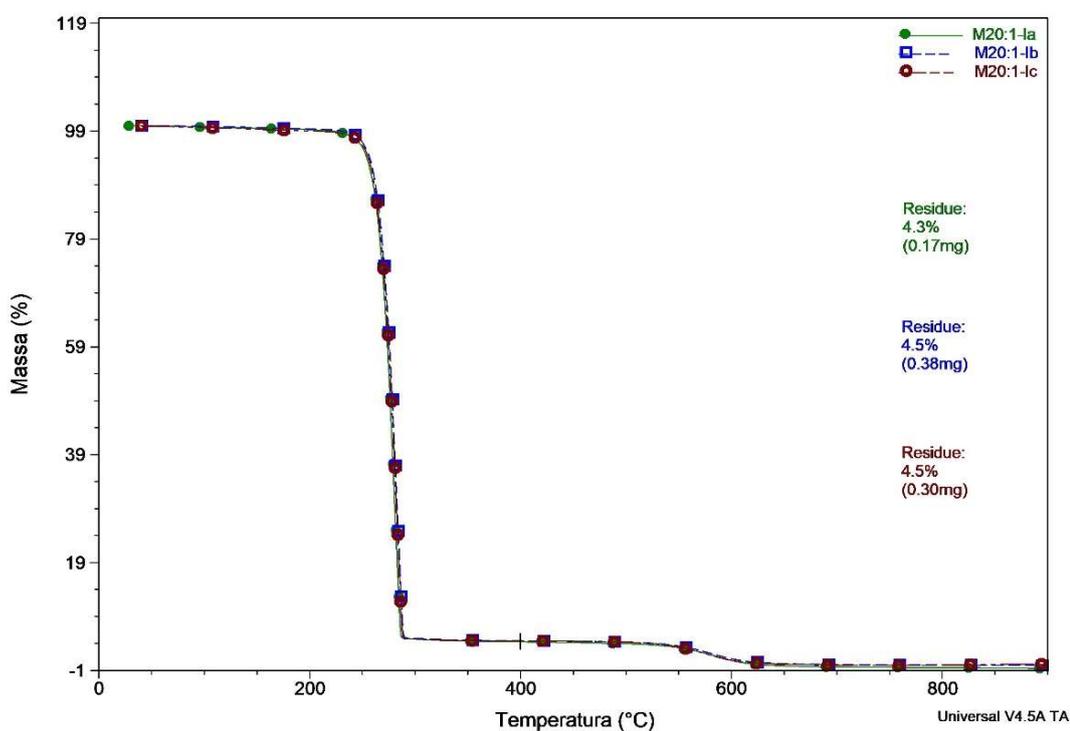


Figura 56 – Curvas termogravimétricas de três regiões distintas do corpo de prova do nanocompósito M20:1-I.

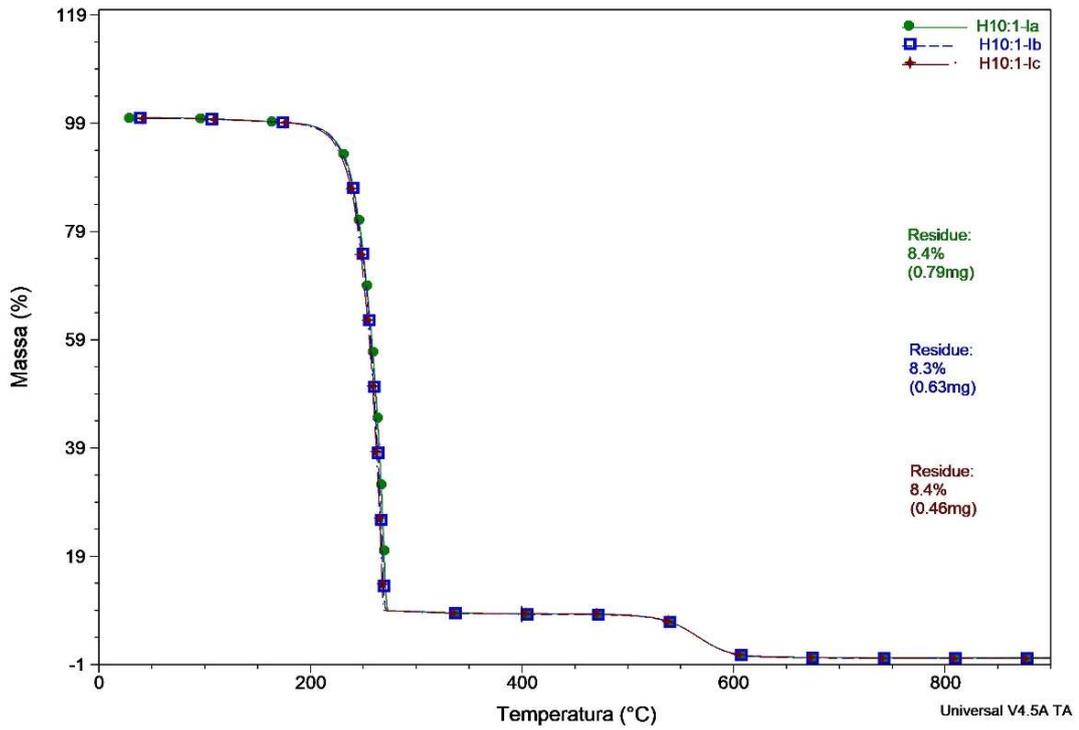


Figura 57 – Curvas termogravimétricas de três regiões distintas do corpo de prova do nanocompósito H10:1-I.

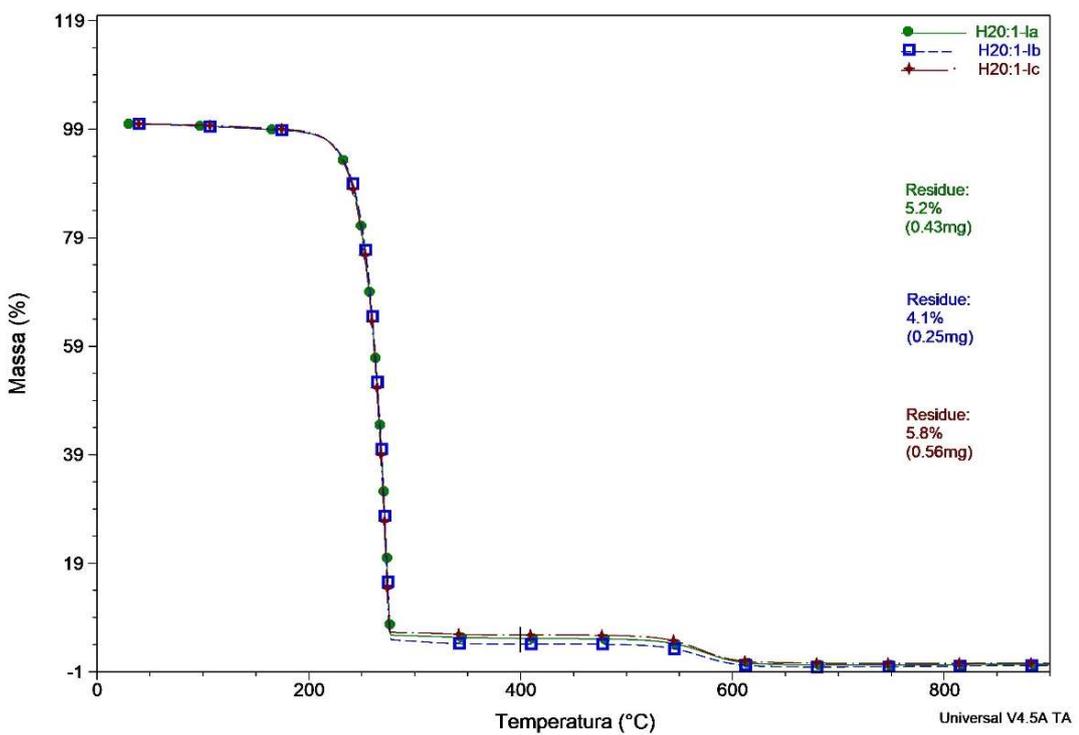


Figura 58 – Curvas termogravimétricas de três regiões distintas do corpo de prova do nanocompósito H20:1-I.

Para realização das análises de TGA, foram utilizadas amostras de pequena massa, entre 5 e 10 mg. Diante disso, realizaram-se análises de perda ao fogo, em que amostras em torno de 1 g de cada formulação foram submetidas a aquecimento em uma estufa a 430°C, com o intuito de alcançar um resultado mais representativo do material em relação à massa residual de nD.

É mostrado na figura 59 que todas as formulações apresentaram uma queda no seu teor de nanocargas em relação ao teor preparado em solução. Esse resultado está de acordo com o observado em TGA. Também é observado que o nD Hydrogen P®, em suas duas formulações, apresenta uma perda menor, se comparado ao nD Molto®. Uma provável explicação para isso encontra-se em seu caráter hidrofóbico semelhante ao do P(HB-HV), o que permite melhor compatibilidade superficial entre eles, diminuindo a perda no processo.

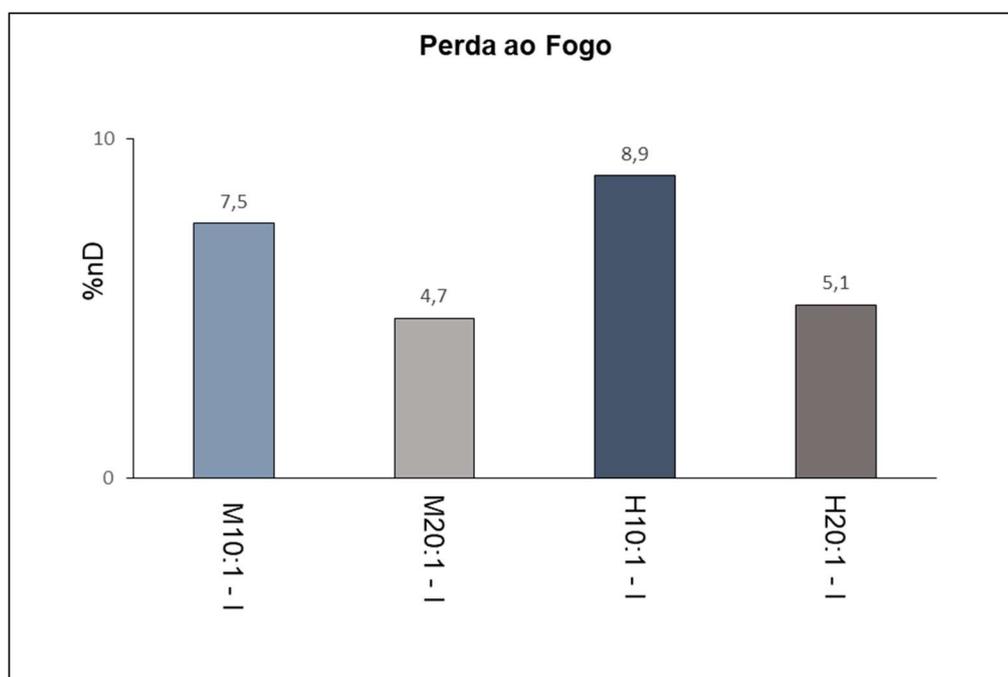


Figura 59 – Teores de nD residual obtidos por perda ao fogo.

Por apresentar menor variação dos valores residuais de nD no TGA, analisou-se também uma amostra de encapsulados de formulação M20:1 e comparou o seu teor residual de nD com o teor do corpo de prova da mesma formulação para verificar se existia alguma perda de nanocarga no processo de injeção. Conforme mostrado na figura 60, as quantidades residuais encontradas são próximas, indicando que não há perdas consideráveis de material entre essas duas etapas do processo. Isso confirma que a perda observada é decorrente do processo de encapsulamento, assim como suposto anteriormente.

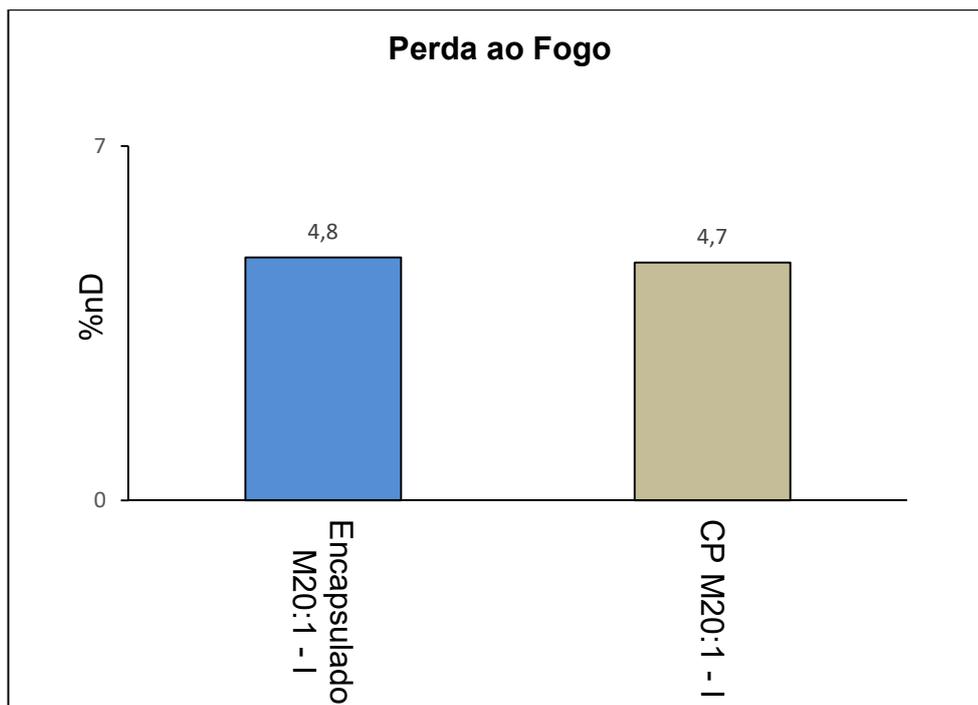


Figura 60 – Teores de nD residual no material encapsulado e no corpo de prova.

Além dos nanocompósitos produzidos, o P(HB-HV), o nD Molto® e o nD Hydrogen P® também foram analisados por TGA (Figura 61 à 63). Foi possível observar que ambos nD apresentam estabilidades térmicas parecidas, com perda desprezível de massa decorrente da perda inicial de água, como mostra a figura 61. O nD Hydrogen P® apresenta uma queda um pouco maior, provavelmente devido ao maior teor de água. Ocorreu um evento único para os dois nDs, no qual há perda intensa de massa a partir de 527,8°C ( $T_{\text{onset}}$ ) para o nD Molto® e 530,2°C para o nD Hydrogen P®. O valor máximo da taxa de perda de massa é atingido em 566,2 ( $T_{\text{máx}}$ ) e 567,0°C, respectivamente.

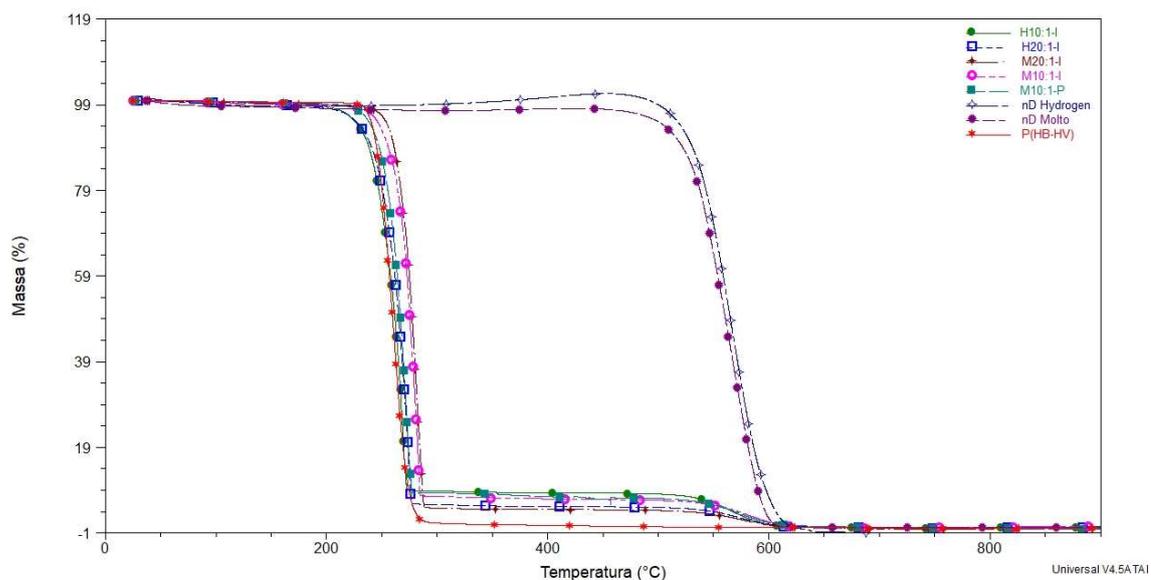


Figura 61 – Curvas termogravimétricas dos insumos puros e dos nanocompósitos.

O P(HB-HV) apresenta perda inicial praticamente nula, se comparado aos nDs. Isso é justificado por sua hidrofobicidade. A 245,4°C ( $T_{\text{onset}}$ ) inicia-se o processo de degradação, também em etapa única, e sua taxa de perda de massa máxima é registrada em 259,6°C ( $T_{\text{máx}}$ ).

Os nanocompósitos apresentam mais de um evento de perda de massa, mas sua primeira etapa é a mais significativa, relacionada à degradação do polímero. A segunda refere-se aos nDs presentes no material. De forma geral, percebe-se que a incorporação dos nDs, tanto Molto®, quanto Hydrogen P®, eleva a temperatura de início de degradação se comparada com a temperatura observada para P(HB-HV) puro. Sugere-se que esse aumento da  $T_{\text{onset}}$  é consequência das interações inter e intra moleculares polímero/carga, que afetará, a temperatura de início de degradação.

Normalmente a incorporação de partículas inorgânicas em matrizes poliméricas tendem a aumentar a estabilidade térmica do material. Interações entre polímero e carga, efeito de barreira e boa dispersão da carga são alguns dos principais fatores que contribuem para melhorar a estabilidade térmica do polímero (ZHAO et al., 2010).

Zhao et al., 2010 obtiveram o aumento de  $T_{\text{onset}}$  adicionando nanodiamante em frações variando de 0,1 a 5% em massa em uma matriz de PLA. Outro trabalho que também verificou um aumento nas  $T_{\text{onset}}$ , com o acréscimo de nanocargas foi o de Xie et al., 2009, que estudou a incorporação de nano-sílica nas propriedades da matriz PHBHx e observou o mesmo deslocamento na temperatura de início de degradação,

justificando tal comportamento ao fato das nanocargas serem uma boa barreira ao transporte de massa.

As temperaturas máximas ( $T_{m\acute{a}x}$ ) referem-se a temperatura na qual há maior taxa de perda de massa, e podem ser identificadas através da derivada da curva termogravimétrica, representada pelo pico de intensidade máxima na temperatura em questão. Essas temperaturas foram obtidas pelas curvas da derivada da massa representadas na figura 62. Uma aproximação desse gráfico está na figura 63, para melhor visualização.

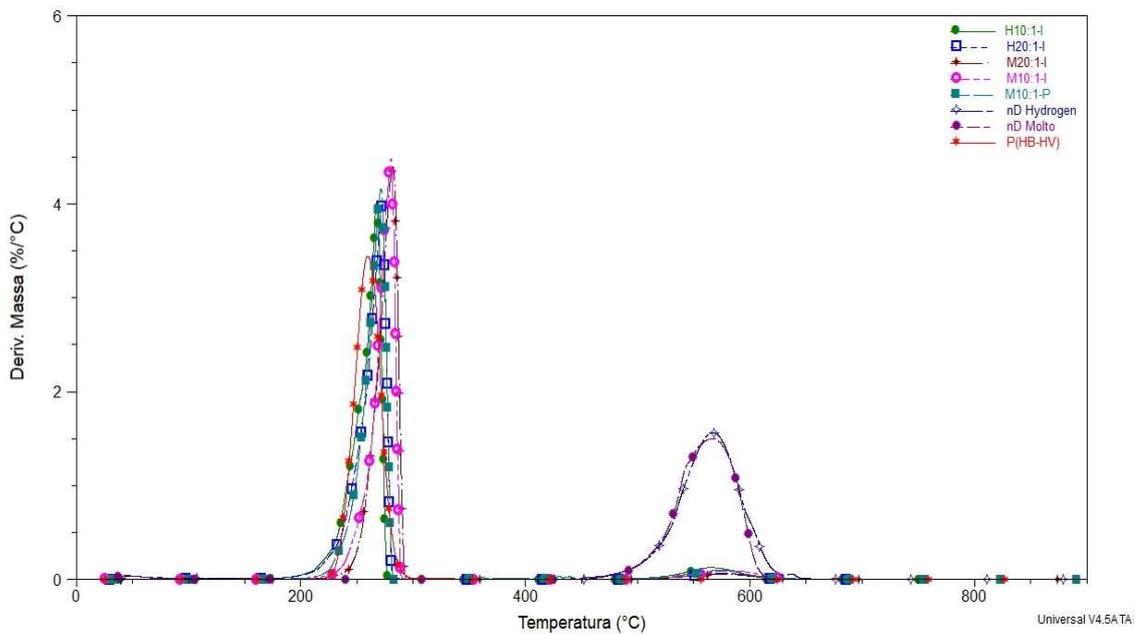


Figura 62 – Curvas DTG do P(HB-HV) e dos nanocompósitos.

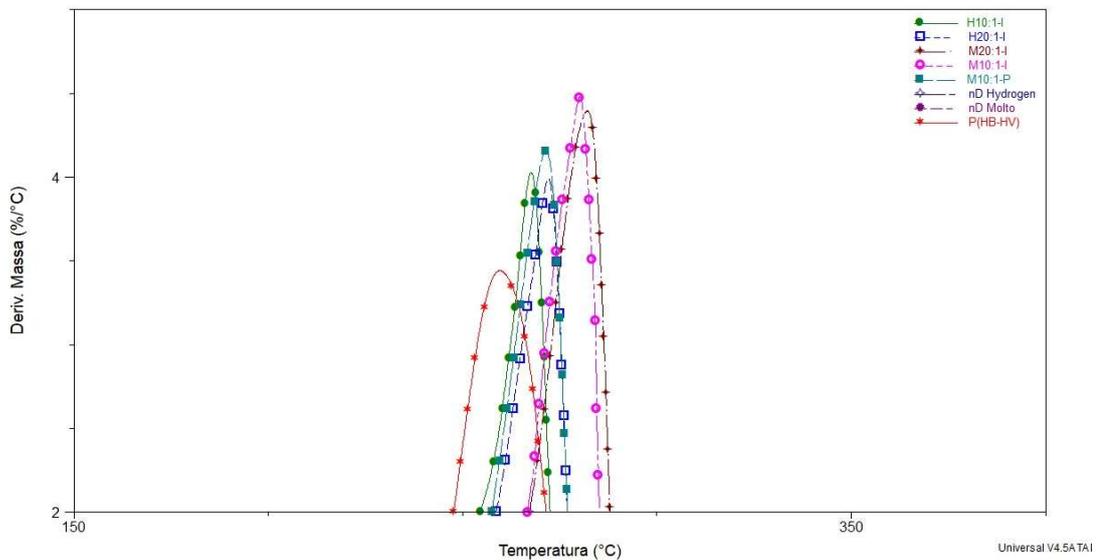


Figura 63 – Aproximação das curvas DTG do P(HB-HV) e dos nanocompósitos.

Os valores das  $T_{onset}$  e  $T_{m\acute{a}x}$  encontrados estão indicados na tabela 6. Os nanocompósitos, independente do nD utilizado e de sua concentração no material, apresentaram  $T_{m\acute{a}x}$  superior à temperatura para o P(HB-HV) puro. Dessa forma, entende-se que a presença das nanocargas retarda o processo de degradação do polímero.

Tabela 6 – Valores de temperatura de início de degradação e temperatura da máxima taxa de degradação para os insumos puros e os nanocompósitos.

Material		$T_{onset}$ (°C)	$T_{m\acute{a}x}$ (°C)
Nanodiamante	Hydrogen P®	530,2	567,0
	Molto®	527,8	566,2
Polímero	P(HB-HV)	245,4	259,6
Nanocompósitos	M10:1-P	256,0	271,4
	M10:1-I	263,4	280,2
	M20:1-I	266,8	282,1
	H10:1-I	252,8	267,6
	H20:1-I	253,6	272,1

Esse comportamento foi visto por Chen et al., 2007, onde nanocompósitos P(HB-HV)/HA com teores de carga variando entre 10-50% mostraram aumento na  $T_{m\acute{a}x}$ . Os autores atribuíram o notável efeito de barreira na decomposição à obstrução da permeabilidade dos produtos voláteis da decomposição causada pela boa distribuição na nHA.

Em relação a quantidade de carga, os nanocompósitos com mais nanodiamante (M10:1-I e H10:1-I) apresentaram  $T_{onset}$  e  $T_{m\acute{a}x}$  menores que os com menos carga (M20:1-I e H20:1-I). A diminuição pode ser explicada a partir das contribuições devida a interação matriz-carga e ao fato dos nDs terem excelente condutividade térmica (MOCHALIN et al., 2012), possibilitando que o material atinja a temperatura de degradação sem retardo em relação a temperatura do forno, em razão de uma maior e mais rápida propagação de calor. Ambrósio-Martín et al., 2015 avaliaram a estabilidade térmica de nanocompósitos de P(HB-HV) reforçados com nanoplaquetas de grafeno funcionalizado e obtiveram valores inferiores de  $T_{m\acute{a}x}$ , concluindo que esse resultado ocorreu em função do aumento da condutividade térmica gerado pela incorporação do grafeno, que assim como o nD, é um ótimo condutor térmico.

Comparando-se os tipos de carga, verifica-se que os formulados com nD Hydrogen P® apresentaram valores inferiores de  $T_{\text{onset}}$  e  $T_{\text{máx}}$ , para as duas concentrações da nanocarga. Como a mobilidade das cadeias está relacionada com a estabilidade térmica, a presença de cristais também restringe a mobilidade e assim pode considerar-se que a cristalinidade e o tamanho dos cristais afetam a temperatura. Como visto através da deconvolução das curvas de DRX, os nanocompósitos formulados com nD Hydrogen P® mostraram grau de cristalinidade menor do que os formulados com o nD Molto®, logo restringiram menos a mobilidade das cadeias do polímero, o que causou queda em  $T_{\text{onset}}$  e  $T_{\text{máx}}$ . A menor restrição do movimento das cadeias poliméricas também foi constatada pela análise de RMN, em que os mesmos apresentaram valores inferiores de  $T_{1H}$ . Outro motivo que pode ter contribuído é o fato do nD Molto® apresentar menores aglomerados e portanto sua distribuição na matriz é mais efetiva, o que melhora o efeito de barreira.

Com o auxílio das análises por DSC foram obtidos  $T_{f1}$ ,  $T_{f2}$ ,  $\Delta H_f$ ,  $\Delta H_c$  e %Xc. No entanto, não foi possível determinar o valor de  $T_g$  para comparação dos valores obtidos pelo DMA através da análise calorimétrica (DSC) já que a mudança na linha média não ficou nítida na análise nem para o primeiro (Figura 64), nem para o segundo aquecimento (Figura 66). Nota-se que o P(HB-HV) e todos os nanocompósitos apresentaram dois picos de fusão, mesmo de forma mais discreta, para as formulações M10:1-P e H20:1-I no primeiro aquecimento, onde aparece um ombro anexo ao pico principal e por esse motivo não foi possível detectar com precisão as temperaturas de fusão para essa parte da curva. Esse comportamento é comum, pois Yu et al., 2011 já haviam notado a presença de picos duplos para o P(HB-HV) e nanocompósitos a base de nanocristais de celulose, bem como Xie et al., 2009 e Öner e İlhan, 2016 para compósitos de P(HB-HV)/HA.

A existência de picos múltiplos pode ser causada por diversos fatores, como a fusão, recristalização e refusão, polimorfismo, diferença morfológica na espessura, perfeição e distribuição das lamelas, relaxação da fração amorfa rígida e distinção das massas molares dos materiais (Liu; Petermann, 2001).

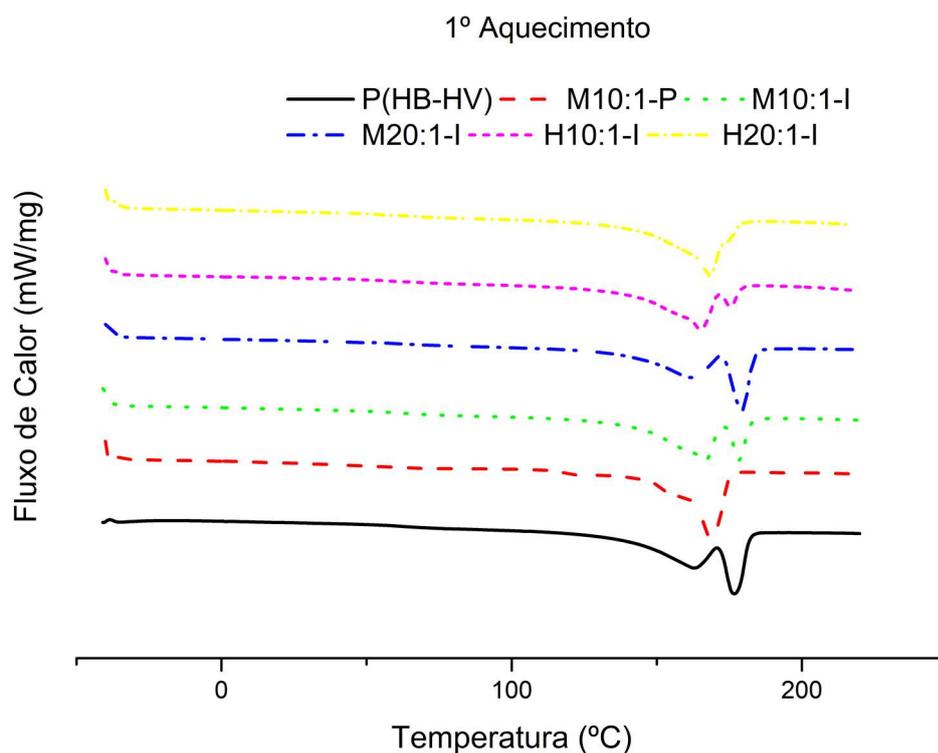


Figura 64 – Curvas referente ao 1º aquecimento obtido através do ensaio de DSC para o P(HB-HV) e os nanocompósitos M10:1-P, M10:1-I, M 20:1-I, H10:1-I e H20:1-I.

Tabela 7 – Valores de  $T_{f1}$ ,  $T_{f2}$ ,  $\Delta H_f$  e  $X_c$  (%) para o P(HB-HV) e nanocompósitos referentes ao 1º aquecimento.

Material		$T_{f1}$ (°C)	$T_{f2}$ (°C)	$\Delta H_f$ (J/g)	$X_c$ (%)
Polímero	P(HB-HV)	162,7	176,7	89,7	61,4
	M10:1-P	-	168,3	75,3	55,9
Nanocompósitos	M10:1-I	167,6	178,2	77,2	56,9
	M20:1-I	161,6	179,4	78,4	56,1
	H10:1-I	165,1	175,4	69,5	52,0
	H20:1-I	167,4	-	74,5	53,7

Na tabela 7 pode ser observado que os resultados de cristalização obtidos por essa análise acompanham a mesma tendência mostrada pela análise de DRX, ou seja, a introdução de nanodiamante diminuiu a cristalinidade do polímero, principalmente para a formulação H10:1-I. O mesmo ocorre com a entalpia de fusão. O motivo para esse comportamento é o mesmo explicado para as análises de DRX. No caso da formulação M10:1-P, a queda mais acentuada em relações as demais formulações com o mesmo nD (M10:1-I e M20:1-I), pode ser explicada pelo diferente

método de preparação do corpo de prova, pois além do teor elevado de nanodiamante, sua estrutura apresentou vários vazios e desprendimento das micropartículas umas das outras, evidenciando que não foi totalmente fundido o P(HB-HV) no processo de confecção do corpo de prova, o que pode ter dificultado o rearranjo dos cristais no processo de cristalização e conseqüentemente afetar o grau de cristalização e a entalpia de fusão. Nessa tabela também foi descrita a temperatura de fusão do primeiro e segundo picos, onde é possível observar que as temperaturas de fusão estão bem próximas. Nota-se que todos os nanocompósitos com nD Molto® apresentaram o segundo pico de fusão ( $T_{f2}$ ) mais intensos que os nanocompósitos com nD Hydrogen P®. Evidenciando dessa forma que como a maior parte do material funde a temperaturas maiores, o nD Molto® induz a formação de cristais mais perfeitos e em maior proporção que o nD Hydrogen P®, provavelmente causado por uma melhor distribuição da nanocarga na matriz, pois a mesma está menos aglomerada e atua melhor como agente nucleador.

Através do resfriamento obtemos a temperatura e entalpia de cristalização. Na figura 65 é possível comparar as curvas do P(HB-HV) e dos nanocompósitos e os valores estão descritos na tabela 8. As temperaturas de cristalização foram maiores para todos os nanocompósitos se comparado com o P(HB-HV). Isso acontece devido à ausência de agentes de partículas nucleadoras no copolímero, reduzindo a temperatura de início de cristalização. As formulações com maior quantidade de nanodiamante (M10:1-P, M10:1-I e H10:1-I), apresentam temperaturas de início de cristalização inferiores que as com menor quantidade de carga (M20:1-I e H20:1-I) se comparadas as formulações com o mesmo tipo de nanodiamante. Isso está em acordo com o argumento de Jee e Lee, 2011 descrito no DRX, ou seja, acontece uma competição entre os efeitos de nucleação e retardo (bloqueio) da cristalização. A adição de maior quantidade de cargas, apesar de atuar também como agentes de nucleação, ao mesmo tempo agem impedindo o movimento dos segmentos da cadeia polimérica, o que atrapalha o processo (JEE; LEE, 2011). Outro fator é que quanto maior a quantidade de carga aumenta a tendência de apresentar aglomerados maiores (Zhao et al., 2010), dessa forma, os agentes nucleantes (reforço) não ficam em contato direto com a matriz.

Já analisando o tipo de nanodiamante, as formulações H10:1-I e H20:1-I apresentam temperaturas de cristalização inferiores causado pela maior aglomeração do nD Hydrogen P®.

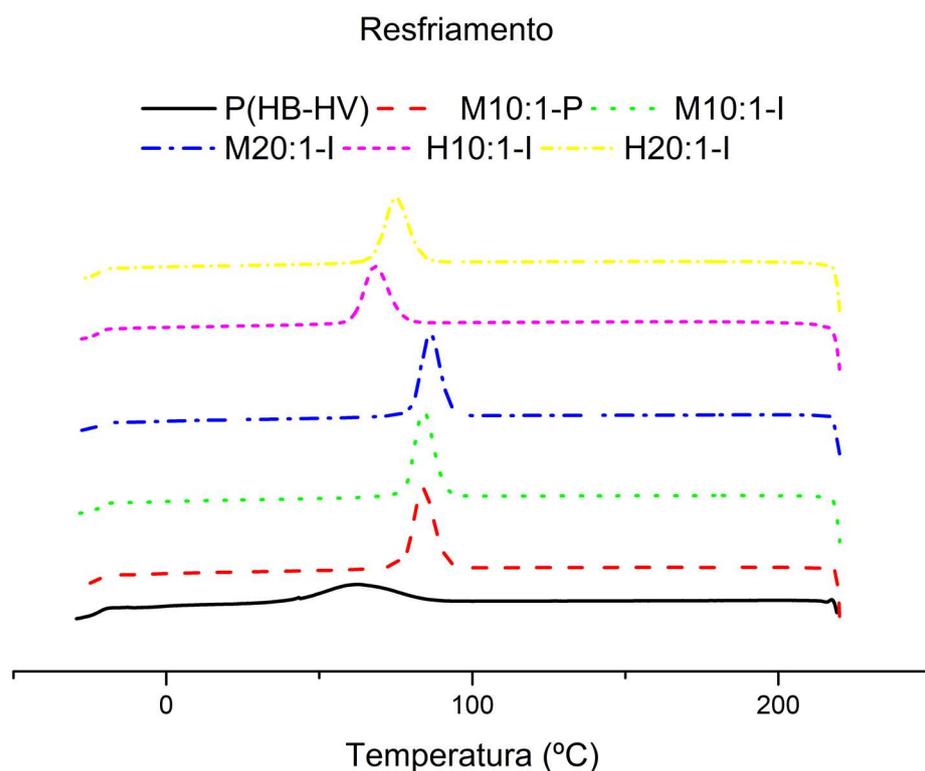


Figura 65 – Curvas referente ao resfriamento obtido através do ensaio de DSC para o P(HB-HV) e os nanocompósitos M10:1-P, M10:1-I, M20:1-I, H10:1-I e H20:1-I.

Tabela 8 – Valores de  $T_c$ ,  $\Delta H_c$  e para o P(HB-HV) e nanocompósitos referentes ao resfriamento.

Material		$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)
Polímero	P(HB-HV)	62,3	46,0
	M10:1-P	84,0	59,6
Nanocompósitos	M10:1-I	84,1	60,4
	M20:1-I	86,2	58,9
	H10:1-I	68,3	51,4
	H20:1-I	75,1	56,0

O comportamento do material foi muito similar durante o segundo aquecimento (Figura 66). Somente o P(HB-HV) apresentou pico de cristalização, pois praticamente não havia cristalizado durante o resfriamento. Já para os nanocompósitos, não apareceu nenhum pico de cristalização assim como no primeiro aquecimento, mostrando que o material se cristalizou totalmente durante o resfriamento. As temperaturas de fusão foram muito similares ao do primeiro aquecimento, mas ligeiramente inferiores, assim como a entalpia de fusão (Tabela 9). Isso provavelmente

foi ocasionado devido ao primeiro aquecimento ser realizado até 220°C, temperatura na qual o P(HB-HV) pode ter parcialmente degradado e com isso sua massa molar pode ter sido reduzida. O aquecimento e fusão até temperatura elevada, no caso 220°C, além de contribuir para degradação do mesmo, dificulta a análise e discussão sobre as diferenças do polímero e nanocompósitos, pois foram desfeitas as características estruturais originais.

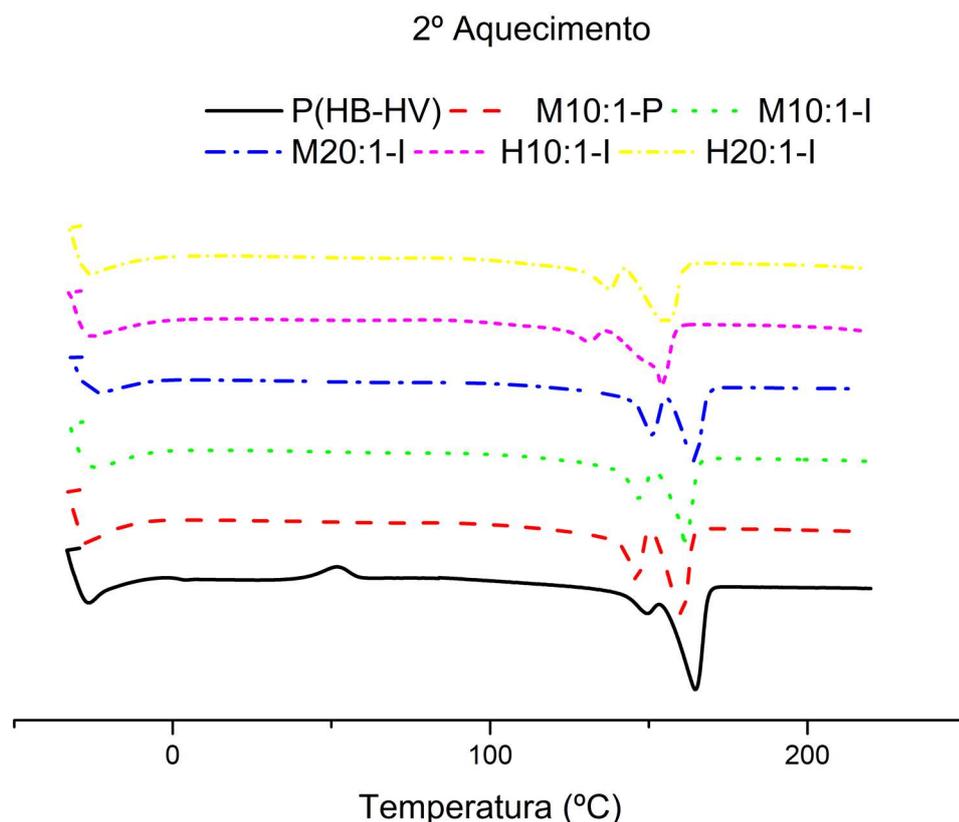


Figura 66 – Curvas referente ao 2º aquecimento obtido através do ensaio de DSC para o P(HB-HV) e os nanocompósitos M10:1-P, M10:1-I, M20:1-I, H10:1-I e H20:1-I.

Tabela 9 – Valores de  $T_{f1}$ ,  $T_{f2}$ ,  $\Delta H_f$ ,  $T_c$ ,  $\Delta H_c$  para o P(HB-HV) e nanocompósitos referentes ao 2º aquecimento.

Material		$T_{f1}$ (°C)	$T_{f2}$ (°C)	$T_c$ (°C)	$\Delta H_f$ (J/g)	$\Delta H_c$ (J/g)
Polímero	P(HB-HV)	149,6	164,7	51,8	81,5	8,5
	M10:1-P	146,3	160,3	-	71,3	-
Nanocompósitos	M10:1-I	146,8	161,3	-	70,3	-
	M20:1-I	151,0	164,2	-	60,8	-
	H10:1-I	131,0	154,1	-	56,8	-
	H20:1-I	137,6	155,3	-	65,2	-

De forma geral, é possível afirmar que a adição de nanodiamante fez com que a recristalização iniciasse em temperaturas superiores já que esse atua como agente nucleante. Porém, devido à quantidade de carga e aglomeração da mesma, atuaram de forma mais intensa como bloqueio do processo de recristalização total já que a cristalização diminuiu, principalmente para a formulação H10:1-I.

#### 4.3.2.2 Avaliação das propriedades mecânicas

Os corpos de prova foram submetidos a ensaios de flexão e os valores de limite de resistência à flexão, deformação até a ruptura e módulo de elasticidade foram calculados através dos dados obtidos durante os ensaios utilizando as equações 7, 8 e 9.

Nas figuras 67 e 68 são mostrados o comportamento das curvas tensão deformação para os corpos de prova feitos na injetora e a comparação do comportamento da curva entre ambos os métodos de preparação, respectivamente. Foram utilizadas como exemplo curvas das amostras que apresentaram valores de módulo próximos a média. Nota-se um comportamento linear para todos os corpos de prova feitos na injetora, apresentando uma curva característica de material com comportamento rígido e frágil. No entanto, o preparado na prensa se diferencia bastante, apresentando menor tensão e menor módulo, provavelmente causado pelos espaços entre as micropartículas encapsuladas (ver figura 71 D).

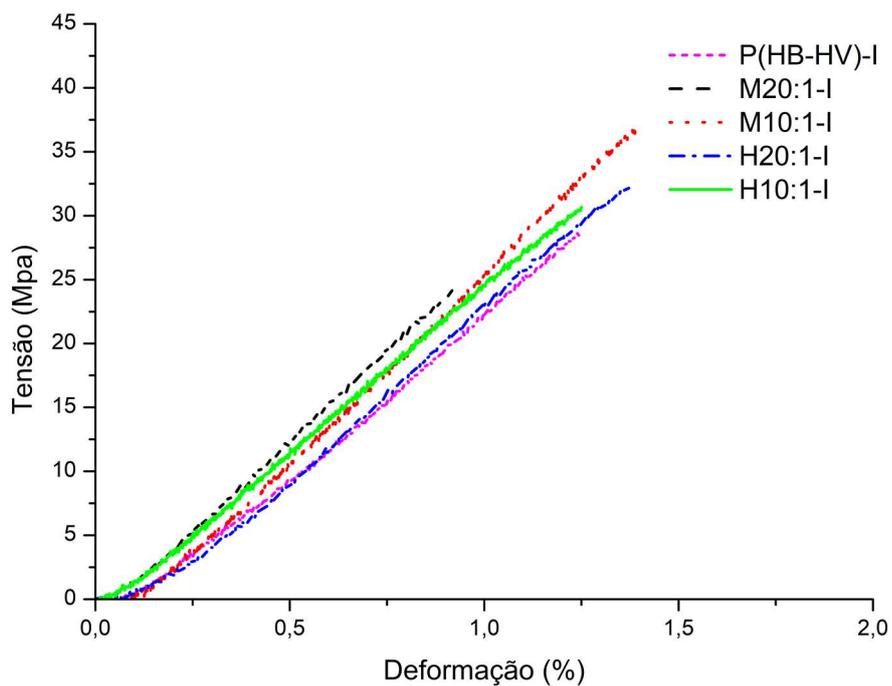


Figura 67 – Exemplo do comportamento do gráfico tensão versus deformação para corpos de prova preparados na injetora obtidos nos ensaios de flexão.

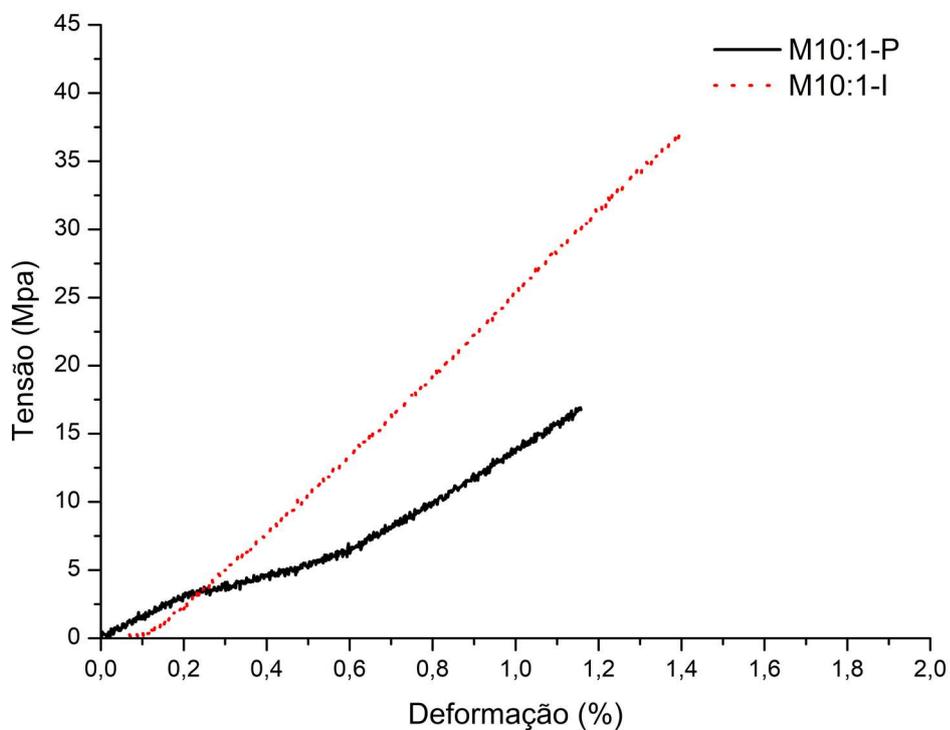


Figura 68 – Exemplo do comportamento do gráfico tensão versus deformação para corpos de prova preparados na injetora e prensa obtidos nos ensaios de flexão.

As figuras 69 e 70 mostram valores médios e desvio padrão de módulo de elasticidade, limite de resistência a flexão e deformação até a ruptura para ambos os métodos de fabricação (prensa x injetora).

As propriedades mecânicas dos corpos de prova moldados na prensa são inferiores aos moldados por injeção. Isso pode ser justificado pela presença de vazios e desprendimento de partículas na superfície da fratura da amostra, como mostrado na figura 71 (C e D). Esses defeitos foram originados pela inexistência de total fusão de polímero, uma vez que a temperatura de moldagem foi de 105°C e isso promoveu uma estrutura descontínua, pois se usado temperaturas próximas a temperatura de fusão poderia ocorrer vazamento do material através dos componentes do molde. Esse fato provavelmente limitou o potencial de aumento nas propriedades para as amostras M10:1-P.

No entanto, os moldados por injeção (M10:1-I), mostraram aumento expressivo nas propriedades mecânicas ( $E$ ,  $\sigma_m$  e  $\epsilon$ ) em comparação com os moldados na prensa. Isso pode ser justificado pela estrutura contínua, isto é, melhor compactação de polímero e distribuição homogênea de nD (Figura 71 (A e B), conhecido por sua alta rigidez e dureza.

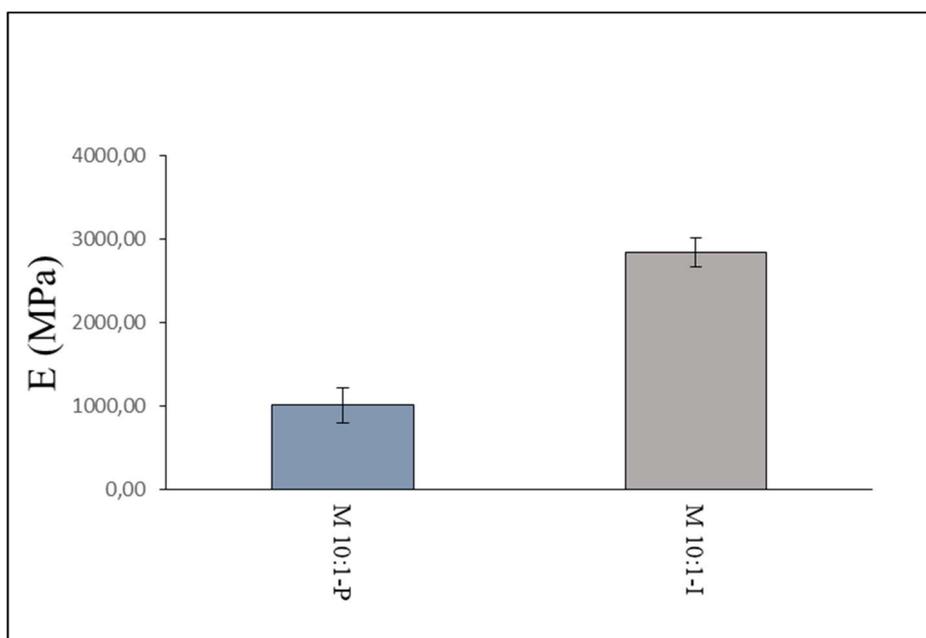


Figura 69 – Valores do módulo de elasticidade obtidos através dos ensaios de flexão para as formulações M10:1-P e M10:1-I.

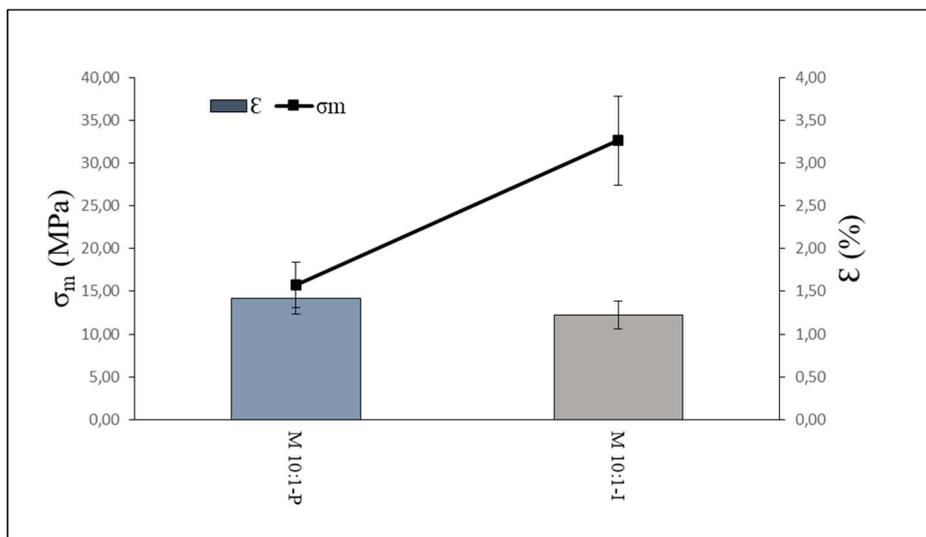


Figura 70 – Valores de tensão e deformação obtidos através dos ensaios de flexão para as formulações M10:1-P e M10:1-I.

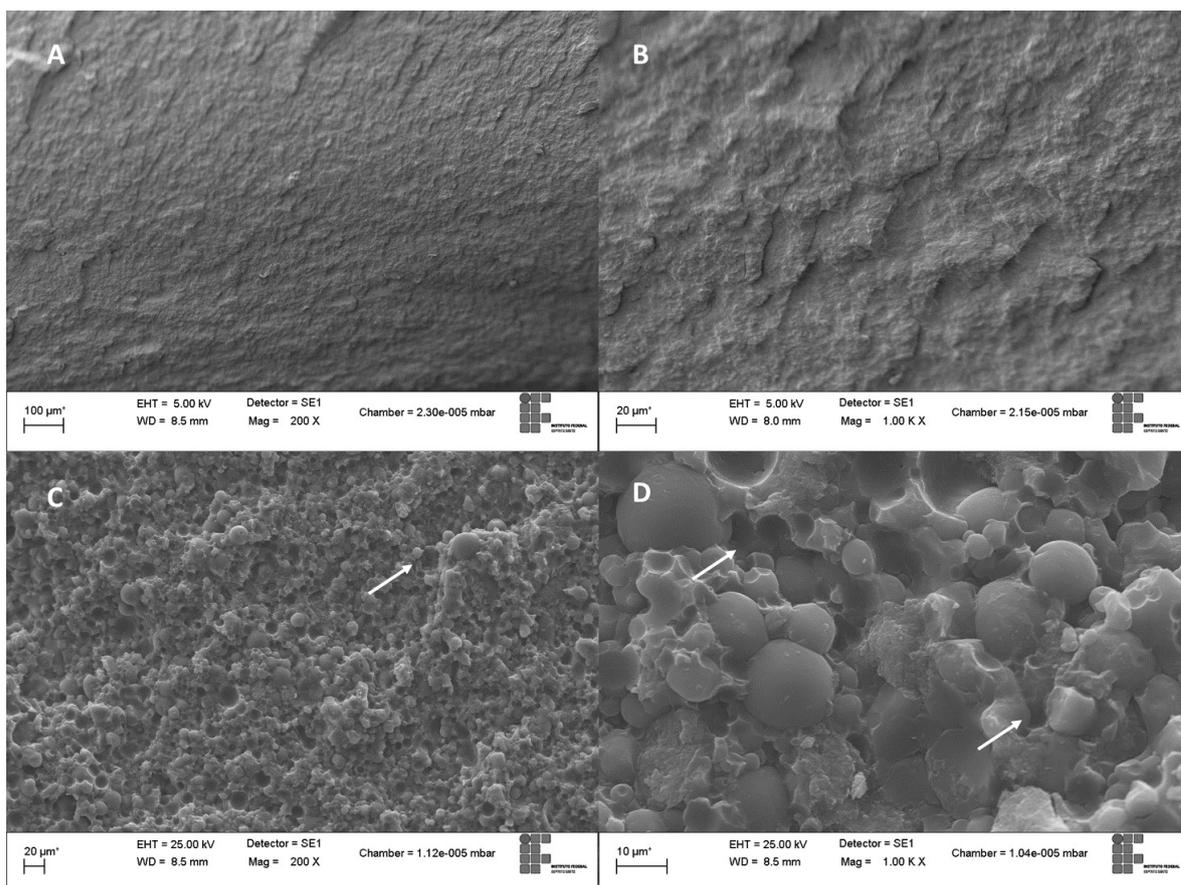


Figura 71 – Micrografias da superfície de fratura das amostras com aumentos de 200x, 1000x da primeira para segunda coluna. As micrografias (A) e (B) correspondem ao M10:1-I; (C) e (D) correspondem ao M10:1-P. Vazios e descolamento de partículas estão indicados por setas.

Por apresentar melhores resultados, com uma estrutura mais compacta e homogênea, os corpos de prova das demais formulações foram fabricados na injetora e utilizados para no restante das análises que visaram comparar à quantidade e tipos de carga (Molto® x Hydrogen P®).

Os valores médios e desvio padrão de módulo de elasticidade, limite de resistência a flexão e deformação até a ruptura são mostrados nas figuras 72 e 73.

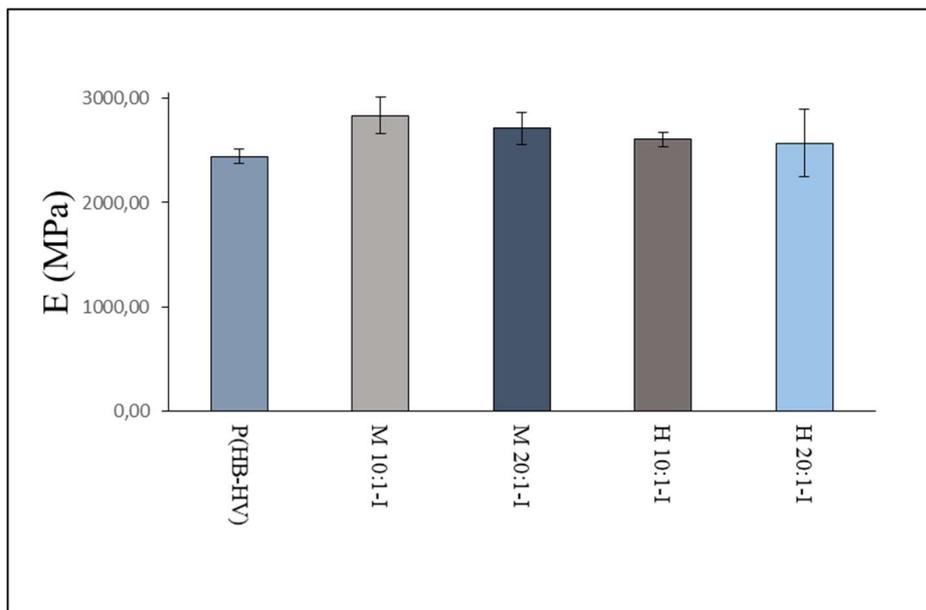


Figura 72 – Valores do módulo de elasticidade obtidos através dos ensaios de flexão para as formulações P(HB-HV), M10:1-I, M20:1-I, H10:1-I e H20:1-I.

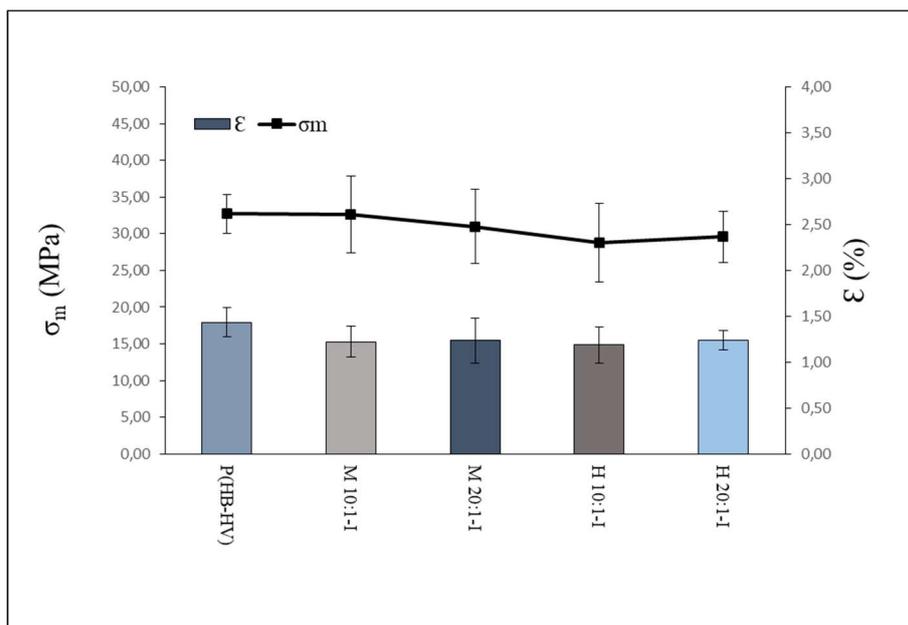


Figura 73 – Valores de tensão e deformação obtidos através dos ensaios de flexão para as formulações P(HB-HV), M10:1-I, M20:1-I, H10:1-I e H20:1-I.

Nota-se que todos os nanocompósitos apresentaram valores de módulo de elasticidade superiores ao P(HB-HV) puro. Esse efeito é devido a carga apresentar maior módulo de elasticidade que a matriz. Considerando o desvio padrão, a tensão máxima não varia de forma significativa em relação à quantidade de carga e tipo de nanodimante, mas apresenta uma leve tendência de queda para o nD Hydrogen P®. Já a deformação máxima ficou inferior para os nanocompósitos se comparado com o P(HB-HV), mas praticamente não variou entre eles. A queda é esperada uma vez que as partículas agem restringindo a deformação das cadeias poliméricas.

Apesar do nD Hydrogen P® apresentar superfície mais hidrofóbica devido à presença de hidrogênio (MOCHALIN et al., 2012), como pode ser concluído através dos resultado de FTIR (Figura 40) e pela queda de O1s nos resultado de XPS (Figuras 41 e 42), ou seja, mais compatível com o P(HB-HV) que também é hidrofóbico (HOLMES, 1995; GANDINI; BELGACEM, 2008), a tendência de queda das propriedades pode ser explicada pela maior aglomeração das partículas que foi observada pelo MEV FEG (Figura 37), pelo ensaio de granulometria realizado no NANOPHOX (Figura 35) e a mais difícil dispersão observada nos ensaios de granulometria no HELOS (Figuras 33 e 34). Os aglomerados, em tamanhos maiores, presentes nos compósitos H10:1-I e H20:1-I podem ter atuado como concentradores de tensão, enfraquecendo o material e diminuindo a rigidez. Além desse fato, o DRX (Figura 38) mostrou que o nD Hydrogen P® apresentou um halo de carbono amorfo e um pico provavelmente de grafite, ou seja, os valores das propriedades inferiores encontrados podem ter sido influenciados também por esse fator.

Ainda como agravante para as propriedades, através das micrografias da região de fratura, apesar de observar-se de forma geral uma fase contínua para o polímero puro e todos os nanocompósitos (Figuras 74, 75 e 76), especificamente para os compósitos H10:1-I e H20:1-I foram observadas também trincas (Figura 77 A e B) que podem ter ocorrido durante o processo de fratura causadas pela concentração de tensão devido aos aglomerados de nD Hydrogen P® com dimensões micrométricas maiores que o Molto®, gerando vazios e menores superfícies de contato. A soma de todos esses fatores descritos, afetaram a melhoria das propriedades destes nanocompósito, mesmo o nD Hydrogen P® tendo uma superfície mais hidrofóbica, assim como a matriz que é essencialmente hidrofóbica do P(HB-HV).

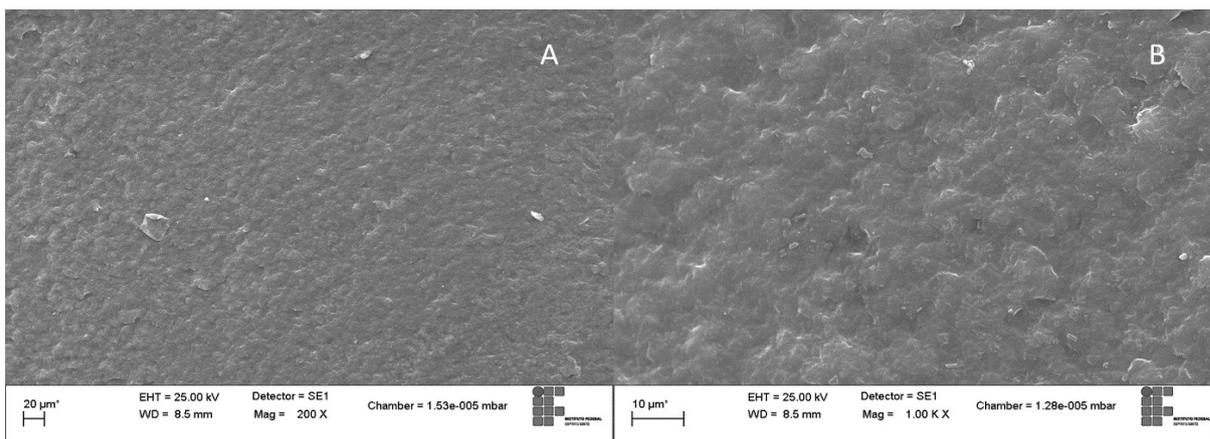


Figura 74 – Micrografias da superfície de fratura das amostras com aumentos de 200x (A), 1000x (B) para o P(HB-HV).

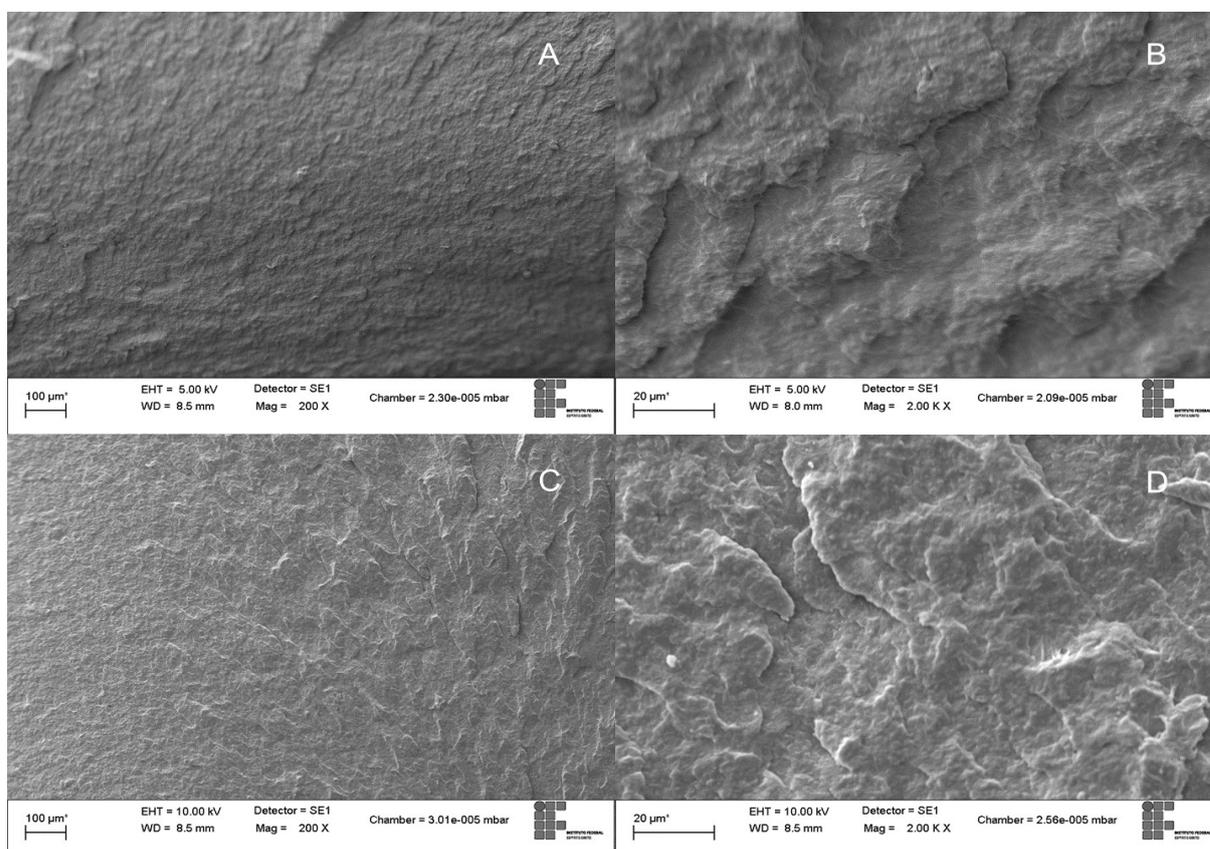


Figura 75 – Micrografias da superfície de fratura das amostras com aumentos de 200x, 2000x da primeira para segunda coluna. As micrografias (A), (B) correspondem ao M10:1-I e (C), (D) ao M20:1-I.

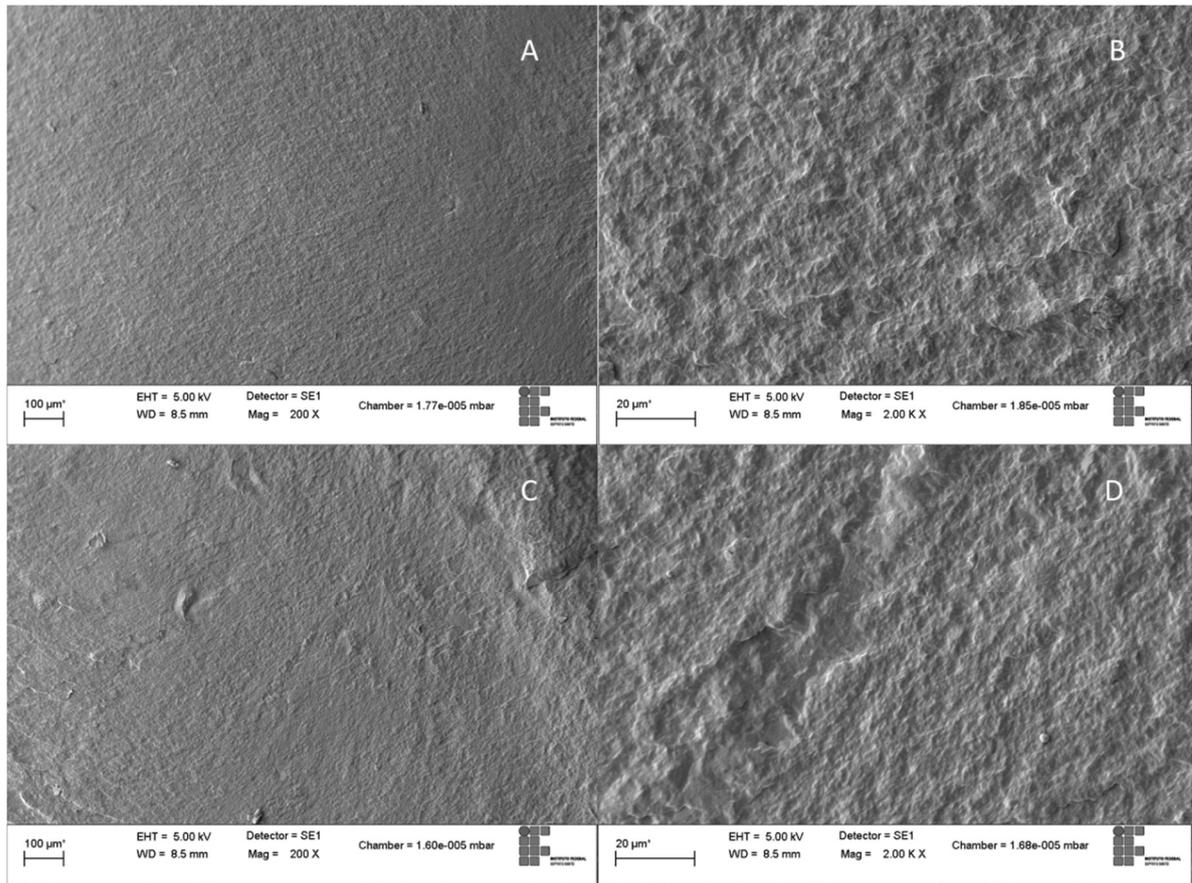


Figura 76 – Micrografias da superfície de fratura das amostras com aumentos de 200x, 2000x da primeira para segunda coluna. As micrografias (A), (B) correspondem ao H10:1-I e (C), (D) ao H20:1-I.

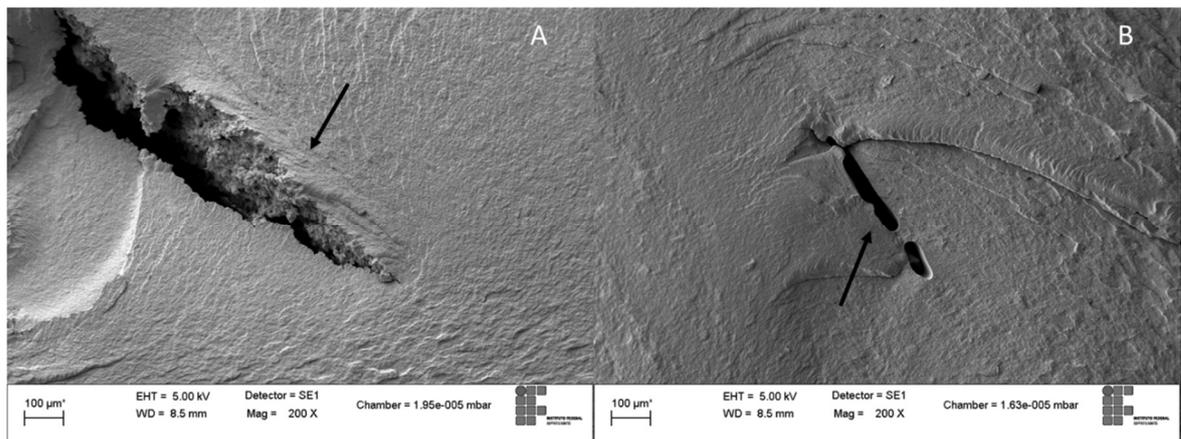


Figura 77 – Micrografias da superfície de fratura das amostras com aumentos de 200x para H10:1-I (A) e H20:1-I (B). Trincas indicadas por setas.

Através do MEV FEG obteve-se aumentos de 30000x (Figura 78). No entanto, apesar de metalizadas, as amostras sofreram um processo de aquecimento pela incidência do feixe de elétrons que gerou um processo de degradação localizada da

camada superficial, o que prejudicou a obtenção de foco principalmente das amostras com o nanodiamante Molto®. Mas mesmo assim foi possível observar a boa distribuição e interação das nanopartículas na matriz, com mais nitidez para as amostras H10:1-I e H20:1-I. Para amostras com o nanodiamante Hydrogen P® observou-se que a carga, apesar de bem distribuída e com boa interface com a matriz, apresenta-se com aglomerados maiores, indicados pelas setas. Nota-se também a presença de tricas nas amostras H10:1-I e H20:1-I, que foram formadas por concentração de tensão nos aglomerados durante o esforço de flexão, causando a propagação das mesmas e explicando a tendência de menores valores de propriedades mecânicas. As micrografias da região de fratura mostram-se coerentes com os resultados das granulometrias obtidas pelo HELOS e NANOPHOX e pela micrografia dos nanodiamantes que indicam aglomerados em dimensões maiores para as nanopartículas Hydrogen P®.

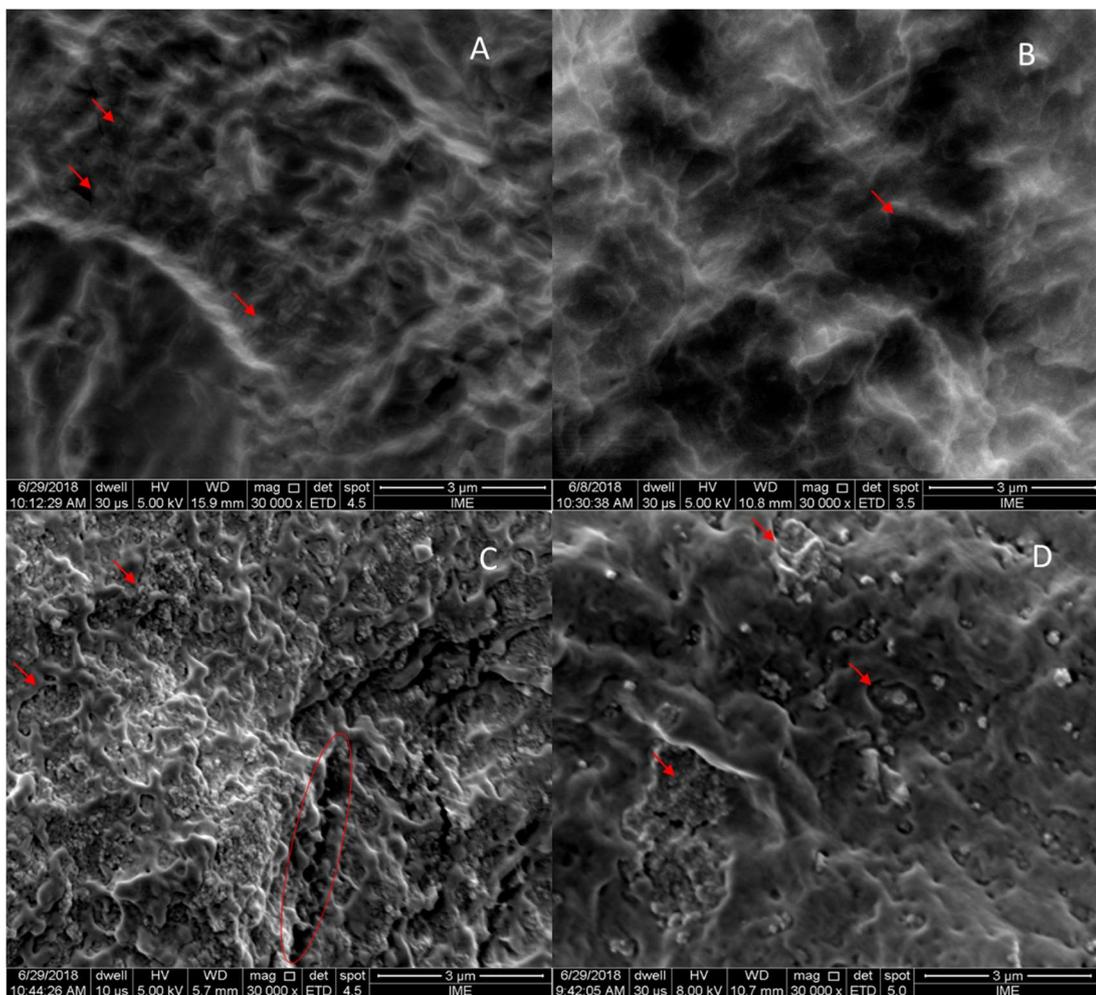


Figura 78 – Micrografias da superfície de fratura das amostras com aumento de 30000x. Sendo M10:1-I (A), M20:1-I (B), H10:1-I (C) e H20:1-I (D). As setas indicam os aglomerados de nanodiamante e o círculo uma trinca.

Observando a curva gerada pelo modelo “Lewis-Nielson” na figura 79, nota-se que a influência de  $K_e$ , que representa se a interface é fraca ou forte, cresce com o aumento da carga. Percebe-se que com exceção da formulação M10:1-P, todas as formulações feitas na injetora apresentaram valores superiores ao previsto pelo modelo com fraca interação, indicando melhora significativa nas propriedades com a produção do nanocompósitos. Logo, pode-se deduzir que o encapsulamento e o método de produção dos corpos de prova utilizando a injetora foram adequados para garantir boa distribuição dos nanodiamantes e efetivo contato com a matriz. Conforme já esperado baseado nos resultados discutidos anteriormente, a formulação M10:1-I e M20:1-I se destacaram e apresentaram valores melhores que as demais ao ser comparada com o modelo. Isso se deve, pois como visto pela análise de DRX (Figura 38), o nD Molto® apresentou alto grau de pureza e menor agregação de acordo com os ensaios de granulometria, permitindo assim obter melhores propriedades.

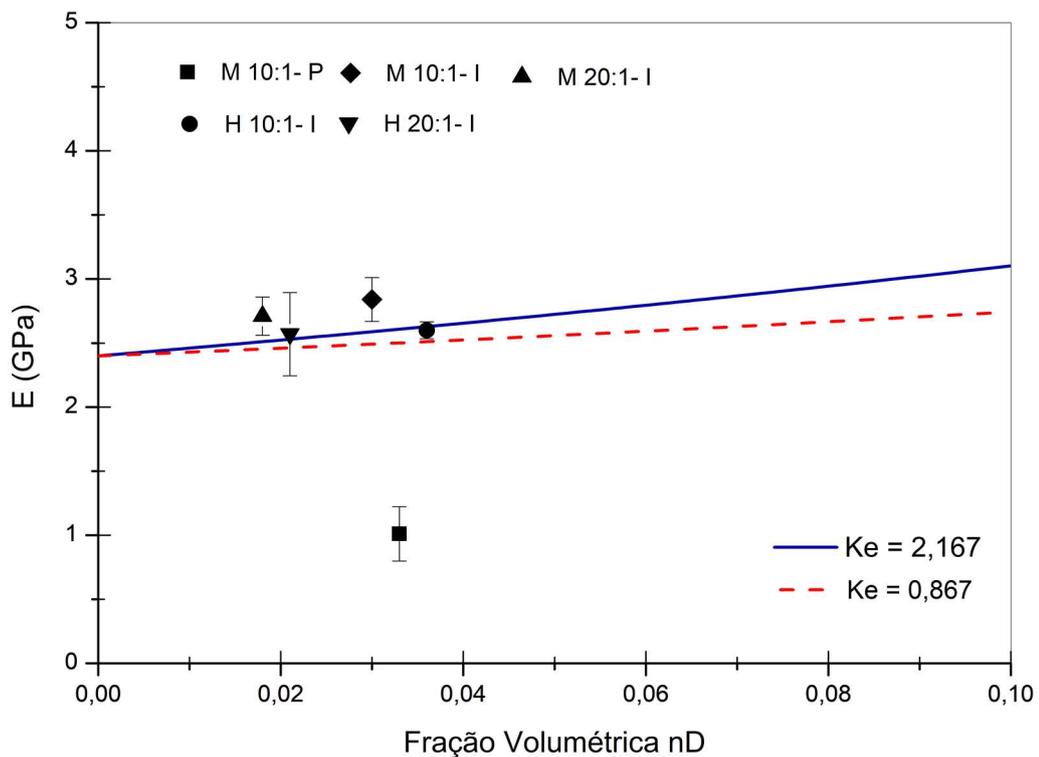


Figura 79 – Comparação dos valores calculados (modelo Lewis-Nielson) e determinados de forma experimental (ensaio de flexão) para os nanocompósitos.

Os valores do módulo de elasticidade obtidos através do ensaio de indentação (Figura 80) mostraram uma tendência similar aos ensaios de flexão, pois os nanocompósitos com nD Hydrogen P® apresentaram novamente uma tendência a

queda em relação ao nD Molto®. A formulação M10:1-P se apresentou inferior a formulação M10:1-I, como aconteceu no ensaio de flexão, e manteve menores propriedades se comparado aos demais nanocompósitos. A formulação M20:1-I apresentou melhores resultados se comparado com o P(HB-HV) e as demais formulações M10:1-I, H10:1-I e H20:1-I. Esse comportamento pode ser associado ao fato que para quantidade de cargas menores, os nanodiamantes tendem a apresentar aglomerados em menor tamanho e além disso o nD Molto® possui alto grau de pureza e menor agregação, permitindo assim obter melhor distribuição e contato matriz-carga, o que causou melhores resultados nas propriedades mecânicas.

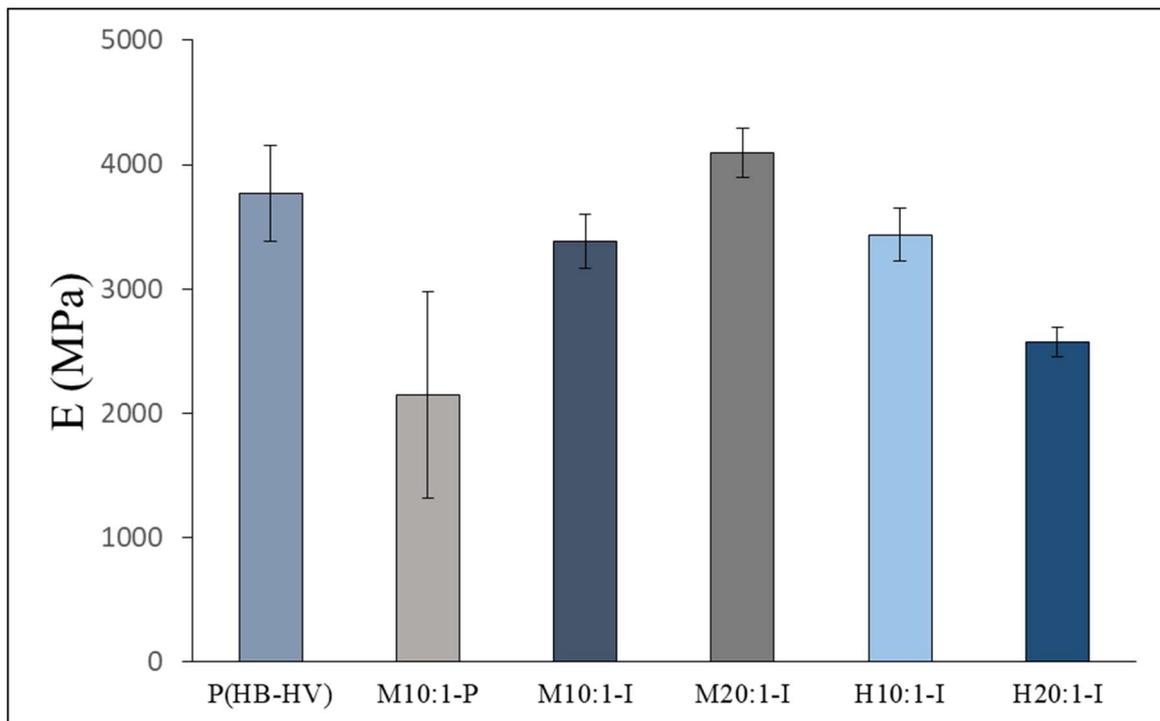


Figura 80 – Valores do módulo de elasticidade obtidos através dos ensaios de indentação para as formulações P(HB-HV), M10:1-P, M10:1-I, M20:1-I, H10:1-I e H20:1-I.

Apesar da dificuldade de reportar um valor único representativo para as propriedades mecânicas do osso, pois irá depender de diversas características do doador como a idade, gênero, espécie, do tamanho e local de retirada da amostra, além da forma de preparação dos corpos de prova, do ensaio realizado, a direção do carregamento, dentre outros (CHOI et al., 1990; BLACK; HASTING, 1998), para fim de comparação e análise da viabilidade na aplicação pretendida, na tabela 10 são descritos os valores obtidos por Choi et al., 1990 para amostras retiradas da tíbia humana e os obtidos experimentalmente para o P(HB-HV) e os nanocompósitos

através do ensaio de flexão. É possível verificar que o módulo de elasticidade encontrado para os nanocompósitos, com exceção da formulação M10:1-P, foram superiores aos valores reportados por Choi et al., 1990 para o osso subcondral. Já para o osso cortical e trabecular, os valores que mais se aproximam são os dos corpos de prova produzidos pela injetora, principalmente o M10:1-I e M20:1-I. A similaridade nos valores indica que o material produzido possui propriedades promissoras para o uso como prótese óssea, já que com materiais que apresentam módulo elástico muito superior ao do osso humano, há um fenômeno conhecido como *stress shielding*, que causa uma blindagem mecânica poupando osso de receber carga. O problema disso é que quanto menor a carga aplicada, acaba por fragilizá-lo, uma vez que menores cargas aplicadas ao osso levam a uma diminuição da porosidade (ELIAZ; METOKI, 2017).

Tabela 10 – Comparação do módulo do P(HB-HV) e nanocompósitos com o módulo do osso humano (amostra retirada da tíbia).

Material		E (GPa)	Desvio Padrão (GPa)
Polímero	P(HB-HV)	2,44	0,06
Nanocompósitos	M10:1-P	1,01	0,22
	M10:1-I	2,84	0,17
	M20:1-I	2,71	0,15
	H10:1-I	2,60	0,06
	H20:1-I	2,57	0,32
	Osso (Tíbia) (CHOI et al., 1990)	Subcondral	1,15
Trabecular Vertical		4,87	1,84
Trabecular Horizontal		3,83	0,45
Trabecular Total		4,59	1,60
Cortical		5,44	1,25

#### 4.3.2.3 Avaliação do comportamento dinâmico mecânico

Devido ao impacto dos aglomerados e da superfície de contato matriz-carga (interface) nas propriedades dos materiais nanocompósitos, avaliou-se por meio de DMA a interação da matriz com carga, ou seja, a efetividade da interface formada entre os componentes do compósito. Isso, por sua vez, pode influenciar as propriedades viscoelásticas (KUBÁT et al., 1990).

Na figura 81 é possível ver as curvas de tan Delta para as formulações M10:1-I, M20:1-I, H10:1-I e H20:1-I. A Tg representa a faixa de temperatura onde começam os movimentos conformacionais, sendo assim, geralmente interações fortes entre as nanopartículas e a matriz polimérica são associadas ao aumento do valor da temperatura, já que uma interface forte tende a restringir o movimento das cadeias do polímero próximas as partículas (KUBÁT et al., 1990; RONG et al., 2004). Com base nisso, percebemos que os nanocompósitos M10:1-I e M20:1-I apresentaram melhor interação com a matriz do P(HB-HV), já ambos obtiveram valores de Tg superiores (19,4°C), se comparado com os nanocompósitos formulados com nD Hydrogen P®. A formulação H10:1-I apresentou a menor temperatura de Tg (15,4°C), ou seja, restringiu menos os movimentos conformacionais que as demais formulações. Esses resultados estão de acordo com os valores de T<sub>1H</sub> obtidos pela análise de RMN, que mostraram maiores valores para as formulações M20:1, M10:1, H20:1 e H10:1 respectivamente. Isso ajuda a explicar o fato do H20:1-I apresentar Tg superior ao H10:1-I. Mesmo que nD Hydrogen P® seja mais hidrofóbico, como o mesmo apresenta aglomerados maiores como visto pela análise granulométrica, implica numa menor superfície de contato matriz-carga, limitando a efetiva restrição dos movimentos conformacionais. BARROS Jr.,2014 em seu estudo observou uma Tg menor para a formulação PHB/nD com quantidades maiores de carga, na qual existia aglomerados da carga em grande extensão, o que causou uma segregação de fase. Além disso, como foi visto pela análise de DRX, essa carga apresentou carbono amorfo e provavelmente um pico de grafite juntamente com o diamante. Sabendo que o grafite possui a capacidade de deslizamento entre suas camadas, isso também pode ter contribuído para que o movimento das cadeias poliméricas começassem em menores temperaturas.

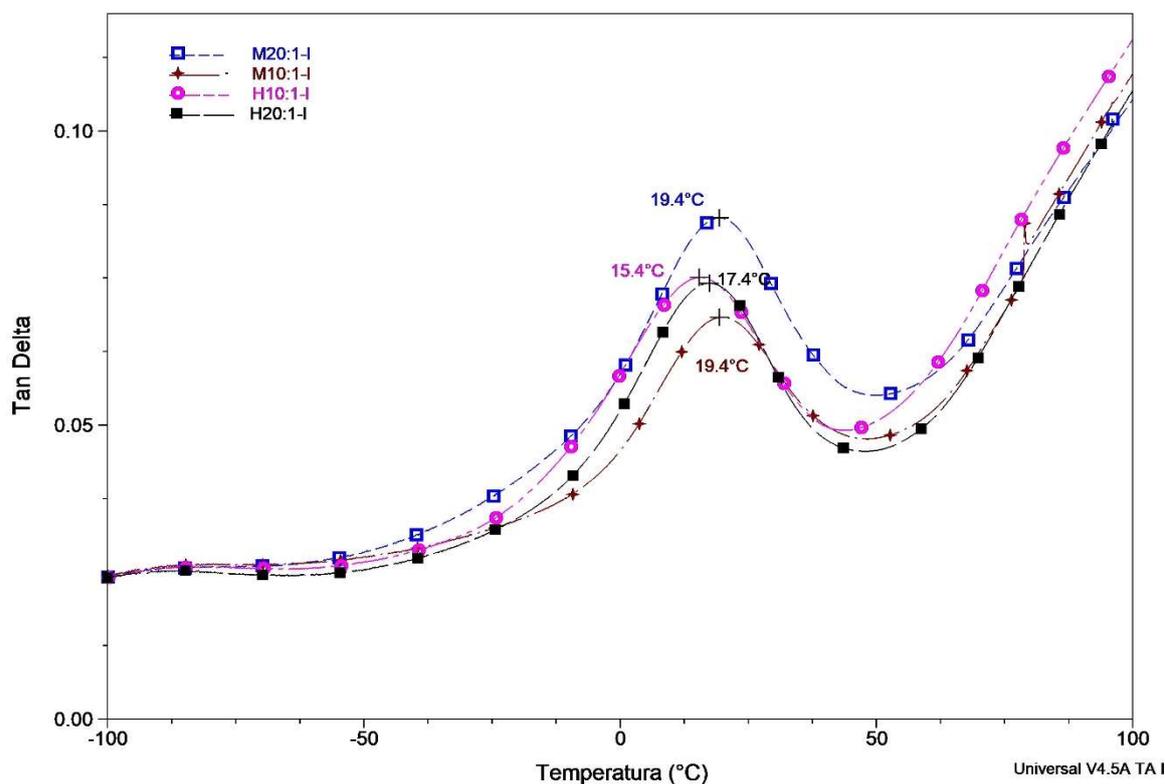


Figura 81 – Curvas de tan Delta obtidas através do ensaio de DMA para as formulações M10:1-I, M20:1-I, H10:1-I e H20:1-I. Obs.: A temperatura indicada na curva se refere a Tg.

A figura 82, mostra as curvas do módulo de armazenamento dos nanocompósitos. Observa-se que a medida que a temperatura aumenta, o valor do módulo de armazenamento diminui para todas as formulações, isso se deve pelo aumento da mobilidade das cadeias poliméricas e do seu volume livre. No entanto, essa diminuição é menos expressiva na parte vítrea, uma vez que nessa região os movimentos conformacionais são inibidos, havendo somente pequenos movimentos localizados. A partir da Tg, percebe-se uma queda mais acentuada, devido ao início dos movimentos conformacionais.

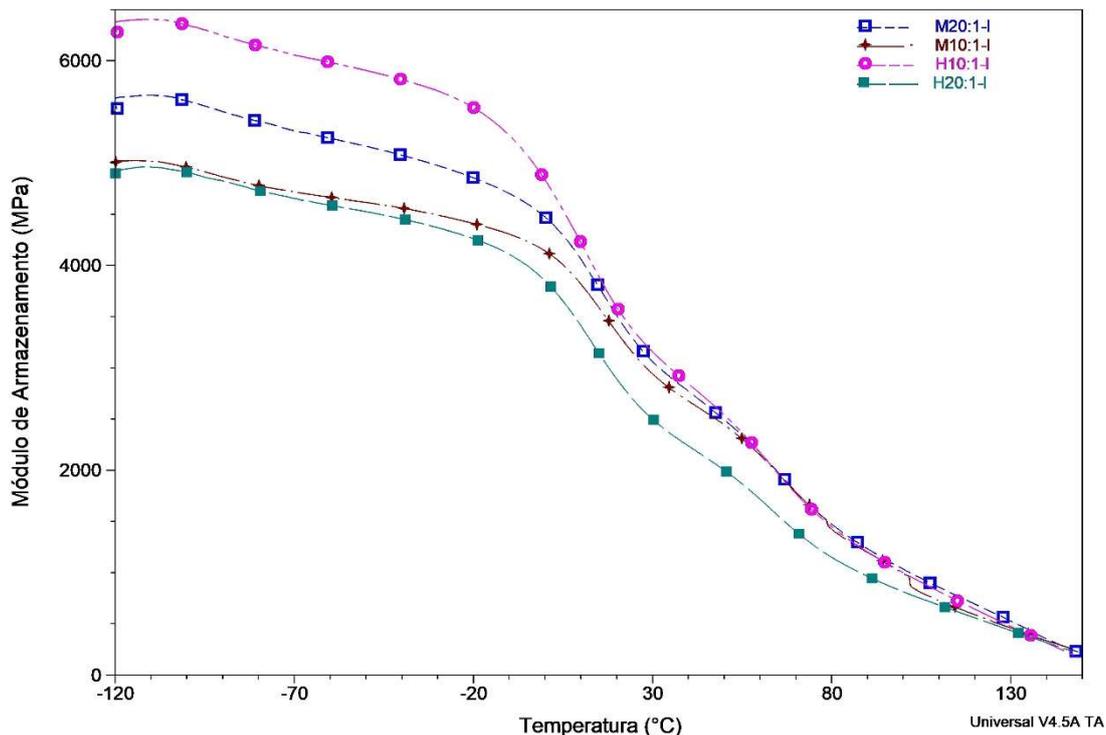


Figura 82 – Curvas do módulo de armazenamento obtido através do ensaio de DMA para as formulações M10:1-I, M20:1-I, H10:1-I e H20:1-I.

Sabendo que a  $\tan \Delta$  é a razão entre o módulo de perda e o módulo de armazenamento, a variação da intensidade também pode ser um indicativo para avaliar a qualidade da interface entre a matriz e a carga (KUBÁT et al., 1990). A diminuição da intensidade do pico de  $\tan \Delta$  sugere uma melhor interface, uma melhor adesão, e conseqüentemente menor dissipação de energia nessa região (CORREA et al., 2007; KUBÁT et al., 1990). Isso porque uma interface ruim favorece o atrito carga-matriz e por tanto a contribuição relativa do módulo de perda é maior, assim a intensidade do pico  $\tan \Delta$  aumenta. Leal et al., 2016 associaram menores alturas de  $\tan \Delta$  para os nanocompósitos PLLA-MWCNT (nanotubos de carbono) com 0,25, 0,5 e 1% se comparado com o polímero puro à uma maior rigidez do material causada pela adição de carga. No entanto, a efetividade do reforço na rigidez do material pode ser calculada através do coeficiente C (equação 10) (POTHAN et al., 2003).

Se formos analisar só a altura de  $\tan \Delta$ , poderíamos concluir que a formulação M20:1-I apresentou menor rigidez que as demais feitas na injetora, o que pode estar associado ao fato dessa formulação apresentar menor quantidade de

carga, 4,7% (Figura 59). Mas ao calcular  $E'v / E'b$  considerando o módulo de armazenamento nas temperaturas de  $-40^{\circ}\text{C}$  e  $50^{\circ}\text{C}$  respectivamente, os valores encontrados foram 1,87 (M10:1-I), 2,03 (M20:1-I), 2,29 (H10:1-I), 2,22 (H20:1-I). Ou seja, mesmo com o menor valor de carga, a formulação M20:1-I, apresentou maior efetividade em melhorar a rigidez que ambas as formulações com o nD Hydrogen P®. A formulação M10:1-I apresentou maior rigidez e foi mais efetiva como reforço, como visto pela menor altura de tan Delta e menor valor do coeficiente C. Isso pode ser explicado pelo fato dela apresentar um teor de carga maior se comparada com a formulação M20:1-I e o nD Molto® apresentar aglomerados em menores tamanhos. As formulações H10:1-I e H20:1-I apresentaram alturas de tan Delta muito próximas e intermediárias entre as demais formulações. Os maiores valores de  $E'v / E'b$  se comparado as formulações M10:1-I e M20:1-I é provavelmente causado pelos mesmos motivos já discutidos acima. Esses resultados se mostram em conformidade os resultados de flexão.

#### 4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS “*IN VITRO*”

Como o NO é um mediador inflamatório, a sua produção pelos macrófagos em contato com material estranho ao organismo é um indicativo de citotoxicidade. Assim, para realização da análise de indução inflamatória foram retiradas pequenas partes dos corpos de prova do P(HB-HV) e dos nanocompósitos e colocadas em poços das placas de cultura celular. Foi então realizada a medida da produção de NO pelos macrófagos nos sobrenadantes das células que ficaram em contato com o nanocompósitos.

As amostras M10:1-I e M10:1-P já haviam sido testadas (BARCELOS, et al., 2017), portanto a figura 83 mostra a produção de NO durante toda a análise para essas amostras, juntamente com as restantes M20:1-I, H10:1-I e H20:1-I. Como as análises foram realizadas em momentos diferentes, o gráfico traz a média dos valores obtidos pelos controles durante todas as análises. A produção pelo controle positivo (LPS), em 24 h, foi bem acima dos nanocompósitos e do controle negativo (CTL). O aumento da produção de NO nos dias 6 e 7 provavelmente ocorreu devido aos fragmentos do material solto no poço, que durante a manipulação da placa causaram a lise mecânica das células que os circundam. A lise celular pode liberar substâncias

internas das células que estimulam o processo inflamatório que ao se acumular com o tempo e induzir um aumento na produção, mas mesmo assim, muito inferior ao controle positivo. Como esse aumento também ocorreu para controle negativo, pode-se concluir que a produção de NO foi baixa para as amostras e dessa forma, é possível afirmar que os nanocompósitos não induziram um processo inflamatório.

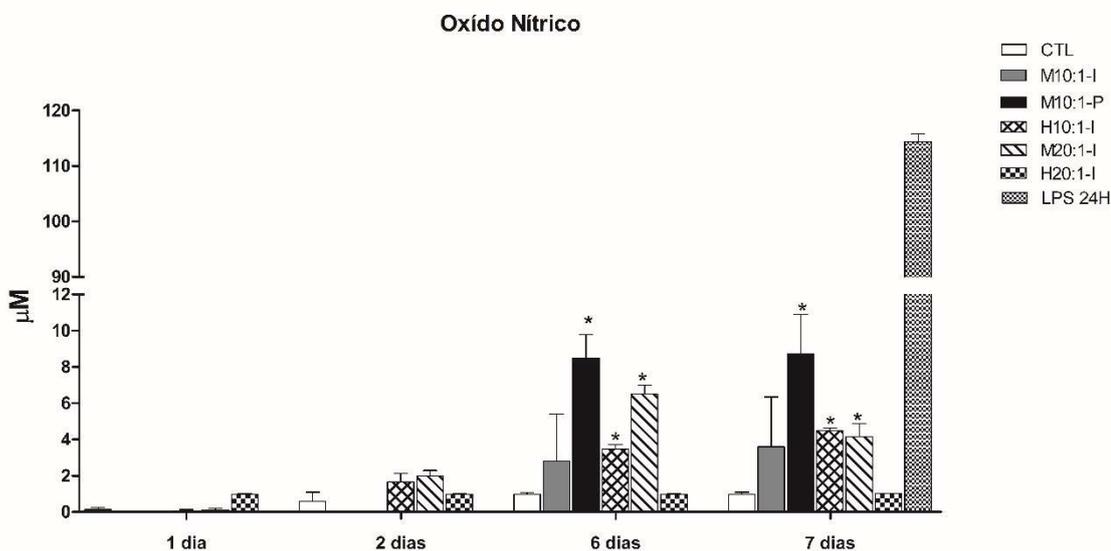


Figura 83 – Comparativo da produção de NO pelas células na presença dos nanocompósitos, controle negativo (CTL), controle positivo (LPS 24H), avaliados após 1, 2, 6 e 7 dias (Adaptado de BARCELOS et al., 2017).

Nas figuras 84 e 85 é possível ver as células que ficaram em contato com os nanocompósitos e sem a presença dos mesmos nos dias 1 e 7, respectivamente. Percebe-se que o crescimento celular para as culturas sem a presença do material analisado (Figura 84 A), é muito similar à cultura com os nanocompósitos (Figura 84 B, C, D, E e F).

Para o controle e as amostras M10:1-P, M10:1-I foi usado o corante Tripán Blue para verificar a morte celular (BARCELOS, et al.,2017). Nota-se que a proporção de células mortas foi praticamente a mesma para o controle e em todas as amostras. Esses resultados indicam que os nanocompósitos não foram citotóxicos e nem citostáticos.

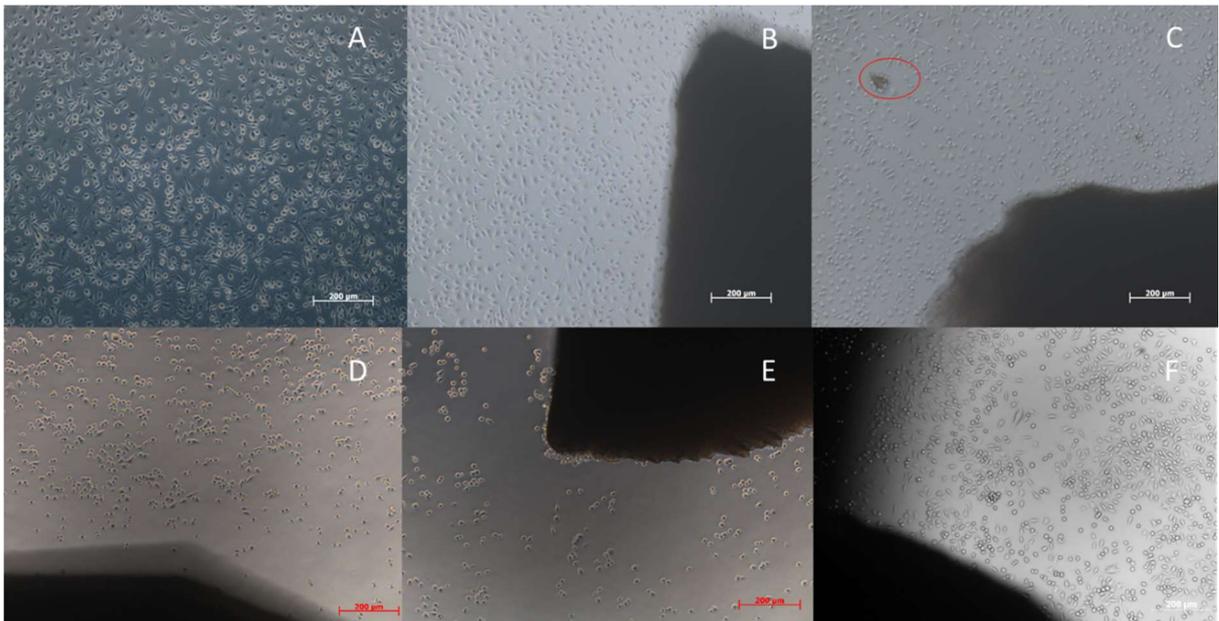


Figura 84 - Imagens da cultura após 1 dia, controle sem material (A), M10:1-P (B), M10:1-I (C), M20:1-I (D), H10:1-I (E), H20:1-I (F). As regiões escuras na imagem correspondem aos corpos de prova. O círculo vermelho na imagem C mostra os macrófagos aderidos a um pequeno fragmento do nanocompósito (Adaptado BARCELOS et al., 2017).

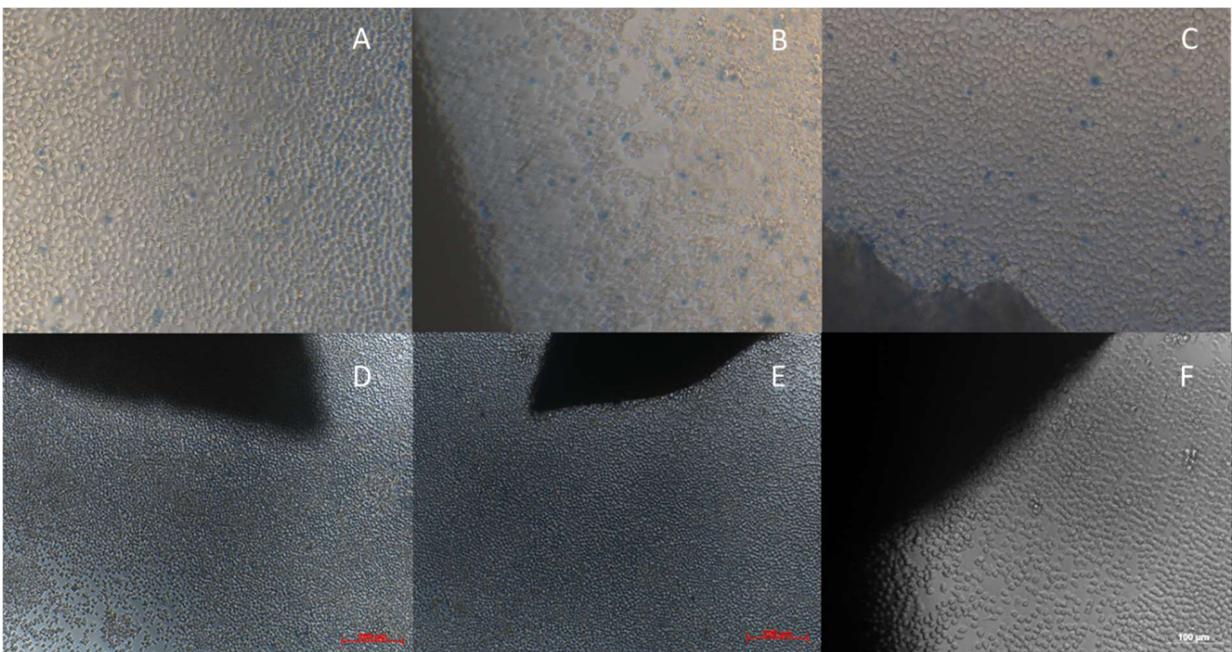


Figura 85 - Imagens da cultura após 7 dias, controle sem material (A), M10:1-P (B), M10:1-I (C), M20:1-I (D), H10:1-I (E), H20:1-I (F). As regiões escuras na imagem correspondem aos corpos de prova. As células mortas estão em azul (Adaptado de BARCELOS et al., 2017).

Siqueira, 2017 realizou testes *in vitro* e *in vivo* em nanocompósitos PHB/nHAP com 18% de nanocarga. Os resultados *in vitro* foram similares aos encontrados nesse trabalho, não induzindo a produção de NO e ausência de atividade citotóxica e citostática durante 5 dias de análise. Nos testes *in vivo* o nanocompósito mostrou seu potencial condutor, sendo observada a presença de uma membrana de tecido conjuntivo na interface osso/implante e obtiveram êxito no que tange ao desempenho biológico promovendo a osteocondução. A similaridade nos resultados *in vitro* e na matriz polimérica utilizada são bons indicativos de que os biocompósitos produzidos neste trabalho podem apresentar resultados satisfatórios também se submetidos a testes *in vivo*. Sendo assim materiais promissores para uso no corpo humano.

## CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES

- O nD Hydrogen P® apresentou presença de carbono amorfo e um pico provavelmente de grafite em sua composição como visto pelo DRX, bandas características de ligação C-H como visto do FTIR, o que conferem a ele um caráter mais hidrofóbico. No entanto, suas partículas formaram aglomerados de tamanho maior e de mais difícil dispersão que o nD Molto®.
- A metodologia de encapsulamento foi executada formando microcápsulas esféricas e ausência de material sem recobrimento possibilitando posteriormente uma distribuição homogênea dos nD nos corpos de prova objeto de estudo.
- Os nanocompósitos fabricados pela metodologia de injeção apresentaram melhores resultados térmicos e mecânicos que os fabricados por prensagem apresentando uma estrutura contínua, com melhor compactação, ausência de vazios e desprendimento de partículas, favorecendo a formação de um contato matriz-carga eficiente.
- Não houve diferença significativa nas propriedades mecânicas de flexão com variação da quantidade de carga. Mas em relação ao tipo de reforço, as propriedades apresentaram tendência de maiores valores para os nanocompósitos formulados com nD Molto®. Isso foi causado já que o nD Hydrogen P®, apesar de apresentar superfície hidrofóbica, que é mais compatível com o P(HB-HV), apresentou em sua composição carbono amorfo e maior aglomeração, o que diminui sua capacidade de restringir os movimentos das cadeias poliméricas como visto pelo RMN.
- Os valores de módulo de elasticidade obtidos para todos os nanocompósitos foram superiores ao osso subcondral humano. Já para o osso cortical e trabecular, os valores que mais se aproximam são os corpos de prova produzidos pela injetora, principalmente os das formulações M10:1-I e M20:1-I. A similaridade nos valores indica que o material produzido possui propriedades promissoras para o uso como biomaterial na área odontológica-ortopédica.
- Conforme visto pela análise de DMA os nanocompósitos com nD Molto® apresentaram temperaturas de transição vítrea superiores se comparados com o nD Hydrogen P®, indicando uma interface mais eficiente entre as nanopartículas e a matriz em consequência do menor grau de aglomeração.

- A adição de nanodiamante diminuiu os valores de cristalização. Isso porque apesar da carga atuar como agente nucleante, favorecendo o início da recristalização, em função da quantidade de carga e aglomeração das mesmas, pode ter agido como bloqueador do processo de recristalização.
- Os nanocompósitos não apresentaram caráter citostáticos, citotóxicos e não induziram atividade inflamatória, sendo isso um bom indicativo de que são propícios para aplicação no corpo humano.

## **CAPÍTULO 6: SUGESTÕES**

- Sugere-se o uso de sonicadores antes da formulação das microcápsulas, afim de ajudar na desaglomeração dos agregados de nanodiamantes com vista a não interferir nas propriedades destes materiais.
- Sugere-se o uso de outros tipos de nanodiamantes com carácter mais hidrofóbico, como por exemplo o nD Amino®.

## CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS

AJAYAN, P. M.; SCHADLER, L. S.; BRAUN, P. V. **Nanocomposite Science and Technology**. 1. Ed. Weinheim: Wiley, 2003.

AMBRÓSIO-MARTÍN, J. GORRASI, G.; LOPEZ-RUBIO, A.; FABRA, M. J.; MAS, L. C.; 3 LÓPEZ-MANCHADO, M. A.; LAGARON, J. M. On the use of ball milling to develop PHBV–graphene nanocomposites (I) - Morphology, thermal properties, and thermal stability. **Journal of Applied Polymer Science**, 2015.

ARAUJO, W. W. R. **MODIFICACAO DE SUPERFICIE DE DIAMANTE UTILIZANDO PLASMA E CARACTERIZACAO POR KELVIN FORCE MICROSCOPY**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 2010.

ARNAULT, J. C.; PETIT, T.; GIRARD, H.; CHAVANNE, A.; GESSET, C.; SENNOUN, M. CHAIGNEAU, M. Surface chemical modifications and surface reactivity of nanodiamonds hydrogenated by CVD plasma. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, N. 24, p. 11481-11487, 2011.

ASHBY, F. M. **Nanomaterials and Nanotechnologies: An Overview**, in **Nanomaterials, Nanotechnologies and Design: An Introduction for Engineers and Architects**, ASHBY, M. F.; FERREIRA, J, P., SCHODEK, L.D. Elsevier, 2009, p.1-15.

**ASTM D6400-12 - Standard Specification for Labeling of Plastics Designed to be Aerobically Composted in Municipal or Industrial Facilities.**

**ASTM D790-17 - Standard Test Methods for Flexural Properties of Unreinforced and Reinforced Plastics and Electrical Insulating Materials.**

BALDIN, V., OLIVEIRA, G. M. Blendas de policaprolactona com poliéster polisulfidrilado. **12º Congresso Brasileiro de Polimeros** - Florianópolis - SC, set. 2013.

BARCELOS, M. B.; NETO, G. A. R.; ALMEIDA, F. M.; RODRIGUEZ, R. J. S.; GOMES, J. G. C. Thermo-Mechanical Properties of P(HB-HV ) Nanocomposites Reinforced by Nanodiamonds. **Materials Research**, p. 1-7, 2017.

BARHAM, P. J.; KELLER, A.; OTUN, E.L.; HOLMES, P.A. Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate. **Journal of Materials Science**, v. 19, n. 9, p. 2781-2794, 1984.

BARNAKOV, CH. N.; KHOKHLOVA, G.P.; POPOVA, A.N.; SOZINOV, S. A.; ISMAGILOV, Z. R. XRD Characterization of the Structure of Graphites and Carbon Materials Obtained by the Low-Temperature Graphitization of Coal Tar Pitch. **Eurasian Chemico-Technological Journal**, v. 17, p. 87-93, 2015.

BARROS, Jr., L. P. **CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA, MECÂNICA E *IN VITRO* DE NANOCOMPÓSITOS DE POLI(3-HIDROXIUTIRATO) (PHB) PARA APLICAÇÕES EM DISPOSITIVOS ORTOPÉDICOS**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2014.

BLACK, J.; HASTING, G. **Handbook of Biomaterial Properties**. 1st. ed. [s.l.] Chapman and Hall, 1998.

BLUHM, T. L.; HAMER, G. K.; MARCHESSAULT, R. H.; FYFE, C. A.; VEREGIN, R. P. Isodimorphism in bacterial poly( $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate). **Macromolecules**, v. 19, n. 11, p. 2871-2876, 1986.

BOISSEAU, P.; LOUBATON, B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. **Academie des Sciences**, v. 12, p. 620-636, 2011.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. Review article. **Journal of Biotechnology**, v. 65, p. 127-161, 1998.

CALLISTER JUNIOR, W. D. **Ciência e engenharia de materiais: uma introdução**. Rio de Janeiro: LTC, 2002, 589 p.

CHAWLA, K. K. **Composite Materials: Science na Engineering**. New York: Springer-Verlag, 1998, 483p.

CHEN, D. Z.; TANG, C. Y.; CHAN, K. C.; TSUI, C. P.; YU, P. H. F.; LEUNG, M. C. P.; USKOKOVIC, P. S. Dynamic mechanical properties and *in vitro* bioactivity of PHBV/HA nanocomposite. **Composites Science and Technology**, V. 67, p. 1617-1626, 2007.

CHEN, L. J.; WANG, M. Production and evaluation of biodegradable composites based on PHB-PHV copolymer. **Biomaterials**, v. 23, n. 13, p. 2631-2639, 2002.

CHOI, K. KUHN, L.; CIARELLI, M.J.; GOLDSTEIN, S.A. The elastic moduli of human subchondral, trabecular, and cortical bone tissue and the size-dependency of cortical bone modulus. **Journal of Biomechanics**, v. 23, n. 11, p. 1103-1113, 1990.

CORREA, C. A.; RAZZINO, C. A.; HAGE, E. Role of Maleated Coupling Agents on the Interface Adhesion of Polypropylene—Wood Composites. **Journal of Thermoplastic Composite Materials**, v. 20, n. 3, p. 323-339, 2007.

ELIAZ, N.; METOKI, N. Calcium phosphate bioceramics: A review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications. **Materials**, v. 10, n. 4, 2017.

FU, Y.S.; FENG, Q.X.; LAUKE, B. MAI, W.Y. Effects of particle size, particle/matrix interface adhesion and particle loading on mechanical properties of particulate-polymer composites. **Composites. Part B: engineering**, v. 39, p. 933-961, 2008.

GALDINO, A. G. S. **PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ARCABOUÇOS POROSOS DE HIDROXIAPATITA-TITÂNIA (HA-TIO<sub>2</sub>) PARA ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 2011.

GALEGO, N.; ROZSA, C.; SANCHEZ, R.; FUNG, J.; VAZQUEZ, A.; TOMAS, J. S. Characterization and application of poly(b-hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials. **Polymer Testing**, v. 19, p. 485-492, 2000.

GANDINI, A.; BELGACEM, M. N. **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**. Amsterdam. Elsevier Ltd, 2008, 562 p.

GARCIA, A.; SPIN, A. J.; SANTOS, A. C. **Ensaio dos materiais**. Rio de Janeiro: LTC, 2000, 247 p.

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.

GIRARD, H.A.; ARNAULT, J.C.; PERRUCHAS, S.; SAADA, S.; GACOIN, T.; BOILOT, P.; BERGONZO, P. Hydrogenation of nanodiamonds using MPCVD: A new route toward organic functionalization. **Diamond & Related Materials**, v. 19, p. 1117-1123, 2010.

GOGOTSI, Y. **Nanomaterials Handbook**. CRC Taylor and Francis Group, LLC, 2006.

HOLMES, A. P. Applications of PHB-a microbially produced biodegradable thermoplastic. **Physics in Technology**, v. 16, n.1, p. 32-36, 1985.

HUANG, H.; WANG, Y. H.; ZANG, J. B.; BIAN, L. Y. Improvement of suspension stability and electrophoresis of nanodiamond powder by fluorination. **Applied Surface Science**, v. 258, p. 4079-4084, 2012.

IULIANELLI, G. C. V.; AZEVEDO, R. S.; SILVA, P. S. R. C.; TAVARES, M. I. B. PHB nanostructured: Production and characterization by NMR relaxometry. **Polymer Testing**, v. 49, p. 57-65, 2016.

JEE, A. Y.; LEE, M. Surface functionalization and physicochemical characterization of diamond nanoparticles. **Current Applied Physics**, v. 9, n. 2, p. 144-147, 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, 2011.

JOHNSEN, B. B; KINLOCH, A. J.; MOHAMMED, R. D.; TAYLOR A.; SPRENGER, S. Toughening mechanisms of nanoparticle-modified epoxy polymers. **Polymer**, v. 48, p. 530-541, 2007.

KAWARADA, H. Hydrogen-terminated diamond surfaces and interfaces. **Surface Science Reports**, v. 26, p. 205-259, 1996.

KOROLKOV, V.V.; KULAKOVA, I.I.; TARASEVICH, B.N.; LISICHKIN, V.G. Dual reaction capacity of hydrogenated nanodiamond. **Diamond & Related Materials**, v. 16, p. 2129-2132, 2007.

KRUEGER, A. Diamond Nanoparticles: Jewels for Chemistry and Physics. **Advanced Materials**, v. 20, p. 2445-2449, 2008 – A.

KRUEGER, A. The structure and reactivity of nanoscale diamond. **Journal of Materials Chemistry**, v. 18, p. 1485-1492, 2008 – B.

KUBÁT, J.; RIGDAHL, M.; WELANDER, M. Characterization of interfacial interactions in high density polyethylene filled with glass spheres using dynamic-mechanical analysis. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 39, p. 1527-1539, 1990.

KULAKOVA I.I. Surface chemistry of nanodiamonds. **Physics of the Solid State**, v. 46 n. 4, p. 636-643, 2004.

LEAL, C. V.; MARTINEZB, D. S. T.; MA, B. A. O.L. ALVES, O. L.; DUEKA, E. A. R.; Influence of purified multiwalled carbon nanotubes on the mechanical and morphological behavior in poly (L-lactic acid) matrix. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 59, p. 547-560, 2016.

LIU, T.; PETERMANN, J. Multiple melting behavior in isothermally cold-crystallized isotactic polystyrene. **Polymer**, v. 42, n. 15, p. 6453-6461, 2001.

KIRMANI, A. R.; PENG, W.; MAHFOUZ, R.; AMASSIAN, A.; LOSOVYJ, Y.; IDRIS, H.; KATSIEV, K. On the relation between chemical composition and optical properties of detonation nanodiamonds. **Diamond and Related Materials**, v. 94, p. 79-84, 2015.

MA, W.; YU, X.; QU, X.; ZHANG, Q. Functionalization of agglomerating nanodiamonds with biodegradable poly( $\epsilon$ -caprolactone) through surface-initiated polymerization. **Diamond and Related Materials**, v. 62, p. 14-21, 2016.

McGEE, S.; McCULLOUGH, L. Combining Rules for Predicting the Thermoelastic Properties of Particulate Filled Polymers, Polyblends, and Foams. **Polymer Composites**, v. 2, n. 4, 1981.

MANO, E. B. **Polímeros como materiais de engenharia**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 1991, 197 p.

MANOJ, B.; KUNJOMANA, A.G. Study of Stacking Structure of Amorphous Carbon by X-Ray Diffraction Technique. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, p. 3127-3134, 2012.

MARCONI, W; PIOZZI, A. **Structure and Properties of Polymeric Materials, in Integrated Biomaterials Science**, New York: Edited by BARBUCCI, R., Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002, p. 25-67.

MATHEW, A. P.; OKSMAN, K.; SAIN, M. Mechanical properties of biodegradable composites from poly lactic acid (PLA) and microcrystalline cellulose (MCC). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 97, p. 2014-2025, 2005.

MENDONCA, T. T.; TAVARES, R. R.; CESPEDES, L. G.; RODRIGUEZ, R. J, S.; SCHRIPEMA, J.; TACIRO, M. K.; GOMEZ, J. G. C.; SILVA, L. F. Combining molecular and bioprocess techniques to produce poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with controlled monomer composition by *Burkholderia sacchari*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 657-663, 2017.

MILLER, N.; WILLIAMS, D. On the biodegradation of poly-phydroxybutyrate (PHB) homopolymer and poly-P-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers. **Biomaterials**, v. 8, n.2, p. 129-136, 1986.

MITEV, D.; SPASSOVA, M.; MINCHEV, Ch.; STAVREV, S. Surface peculiarities of detonation nanodiamonds in dependence of fabrication and purification methods. **Diamond and Related Materials**, v. 16, n. 4-7, p. 776-780, 2007.

MOCHALIN, N. V.; SHENDEROVA, O.; HO, D.; GOTOSI, Y. The properties and applications of nanodiamonds. **Natura Nanotechnology**, v. 7, p. 11-23, 2012.

NEITZEL, I. **NANODIAMOND-POLYMER COMPOSITES**. Tese de Doutorado, Drexel University, 2012.

NETO, G. R. A. **FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS DE PHB COM REFORÇO DE NANODIAMANTES PARA DISPOSITIVOS ORTOPÉDICOS**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Estadual do Norte, 2016.

NETO, G. R. A.; BARCELOS, M. V.; RODRIGUEZ, R. J. S.; GOMEZ, J. G. C. Influence of encapsulated nanodiamond dispersion on P(3HB) biocomposites properties. **Materials Research**, v. 20, 2017.

NETO, L. F.; PARDINI, C. L. **Compósitos Estruturais: Ciência e Tecnologia**. São Paulo: Blucher, 2006, 313 p.

NI, J.; WANG, N. *In vitro* evaluation of hydroxyapatite reinforced polyhydroxybutyrate composite. **Materials Science and Engineering**, v. 20, p. 101-109, 2002.

NIEDZIAŁKOWSKI, P.; OSSOWSKI, T.; ZIĘBA, P.; CIROCKA, A.; ROCHOWSKI, P.; POGORZELSKI, S.J.; RYL, J.; SOBASZEK, M.; BOGDANOWICZ, R. Poly-L-lysine-modified boron-doped diamond electrodes for the amperometric detection of nucleic acid bases. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 756, p. 84-93, 2015 - A.

NIEDZIAŁKOWSKI, P.; OSSOWSKI, T.; ZIĘBA, P.; BOGDANOWICZ, R. Melamine-modified Boron-doped Diamond towards Enhanced Detection of Adenine, Guanine and Caffeine. **Electroanalysis**, v. 28, p. 211-221, 2015 - B.

ÖNER, M.; İLHAN, B. Fabrication of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) biocomposites with reinforcement by hydroxyapatite using extrusion processing. **Materials Science and Engineering C**, v. 65, p. 19-26, 2016.

ORÉFICE, L. R.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, S. H. **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006, 538p.

OSSWALD, S. YUSHIN, G.; MOCHLAIN, V. KUCHEYEV, O.S.; GOGOTSI, Y. Control of sp<sup>2</sup>/sp<sup>3</sup> Carbon Ratio and Surface Chemistry of Nanodiamond Powders by Selective Oxidation in Air. **J. AM. CHEM. SOC.**, v. 128, p. 11635-11642, 2006.

OPELT, C. V. **TENACIDADE À FRATURA EM SISTEMAS EPÓXI NANOESTRUTURADOS**. Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado de Santa Catarina, 2013.

PADILHA, F. A. **Materiais de engenharia: microestruturas e propriedades**. São Paulo: Hemos Editora Ltda, 1997, 349 p.

PAIVA, L. B.; MORALES, A. R.; GUIMARÃES, T. R. Propriedades mecânicas de nanocompósitos de polipropileno e montmorilonita organofílica. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.16, n.2, p.136-140, 2006.

PICHOT, V.; COMET, M.; FOUSSON, E.; BARAS, C.; SENGER, A.; LE NORMAND, F.; SPITZER, D. An efficient purification method for detonation nanodiamonds. **Diamond and Related Materials**, v. 17, n.1, p.13-22, 2008.

POIRIER, Y.; DENNIS, D. E.; KLOMPARENS, K.; SOMERVILLE, C. PHB, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. **Science**, v. 256, n.5056, 1992.

POPOV, C.; KULISCH, W.; BLIZNAKOV, G.; CECCONE, D.; SIRGHI, L.; ROSSO, F. Surface modification of nanocrystalline diamond/amorphous carbon composite films. **Diamond and Related Materials**, v. 17, p. 1229-1234, 2008.

POPOV, M.; CHURKIN, V.; KIRICHENKO, A.; DENISOV, V.; OVSYANNIKOV, D.; KULNITSKIY, B.; PEREZHOGIN, I.; AKSENEKOV, V.; BLANK, V. Raman spectra and bulk modulus of nanodiamond in a size interval of 2–5 nm. **Nanoscale Research Letters**, 2017.

POTHAN, L. A.; OOMMEN, Z.; THOMAS, S. Dynamic mechanical analysis of banana fiber reinforced polyester composites. **Composites Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 283-293, 2003.

RAMAKRISHNA, S.; MAYER, J.; WINTERMANTEL, E.; LEONG, W. K. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. **Composites Science and Technology**, v. 61, n. 9, p. 1189-1224, 2001.

RAY, S. S.; BOUSMINA, M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. **Progress in Materials Science**. v. 50, n. 8, 2005.

REDDY, C. S. K.; Ghai, R.; Rashmi; Kalia, V. C. et al. Polyhydroxyalkanoates: An overview. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 137-146, 2003.

RISTEIN, J. Surface science of diamond: Familiar and amazing. **Surface Science**, v. 600, n. 18, p. 3677- 3689, 2006.

RONG, M. Z.; ZHANG, M. Q.; PAN, S. L.; LEHMANN, B.; FRIEDRICH, K. Analysis of the interfacial interactions in polypropylene/silica nanocomposites. **Polymer International**, v. 53, n. 2, p. 176-183, 2004.

ROSA, S. D.; FRANCO, M. L. B.; CALIL, R. M. Biodegradabilidade e Propriedades Mecânicas de Novas Misturas Poliméricas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 3, p. 82-88, 2001.

RUDNIK, E. **Compostable Polymer Materials**. Oxford: Elsevier, 2008.

SADAT-SHOJAI, M.; KHORASANI, M-T.; JAMSHIDI, A.; IRANI, S. Nano-hydroxyapatite reinforced polyhydroxybutyrate composites: A comprehensive study on the structural and *in vitro* biological properties. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 5, p. 2776-2787, 2013.

SANTOS, G. A.; BARBOSA, A.A.; OLIVEIRA, L.M.; FERRAZ, A.V.; OLIVER, N.C.; ACCHAR, W., DANTAS, A.C.S. Production of polyhydroxybutyrate and hydroxyapatite (PHB/HA) composites for use as biomaterial. **Cerâmica**, v. 63, p. 557-561, 2017.

SHENDEROVA, O.; PANICH, A. M.; MOSEENKOV, S.; HENS, S. C.; KUZNETSOV, V. VIETH, H. –M. Hydroxylated Detonation Nanodiamond: FTIR, XPS, and NMR Studies. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 39, p. 19005-19011, 2011.

SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C. Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros Biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1732-1743, 2007.

SILVA, D. D.; SANTOS, W. F.; PEZZIN, S. H. Nanocompósitos de matriz epoxídica com reforços produzidos a partir do grafite natural. **Revista Matéria**, v. 18, n. 2, p. 1260-1272, 2013.

SIQUEIRA, L. C. B. **FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS COMPOSTOS COM HIDROXIAPATITA**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2009.

SIQUEIRA, L. C. B. **BIOCOMPÓSITOS P3HB/NANO-HAP PARA USO NA ÁREA MÉDICO-ODONTOLÓGICA**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2017.

SMITH, F. W. **Princípios de ciências e engenharia dos materiais**. Portugal: McGRAW-HILL, 1998, 891 p.

SPITSYN, V.B.; DAVIDSON, L. J.; GRADOBOEV, N.M.; GALUSHKO, B.T.; SEREBRYAKOVA, V.N.; KARPUKHINA, A. T.; KULAKOVA, I.I.; MELNIK, N.N. Inroad to modification of detonation nanodiamond. **Diamond & Related Materials**, v. 15, p. 296–299, 2006.

SUN, Y., FINNE-WISTRAND, A., WAAG, T., XING, Z., YASSIN, M., YAMAMOTO, A., MUSTAFA, K., STEINMÜLLER-NETHL, D., KRUEGER, A., ALBERTSSON, A. C. Reinforced Degradable Biocomposite by Homogenously Distributed Functionalized Nanodiamond Particles. **Macromolecular Materials and Engineering**, DOI: 10.1002/mame.201400387, 2014.

SURIYAMONGKOL, P.; WESELAKE, R.; NARINE, S.; MOLONEY, M.; SHAH, S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - A review. **Biotechnology Advances**, v. 25, pp. 148-175, 2007.

TACHIKI, M.; SUMIKAWA, Y.; SHIGENO, M.; BANNO, T.; SONG, K. S.; UMEZAWA, H.; KAWARADA, H. Diamond nanofabrication and characterization for biosensing application. **Physica Status Solidi (a)**, v. 199, n. 1, p. 39-43, 2003.

TAN, G. Y. A.; CHEN C. L.; LI, L.; GE, L.; WANG, L.; RAZAAD, I. M. N.; LI, Y.; ZHAO, L.; MO, Y.; WANG, J. Y. Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a review. **Polymers**, v. 6, p. 706-754, 2014.

TAVARES, B. D. A. V. (2011) **MATRIZES DE POLICAPROLACTONA E QUITOSANO PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA DE TECIDOS**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade Nova de Lisboa, 2011.

THIRÉ, R. M. S. M.; ARRUDA, L. C.; BARRETO, L. S. Morphology and Thermal Properties of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/Attapulgite Nanocomposites. **Materials Research**, v. 14, n. 3, p. 340-344, 2011.

TOMITA, S.; BURIAN, A.; DORE, J. C; LeBOLLOCH, D.; FUJII, M.; HAYASHI, S. Diamond nanoparticles to carbon onions transformation: X-ray diffraction studies. **Carbon**, v. 40, n. 9, p. 1469-1474, 2002.

TUDORACHI, N.; CHIRIAC, O. A.; MUSTATA, F. New nanocomposite based on poly(lactic-co-glycolic acid) copolymer and magnetite. Synthesis and characterization. **Composites: Part B**, v. 72, p. 150-159, 2015.

VERHOOGT, H.; RAMSAY, B. A.; FAVIS, B. D. Polymer blends containing poly(3-hydroxyalkanoates)s. **Polymer Review**, v.35, n.24, p. 5155-5168, 1994.

VOGELSANGER, N.; FORMOLO, M. C.; PIRES, A. T. N.; FURLAN, S. A.; SCHNEIDER, A.L.; DUEK, E. A. R.; PEZZIN, A. P. T.; Blendas biodegradáveis de P(3HB)/ PCL para aplicação como filmes para agricultura. **X Encontro de Química da Região Sul**, Joinville – SC, 2002.

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, 2001.

XIE, Y.; KOHLS, D.; NODA, I.; SCHAEFER, D. W.; AKPALU, Y. A. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) nanocomposites with optimal mechanical properties. **Polymer**, v. 50, p. 4656-4670, 2009.

YU, H-Y.; QIN, Z-Y.; ZHOU, Z. Cellulose nanocrystals as green fillers to improve crystallization and hydrophilic property of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). Progress in Natural Science: **Materials International**, v.21, p. 478-484, 2011.

ZHANG, Q.; MOCHALIN, N. V.; NEITZEL, I.; KNOKE, Y. I.; HAN, J.; KLUNG, A. C.; ZHOU, G. J.; LELKES, I. P.;GOGOTSI, Y. Fluorescent PLLA-nanodiamond composites for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 32, p.87-94, 2011.

ZHAO, Y. Q; LAU, K. T.; KIM, J. K.; XU, C .L.; ZHAO, D. D.; LI, H. L. 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, 2010.

ZHAO, F; VRAJITOAREA, A.; JIANG, Q.; HAN, X.; CHAUDHARY, A.; WELCH, J. O; JACKMAN, R. B. Graphene-Nanodiamond heterostructures and their application to High Current Devices. **Scientific Reports**, DOI: 10.1038/srep13771, 2015.