

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Preparação e caracterização de filmes poliméricos a base de amido de milho e  
polipirrol para aplicação como biomaterial**

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação  
em Química para a obtenção do grau de  
Doutor em Química.

Área de concentração: Físico-Química

Departamento de Química

Orientador: Dr. Valdir Soldi

**CAROLINE TEIXEIRA VASQUES**

**FLORIANÓPOLIS, MAIO DE 2007**

**CAROLINE TEIXEIRA VASQUES**

*Preparação e Caracterização de Filmes Poliméricos a Base de Amido de Milho e Polipirrol  
para Aplicação como Biomaterial*

Esta tese foi julgada para obtenção do título de **Doutor em Química**, área de concentração em **Físico-Química**, e aprovada pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 24 de maio de 2007

---

**Prof. Dr. Ademir Neves**  
**Coordenador do Programa**

---

**Prof. Dr. Valdir Soldi**  
**Orientador**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Jonas Gruber**  
**(IQ-USP- Relator)**

---

**Prof(a). Dr(a). Elenara Lemos-Senna**  
**(CF – UFSC)**

---

**Prof. Dr. Adley Forti Rubira**  
**(IQ – UEM)**

---

**Prof. Dr. Valfredo Tadeu Fávere**

---

**Prof. Dr. Nito Ângelo Debacher**

Dedico esse trabalho às pessoas mais importantes da minha vida, meu filho Gabriel, minha irmã Clarissa e meus pais Volney e Marlene. Obrigada por tornarem possível a conclusão de mais essa etapa da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre presente em minha vida, pelas oportunidades que me concedeu até esse momento, por me dar forças para enfrentar as dificuldades e sempre me guiar para o melhor caminho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valdir Soldi pela dedicação, pelo incentivo, pela amizade, pela paciência e confiança.

À Marly Soldi pela amizade, apoio nas análises, colaboração nas discussões dos resultados e ensinamentos.

À Susana Domenech pela colaboração durante o desenvolvimento do trabalho e discussões dos resultados.

Ao Prof. Dr. Pedro Barreto pela amizade, apoio nas análises e colaboração durante as discussões dos resultados.

Ao Prof. Dr. Jonas Gruber da USP pela amizade e gentileza na realização da análise elementar.

Ao Prof. Dr. Jamil Assreuy pelas sugestões enriquecedoras e apoio na análise de adesão celular e citotoxicidade.

À Ângela Bet pelo auxílio nas análises de adesão celular e citotoxicidade e colaboração nas discussões dos resultados.

Aos colegas do laboratório Polimat, Giovana, Eloise, Rosane, Cristina, Gabriela, Vanderlei, Ledilege, Maria Alice, Paula, Evilásio, e Tiago em especial as amigas Aline Oliveira, Cláudia Cristiano, Betsy Luiz, Luana Bendo e Larissa Andreani, pela amizade, paciência, discussão dos resultados e apoio no desenvolvimento desse trabalho.

À querida amiga Aline Lima que mesmo distante contribuiu na realização desse trabalho.

A todos que de alguma forma direta ou indiretamente tornaram possível a realização desse trabalho.

Aos meus pais Marlene e Volney pelo incentivo e apoio na realização desse trabalho.

À minha irmã Clarissa e meu cunhado Sandro pelo apoio, amor, amizade, incentivo e presença durante a realização desse trabalho, dividindo as angústias, dúvidas e alegrias.

Ao meu filho Gabriel pela paciência, amor, companheirismo e compreensão nos momentos de ausência.

Ao Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq) e a Universidade Federal de Santa Catarina pelo suporte financeiro.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS .....	xiii
PRODUÇÃO CIENTÍFICA RELACIONADA AO TEMA.....	xiv
Capítulo 1.....	1
1.1 -Introdução.....	1
1.2 -Justificativa.....	3
1.3 -Objetivos .....	5
1.3.1- Objetivos Gerais .....	5
1.3.2- Objetivos Específicos .....	5
Capítulo 2.....	7
Revisão Bibliográfica.....	7
2.1- Biomateriais .....	7
2.2- Modificação da superfície de biopolímeros – interface polímero-tecido.....	10
2.3- Técnicas de caracterização de biomateriais .....	14
2.4- Blendas poliméricas .....	16
2.5- Polissacarídeos .....	18
2.6- Amido .....	18
2.6.1- Plastificantes mais utilizados na aditivação do amido.....	22
2.6.1.1- Sorbitol.....	23
2.6.2- Reticulação do amido .....	24
2.7- Polímeros condutores intrínsecos (PCI) .....	24
2.8- Polipirrol.....	26
Capítulo 3.....	29
3. Efeito do tratamento térmico sobre a estabilidade e estrutura dos filmes de amido de milho... 29	
Metodologia Experimental.....	30
3.1- Preparação dos filmes de amido de milho .....	30
3.2- Tratamento térmico dos filmes de amido de milho.....	30
3.3- Reologia das soluções de amido de milho.....	31
3.4- Microscopia óptica do grão de amido de milho.....	31
3.5- Termogravimetria (TG) .....	31
3.6- Grau de intumescimento.....	32

3.7- Análise de FT-IR.....	33
3.8- Ensaio mecânicos.....	34
3.9- Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	35
Resultados e Discussão.....	35
3.10- Reologia das soluções de amido de milho e microscopia óptica do grão de amido de milho.....	35
3.11- Termogravimetria (TG).....	38
3.12- Grau de intumescimento.....	41
3.13- Análise de FT-IR.....	43
3.14- Ensaio mecânicos.....	50
3.15- Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	51
3.16- Conclusões.....	52
Capítulo 4.....	54
4. Preparação química de filmes de amido eletricamente condutores.....	54
Metodologia Experimental.....	55
4.1- Síntese química do polipirrol.....	55
4.2- Preparação de filmes poliméricos a base de amido de milho contendo sorbitol como agente plastificante e FeCl <sub>3</sub> como agente oxidante.....	55
4.3- Modificação da superfície de filmes poliméricos a base de amido de milho com polipirrol.....	56
4.4- Reologia das soluções de amido de milho e sorbitol.....	56
4.5- Síntese do polipirrol sobre os filmes de amido de milho/sorbitol/FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O.....	57
4.6- Análise elementar.....	57
4.7- Medidas de condutividade elétrica específica superficial (Método das Quatro Pontas).....	57
4.8- Difração de raios-X.....	58
4.9- Termogravimetria (TG).....	59
4.10- Análise de FT-IR.....	59
4.11- Ensaio mecânicos.....	59
4.12- Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	59
Resultados e Discussão.....	60
4.13- Reologia das soluções de amido de milho e sorbitol.....	60
4.14- Síntese do polipirrol sobre os filmes de amido de milho/sorbitol/FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O.....	62

4.15- Análise elementar.....	64
4.16- Medidas de condutividade elétrica específica superficial (Método das Quatro Pontas) .....	66
4.17- Difração de raios-X .....	67
4.18- Termogravimetria (TG) .....	69
4.19- Análise de FT-IR.....	73
4.20- Ensaio mecânicos.....	79
4.21- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	81
Conclusões.....	83
Capítulo 5.....	86
5. Estudo da viabilidade de um novo biomaterial a base de amido de milho, sorbitol e polipirrol para aplicações biomédicas.....	86
Metodologia Experimental.....	86
5.1- Preparação de filmes poliméricos a base de amido de milho sorbitol e polipirrol .....	86
5.2- Ensaio mecânicos.....	87
5.3- Grau de intumescimento .....	87
5.4- Degradação <i>in vitro</i> em diferentes pH.....	87
5.5- Teste de bioatividade <i>in vitro</i> .....	88
5.6- Degradação <i>in vitro</i> frente a ataque enzimático .....	88
5.7- Análise de adesão celular.....	90
5.8- Análise de citotoxicidade.....	91
Resultados e Discussão .....	92
5.9- Ensaio mecânicos.....	92
5.10- Grau de intumescimento .....	93
5.11- Degradação <i>in vitro</i> em diferentes pH.....	95
5.12- Teste de bioatividade <i>in vitro</i> .....	97
5.13- Degradação <i>in vitro</i> frente a ataque enzimático .....	100
5.14- Análise de adesão celular.....	105
5.15- Análise de citotoxicidade.....	107
Conclusões.....	108
Capítulo 6.....	110
Conclusões finais .....	110
Referências Bibliográficas.....	112

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1- Fatores que levam a modificação de superfícies.....	12
Tabela 2- Estrutura dos principais polímeros intrinsecamente condutores. ....	25
Tabela 3- Parâmetros termogravimétricos da degradação térmica dos filmes de amido de milho submetidos a diferentes condições de tratamentos térmico. ....	40
Tabela 4- Propriedades mecânicas dos filmes de amido. ....	50
Tabela 5- Composição dos filmes avaliados.....	42
Tabela 6- Propriedades mecânicas dos filmes de amido, amido/sorbitol e amido/sorbitol/polipirrol.....	80
Tabela 7- Propriedades mecânicas dos filmes de amido/sorbitol e amido/sorbitol/polipirrol em diferentes umidades relativas. ....	93
Tabela 8- Descrição do teste de degradação enzimática .....	101
Tabela 9- Número de células por poço após 24 hs do plaqueamento. ....	107

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- (A) Representação de fixação de parafusos. (B) Exemplo de pinos e parafusos metálicos utilizados como biomateriais.....	8
Figura 2- Representação estrutural do amido. ....	19
Figura 3- Representação estrutural da amilopectina (a) e da amilose (b). ....	20
Figura 4- Representação estrutural do sorbitol. ....	23
Figura 5- Representação estrutural do pirrol (a) e do polipirrol (b).....	26
Esquema 1- Equação de polimerização do polipirrol a partir de pirrol e cloreto férrico como agente oxidante. Para cada três unidades constituídas uma é protonada.....	27
Figura 6- Ilustração do sistema para obtenção de espectros de IV de produtos gasosos. ....	34
Figura 7 Perfil de viscosidade e temperatura de uma suspensão aquosa de amido de milho (6% <sub>m/v</sub> ) obtido durante aquecimento em reômetro a taxa de deformação constante de 93s <sup>-1</sup> .....	36
Figura 8- Micrografias ópticas do amido de milho obtido em diferentes condições de aquecimento: A) sem aquecimento; B) após aquecimento a 67°C; C) após aquecimento a 82,8°C; D) após aquecimento a 70°C por 20min.....	37
Figura 9- Curvas de TGA e DTG dos filmes de amido de milho: I) não-tratados; II) 100°C/120min usando diferentes taxas de aquecimento: A) 10°C.min <sup>-1</sup> , B) 15°C.min <sup>-1</sup> , C) 20°C.min <sup>-1</sup> .....	39
Figura 10- Energia de ativação vs fração de perda de massa de amido de milho submetido a tratamento térmico em diferentes condições: A) não-tratados; B) 100°C/120min. ....	41
Figura 11- Perda de massa vs tempo de evaporação para amostra de amido submetido ao intumescimento por 72h. ....	42
Figura 12- Espectros de FTIR dos filmes de amido submetidos a diferentes condições de tratamento térmico: A, C, E) não-tratado; B, D, F) 100°C/120min (as temperaturas em que os espectros foram expostos durante aquecimento em forno tubular estão indicadas na Figura).....	44
Figura 13- Espectros de FTIR de produtos de degradação voláteis dos filmes de amido submetidos a diferentes condições de tratamento térmico: A, C, E) não-tratado; B, D, F) 100°C/120min (as temperaturas em que os espectros foram expostos durante aquecimento em forno tubular estão indicadas na Figura).....	48
Figura 14- Micrografias eletrônica de varredura (seção transversal): A) filme de amido de milho	

- sem tratamento; B) filme de amido de milho tratado termicamente 100°C/120min. .... 51
- Figura 15- Ilustração do sistema de medida de condutividade elétrica pelo método das quatro pontas, onde  $s$  é a distância entre as pontas,  $a$  o comprimento e  $d$  a largura da amostra<sup>[93]</sup>.58
- Figura 16- Perfil de viscosidade e temperatura de uma suspensão aquosa de amido de milho (6%<sub>m/v</sub>): A) Sem sorbitol e B) Com sorbitol (20%<sub>m/v</sub> concentração relativa a quantidade de amido) obtida durante aquecimento em reômetro a uma taxa de cisalhamento de 93s<sup>-1</sup>. ... 61
- Figura 17- Gráficos de: A) Sorção de pirrol e B) Fração de polimerização em função do tempo de exposição aos vapores de pirrol dos filmes de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e diferentes concentrações de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O. .... 63
- Esquema 2- Equação de polimerização do polipirrol a partir de pirrol e cloreto férrico como agente oxidante. Para cada três unidades constituídas uma é protonada. .... 65
- Figura 18- Gráficos de condutividade elétrica  $\sigma_c$  em função do tempo de exposição ao pirrol dos filmes de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e diferentes concentrações de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O. 67
- Figura 19- Difratoograma de raios-x de: a) amido de milho (pó *in natura*); b) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O; c) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O após 24h de exposição aos vapores de pirrol; d) polipirrol (pó). .... 69
- Figura 20- A ) Curvas de TG e B) curvas de DTG de: a) sorbitol; b) filme de amido de milho; c) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol; d) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O; e) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O após 24h de exposição aos vapores de pirrol. .... 70
- Figura 21- Espectros de FTIR de: a) filme de amido de milho; b) sorbitol (pó); c) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O; d) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O após 24h de exposição aos vapores de pirrol; e) polipirrol (pó). .... 74
- Figura 22- Espectros de FTIR –ATR de: A) filme de amido de milho; B) filme de amido/sorbitol; C) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O; D) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O após 24h de exposição aos vapores de pirrol. .... 76
- Figura 23- Micrografias eletrônica de varredura (superfície): A) filme de amido de milho; B) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol; C) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O; D) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O após 24h de exposição aos vapores de pirrol. .... 82

- Figura 24- Micrografias eletrônica de varredura (seção transversal): A) filme de amido de milho; B) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol; C) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O; D) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O após 24h de exposição aos vapores de pirrol. .... 83
- Figura 25- Perda de massa vs tempo de evaporação dos filmes de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O e dos filmes contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol, 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O após 24h de exposição aos vapores de pirrol..... 95
- Figura 26- Perda de massa vs tempo de degradação dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol..... 96
- Figura 27- Micrografias eletrônicas de varredura dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol: A) Filme controle (antes da imersão em SBF); B) 1 dia após imersão em SBF; C) 3 dias após imersão em SBF; D) 7 dias após imersão em SBF com aumento de 1000x..... 98
- Figura 28- Espectro de espectroscopia de energia dispersiva dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol após 1 dias imersão em SBF. .... 100
- Figura 29- Espectro de espectroscopia de energia dispersiva dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol após 3 dias imersão em SBF. .... 100
- Figura 30- Espectro de espectroscopia de energia dispersiva dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol após 7 dias imersão em SBF. .... 100
- Figura 31- Curva de calibração para glicose na presença de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), a 25°C (R<sup>2</sup>=0,9934)..... 102
- Figura 32- Concentração de açúcares redutores liberados na solução após seis semanas de incubação dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol em diferentes soluções de enzima a 37°C..... 103
- Figura 33- Micrografias eletrônicas de varredura da superfície dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol após seis semanas de incubação em diferentes soluções de enzima a 37°C: A) sem tratamento; B) PBS; C) α-amilase (0,6mg/mL); D) α-amilase (2,4mg/mL). .... 104
- Figura 34- Micrografias da superfície dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol após ensaio de adesão celular: A) células fixadas na lamínula com paraformaldeído 4%; B) fragmento de filme incubado sem célula; C) fragmento de filme incubado com célula fixada com paraformaldeído 4%. Com aumento de 500x. .... 106

**SÍMBOLOS E ABREVIATURAS**

DSC – calorimetria diferencial de varredura

FTIR – espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier

Ea – energia de ativação

EPDM – etileno-propileno-5-etilideno-2-norborneno

HA – hidroxiapatita

Semi-IPN – semi - interpenetrante

MEV – microscopia eletrônica de varredura

M<sub>0</sub> – peso da amostra – antes da imersão

M<sub>T</sub> – peso final – após a retirada da imersão

PCI – polímeros condutores intrínsecos

PBS – solução salina tamponada fosfatada

PPi – polipirrol

RGD – seqüência peptídica (arginina-glicina-aspartato)

RMN – ressonância magnética nuclear

rpm – rotações por minuto

SBF – solução simuladora de plasma sanguíneo

Tg – temperatura de transição vítrea

TG – termogravimetria

UR – umidade relativa

## PRODUÇÃO CIENTÍFICA RELACIONADA AO TEMA

### - ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

C. T. Vasques, S. C. Domenech, V. L. S. Severgnini, L. A. O. Belmonte, M. S. Soldi, P. L. M. Barreto, V. Soldi, *Effect of Thermal Treatment on the Stability and Structure of Maize Starch Cast Films*, **Starch/Stärke**, 59 (2007), p. 161-170

### - TRABALHOS RESUMIDOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

C. T. Vasques, S. C. Domenech, V. L. S. Severgnini, L. A. O. Belmonte, M. S. Soldi, V. Soldi, *Effect of Thermal Treatment on the Stability and Crosslinking of Maize Starch Casted Films*, **FBPOL 2005 – 1st French-Brazilian Meeting on Polymers, Florianópolis-Brazil – 24-29 of April 2005.**

C. T. Vasques, S. C. Domenech, V. Soldi, *Caracterização de Filmes de Amido de Milho Reticulados Via tratamento térmico*, **8º Congresso Brasileiro de Polímeros, Águas de Lindóia-SP – 6-10 de Novembro 2005.**

C. T. Vasques, S. C. Domenech, V. Soldi, *Influence of Polypyrrole on the Properties of Maize Starch Casted Films*, **Macro 2006 – World Polymer Congress/ 41st International Symposium on Macromolecules, Rio de Janeiro- Brazil – 16-21 of July 2006.**

## RESUMO

O objetivo geral deste estudo foi preparar filmes de amido de milho com propriedades térmicas, mecânicas e de biocompatibilidade adequadas para aplicação como biomaterial. Nesse sentido, foi inicialmente analisado o efeito do tratamento térmico na estabilidade e estrutura dos filmes de amido de milho. Características como solubilidade, estabilidade térmica, propriedades mecânicas, estruturais e morfológicas foram avaliadas. Os resultados comprovaram o uso do tratamento térmico como uma técnica de baixo custo para a obtenção de filmes de amido mais estáveis. Numa segunda etapa, os filmes de amido de milho foram avaliados quanto à adição de plastificante e polímero condutor. Para este sistema, condições de gelatinização, análise elementar, condutividade elétrica, cristalinidade, estabilidade térmica, propriedades mecânicas, estruturais e morfológicas foram determinadas. Os valores de condutividade alcançaram um máximo de, aproximadamente,  $2,07 \times 10^{-6} \text{ Scm}^{-1}$  para composição contendo 20% de sorbitol e 5% de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  escolhida como condição de síntese de polipirrol ideal. A provável formação de um complexo entre o amido e cloreto férrico foi responsável por várias modificações nas propriedades térmicas, estruturais e morfológicas dos filmes. O efeito do plastificante sobre os filmes de amido ficou evidenciado com a diminuição do módulo de elasticidade e tensão máxima de ruptura. Finalmente, foi avaliada a viabilidade desse novo material para aplicações biomédicas, através de estudos das propriedades mecânicas em diferentes umidades relativas, intumescimento, ensaios citológicos de adesão celular, citotoxicidade, bioatividade, degradação enzimática e degradação em diferentes pH. Os resultados sugerem a obtenção de um filme com caráter condutor e com propriedades adequadas que favorecem a adesão celular e a biocompatibilidade, sendo portanto viável sua aplicação como biomaterial.

## ABSTRACT

In this study, the main objective was to prepare maize starch films with adequate thermal, mechanical and biocompatible properties for application as a biomaterial. Thus, the effect of thermal treatment on the stability and structure of maize starch films was first analyzed. Characteristics such as solubility, thermal stability, structural, morphologic and mechanical properties, were analyzed. The results suggested that the thermal treatment is a low cost technique for the preparation of stable starch films. Secondly, the maize starch films were evaluated considering the addition of a plasticizer and a conducting polymer. For this system, the gelatinization conditions, elemental analysis, electric conductivity, mechanical, structural and morphological properties, were determined. The maximum conductivity value was ca.  $2.07 \times 10^{-6} \text{ Scm}^{-1}$  for the system with 20% sorbitol and 5%  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  which was chosen as the ideal condition for the synthesis of polypyrrol. Apparently, the formation of a complex between starch and ferric chloride was responsible for the changes in the thermal, mechanical, structural and morphological properties. The decrease in the elasticity modulus and strenght at the rupture were the evidence for the plasticizer (sorbitol) effect. Finally, the viability of the new material for application in the medical area was evaluated by the study of the mechanical properties at different humidities, swelling, cytologic experiments for celular adhesion, citotoxicity, bioactivity, enzymatic degradation and degradation at differents pH. The results suggested the obtention of film with a conduting character and with adequate properties which favor the celular adhesion and biocompatibility, being adequate for using as biomaterial.

## **CAPÍTULO 1**

### **1.1 -INTRODUÇÃO**

As superfícies e interfaces de biomateriais desempenham papel fundamental em sistemas biológicos e na medicina devido ao fato de que a grande maioria das reações imunológicas e inflamatórias ocorrerem nestes locais<sup>[1]</sup>. No século XIX, foram realizadas as primeiras observações relativas ao controle das reações biológicas na superfície dos materiais. Mais recentemente, o avanço das técnicas de caracterização de materiais e superfícies, relacionadas tanto a estrutura quanto à composição e cristalinidade, impulsionou e permitiu o avanço na área de ciências e engenharia de materiais, principalmente biomateriais<sup>[1]</sup>. Os materiais utilizados para o desenvolvimento de produtos a serem implantados em tecidos vivos podem ser compostos de uma variedade de biomateriais, como metais, vidros, cerâmicas e polímeros biodegradáveis. O conhecimento da eficácia biológica de cada material requer um profundo conhecimento de sua superfície e a interação da mesma com o tecido. A superfície tem papel crucial na interação biológica por duas razões: primeiramente, a região superficial do material pode ser diferente na morfologia e composição do resto do material. Em segundo lugar, os materiais que não liberam substâncias reativas com o tecido têm sua resposta condicionada às características da superfície<sup>[2]</sup>.

A natureza da superfície pode ser descrita em termos químicos, morfológicos, biológicos e de propriedades elétricas<sup>[1]</sup>. Sua modificação para aplicações biomédicas possibilita a combinação de propriedades de volume do material com as propriedades desejadas, como biocompatibilidade, bioatividade, resistência mecânica, dentre outras. Esta combinação visa otimizar o desempenho do sistema, minimizando simultaneamente as perdas funcionais

decorrentes da substituição do tecido ou órgão lesado pelo biomaterial implantado. Os métodos de modificação de superfície são classificados em três grupos principais: métodos biológicos, métodos físico-químicos, e os métodos de recobrimento<sup>[1]</sup>.

Os materiais utilizados na área biomédica devem possuir características biomecânicas, elétricas e biológicas compatíveis com o tecido ou órgão lesado. Para escolha de um material para implantação no tecido vivo deve-se levar em conta vários fatores tais como fadiga do material, bioatividade, adesão celular, degradação do material e biocompatibilidade.

No âmbito acadêmico, optou-se neste estudo pelo desenvolvimento de um biomaterial através do método de modificação de superfície a partir da deposição de polipirrol, um polímero condutor, sobre filmes de amido de milho e sorbitol, com objetivo de criar um dispositivo para fixação interna que reúna ao mesmo tempo propriedades de bioatividade, biocompatibilidade e bioadesão e que seja preferencialmente bioabsorvível.

Este trabalho, estruturado em capítulos, apresenta no capítulo 2 embasamentos teóricos pertinentes à análise dos resultados, bem como antecedentes bibliográficos referentes ao assunto. O capítulo 3 descreve a metodologia utilizada para avaliar o efeito do tratamento térmico sobre a estabilidade e estrutura dos filmes de amido de milho. Por sua vez, o capítulo 4 propõe uma metodologia para preparação de filmes de amido de milho eletricamente condutores para aplicação como biomaterial. No capítulo 5 estão apresentados os estudos de viabilidade de aplicação desse material a base de amido de milho na forma de experimentos simuladores de reações biológicas *in vitro*. As conclusões finais estão apresentadas no capítulo 6.

## 1.2 -JUSTIFICATIVA

A ciência de polímeros tem intensificado os estudos na área de biomateriais levando ao desenvolvimento de novos materiais bioabsorvíveis para várias aplicações na área biomédica. Uma das principais vantagens desses dispositivos consiste no fato de não haver necessidade de remoção, uma vez que o controle da sua cinética de degradação permite a reconstituição do órgão ou tecido à medida que ocorre sua absorção.

O desenvolvimento de biomateriais nacionais é uma alternativa para a redução dos custos com saúde pública, uma vez que os materiais utilizados para fixação interna em sua maioria são importados.

O investimento no desenvolvimento de tecnologias em biomateriais que substituam em parte ou totalmente um tecido vivo possibilita benefícios a curto e longo prazo e, num primeiro momento, reduz o tempo de convalescença de um paciente evitando maiores gastos em saúde pública. Num segundo momento proporcionará a aplicação de tratamentos menos agressivos minimizando cada vez mais os riscos de rejeição e recuperação em processos cirúrgicos.

Muitos polímeros biodegradáveis têm sido utilizados em diferentes aplicações, por exemplo, próteses ortopédicas, liberação controlada de fármacos e engenharia de tecidos. Estes materiais tem sido desenvolvidos para se degradarem em períodos de tempo controlados, bem como produzirem produtos de degradação de baixa toxicidade. A degradação desses materiais está geralmente associada ao controle de suas propriedades físico-químicas (cristalinidade, peso molecular, composição química e hidrofiliabilidade).

O desenvolvimento de materiais considerados bioativos e biodegradáveis é de grande interesse, principalmente porque, além de substituir tecidos traumatizados também propiciam a

recuperação do tecido danificado através da atuação em metabolismo intra e extracelulares responsáveis pela reprodução celular e propagação dos tecidos em crescimento.

Assim, os polímeros naturais, como os polissacarídeos, bem como os polímeros condutores vêm ganhando espaço na otimização de superfícies como material de recobrimento devido em parte a propriedades como biodegradabilidade, bioatividade e baixa toxicidade, sem deixar de mencionar o baixo custo e acessibilidade.

Neste trabalho foi utilizado, o amido de milho como uma alternativa viável para este fim, devido principalmente ao seu baixo custo e acessibilidade. A fim de garantir melhores propriedades mecânicas adicionou-se aos filmes de amido de milho o sorbitol como agente plastificante. Os filmes foram modificados com adição do polipirrol um polímero condutor com propósito de otimizar propriedades de biocompatibilidade e bioadesão, uma vez que a adição desse tipo de polímero pode promover, ou ainda, facilitar o processo de adesão celular .

Dentro deste contexto, este estudo tem como objetivo elaborar filmes poliméricos biocompatíveis, utilizando os materiais acima mencionados, para aplicação na área biomédica.

Um dispositivo com estas características poderá promover uma melhor interação com o tecido ou órgão lesado, possibilitando assim uma regeneração mais eficiente e rápida.

### **1.3 -OBJETIVOS**

#### **1.3.1- Objetivos Gerais**

Preparar e caracterizar filmes de amido e sorbitol eletricamente condutores. Avaliar os efeitos da adição do plastificante, agente oxidante e polímero condutor quanto à estabilidade térmica, estrutura química e morfológica, condutividade e propriedades mecânicas, bem como sua viabilidade para aplicações biomédicas mediante simulação de situações fisiológicas.

#### **1.3.2- Objetivos Específicos**

- Determinar as condições de gelatinização do amido de milho através de reologia e microscopia óptica.
- Tratar termicamente os filmes de amido de milho com intuito de aumentar a estabilidade em fluidos biológicos.
- Investigar as propriedades térmicas (estabilidade) e mecânicas (módulo de elasticidade, tensão na ruptura, deformação máxima), bem como capacidade de retenção de água, dos filmes de amido de milho tratados e não tratados termicamente.
- Caracterizar a estrutura química por espectrometria no infravermelho (FTIR) e morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de amido de milho tratados e não tratados termicamente, e, dos filmes amido/sorbitol/ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  antes e após a exposição aos vapores de pirrol.
- Avaliar o efeito da adição de plastificante, cloreto férrico e polímero condutor nas propriedades térmicas e capacidade de retenção de água, bem como possíveis mudanças na cristalinidade (difração de raios-x) sobre os filmes de amido de milho.

- Determinar através de análise gravimétrica a sorção de pirrol e fração de polimerização de polipirrol sobre os filmes de amido de milho e sorbitol.
- Determinar a composição elementar do polipirrol (análise elementar) obtido por síntese química, bem com a condutividade dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol.
- Avaliar o efeito da adição de polímero condutor em diferentes umidades relativas sobre as propriedades mecânicas (módulo de elasticidade, tensão na ruptura, deformação máxima) dos filmes de amido.
- Avaliar a degradação *in vitro* dos filmes de amido/sorbitol/PPi frente ao ataque enzimático e a diferentes pH.
- Determinar a bioatividade, capacidade de adesão celular e citotoxicidade dos filmes de amido/sorbitol/PPi.

## **CAPÍTULO 2**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **2.1- Biomateriais**

Materiais aplicáveis em componentes implantados no corpo humano para substituição de partes danificadas ou doentes são denominados biomateriais. Características de não toxicidade e compatibilidade com os tecidos do corpo, bem como capacidade de não promover reações biológicas adversas, despertaram o interesse da comunidade científica nos últimos anos, intensificando assim os estudos nessa área<sup>[1]</sup>.

Os biomateriais usados em dispositivos médicos, sobretudo naqueles que são temporária ou permanentemente implantados, são manufaturados ou processados para se adequarem ao contato com proteínas, células, tecidos, órgãos e sistemas orgânicos. As complicações oriundas desses dispositivos variam de acordo com sua aplicação. Infecções e biodegradação podem afetar dispositivos que têm aplicações de longa duração como, por exemplo, próteses permanentes e válvulas cardíacas.

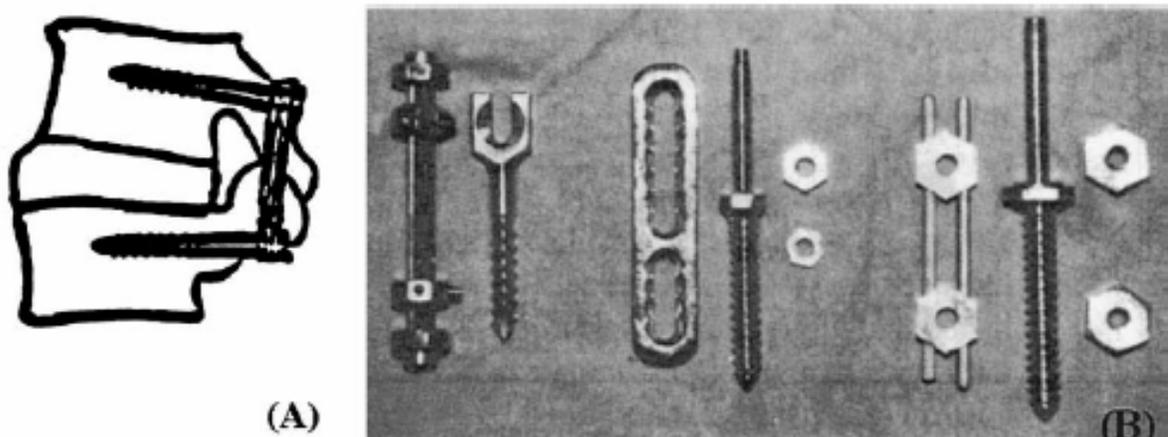
Quanto ao tipo de material, os biomateriais podem ser: metais, cerâmicos, polímeros sintéticos, macromoléculas naturais (como biopolímeros), compósitos e semicondutores.

Os materiais metálicos destacam-se pelo uso na confecção de implantes, principalmente devido a sua boa resistência mecânica, elevada tenacidade, facilidade de fabricação e baixo custo. Elementos metálicos como Fe, Cr, Co, Ni, Ti, Ta, Mo, são tolerados pelo corpo em quantidades limitadas, sendo alguns até essenciais para funções celulares ou metabólicas<sup>[1]</sup>.

Entretanto, o potencial de corrosão e os produtos de corrosão são os fatores limitantes na sua aplicabilidade como biomaterial.

Dentre os biomateriais metálicos, os aços inoxidáveis, principalmente ligas Co-Cr-Mo, Co-Ni-Cr-Mo, titânio puro, Ti-6Al-4V, são comumente utilizados, pois possuem ampla aplicação na ortopedia na confecção de próteses articuladas e ainda como elementos estruturais na fixação de fraturas nas osteossínteses<sup>[1,3-6]</sup>.

A Figura 1 apresenta algumas formas utilizadas na ortopedia como elementos estruturais de fixação de fraturas.



**Figura 1-** (A) Representação de fixação de parafusos. (B) Exemplo de pinos e parafusos metálicos utilizados como biomateriais.

Materiais cerâmicos (incluindo vidros e vitrocerâmicos) são compostos inorgânicos não metálicos, tipicamente duros, frágeis, com altas temperaturas de fusão, baixa condutividade e boa estabilidade química<sup>[1]</sup>. Na medicina são amplamente utilizados como lentes para óculos, fibras ópticas para endoscopia, vidros porosos carreadores de anticorpos e enzimas, e mais

recentemente como materiais de implantes e regeneração de tecidos.

A aplicação de cerâmicas, vidros e vitrocerâmicos para reparo ou substituição dos tecidos conectivos duros vem sendo consolidada através do desenvolvimento de novos materiais contendo misturas de sílica, fosfato, óxido de cálcio entre outros<sup>[7-9]</sup>. Muitas composições de cerâmicas vem sendo testadas para uso no corpo humano. O sucesso clínico desses materiais biocerâmicos requer a realização simultânea de uma interface estável com o tecido e uma compatibilidade do comportamento mecânico do implante com o tecido a ser substituído<sup>[1,10]</sup>.

A bioatividade do material provoca uma ligação interfacial entre o tecido vivo e o material, sem a formação da cápsula fibrosa que separa o biomaterial do tecido. Fatores como composição química das biocerâmicas e vidros bioativos, estrutura porosa entre outros são essencialmente importantes, pois podem afetar a resposta do tecido que pode ser classificada como<sup>[1,7,8]</sup>:

- 1- Fixação morfológica: o implante é fixado por crescimento tecidual nas irregularidades superficiais, por cimentação do componente ou por ajuste sob pressão no defeito. Ocorre para cerâmicas não-porosas, quase inertes.
- 2- Fixação biológica: o tecido cresce internamente aos poros do material, fixando o implante. Ocorre para cerâmicas inertes mais porosas.
- 3- Fixação bioativa: o material se fixa diretamente através da formação de uma interface contínua com o tecido. Ocorre para cerâmicas bioativas densas.

A natureza da interface tecido-implante e o mecanismo de fixação são de grande importância no desempenho do implante<sup>[1,7,8]</sup>.

Polímeros biodegradáveis apresentam interesse cada vez maior na área de biomateriais por não precisarem ser removidos e não causarem efeitos indesejáveis em longoprazo. Suas inúmeras aplicações incluem suturas, liberação controlada de fármacos, fixação de dispositivos ortopédicos e matrizes para engenharia de tecidos<sup>[3-8,11]</sup>.

Além de serem funcionalmente ativos os biopolímeros devem ser biocompatíveis. A biocompatibilidade de polímeros envolve normalmente quatro fenômenos<sup>[1,12]</sup>:

- 1- Processos de concentração de biomacromoléculas junto à superfície dos materiais (adsorção), logo após a implantação destes no corpo;
- 2- Resposta local do tecido à presença do biomaterial (observada na forma de respostas inflamatórias e imunológicas);
- 3- Efeito do ambiente corpóreo no material (visualizado, por exemplo, pelo estabelecimento de processos de degradação de um polímero);
- 4- Resposta do corpo como um todo à presença do biomaterial (percebida através do aparecimento de tumores, alergia, infecções, entre outras);

## **2.2- Modificação da superfície de biopolímeros – interface polímero-tecido**

A interação entre materiais sintéticos usados como próteses é regulada por fenômenos que ocorrem na interface deste sistema, como adsorção de proteínas, fixação de células matriciais entre outros<sup>[1]</sup>.

As características e propriedades interfaciais são fundamentais para promover interação entre o sistema tecido vivo-implante. A característica estrutural da interface está associada a diferentes aspectos químicos, físicos e morfológicos.

As modificações superficiais podem ser divididas em duas categorias: (1) Alteração física ou química dos átomos ou moléculas nas superfícies existentes (modificação química, entre outras) e (2) Recobrimento de uma superfície natural com material de diferentes composições ou estrutura (filmes, enxertos, entre outros)<sup>[1]</sup>.

Polímeros são especialmente úteis para aplicação como biomateriais, uma vez que podem ser facilmente modificados estruturalmente visando uma determinada aplicação.

As propriedades de um polímero podem ser modificadas através de sua mistura com outros polímeros ou materiais. Essas novas propriedades dependerão da natureza e estado físico do polímero original, da forma de processamento da mistura, da faixa de composição dos componentes misturados e das interações entre estes componentes.

A interação tecido-implante é fortemente influenciada pelas propriedades químicas e físicas da superfície do material implantado, tais como carga elétrica, rugosidade, propriedades mecânicas (rigidez ou flexibilidade), cristalinidade, porosidade, solubilidade, pH, ou presença de certos átomos ou grupos funcionais. Uma superfície considerada ativada para acoplamento deve possuir grupos quimicamente reativos como hidroxilas (-OH), aminas (-NH<sub>2</sub>), ácidos carboxílicos (-COOH) entre outros. Se tais grupos reativos não estiverem presentes nas superfícies naturais, tratamentos como plasma, ataque químico e outros devem ser utilizados<sup>[1,12,13]</sup>.

Nos casos em que a biocolonização é almejada, a adsorção de certas proteínas constituintes do tecido anfitrião deve ser obtida. Proteínas adesivas adsorvidas em superfícies (fibronectina e vitronectina, entre outras) apresentam seqüências de aminoácidos (seqüência RGD – arg-gly-asp) as quais são reconhecidas por receptores situados nas membranas celulares chamados integrinas. Estes receptores estão ligados a microfilamentos intracelulares responsáveis pela adesão celular. Outra opção de modificação de superfície é a inserção, na superfície do polímero, de peptídeos contendo a seqüência de aminoácidos RGD, quando exposto ao contato celular propiciarão a osteointegração<sup>[1,12-18]</sup>.

A reação global, de um sistema vivo a um implante, é controlada por um elevado número de fatores, resultando na aceitação ou rejeição desse material no desempenho das funções desejadas. A existência de um elevado número de ligações químicas, presença e distribuição heterogênea de cargas, resulta em uma energética de superfície diferente da energética do volume do material<sup>[1]</sup>.

A estratégia de se modificar a superfície de biomateriais está vinculada à idéia de reter características físicas do material relevantes, ao mesmo tempo em que biointerações são manipuladas visando respostas material-tecido adequadas.

Os métodos mais comuns de se alterar a superfície de materiais são: (1) recobrimentos; (2) gradiente superficial causado por enxerto de macromoléculas, implantação iônica ou difusão de uma segunda espécie; (3) deposição de filmes via Langmuir-Blodgett (múltiplas camadas de moléculas orientadas); (4) uso de aditivos que migram para superfície durante o processamento; (5) reações químicas de superfície e (6) ataque químico ou mecânico de superfícies (criação de rugosidade)<sup>[1]</sup>.

Na Tabela 1 estão apresentados alguns fatores que levam a modificação de biomateriais.

**Tabela 1-** Fatores que levam a modificação de superfícies <sup>[1]</sup>.

---

Para modificar a hemocompatibilidade:

- \*grupos octadecil enxertados em superfícies
- \*deposição de flúor-polímero via plasma
- \*deposição de polissiloxanos via plasma
- \*hidrogéis enxertados a partir de tratamento com radiação

Para afetar a adesão e crescimento celular:

- \*oxidação superficial de poliestirenos
- \*superfície tratada com plasma de amonia
- \* deposição de flúor-polímero via plasma
- \*superfície dotada de grupamentos peptídeos RGD ou proteínas adesivas (fibronectina)

Para controlar a adsorção de proteínas

- \*superfícies com poli(etileno glicol) imobilizado (reduz a adsorção)
  - \*enxerto de albumina em superfícies (reduz a adsorção)
  - \*superfícies poliméricas com ligações cruzadas (reduz a adsorção)
  - \*poliestireno modificado quimicamente visando atividades similares a heparina
- 

De acordo com a Tabela 1 é possível modificar a superfície de um biomaterial visando melhorar propriedades de adesão e crescimento celular. A adição de um polímero condutor a uma matriz polimérica pode favorecer a interação tecido-implante, através de estímulos elétricos. Outra possibilidade é a incorporação de moléculas biologicamente ativas nas matrizes poliméricas.

### 2.3- Técnicas de caracterização de biomateriais

Os métodos de avaliação citológica da reação local são histologia, histoquímica, imunohistoquímica, microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia eletrônica de varredura (MEV), testes bioquímicos e testes mecânicos<sup>[1]</sup>. A histologia, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão são empregados para determinar aspectos morfológicos do material de implante e tecido vizinho nos níveis tissular, celular e molecular. A morfologia e padrões de coloração das células e matriz extracelular possibilitam a identificação desses componentes no tecido adjacente<sup>[1]</sup>.

Para avaliação de certos tipos de células e componentes da matriz extracelular tem sido utilizado método histoquímico. A presença de fosfatase ácida resistente a tartarato é usada para distinguir osteoclastos e a coloração para fosfatase alcalina auxilia na identificação dos osteoblastos<sup>[1]</sup>.

A toxicidade é definida pela capacidade de liberar substâncias que possam causar danos ou morte celular, direta ou indiretamente, através de vias metabólicas<sup>[1]</sup>. Os testes para determinação *in vitro* são usados em biomateriais nas formas sólida, pulverizada, em solução ou extrato. Após a interação do biomaterial com as culturas celulares, os danos são observados e classificados conforme normas de organizações internacionais como *American Society for Testing Materials* (ASTM), *International Standardt Organization* (ISO) e *United States Pharmacopeia* (USP). Dentre os testes mais utilizados tem-se o teste de contato direto-ASTM-F813<sup>[19]</sup>, o teste de difusão em agar-ASTM –F895<sup>[20]</sup>.

Nos estudos da biodegradação *in vitro* de biomateriais são utilizadas metodologias que envolvem a degradação do material frente ao ataque ácido, básico e enzimático. Investigar o

comportamento de degradação de um dispositivo ortopédico bioabsorvível frente a diferentes pH é de fundamental importância. Quando o biomaterial é implantado, no momento que ocorre a fratura, uma série de reações acontecem e deste momento até a consolidação total do osso ocorrem várias alterações no pH do meio, as quais influenciam no tempo de degradação do material implantado. Avaliar a ação enzimática no desenvolvimento de biomateriais com tempo de degradação controlada é extremamente importante, uma vez que existe a possibilidade de desenvolver metodologias de imobilização de enzimas para acelerar a degradação ou ainda para degradar a matriz polimérica contendo um agente bioativo. Polímeros diferem no tempo e na forma de degradação a qual é determinada pela energia requerida para quebrar as ligações e pela localização das ligações. Polímeros com ligações covalentes fortes (C-C) ao longo da cadeia e sem grupos hidrolisáveis necessitam de um longo tempo ou catalisadores para que ocorra a degradação. Moléculas com grupos hidrolisáveis (ex: C-O-C, C-N) são degradados muito mais rápida e eficientemente<sup>[21]</sup>. Para caracterizar um biomaterial frente à ação enzimática é interessante utilizar enzimas específicas que possam estar envolvidas no processo de degradação desse material<sup>[22]</sup>. No caso do amido as enzimas capazes de degradá-lo são  $\alpha$ -amilases,  $\beta$ -amilases, glucoamilases, entre outras<sup>[22]</sup>.

Outro fator fundamental no estudo de biomateriais é a avaliação do comportamento bioativo. Esse estudo pode ser realizado através do contato do material desenvolvido com uma solução simuladora de plasma. O objetivo desse teste é verificar a possível formação de uma camada bioativa de Ca-P (cálcio e fosfato), a qual indica que o material pode apresentar uma interação com o tecidos ósseo *in vivo*<sup>[23]</sup>.

## 2.4- Blendas poliméricas

Blendas poliméricas são misturas físicas de dois ou mais polímeros<sup>[24]</sup> que podem interagir entre si através de forças secundárias como Van der Waals, dipolo-dipolo, ligações hidrogênio, etc. As blendas poliméricas podem apresentar vantagens em relação aos seus componentes puros e comparativamente, a síntese de um novo polímero, como a melhora nas características térmicas e mecânicas, bem como a redução do custo de obtenção de um novo material via síntese química.<sup>[25]</sup>

Amido/poli(vinil álcool)<sup>[26]</sup>, Amido/poli(ácido lático)/poli(vinil álcool)<sup>[27]</sup>, Amido/policaprolactona<sup>[28,29]</sup> e Amido/poli-3-hidroxibutirato<sup>[30]</sup> são exemplos de blendas poliméricas a base de amido descritas na literatura.

Os métodos de processamento de blendas poliméricas mais utilizados são: mistura mecânica, na qual os polímeros são misturados à temperatura acima da sua temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) ou temperatura de fusão ( $T_m$ ) e solubilização no qual os polímeros são dissolvidos em um solvente comum ou mistura de solventes com posterior evaporação<sup>[31]</sup>.

Os métodos de caracterização de blendas poliméricas mais comumente utilizados são: análise termogravimétrica (TG), ensaios mecânicos, microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopias de infravermelho (FTIR) e de difração de raios-x, entre outros.

A termogravimetria (TG) é a técnica na qual a variação de massa de uma substância é medida em função da temperatura (varredura de temperatura), ou do tempo a uma temperatura constante (modo isotérmico). A amostra pode ser aquecida ou resfriada, a uma velocidade selecionada, ou ainda pode ser mantida a uma temperatura fixa. O registro é a curva termogravimétrica, mas é possível ainda a obtenção da derivada dessa curva, denominada DTG, a qual representa a velocidade de variação de perda de massa em função da temperatura ou

tempo. O equipamento utilizado na termogravimetria é constituído de uma microbalança, forno, um programador de temperatura e um sistema de aquisição de dados. As curvas termogravimétricas permitem obter conclusões quanto à decomposição térmica da amostra<sup>[32]</sup>.

O ensaio mecânico de tração permite avaliar o comportamento do material sob carga de tração estática ou lentamente aplicada. O registro é uma curva de tensão em função da deformação. O coeficiente de proporcionalidade entre a tensão e deformação representa o módulo de elasticidade. O limite de resistência do material representa a tensão máxima a qual o material pode ser submetido antes de romper<sup>[1]</sup>.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite o estudo de amostras de filmes em seu estado original, essa técnica possibilita a visualização de possíveis imperfeições, porosidades, separação de componentes dos filmes em camadas, estrutura da superfície e visão da estrutura da seção transversal. O microscópio eletrônico de varredura produz uma imagem ampliada e tridimensional a partir de interações de um feixe de elétrons com o material que varre a área em análise<sup>[1,33]</sup>

A análise por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) tem sido utilizada para caracterizar possíveis interações entre misturas poliméricas. A espectroscopia FTIR é uma técnica acessível e quando seus resultados são explorados adequadamente fornece informações estruturais importantes que também poderiam ser acessadas com outras técnicas como, por exemplo, ressonância magnética nuclear (RMN)<sup>[1,33]</sup>.

A difração de raios-x é uma técnica usada primeiramente para identificar as fases cristalinas presentes nos materiais, pois cada sólido cristalino tem seu padrão único de difração de raios x que pode ser usado como uma “impressão digital”. Os espectros com o resultado de um experimento são fornecidos relacionando os valores do ângulo de difração ( $2\theta$ ) com a sua intensidade<sup>[1,33]</sup>.

## 2.5- Polissacarídeos

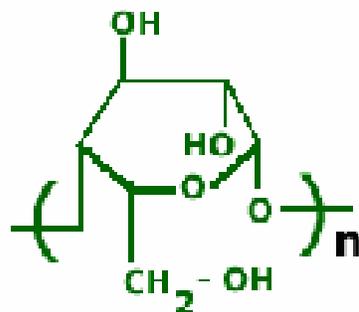
Polissacarídeos são macromoléculas naturais presentes em quase todos os organismos vivos, no qual, exercem várias funções. São formados pela condensação de monossacarídeos ou seus derivados, unidos entre si por ligações glicosídicas<sup>[22,34]</sup>. A seqüência desses monossacarídeos pode variar muito, alternando as unidades estruturais, contendo segmentos mais curtos ou mais longos, formando cadeias lineares, ramificadas e raramente, cíclicas como dextrinas de Shardingier<sup>[34]</sup>.

Nos últimos anos, polímeros naturais, como os polissacarídeos, têm sido aplicados na área biomédica devido principalmente a propriedades como biodegradabilidade e não toxicidade. Os exemplos mais comuns são: o amido, celulose, pectina, entre outros, cujo interesse da área biomédica está associada à possibilidade de serem aplicados em formulação de cimentos ósseos, engenharia de tecidos e na liberação controlada de fármacos<sup>[23,35,36]</sup>.

## 2.6- Amido

O amido é um carboidrato responsável pelo armazenamento de energia das plantas. Encontra-se, sobretudo em partes específicas, como nas sementes, no caso do milho, onde se apresenta densamente compactado em estruturas conhecidas como grânulos semicristalinos. Composto por dois polissacarídeos: amilose (10-30%) e amilopectina (70-90%)<sup>[22,34]</sup>.

O amido é um homopolímero constituído de repetições de unidades de anidroglicose. Sua estrutura química está representada na Figura 2.



**Figura 2-** Representação estrutural do amido.

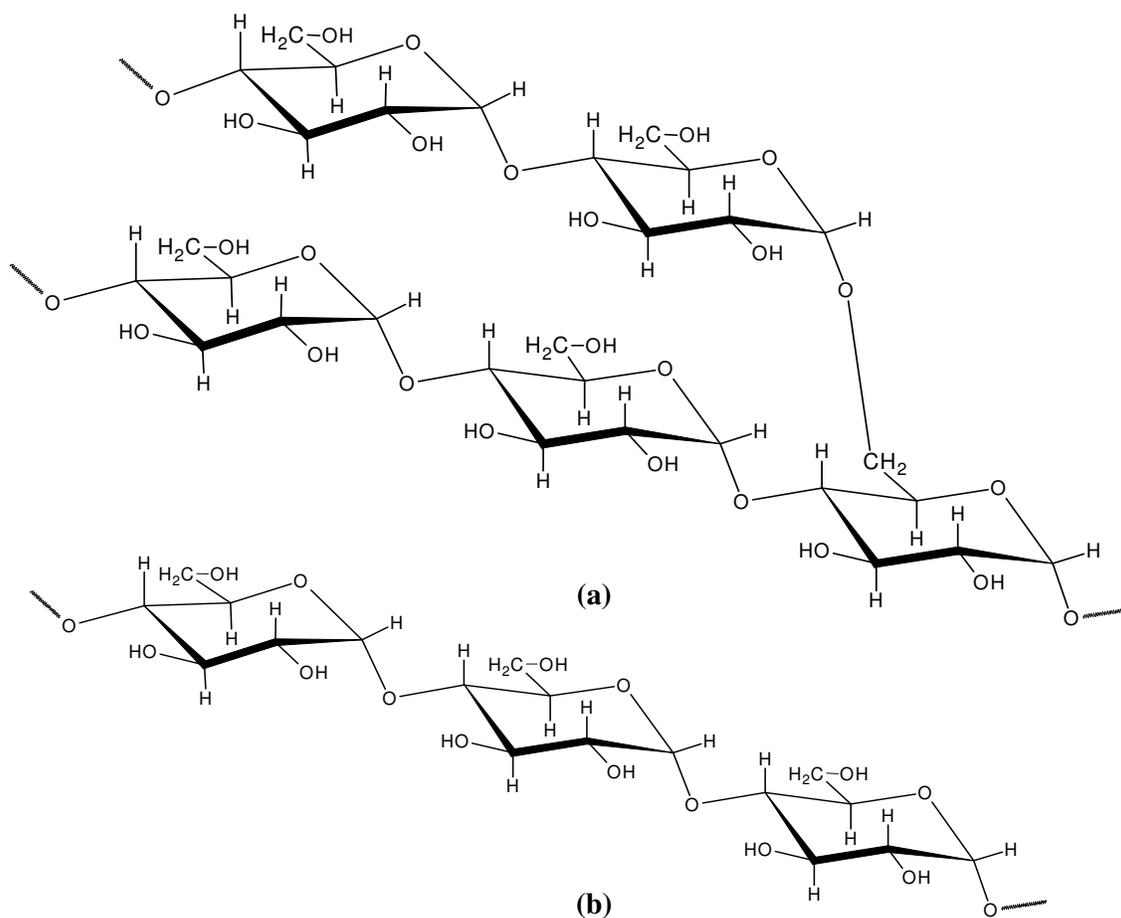
Os amidos podem ser isolados a partir de fontes, como milho, batata, mandioca, aveia, ervilha, arroz, entre outras. Diferem em suas propriedades estruturais e químicas devido a diferentes proporções de amilose e amilopectina<sup>[22,34,37]</sup>.

A amilose é formada por unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranoses unidas entre si por ligações glicosídicas  $\alpha(1\rightarrow4)$  caracterizando a parte não ramificado. A estruturas da amilose e amilopectina estão representadas na Figura 3.

As moléculas de amilose são formadas por cerca de 200 a 700 unidades de glicose, o que geralmente confere a esta uma forma mais alongada. Embora ilustrada tipicamente por uma estrutura linear de cadeia, a amilose de fato é freqüentemente helicoidal. As moléculas de amilose tendem a enrolar-se de forma rígida formando uma única hélice ou ainda podem formar zonas de junção de duplas hélices paralelas ainda mais rígidas. O interior da hélice contém átomos de hidrogênio sendo, portanto, hidrofóbico e permite que a amilose forme complexos com ácidos graxos livres, com componentes glicéridos dos ácidos graxos, com alguns álcoois e com iodo<sup>[38,39]</sup>.

Por outro lado, amilopectina é constituída de unidades  $\alpha$ -D-glucopiranoses também ligadas umas às outras por ligações  $\alpha(1\rightarrow4)$ , no entanto essas cadeias estão unidas entre si por

ligações  $\alpha(1\rightarrow6)$  responsável pela parte ramificada do amido<sup>[22,34,37,40]</sup>. A molécula de amilopectina constituída por uma cadeia principal, chamada cadeia C, que possui um grupamento final não redutor e numerosas ramificações, chamadas de cadeias B, nas quais o terceiro tipo de cadeia, as cadeias A, são fixadas<sup>[38,39,41]</sup>.



**Figura 3-** Representação estrutural da amilopectina (a) e da amilose (b).

A molécula de amilopectina pode conter cerca de 2 milhões ou mais de unidades de glicose, formando uma estrutura bastante compacta. As moléculas estão orientadas de forma radial, podendo, em função disso, formar regiões concêntricas alternando domínios cristalinos e amorfos<sup>[39,41]</sup>.

Existem três tipos de estruturas cristalinas classificadas por Katz e Van Itallie<sup>[41]</sup> conhecidas como tipo-A, característico de amido de cereais, tipo-B encontrado em amido de tubérculos e amidos de vagens denominados tipo-C. A principal diferença entre as estruturas cristalinas A e B é a densidade da dupla hélice na célula unitária. A estrutura do tipo B é descrita como a união das cadeias em forma de hélices originando uma estrutura hexagonal. No centro desse arranjo são alojadas moléculas de água que conferem a esse tipo de estrutura menor rigidez. A estrutura do tipo A apresenta uma disposição das duplas hélices de forma monoclinica que confere uma estrutura mais rígida<sup>[38,40,41]</sup>.

Devido à excelente biodegradabilidade, baixo custo de produção e obtenção a partir de recursos renováveis, o amido constitui-se como fonte promissora para aplicações biomédicas, principalmente na pesquisa voltada à obtenção de biomateriais usualmente empregados em implantes, bem como constituinte na formulação de novos materiais para essas aplicações.

Materiais a base de amido podem ser degradados no corpo humano por várias enzimas, resultando em produtos de degradação (carboidratos) que podem ser rapidamente metabolizados e excretados. Ao mesmo tempo em que são degradados esses biomateriais podem servir como suporte para crescimento de células<sup>[8]</sup>.

De acordo com Espigares *et al*<sup>[23]</sup> a combinação do amido com compostos cerâmicos como a hidroxiapatita (HA) pode produzir um material parcialmente biodegradável e bioativo capaz de promover a regeneração de ossos, podendo ser utilizado como cimento ósseo.

Da mesma forma Boesel *et al*<sup>[42]</sup>, avaliando o comportamento de compósitos hidrofílicos a base de amido como substituintes para fixação e preenchimento de defeitos ósseos

comprovaram sua viabilidade tanto em aspectos de biocompatibilidade quanto de não-toxicidade.

Segundo, Elvira *et al*<sup>[43]</sup> hidrogéis a base de amido podem representar uma alternativa interessante para aplicações biomédicas em sistemas de liberação controlada de fármacos.

Além disso, propriedades inerentes ao amido como as citadas anteriormente permitem também sua aplicação na engenharia de tecidos como suporte para crescimento de célula comprovada pela capacidade de restauração das características estruturais e funções fisiológicas do organismo à medida que um novo tecido vai sendo formado<sup>[44-46]</sup>.

Leonor *et al*<sup>[71]</sup> apresentaram o amido como uma possibilidade de otimização de superfícies de compósitos melhorando assim sua performance de proliferação e adesão celular.

Pashkuleva *et al*<sup>[36]</sup> avaliaram a modificação das superfícies de blendas a base de amido e seu efeito na performance de proliferação e adesão celular de osteoblastos.

Estudos adicionais envolvendo compósitos a base de amido, relacionados a sua bioatividade, comprovaram seu potencial como alternativa para várias aplicações biomédicas<sup>[7,8,47,48]</sup>.

### **2.6.1- Plastificantes mais utilizados na aditivação do amido**

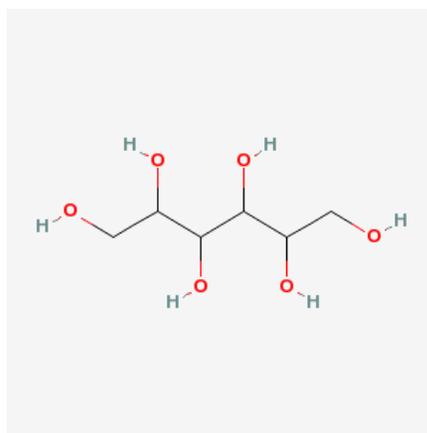
Os plastificantes geralmente reduzem as temperaturas de transição vítrea e de fusão. Além disso, afetam as propriedades mecânicas e físicas, sem alterar a natureza química das macromoléculas.

A atuação dos plastificantes nos polímeros envolve a neutralização, ou redução, das forças intermoleculares. Além de miscível com o polímero, o plastificante deve ser compatível e permanecer no sistema. Isto implica necessariamente em similaridade de forças intermoleculares dos dois componentes<sup>[49,50]</sup>.

Compostos hidrofílicos como polióis (glicerol, sorbitol e polietileno glicol) são normalmente utilizados como plastificantes na formação de filmes hidrofílicos devido a suas habilidades em reduzir as ligações de hidrogênio ao mesmo tempo em que aumenta os espaços internos<sup>[50]</sup>.

### 2.6.1.1- Sorbitol

A *D*-glicose sofre reações típicas podendo ser reduzida, por exemplo, com boro hidreto de sódio ao *D*-glicitol (também conhecido como sorbitol)<sup>[51]</sup>. Proveniente de frutas e outras fontes naturais, quase tão doce quanto o açúcar pode ser representado estruturalmente como na Figura 4.



**Figura 4-** Representação estrutural do sorbitol.

Uma das principais características do sorbitol é o fato de produzir soluções viscosas de grande aplicabilidade na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica.

Extremamente empregado em alguns tipos de materiais poliméricos tem função plastificante, a qual permite melhorar a processabilidade e aumentar a flexibilidade<sup>[49]</sup>.

### 2.6.2- Reticulação do amido

Modificações químicas, como a formação de ligações cruzadas, são necessárias para um melhor controle da dissolução e degradação do material quando em contato com fluidos biológicos, promovidos pela absorção de água e movimentações macromoleculares.

Quando o amido é tratado com reagentes multifuncionais, ocorre a reticulação. Os reagentes introduzem ligações intermoleculares que provocam um aumento na estabilidade do material<sup>[52]</sup>. Para promover a reticulação técnicas como irradiação ultravioleta e o uso de agentes químicos como trimetafosfato, epícloridrina ou misturas de anidridos e ácidos dicarboxílicos são utilizados<sup>[51]</sup>.

### 2.7- Polímeros condutores intrínsecos (PCI)

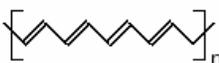
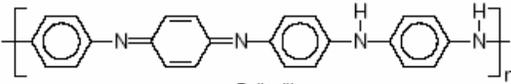
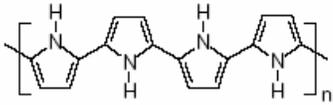
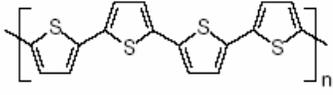
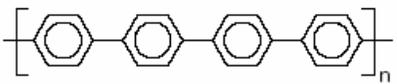
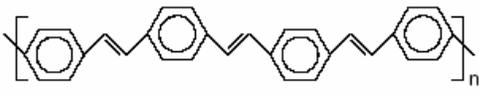
Polímeros orgânicos que combinam propriedades elétricas, eletrônicas, magnéticas e óticas dos metais e semicondutores inorgânicos e as propriedades mecânicas e processabilidade dos polímeros convencionais são denominados *polímeros intrinsecamente condutores* ou metais sintéticos. Intrínsecas são suas propriedades quando encontrados no estado dopado<sup>[53]</sup>.

Formados por cadeias contendo ligações  $\pi$  conjugadas permitem a criação de um fluxo de elétrons em condições específicas. Dentre os mais conhecidos podemos citar: poli(acetileno), poli(anilina), poli(pirrol), poli(tiofeno), poli(*p*-fenileno), poli(*p*-fenileno vinileno), (Tabela 2)<sup>[54]</sup>.

Esses polímeros passam de isolantes a condutores elétricos através de processos reversíveis de oxidação ou redução do sistema  $\pi$  conjugado, e também protonação no caso das poli(anilinas). As reações de oxidação (ou redução) na cadeia poliênica têm como consequência

a formação de cargas positivas (ou negativas) deslocalizadas, as quais são neutralizadas pela incorporação de íons chamados dopantes. Esta reação redox também chamada de dopagem é responsável pela condutividade elétrica e propriedades eletroquímicas e electrocromáticas dos polímeros condutores intrínsecos<sup>[55]</sup>.

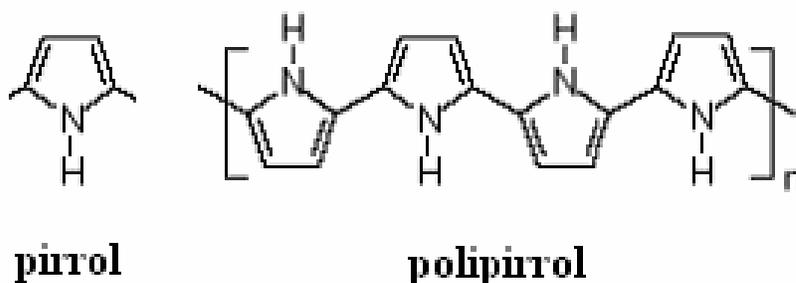
**Tabela 2-** Estrutura dos principais polímeros intrinsecamente condutores<sup>[54]</sup>.

Polímero condutor	Condutividade / S cm <sup>-1</sup>
 Poliacetileno	10 <sup>9</sup> a 10 <sup>8</sup>
 Polianilina	10 a 10 <sup>9</sup>
 Polipirrol	600
 Politiófeno	200
 Poli(p-fenileno)	500
 Poli(p-fenileno vinileno)	1

Os valores de condutividade expressos na tabela anterior referem-se aos polímeros condutores em seu estado dopado.

## 2.8- Polipirrol

Polímeros condutores intrínsecos como polipirrol (Figura 5) tem despertado grande interesse da comunidade científica principalmente no que diz respeito a sua aplicação para fins biomédicos<sup>[3-5,56,57,58]</sup>.



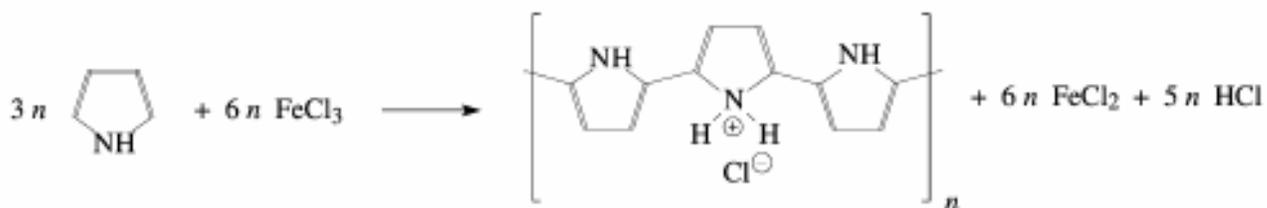
**Figura 5-** Representação estrutural do pirrol (a) e do polipirrol (b).

Polipirrol é de fácil preparação, apresenta boa estabilidade ao ambiente e alta condutividade elétrica<sup>[55]</sup>.

As técnicas de síntese mais utilizadas na produção do polipirrol são a síntese eletroquímica que consiste na oxidação do monômero em um solvente apropriado em presença de um eletrólito, permitindo a formação de filmes finos sobre a superfície dos eletrodos<sup>[3,59,60,61]</sup>. E ainda, síntese química que permite a obtenção do polímero através da exposição de uma matriz contendo o agente oxidante aos vapores do monômero<sup>[18,55,62,63]</sup>. A síntese química é interessante como rota alternativa. O polipirrol tem sido sintetizado quimicamente por exposição do monômero a oxidantes fortes, tipicamente sais de Fe(III) e como resultado da síntese do

polímero um pó preto é formado<sup>[55]</sup>.

O polímero é formado e simultaneamente oxidado ao estado dopado. A síntese química do polipirrol ocorre segundo a reação proposta por Omastová *et al*<sup>[64,65,66]</sup> como mostrado no Esquema 1, no qual, o FeCl<sub>3</sub> é o agente oxidante geralmente utilizado. Segundo Omastová *et al*<sup>[64,65,66]</sup> a razão ótima de FeCl<sub>3</sub>/Pirrol é de 2,3.



**Esquema 1-** Equação de polimerização do polipirrol a partir de pirrol e cloreto férrico como agente oxidante. Para cada três unidades constituídas uma é protonada.

Nos últimos anos a pesquisa em biomateriais tem estado voltada para o desenvolvimento ou melhoramento de superfícies capazes de interagir positivamente com o ambiente biológico.

Nesse sentido, o polipirrol surge como uma alternativa para aplicações biomédicas. Sua capacidade de ser sintetizado diretamente sobre materiais metálicos (uma propriedade peculiar aos polímeros condutores), para formar materiais ditos inteligentes, isto é, materiais capazes de agirem de diferentes formas (por exemplo: pele e ossos artificiais) em regiões específicas do corpo humano, e ainda seu caráter biocompatível são requisitos importantes de grande interesse para área de biomateriais<sup>[57]</sup>.

Mais recentemente estudos envolvendo a modificação da superfície de filmes de polipirrol por meio da incorporação de macromoléculas biológicas mostraram outra das inúmeras

possibilidades de aplicação desse polímero. Esses filmes permaneceram biologicamente ativos por semanas<sup>[3-5,56]</sup>. Segundo De Giglio *et al*<sup>[3-5]</sup>, polímeros eletricamente condutores apresentam um grande diferencial para aplicações biomédicas, uma vez que estimulam e portanto favorecem o crescimento celular

Da mesma forma estudos previamente realizados com polímeros condutores especificamente na área de engenharia de tecidos, como substrato para crescimento e diferenciação de células animais, mostraram-se potencialmente eficientes na aplicação desejada. A tecnologia utilizada nesses materiais “inteligentes” permite o controle de suas propriedades dinâmicas por meio eletroquímico ou ainda bioquímico<sup>[57,58]</sup>.

Estudos *in vivo* comprovaram a viabilidade de utilização do polipirrol, na forma de compósitos, como material bioativo para melhorar a regeneração tecidual por ser não tóxico, biocompatível capaz de promover estímulos elétricos em células nervosas e ósseas<sup>[58]</sup>.

## **CAPÍTULO 3**

### **3. EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO SOBRE A ESTABILIDADE E ESTRUTURA DOS FILMES DE AMIDO DE MILHO**

No capítulo 2 foram descritos conceitos gerais, aplicações e métodos de síntese envolvendo amido de milho, sorbitol e polipirrol. Previamente à produção dos filmes propriamente ditos, realizou-se um estudo sobre as propriedades térmicas, mecânicas e estruturais dos filmes de amido de milho. Independente da aplicação dos filmes, que inclui indústrias de alimentos, farmacêutica e médica, existe a necessidade de um conhecimento mais amplo dessas propriedades a fim de manter a integridade dos filmes durante um certo período de tempo. Neste estudo, o efeito do tratamento térmico na estabilidade e estrutura química dos filmes de amido de milho foi estudado em detalhes por análise termogravimétrica, (TGA), experimentos de intumescimento e espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ensaio mecânico e microscopia eletrônica de varredura. Os parâmetros cinéticos foram determinados usando o método de Ozawa<sup>[67]</sup>. O tratamento térmico nos filmes de amido de milho foi estudado como um método alternativo para obtenção de materiais com elevada estabilidade quando expostos a meios húmidos/líquidos (considerando a aplicação na indústria de alimentos como coberturas, bem como na indústria farmacêutica na liberação controlada de fármacos) e ainda na produção de biomateriais em geral. Uma vez que, a utilização de técnicas convencionais tais como irradiação (que freqüentemente causam degradação significativa à temperatura ambiente) ou o uso de agentes químicos que podem ser, tanto tóxicos, como podem ainda gerar um alto custo para o produto final.

## **METODOLOGIA EXPERIMENTAL**

### **3.1- Preparação dos filmes de amido de milho**

Filmes poliméricos foram preparados por *casting* utilizando amido de milho ((C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub> Sigma-Aldrich), contendo aproximadamente 25% de amilose e 75% de amilopectina. Suspensões com concentração de 2%<sub>m/v</sub> de amido de milho em água deionizada, foram submetidas à agitação constante em agitador magnético (Microquímica modelo MQAMA 301) a 200 rpm por 30 minutos a 70°C. Em seguida os frascos contendo a suspensão de amido de milho foram mantidos sob agitação sem aquecimento até alcançarem a temperatura ambiente. As suspensões foram então vertidas em placas de Petri (145mm de diâmetro) para evaporação total do solvente em capela de exaustão por aproximadamente 48 h. Filmes de amido (40µm de espessura – Eletronic Digital Micrometer - Marathon) foram retirados das placas e mantidos em dessecador.

### **3.2- Tratamento térmico dos filmes de amido de milho**

O tratamento térmico foi conduzido imediatamente após a secagem dos filmes em forno tubular (LINDBERG Modelo TF55035A). Painelas de cerâmica contendo 0,2g de filme de amido foram aquecidas a 60°C, 80°C e 100°C num forno tubular a uma taxa de 10°C.min<sup>-1</sup>. As temperaturas foram mantidas constantes por períodos de tempo (15min, 60min e 120min). Para cada um desses procedimentos amostras em triplicatas foram utilizadas.

### 3.3- Reologia das soluções de amido de milho

As condições de gelatinização do amido de milho foram estabelecidas em reômetro

Brookfield DV-III ultra, do tipo cone-prato, acoplado a um banho termostaticado para controle de temperatura (TECNAL Modelo TE-184). Para este experimento uma suspensão de amido de milho em água (6% m/v) foi aquecida de 16,7 °C até 91,6 °C a uma taxa de aquecimento de 1,5°C.min<sup>-1</sup>, e taxa de cisalhamento de 93s<sup>-1</sup>.

### 3.4- Microscopia óptica do grão de amido de milho

A morfologia do grão de amido de milho foi observada utilizando um microscópio óptico (BIOVAL) acoplado a uma câmera digital (Samsung Modelo SDC 312), com aumento de 40x, sem luz polarizada, utilizando como contraste uma solução de lugol.

### 3.5- Termogravimetria (TG)

A análise térmica dos filmes submetidos a diferentes condições de tratamentos térmicos foi conduzida empregando-se um TGA-50 Shimadzu. Amostras contendo cerca de 7mg de filme foram submetidas a diferentes taxas de aquecimento (10, 15 e 20°C.min<sup>-1</sup>), em atmosfera de N<sub>2</sub> (50 mL.min<sup>-1</sup>) na faixa de 25°C até 600°C. Os parâmetros termogravimétricos foram determinados de acordo com o método de Ozawa<sup>[67]</sup>. Este método descreve os dados de uma única etapa de degradação no estado sólido em termos da cinética da reação. Onde  $E_a$  é a energia de ativação e,  $A$  o fator pré exponencial de uma expressão de modelo cinético em função de uma fração de conversão  $\alpha$ ,  $f(\alpha)$  que pode ser ajustado para dados experimentais como proposto a seguir<sup>[67]</sup>:

$$\frac{d\alpha}{dt} = A \exp\left(-\frac{Ea}{RT}\right) f(\alpha) \quad (1)$$

Uma vez determinada a energia de ativação é possível encontrar um modelo cinético que melhor descreva os dados termogravimétricos. A equação (1) pode ser então expressada em função da fração de massa degradada ( $\alpha$ ):

$$\frac{d\alpha}{f(\alpha)} = \frac{A}{\phi} e^{\left(\frac{-Ea}{RT}\right)} dT \quad (2)$$

onde  $\phi$  [ $\text{K}\cdot\text{s}^{-1}$ ] é a taxa de aquecimento e  $R$  a constante universal dos gases ( $8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ).

O método de Ozawa integra a equação em função de  $\alpha$  e de  $T$ , resultando na seguinte relação<sup>[67]</sup>:

$$-\log \phi_1 - 0,4567 \frac{Ea}{RT_1} = -\log \phi_2 - 0,4567 \frac{Ea}{RT_2} = \dots \quad (3)$$

Onde  $Ea$  [ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ] é a energia de ativação do processo cinético. A energia de ativação foi determinada pela inclinação do gráfico de  $\log \phi$  vs  $1/T$ .

### 3.6- Grau de intumescimento

Para determinar o grau de intumescimento ( $Q$ ), 0,8g de amostra (filme de amido) foi imersa em 400mL de água deionizada por 72h a  $25^\circ\text{C}$ . Posteriormente, as amostras foram pesadas periodicamente durante a evaporação do solvente até 24h após a retirada da imersão. O grau de intumescimento foi calculado de acordo com a seguinte equação<sup>[68]</sup>:

$$Q = \frac{m_1 - m_2}{m_2} \quad (4)$$

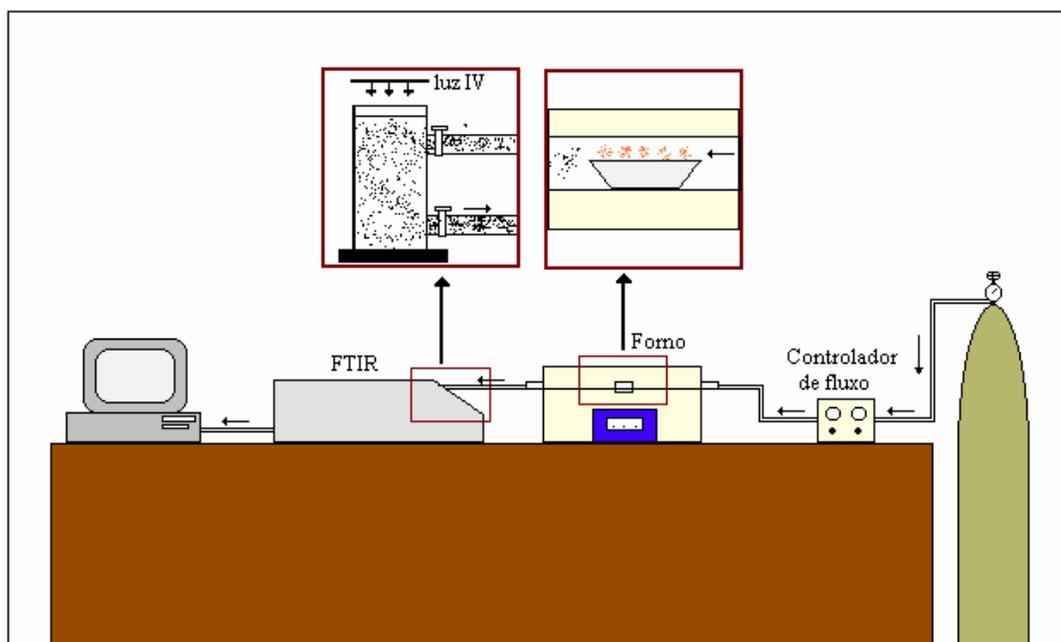
Onde:

$m_1$  [g] é a massa de amostra imediatamente após intumescimento em água deionizada

$m_2$  [g] é a massa de amostra seca.

### 3.7- Análise de FT-IR

Os espectros de FTIR dos filmes de amido com 2,0 $\mu$ m de espessura (submetidos e não submetidos a tratamento térmico) foram obtidos usando um espectrômetro (Bomem, FTLA 2000) com resolução de 4 $\text{cm}^{-1}$  na faixa de 4000 $\text{cm}^{-1}$  a 400 $\text{cm}^{-1}$ . Para análise dos produtos de degradação, 0,2g de filmes de amido (submetidos e não submetidos a tratamento térmico) foram aquecidos em forno tubular com taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  em atmosfera de nitrogênio (25 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) a diferentes temperaturas: (i) 120 $^{\circ}\text{C}$  (antes do início da perda de massa), (ii) 350 $^{\circ}\text{C}$  (temperatura de máxima velocidade de degradação) e (iii) 450 $^{\circ}\text{C}$  (final do processo de degradação). Os resíduos sólidos formados foram resfriados até temperatura ambiente e os espectros de FTIR obtidos na forma de pastilhas de KBr. Os produtos gasosos foram coletados em células de gás, analisados por FTIR durante o processo de degradação num sistema com forno tubular e equipamento de infravermelho conforme mostrados na figura 6. Neste sistema, as amostras sólidas são degradadas por aquecimento no forno tubular e os produtos voláteis são conduzidos pelo fluxo de nitrogênio para célula de gás acoplada ao infravermelho onde são obtidos os espectros.



**Figura 6-** Ilustração do sistema para obtenção de espectros de IV de produtos gasosos.

### 3.8- Ensaios mecânicos

Os ensaios de tensão máxima de ruptura, alongação na ruptura e módulo de elasticidade (módulo de Young) foram realizados na máquina de Ensaio Universal (EMIC-DL-500), de acordo com as normas ASTM D882-95 (*Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Films*)<sup>[69]</sup>. A separação inicial das garras foi de 50mm e a velocidade de tração de  $5\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$ , com célula de carga de 50Kgf. Os dados das curvas de Tensão (MPa) vs Deformação (%) foram coletados e tratados utilizando-se um software apropriado. Nessa análise foram preparadas de 10-14 repetições para cada amostra com dimensões de 100mm de comprimento e 25mm de

largura. Antes das análises as amostras foram mantidas por 20 dias em ambiente controlado 23°C e 43% de humidade relativa.

O módulo de Young para as amostras foi obtido considerando-se a tangente da região elástica das curvas de Tensão versus Deformação.

### **3.9- Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A morfologia do filme de amido de milho, tratado e não tratado térmicamente foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. Foram analisadas amostras de superfície e seção transversal (fraturadas em nitrogênio líquido) dos filmes, metalizadas (metalizador Modelo P-S2 Diode Sputtering) com uma fina camada de ouro, antes da análise em equipamento Philips XL 30.

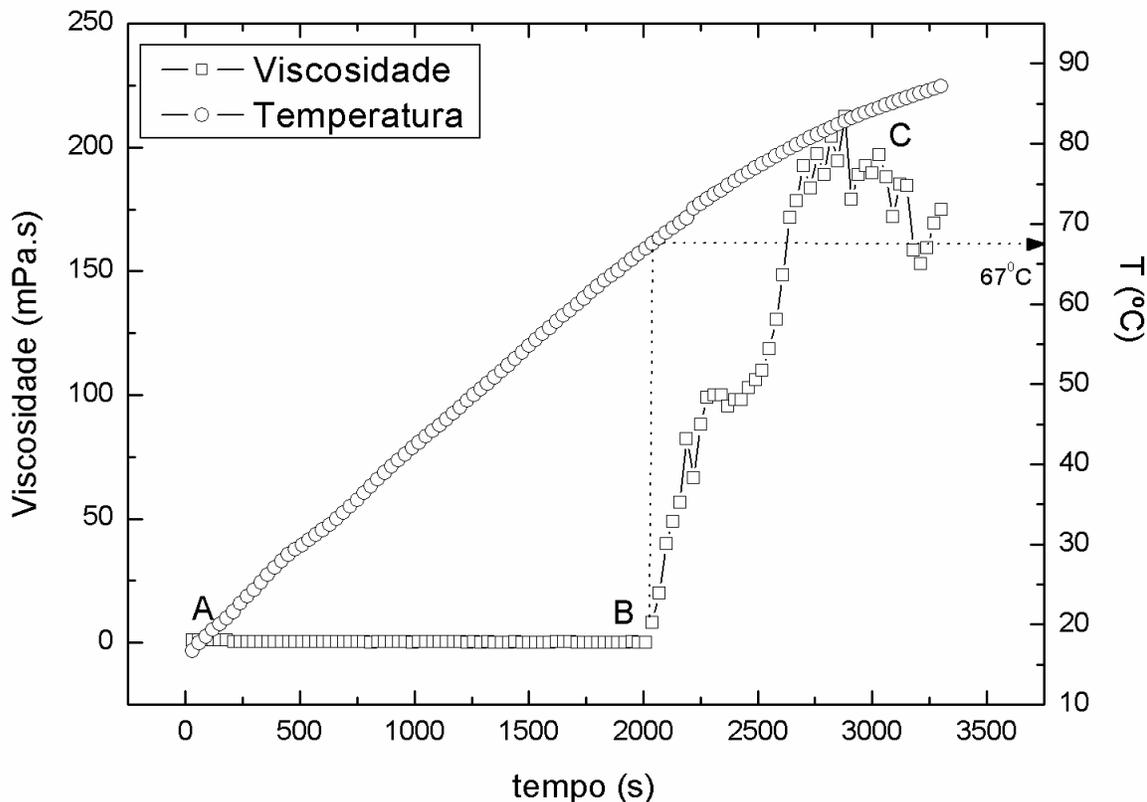
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.10- Reologia das soluções de amido de milho e microscopia óptica do grão de amido de milho**

As modificações dos grânulos de amido de milho dispersos em meio aquoso durante aquecimento a uma taxa constante foram observados por medidas reológicas e microscopia óptica, a fim de estabelecer as condições de gelatinização do amido de milho a serem usadas, bem como confirmar o método de preparação dos filmes descrito como suficiente para promover uma completa gelatinização dos grânulos de amido em suspensão e como meio para obtenção das propriedades desejadas do filme.

A Figura 7 mostra o comportamento reológico de uma suspensão de amido durante

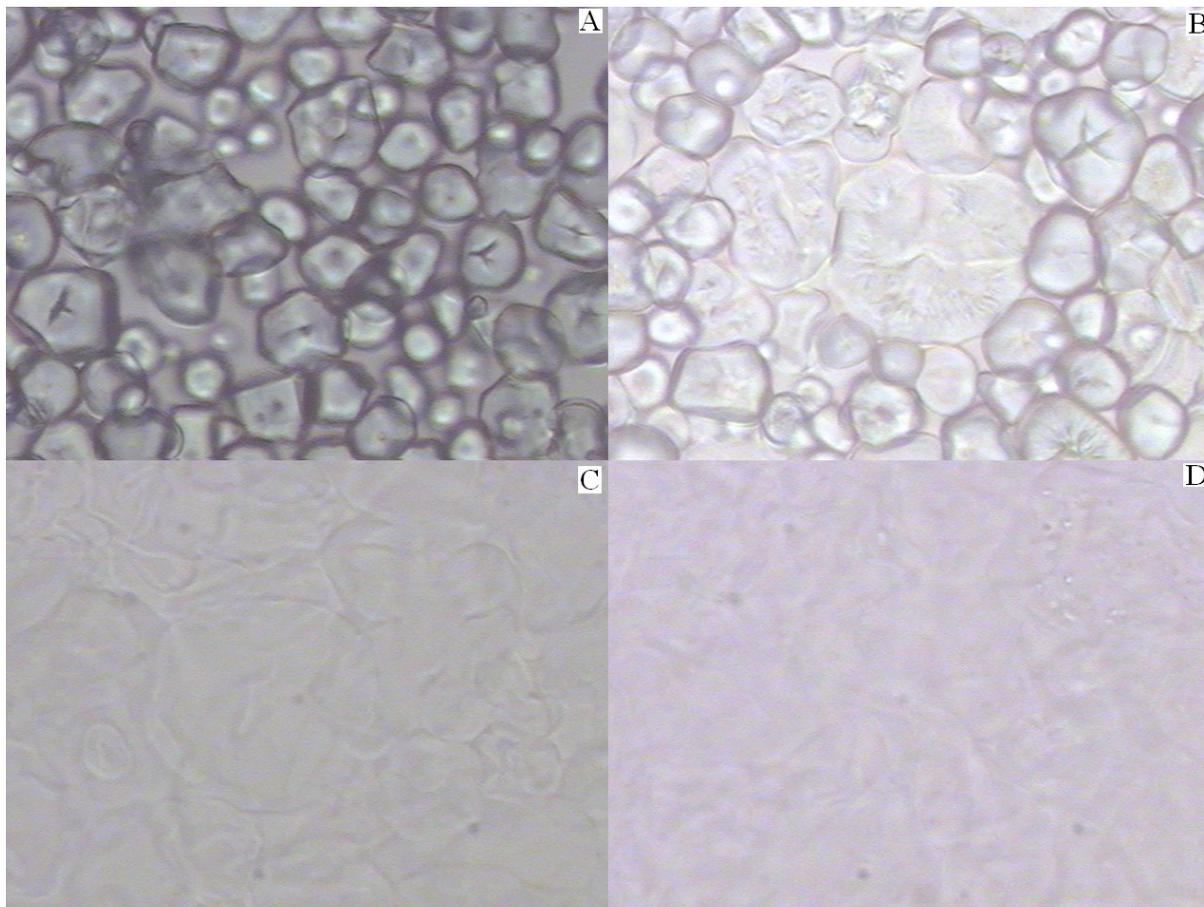
aquecimento a uma taxa de deformação constante.



**Figura 7-** Perfil de viscosidade e temperatura de uma suspensão aquosa de amido de milho ( $6\%_{m/v}$ ) obtido durante aquecimento em reômetro a taxa de deformação constante de  $93s^{-1}$ .

Adicionalmente, foi observada a morfologia dos grânulos de amido durante o processo de aquecimento em diferentes estágios, uma suspensão de amido ( $2\%_{m/v}$ ) em água deionizada foi preparada sob agitação (magnética) e submetida a aquecimento para simular o processo utilizado no experimento reológico. Essa suspensão foi cuidadosamente gotejada sobre lâminas de microscópio e pressionadas de forma a mantê-las distribuídas homogeneamente sem fraturas para manutenção da integridade dos grânulos. Micrografias foram obtidas em diferentes

condições de aquecimento como mostrado na Figura 8.



**Figura 8-** Micrografias ópticas do amido de milho obtido em diferentes condições de aquecimento: A) sem aquecimento; B) após aquecimento a 67°C; C) após aquecimento a 82,8°C; D) após aquecimento a 70°C por 20min.

No início do experimento reológico, a suspensão de amido estava a 17°C (estágio A na Fig.7) e os valores de viscosidade observados foram similares aos da água (1mPa.s). Nessa condição os grânulos de amido estavam insolúveis em água. A micrografia na Fig. 8A mostra a morfologia dos grânulos no estágio A, o qual observa-se um hilo que é tipicamente encontrado

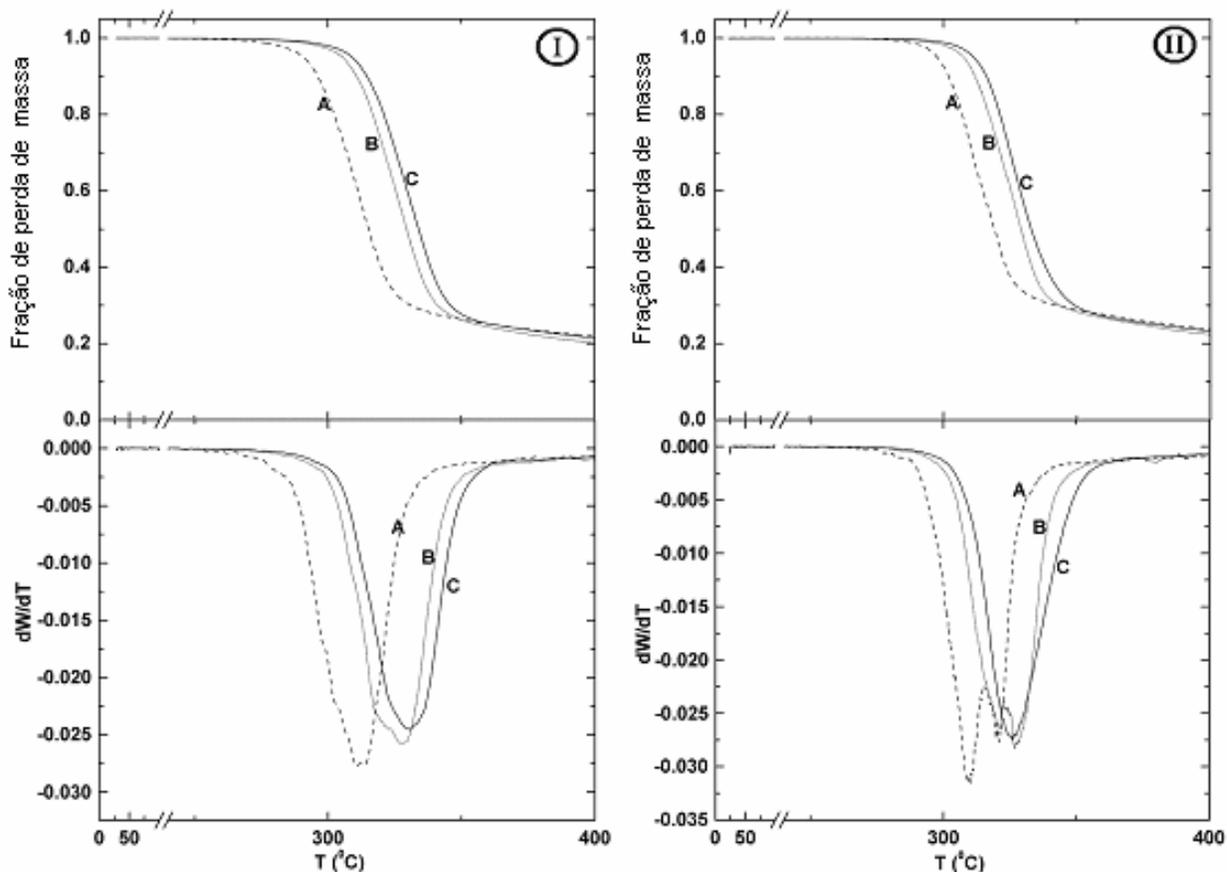
em grânulos de amido em seu estado nativo<sup>[70,71]</sup>. No início do processo de aquecimento a

viscosidade da suspensão de amido permaneceu inalterada até 67°C. A partir dessa temperatura onde um aumento repentino indicando o ponto em que ocorreu o início da gelatinização da suspensão de amido (estágio B na Fig. 7) foi observado. A gelatinização ocorre enquanto os grânulos de amido de milho intumescem com absorção de água, aumentando o volume conforme observado na Fig. 8B. Com o aumento da temperatura os grânulos continuam a intumescer até um valor máximo de viscosidade de 212mPa.s a 82,8°C. Acima dessa temperatura, um decréscimo na viscosidade foi observado devido à ruptura dos grânulos de amido(estágio C, Fig. 7). A Fig. 8C confirma a ruptura total da estrutura dos grânulos de amido. Uma morfologia similar pôde ser observada na micrografia obtida da suspensão de amido aquecida sob agitação magnética (200min<sup>-1</sup>), a 70°C por 20min (Fig. 8D), o que indica que o método de preparação utilizado promove uma gelatinização completa do amido.

### 3.11- Termogravimetria (TG)

Na Figura 9 são apresentadas as curvas de TGA e de termogravimetria diferencial (DTG) dos filmes de amido de milho submetidos a diferentes condições de tratamento térmico. Os parâmetros termogravimétricos determinados a partir das curvas de TG e DTG desses filmes são apresentados na Tabela 3. Uma única etapa de degradação foi observada para os filmes de amido não tratados termicamente (Figura 9-I), observando-se que a perda de massa inicia em 231°C. Este comportamento também foi observado por Wolkers *et al*<sup>[72]</sup> e Pavlovic *et al*<sup>[73]</sup> em estudos sobre a estabilidade térmica do amidos de mandioca e milho respectivamente. As curvas termogravimétricas dos filmes de amido submetidos ao tratamento térmico (Figura 9-II) mostram

essencialmente o mesmo comportamento indicando que, aparentemente, ocorre um mecanismo



**Figura 9-** Curvas de TGA e DTG dos filmes de amido de milho: I) não-tratados; II) 100°C/120min usando diferentes taxas de aquecimento: A) 10°C.min<sup>-1</sup>, B) 15°C.min<sup>-1</sup>, C) 20°C.min<sup>-1</sup>.

de degradação similar. Todas as amostras foram degradadas até 500°C. Ao final do estágio de degradação, o amido (não-tratado) apresentou 14,1%<sub>(m/m)</sub> de resíduo. Para as amostras tratadas a quantidade de resíduo nesse estágio variou de 5,5 a 17,3%<sub>(m/m)</sub> dependendo das condições de

tratamento. A aproximadamente 350°C todas amostras mostraram uma taxa de degradação máxima (pico máximo na curva de DTG nas Figuras 9-I e 9-II). Portanto, essa temperatura foi selecionada para análise dos resíduos sólidos e gasosos por análise de FTIR.

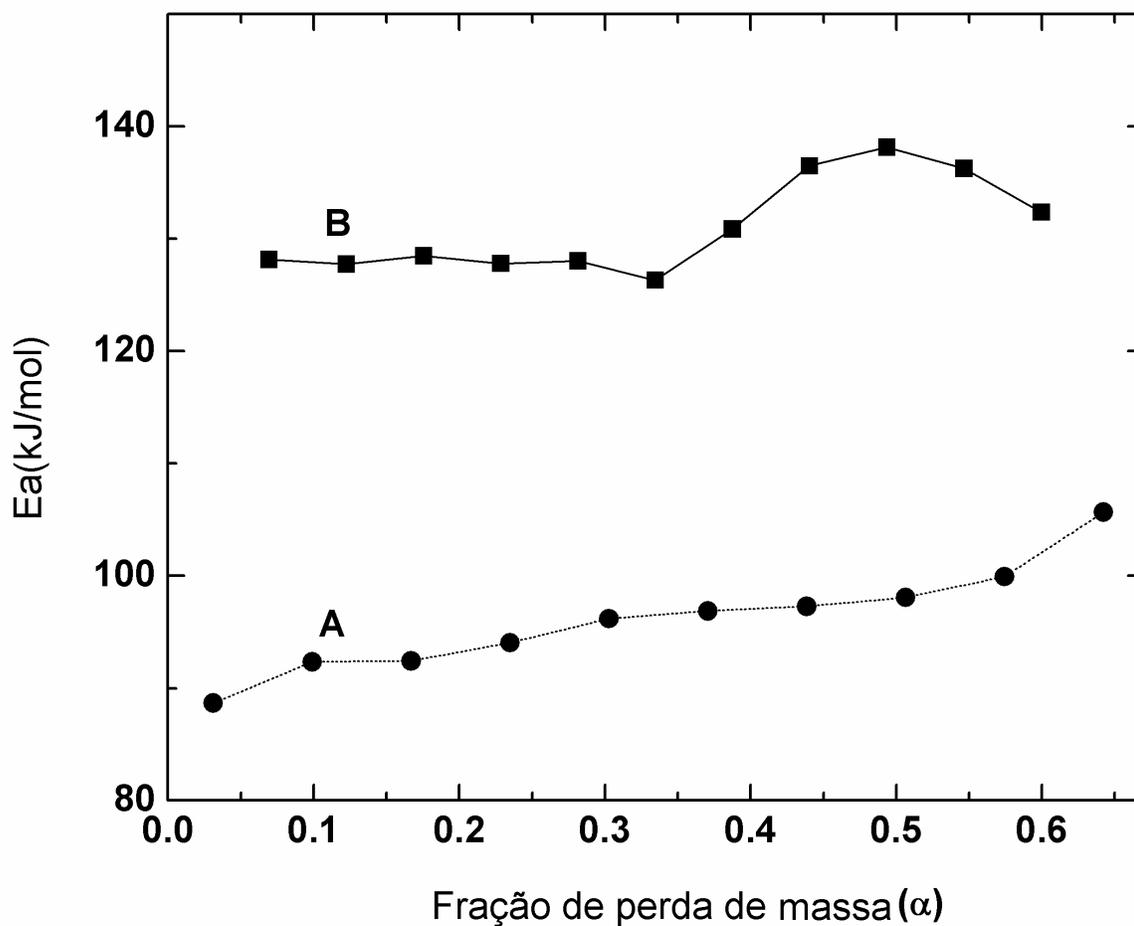
**Tabela 3-** Parâmetros termogravimétricos da degradação térmica dos filmes de amido de milho submetidos a diferentes condições de tratamentos térmico<sup>a</sup>.

Condições de tratamento térmico		Faixa de temperatura do processo de degradação [°C]	$T_{max}^b$ [°C]
Temperatura [°C]	Tempo de aquecimento [min]		
-	-	231-600	327
100	15	301-600	360
100	60	307-600	357
100	120	262-600	339

<sup>a</sup> Obtido a uma taxa de aquecimento: 20°C.min<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup> $T_{max}$ : Temperatura de degradação máxima, obtida das curvas de DTG.

Embora, o comportamento observado nas curvas de TG sugira que o mecanismo de degradação dos filmes sejam similares, algumas diferenças nos valores de  $E_a$  calculados de acordo com o método de Ozawa para os filmes tratados, em relação ao não-tratado, foram observadas. Um aumento nos valores da  $E_a$  foi observado para amostras tratadas por períodos de tempo e temperaturas diferentes, em comparação com a amostra não-tratada, indicando um aumento na estabilidade térmica dos filmes tratados. Os valores mais altos de  $E_a$  foram observados nas amostras tratadas a 100°C por 2h (Figura 10, curva B). Para confirmar mudanças na estrutura do polímero os filmes foram preparados nessas condições para análise no FTIR.

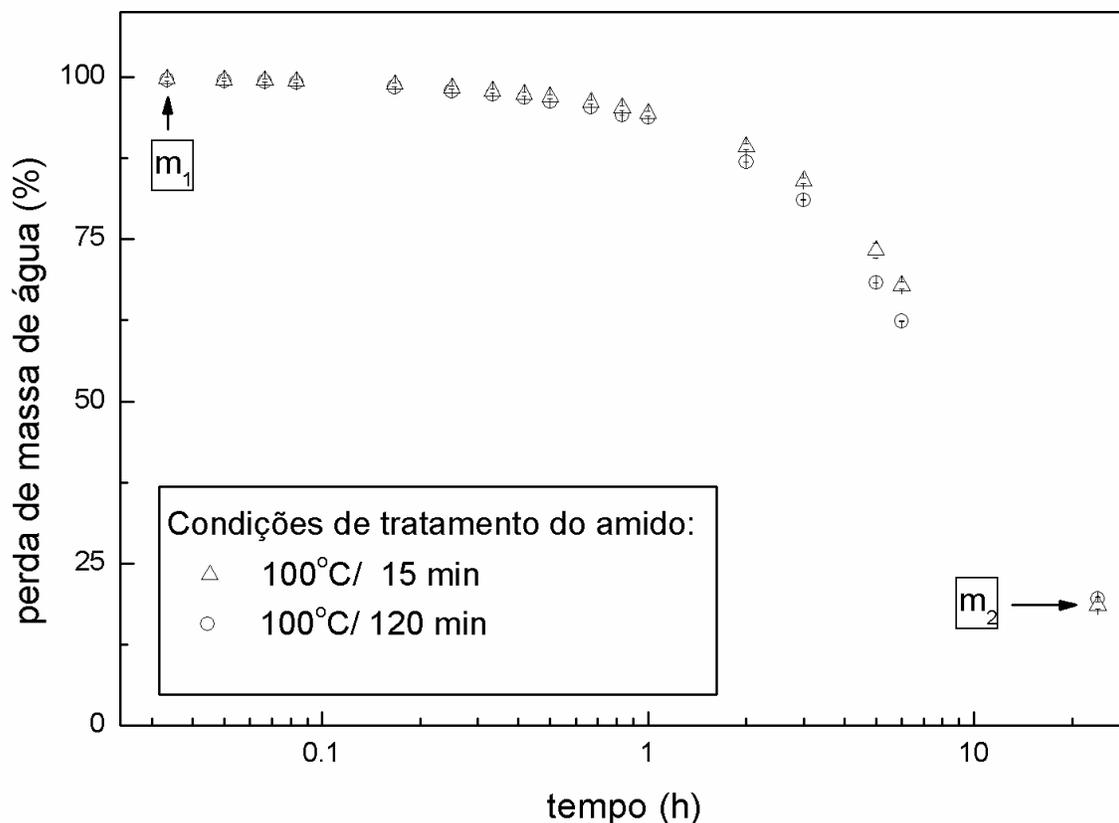


**Figura 10-** Energia de ativação vs fração de perda de massa de amido de milho submetido a tratamento térmico em diferentes condições: A) não-tratados; B) 100°C/120min.

### 3.12- Grau de intumescimento

Adicionalmente, para observar o efeito das diferentes condições de tratamento térmico dos filmes na dissolução em meio aquoso, a perda de massa foi monitorada gravimetricamente em função do tempo (Figura 11) até 24h de evaporação a 20°C (após esse

período, a taxa de evaporação diminuiu abruptamente e nenhuma perda de massa significativa



**Figura 11-** Perda de massa vs tempo de evaporação para amostra de amido submetido ao intumescimento por 72h.

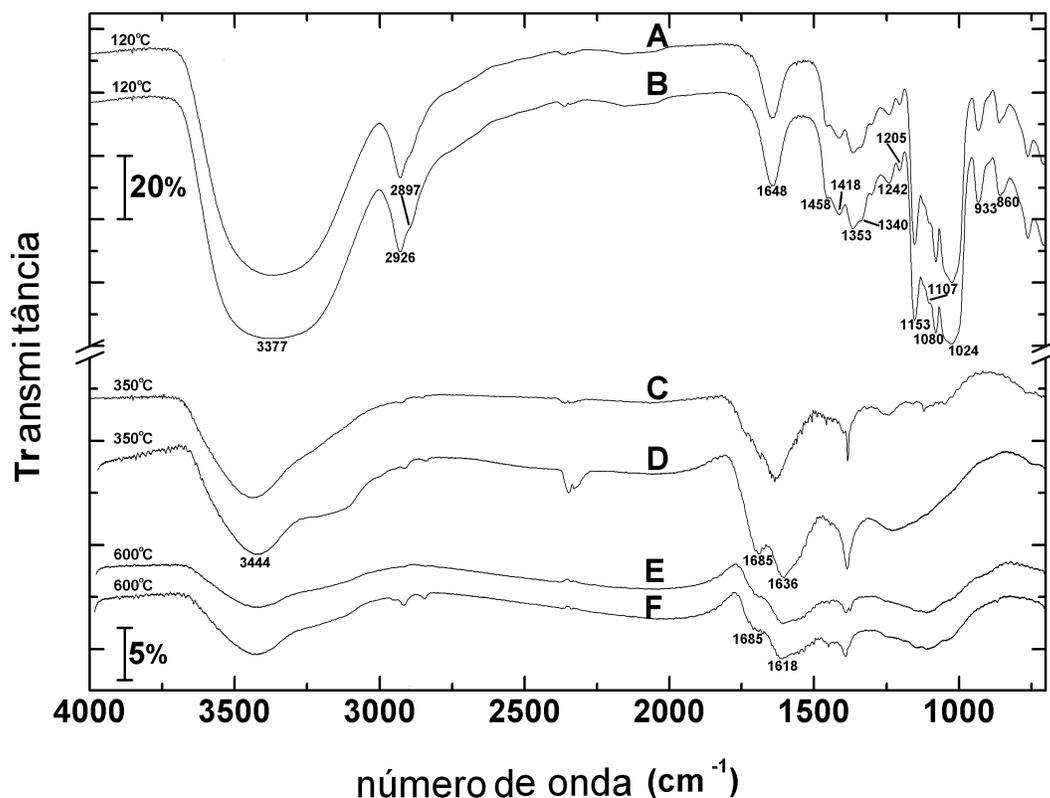
foi observada). Os termos  $m_1$  e  $m_2$  (Equação 4) usados para calcular o grau de intumescimento ( $Q$ ) estão indicados na Figura 11. Filmes não tratados termicamente foram dissolvidos totalmente em meio aquoso após 6h de imersão. Por outro lado, os filmes submetidos à temperatura de 100°C por 2h e 100°C por 15 min permaneceram aparentemente insolúveis por até 72h de imersão e apresentaram um grau de intumescimento de 3,42 e 4,39 respectivamente. Estes valores sugerem que os filmes tratados termicamente tiveram uma taxa de dissolução menor em

meio aquoso que o filme não-tratado, o qual foi confirmado pelos valores mais altos de  $E_a$  calculados para os filme tratados em comparação com aquele não-tratado.

Esse comportamento pode ser explicado considerando que o processo de tratamento térmico leva a perda de moléculas de água dos filmes de amido, provavelmente devido à formação de ligações cruzadas entre as moléculas do polímero. Considerando uma aplicação específica na indústria de alimentos (como filmes para coberturas e embalagens) ou ainda na indústria farmacêutica (como filmes para liberação controlada de fármacos), os resultados descritos acima indicam que o tratamento térmico aplicado parece promover um aumento na durabilidade dos filmes.

### 3.13- Análise de FT-IR

A Figura 12 apresenta os espectros de FTIR dos filmes de amido (submetidos e não submetidos a tratamento térmico), submetidos a aquecimento em forno tubular a diferentes temperaturas, buscando a obtenção dos produtos sólidos de degradação. O espectro de FTIR do filme de amido não-tratado termicamente (não apresentado) teve um comportamento similar ao da curva A da Figura 12 (filme de amido não tratado, analisado após aquecimento até 120°C em forno tubular). Como esperado, nenhuma reação de degradação do polímero ocorreu nessa temperatura. Esse espectro representa um comportamento típico do amido, descrito na literatura<sup>[73]</sup>. A banda larga na região de 3600-3000 observada a 3377  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a absorção dos grupos hidroxilas do amido. Bandas de absorção a aproximadamente 2926 $\text{cm}^{-1}$  e 2897 $\text{cm}^{-1}$  indicam estiramento C-H<sup>[72]</sup>. As Bandas de absorção em 1648 $\text{cm}^{-1}$  e 1400-1460 $\text{cm}^{-1}$  correspondem a água ligada e C-C e C-O-H, respectivamente<sup>[72]</sup>. A posição da banda relativa à água residual é dependente da cristalinidade do polissacarídeo. Em estudos sobre a cristalinidade



**Figura 12-** Espectros de FTIR dos filmes de amido submetidos a diferentes condições de tratamento térmico: A, C, E) não-tratado; B, D, F) 100°C/120min (as temperaturas em que os espectros foram expostos durante aquecimento em forno tubular estão indicadas na Figura).

da trealose (um dissacarídeo), por exemplo, foi relatado o aparecimento de uma banda de absorção de água a  $1685\text{cm}^{-1}$ , indicando a presença de fortes ligações de hidrogênio, entretanto para trealose amorfa essa banda foi observada a  $1648\text{cm}^{-1}$ <sup>[72]</sup>. Bandas localizadas a aproximadamente  $1458\text{cm}^{-1}$ ,  $1242\text{cm}^{-1}$  e  $860\text{cm}^{-1}$  são designadas como vibrações associadas com grupos  $\text{CH}_2$ <sup>[73]</sup>. As absorções em  $1340\text{cm}^{-1}$  e  $1024\text{cm}^{-1}$  tem sido relacionadas a deformações de grupos  $\text{C-OH}$ <sup>[72]</sup>. Os modos relacionados a deformações  $\text{CCH}$  foram identificados em torno de

1418 $\text{cm}^{-1}$ , 1205 $\text{cm}^{-1}$  e 1080 $\text{cm}^{-1}$ , enquanto que estiramentos C-O e C-C correspondem a bandas em 1153 $\text{cm}^{-1}$ , 1107 $\text{cm}^{-1}$  e 933 $\text{cm}^{-1}$ <sup>[73]</sup>. As bandas associadas com C-O e C-O-H tem sido atribuídas às ligações glicosídicas<sup>[74]</sup>.

Os espectros dos filmes de amido de milho expostos a tratamento térmico em diferentes condições (não apresentado) exibiram um comportamento similar ao apresentado na Figura 12 (curva A). Somente pequenas diferenças em comparação com esse espectro foram observadas. Por exemplo, o deslocamento da banda de absorção alargada a 3377 $\text{cm}^{-1}$  para valores menores (cerca de 3358 $\text{cm}^{-1}$ ), indicou um aumento de ligações cruzadas (ligações de éteres)<sup>[73]</sup>, quando a temperatura e o tempo de tratamento foram aumentados. Um leve deslocamento da banda de absorção a 1648 $\text{cm}^{-1}$  para valores maiores (1650 $\text{cm}^{-1}$  e 1653 $\text{cm}^{-1}$ ) para os filmes expostos a tratamento térmico a 80°C e 100°C, respectivamente foi provavelmente devido a presença de ligações de hidrogênio fortes<sup>[72]</sup>. E ainda, pequenos deslocamentos foram também observados para bandas a 1418 $\text{cm}^{-1}$  para números de onda menores (cerca de 1415 $\text{cm}^{-1}$  e 1413 $\text{cm}^{-1}$  para filmes tratados a 80°C e 100°C, respectivamente), os quais também sugerem uma modificação nos níveis de ligações de hidrogênio.

Muitos processos de degradação de polissacarídeos tem sido descritos na literatura considerando principalmente produtos de degradação e os mecanismos de reação<sup>[74-79]</sup>. Eliminação de água e despolimerização tem sido considerados como os dois principais processos associados ao mecanismo de degradação<sup>[80-83]</sup>.

Nesse sentido, a degradação da celulose forma produtos de voláteis tais como, CO<sub>2</sub>, CO, H<sub>2</sub>O, aldeídos, entre outros. Nesse processo ocorre a quebra do anel de glicose. Além disso, o processo de despolimerização forma CO<sub>2</sub>, CO e produtos líquidos<sup>[84]</sup>. Na pirólise da celulose Banyasz *et al.*<sup>[85]</sup> identificou um total de dez compostos gasosos incluindo CO<sub>2</sub>, CO, H<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> e CH<sub>2</sub>O. De modo similar, no caso do amido, grupos éteres e estruturas insaturadas são

formados via condensação térmica entre grupos hidroxila da cadeia de amido com eliminação de água e outras moléculas pequenas<sup>[80-83]</sup>. Nesse estudo, espectros de resíduos sólidos de filmes de amido (expostos e não expostos a tratamento térmico a 100°C por 2h) formados quando as amostras foram aquecidas em forno tubular até 350°C e 600°C (Figura 12, curva C a F) e de produtos voláteis produzidos durante aquecimento a 270°C, 350°C e 450°C (Figura 13) foram obtidos.

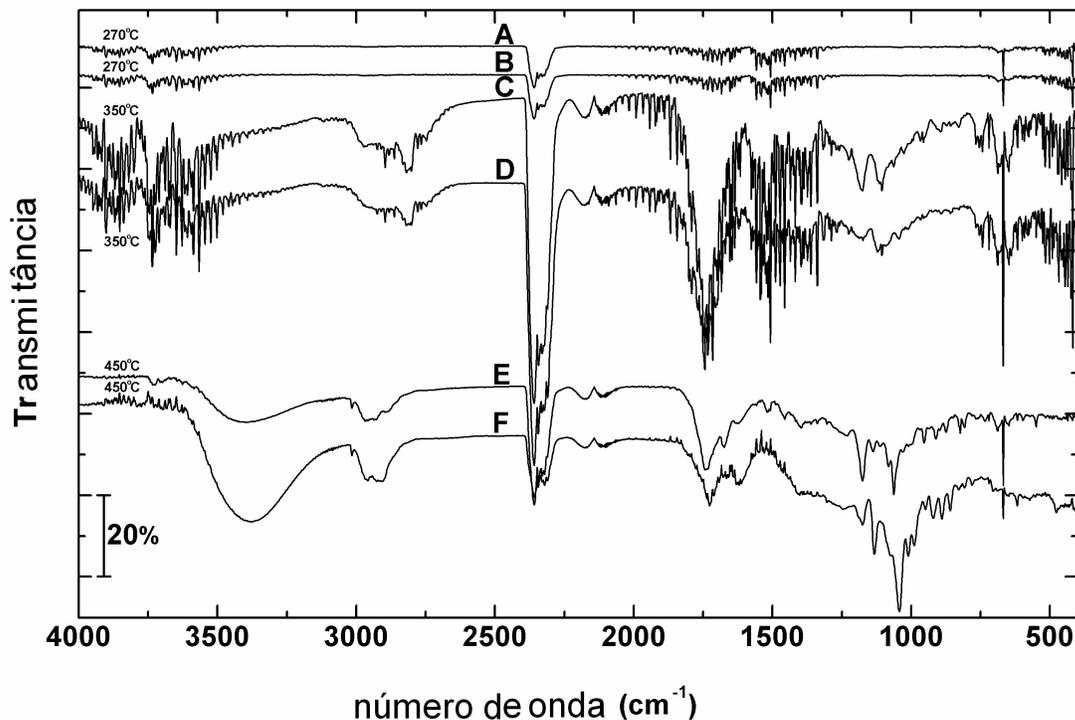
Comparando-se os espectros dos resíduos sólidos dos filmes de amido obtidos por aquecimento a 120°C (Figura 12, curva A e B) e a 350°C (Figura 12, curva C e D), algumas diferenças foram observadas. Uma banda larga de absorção entre 3600-3000cm<sup>-1</sup> referente a grupos hidroxila do amido<sup>[72]</sup> em aproximadamente 3377cm<sup>-1</sup> na curva obtida para o filme, diminui evidentemente a intensidade acompanhada por um deslocamento para números de onda maiores (3444cm<sup>-1</sup>) nos espectros obtidos a 350°C, o qual sugere a eliminação dos grupos hidroxila no anel de glicose formando moléculas de água, de acordo com o mecanismo proposto por Ruseckaite *et al.*<sup>[80]</sup>. As bandas relacionadas a estiramento C-H observadas a 2930cm<sup>-1</sup> e a 2880cm<sup>-1</sup> não estão presentes nos espectros obtidos a 350°C, indicando a quebra da cadeia principal nessa temperatura. Um alargamento na banda de absorção relacionada à água ligada (cerca de 1648cm<sup>-1</sup>), também foi observada com a presença de um pico de forte intensidade a 1685cm<sup>-1</sup>, indicando que a 350°C a formação de novos compostos carbonila, provavelmente de aldeídos 3444cm<sup>-1</sup><sup>[86,87]</sup>, sugerindo mudanças no mecanismo de degradação. Nessa temperatura, os espectros também mostram a ausência de modos de vibração à 1458cm<sup>-1</sup> e 860cm<sup>-1</sup>, e uma forte diminuição na intensidade da banda a 1242cm<sup>-1</sup>, bem como a falta de absorções a 1353cm<sup>-1</sup> e 1024cm<sup>-1</sup>, sugerindo a degradação das estruturas com grupos CH<sub>2</sub> e C-OH, respectivamente. Adicionalmente, as bandas relacionadas à deformação angular CCH (a 1418cm<sup>-1</sup>, 1205cm<sup>-1</sup> e 1080cm<sup>-1</sup>) e a estiramento C-O e C-C (a 1153, 1107 e 933cm<sup>-1</sup>) não foram observadas a 350°C.

Os espectros obtidos por aquecimento dos filmes de amido até 600°C (Figura 12,

curvas E e F) mostram um alargamento e uma diminuição da banda de intensidade a 3600-3000 $\text{cm}^{-1}$  (grupos O-H). A banda de absorção relacionada à água ligada (cerca de 1648 $\text{cm}^{-1}$ ) pode ainda ser observado como um pico à 1618 $\text{cm}^{-1}$  e um ombro a 1685 $\text{cm}^{-1}$ . Outras bandas observadas para o amido estão ausentes no espectro de resíduos sólidos obtido nessa temperatura.

Os espectros relacionados aos produtos gasosos dos filmes de amido são mostrados na Figura 13. No espectro obtido abaixo de 200°C (não mostrado) nenhum produto volátil foi observado, estando de acordo com as curvas termogravimétricas onde nenhum processo de degradação aparece. Os espectros obtidos a 270°C (Figura 13, curvas A e B) mostram bandas de absorção a 2360 e 668 $\text{cm}^{-1}$  (pequena), indicando a formação de dióxido de carbono.

Os espectros a 350°C (perto da temperatura onde ocorre a taxa máxima de degradação – Figura 13, curva C e D) mostram uma banda a 3750 $\text{cm}^{-1}$ , indicando a presença de grupos O-H relacionados a formação de álcool (primário). As bandas localizadas a 2360 e 668 $\text{cm}^{-1}$  indicam a formação de dióxido de carbono, bem como as bandas a 2172 e 2108 $\text{cm}^{-1}$  estão relacionadas à formação de monóxido de carbono. A estrutura vibracional centrada a 1748 $\text{cm}^{-1}$  somado ao aparecimento de uma banda a 1010 $\text{cm}^{-1}$  indica a formação de compostos com grupos carbonila. A presença de CO<sub>2</sub>, CO e compostos carbonila nesses espectros sugerem a cisão das ligações glicosídicas e de ligações fortes na cadeia principal do amido<sup>[88]</sup>. As bandas



**Figura 13-** Espectros de FTIR de produtos de degradação voláteis dos filmes de amido submetidos a diferentes condições de tratamento térmico: A, C, E) não-tratado; B, D, F) 100°C/120min (as temperaturas em que os espectros foram expostos durante aquecimento em forno tubular estão indicadas na Figura).

a 1500cm<sup>-1</sup> são relacionadas a estruturas alifáticas formado pela quebra da cadeia principal do amido. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por *Athawale e Lele*<sup>[89]</sup> na pirólise do amido de milho. E ainda, as bandas localizadas a 1390cm<sup>-1</sup> estão relacionadas à deformação angular de CH<sub>3</sub>.

Nos espectros obtidos a 450°C (Figura 13, curvas E e F) as bandas nas regiões de 3750-3500cm<sup>-1</sup> (formação de álcool condensado na janela de KBr da célula) e aquelas a 3000-2850cm<sup>-1</sup> (frações ramificadas), ainda podem ser observadas com aumento na intensidade. Uma diminuição na intensidade foi observada para bandas localizadas a 2360cm<sup>-1</sup> 668cm<sup>-1</sup> (dióxido de

carbono). As bandas a  $2172\text{cm}^{-1}$  e  $2108\text{cm}^{-1}$  (monóxido de carbono) ainda estão presentes, sem mudanças na intensidade. As estruturas vibracionais a  $1748\text{cm}^{-1}$  e a banda a  $1010\text{cm}^{-1}$  (grupos carbonila) e aquela a  $1500\text{cm}^{-1}$  (estrutura alifática formada pela cisão da cadeia principal do amido) apresentaram intensidade mais alta a  $450^\circ\text{C}$ . As bandas centradas a  $1390\text{cm}^{-1}$  (deformação angular de  $\text{CH}_3$ ) também apresentaram uma intensidade mais alta a essa temperatura.

Algumas mudanças adicionais foram encontradas nos espectros obtidos a  $600^\circ\text{C}$  (não mostrados). Um considerável decréscimo na intensidade das bandas relatadas para estiramento C-H, associadas à quebra de ligações fracas na cadeia do amido. Um alargamento e diminuição na intensidade da banda a  $1748\text{cm}^{-1}$  e o desaparecimento da banda a  $1010\text{cm}^{-1}$  sugerem que ácidos carboxílicos, ésteres e aldeídos foram formados como produtos voláteis principais, os quais são consumidos nessa temperatura. Estes resultados estão de acordo com a formação de ácido fórmico, ácido 1-hidroxiopropanona-2, ácido acético e etileno glicol em estudos de degradação de polissacarídeos relatados por Richards *et al*<sup>[90]</sup>. As bandas associadas com estiramento C-H ( $3000\text{-}2850\text{cm}^{-1}$ ) e deformação angular de  $\text{CH}_3$  ( $1240\text{cm}^{-1}$ ) praticamente desaparecem a  $600^\circ\text{C}$ . O aparecimento de novas bandas nas regiões de  $750$  a  $1000\text{cm}^{-1}$ , e a  $1620$  e  $3000\text{cm}^{-1}$ , sugerem a formação de compostos aromáticos. Os espectros de amido tratados termicamente (Fig.13, curvas B, D e F) mostraram um comportamento similar quando comparados com o não-tratado (curvas A, C e E). Nenhuma diferença marcante foi observada nesses espectros por FTIR.

### 3.14- Ensaio mecânicos

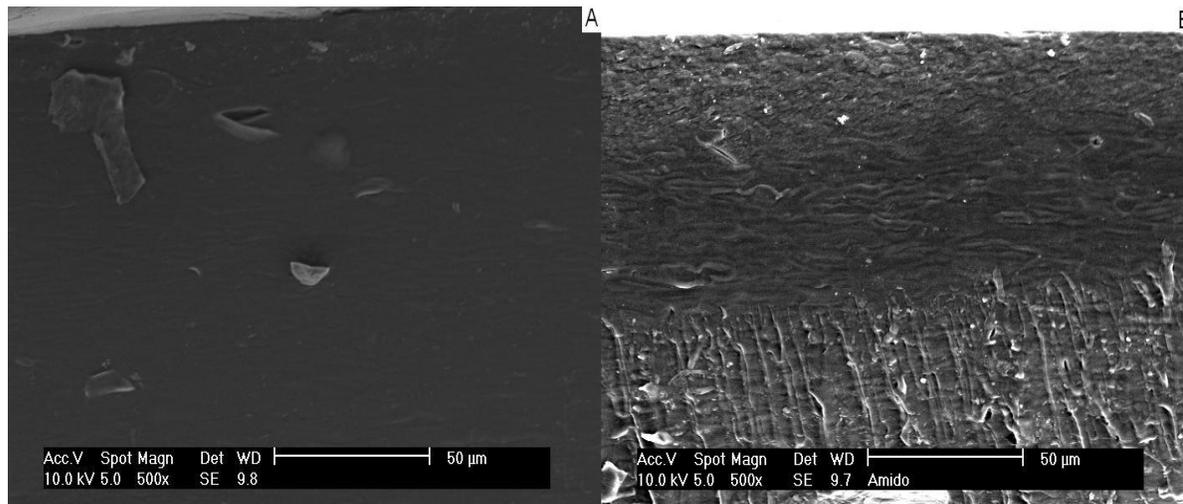
As propriedades mecânicas dos filmes de amido de milho tratados e não tratados termicamente foram analisadas em função do tratamento térmico. Os resultados do módulo de elasticidade, tensão máxima de ruptura e alongamento na ruptura, apresentados na tabela 4 mostraram uma variação entre o filme de amido puro em relação ao filme de amido submetido a tratamento térmico (100°C/120min). Os valores do módulo de elasticidade e tensão máxima de ruptura do filme de amido tratado termicamente de 326,7MPa e 40,0MPa, respectivamente foram maiores que os encontrados para o filme de amido puro que foram 261,3MPa e 29,7MPa, respectivamente. Esses valores indicam que o filme de amido tratado termicamente apresentou um comportamento mais rígido em relação ao filme de amido puro. Este comportamento pode ser atribuído a maior estabilidade do filme alcançado com o tratamento térmico, comprovado pelo valor mais alto da energia de ativação ou ainda pela possível formação de ligações cruzadas devido à formação de ligações covalentes intra e intermoleculares.

**Tabela 4-** Propriedades mecânicas dos filmes de amido.

Condições de Tratamento Térmico dos Filmes de Amido de Milho	Módulo de Elasticidade (MPa)	Tensão máxima de ruptura (MPa)	Alongamento na Ruptura (%)	UR (%)
Amido Sem Tratamento	261,3±1,0	29, 7±4,9	2,2±0.8	43
Amido Termicamente Tratado 100°C/120min	326,7±2,0	40±8,2	3,2±0.5	43

### 3.15- Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias das fraturas dos filmes de amido puro (sem tratamento térmico) e dos filmes de amido submetidos a tratamento térmico (100°C/120min) são apresentadas na Fig. 14. A análise morfológica da superfície dos filmes aparentemente não mostrou diferenças significativas. Entretanto, uma certa porosidade foi observada em toda seção transversal do filme tratado termicamente em relação ao não tratado, o qual mostrou uma estrutura mais compacta. A



**Figura 14-** Micrografias eletrônica de varredura (seção transversal): A) filme de amido de milho sem tratamento; B) filme de amido de milho tratado termicamente 100°C/120min.

maior rugosidade observada após o tratamento térmico parece estar relacionada com a maior resistência à ruptura desse filme. Quando submersos em água como nos ensaios de intumescimento, esses canais possuem uma capacidade de alojar uma quantidade maior de

solvente. Quando a água preenche esses espaços faz com que os filmes itumescam, como observado, aumentando a resistência à ruptura do material.

### 3.16- CONCLUSÕES

O experimento reológico e a morfologia observada por microscopia óptica permitiram a determinação das condições de gelatinização do amido de milho disperso em meio aquoso, e ainda a verificação de que o método de preparação é adequado para obtenção de filmes por *casting*.

Um aumento na energia de ativação foi observado para amostras tratadas usando diferentes períodos de tempo e temperaturas em relação ao amido não-tratado, indicando uma maior estabilidade do filme após o tratamento térmico. Os valores mais altos de  $E_a$  foram observados nas amostras tratadas a 100°C por 120min.

Um taxa de dissolução menor em meio aquoso dos filmes de amido tratados termicamente comparados ao não-tratado foi observada. Esse comportamento sugere que o tratamento térmico pode promover uma perda de água dos filmes de amido levando a um aumento na cristalinidade.

Algumas diferenças nos espectros de FTIR dos filmes de amido de milho tratados termicamente em relação ao não-tratado foram observadas: (i) pequeno deslocamento da banda a  $1418\text{cm}^{-1}$  para números de onda menores (filmes tratados a temperaturas mais altas que 80°C e por períodos de tempo maiores que 15min), os quais sugerem uma mudança nos níveis de ligação de hidrogênio; (ii) um deslocamento da banda de absorção a  $1645\text{cm}^{-1}$  para valores maiores provavelmente devido a fortes ligações de hidrogênio; (iii) um deslocamento da principal banda de absorção a  $3377\text{cm}^{-1}$  para valores menores com o aumento da temperatura e do tempo de tratamento térmico, indicando um aumento de ligações cruzadas. Este

comportamento sugere que o mecanismo de degradação do amido consiste em dois processos principais: eliminação de água e despolimerização, formando produtos de degradação sólidos como ésteres, ácidos, aldeídos e álcoois primários. E ainda, produtos gasosos principalmente compostos de CO, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O e CH<sub>2</sub>O.

Um aumento nos valores de módulo de elasticidade e tensão máxima de ruptura dos filmes tratados termicamente em relação aos não tratados foi observada, confirmando o aumento da estabilidade dos filmes após tratamento térmico.

As micrografias da seção transversal dos filmes de amido após tratamento térmico apresentaram uma rugosidade maior em relação à do amido sem tratamento, a qual apresentou-se de forma mais compacta. Em relação à superfície, nenhuma diferença significativa na estrutura rugosa foi observada.

Finalmente, a metodologia de tratamento térmico descrito nesse capítulo é apresentada como uma técnica de baixo custo para modificar e estabilizar os filmes de amido.

## **CAPÍTULO 4**

### **4. PREPARAÇÃO QUÍMICA DE FILMES DE AMIDO ELETRICAMENTE CONDUTORES**

No capítulo 3, um estudo específico do amido de milho foi abordado com ênfase em suas propriedades térmicas, mecânicas e estruturais, como um primeiro passo para sua modificação. Nesse capítulo é apresentada uma nova alternativa de modificação do material, inferindo a este características que permitam sua aplicação como biomaterial. Dentro desse contexto, foram escolhidos componentes capazes de promover ou melhorar a estabilidade térmica, as propriedades mecânicas, e ainda incluir um caráter condutor ao filme de amido de milho.

A decisão de adicionar um plastificante foi motivada pela necessidade de diminuir a fragilidade dos filmes de amido, bem como melhorar propriedades de flexibilidade e extensibilidade. Compostos hidrofílicos tais como polióis (por exemplo o sorbitol) são comumente usados como plastificantes na formação de filmes hidrofílicos.

O polipirrol foi escolhido em função do seu caráter condutor e sua biocompatibilidade. Optou-se ainda, pela síntese química por ser uma metodologia de baixo custo e de fácil obtenção.

Nesse estudo a modificação da superfície de filmes de amido contendo sorbitol e polipirrol foi caracterizada por medidas de condutividade elétrica específica superficial, difração de raios-x, termogravimetria, FTIR, ensaios mecânicos e microscopia eletrônica de varredura.

## METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 4.1- Síntese química do Polipirrol

Para análise elementar, FTIR e difração de raios-x, polipirrol foi quimicamente sintetizado como descrito a seguir:  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (5% m/v) foi dissolvido em água deionizada sob agitação constante em agitador magnético a 200 rpm a 25°C por 2h. A solução foi então vertida em placas de Petri (83mm de diâmetro) para evaporação total do solvente em capela de exaustão a temperatura ambiente por aproximadamente 24h. O pó de polipirrol obtido foi lavado em água deionizada para eliminação do excesso de resíduo de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Tiocianato de potássio foi adicionado a solução de lavagem do polímero de forma a garantir a remoção total de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  que não reagiu. Finalmente, o polipirrol obtido foi seco a vácuo a 25°C por 24h.

### 4.2- Preparação de filmes poliméricos a base de amido de milho contendo sorbitol como agente plastificante e $\text{FeCl}_3$ como agente oxidante

Os filmes de amido/sorbitol foram obtidos por *casting* utilizando-se amido de milho (já descrito no item 3.1) e sorbitol ( $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ , Nuclear) como plastificante. Suspensões com concentração de 2%<sub>m/v</sub> de amido de milho e sorbitol em água deionizada, foram submetidas à agitação constante em agitador magnético (Microquímica modelo MQAMA 301) a 200 rpm por 30 minutos até completa gelatinização a 70°C. Os frascos contendo a suspensão de amido de milho foram mantidos sob agitação sem aquecimento até alcançarem a temperatura ambiente. Posteriormente,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Nuclear) previamente dissolvido em água deionizada foi adicionado a mistura e mantido sob agitação por mais 2h. A solução final foi então vertida em

placas de Petri (83mm de diâmetro) para evaporação total do solvente em capela de exaustão a temperatura ambiente por aproximadamente 48 h. Com o objetivo de otimizar o sistema, amostras contendo 10%<sub>m/m</sub> a 25%<sub>m/m</sub> de sorbitol e 1%<sub>m/m</sub> a 10%<sub>m/m</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (concentrações relativas a quantidade de amido) foram preparados de acordo com a Tabela 5.

**Tabela 5-** Composição dos filmes avaliados.

Amostras	Amido de milho	Sorbitol	Cloreto férrico
A	1g	0,10g	0,05g
B	1g	0,20g	0,05g
C	1g	0,25g	0,05g
D	1g	Sem sorbitol	0,05g
E	1g	0,20g	0,01g
F	1g	0,20g	0,05g
G	1g	0,20g	0,10g

#### 4.3- Modificação da superfície de filmes poliméricos a base de amido de milho com polipirrol

Filmes contendo sorbitol (20%<sub>m/v</sub>) como agente plastificante e FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (agente oxidante) foram expostos aos vapores de pirrol (C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>N, Acros Organics) sem purificação prévia em dessecador protegido da luz a 25°C.

#### 4.4- Reologia das soluções de amido de milho e sorbitol

As condições de gelatinização do amido de milho e sorbitol foram determinadas em reômetro Brookfield DV-III ultra, conforme descrito no item 3.3.

#### 4.5- Síntese do polipirrol sobre os filmes de amido de milho/sorbitol/ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

A sorção do monômero pirrol, bem como a fração de massa de polipirrol formada ( $X_{\text{PPi}}$  %) foram monitoradas gravimetricamente em balança analítica (Bioprecisa Modelo FA2104N) por 72h em diferentes períodos de tempo. Para observar a sorção de pirrol, as amostras foram pesadas imediatamente após a exposição. Com objetivo de monitorar a fração de polipirrol formado, as amostras foram pesadas após a secagem a vácuo por 2h<sup>[55]</sup>.

#### 4.6- Análise elementar

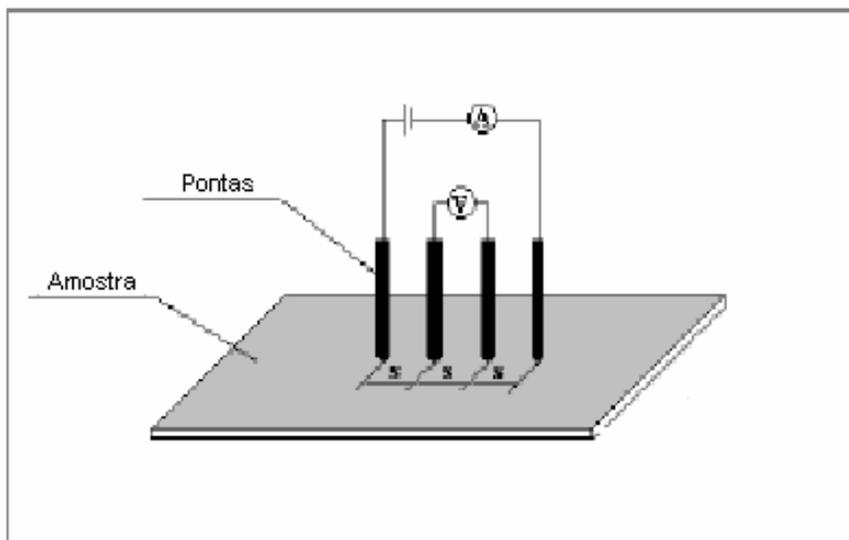
A composição de polipirrol foi determinada por análise elementar utilizando um analisador elementar (Perkin Elmer, Modelo 2400 CHN). A análise foi conduzida à temperatura de combustão de 925°C em presença de  $\text{O}_2$ .

#### 4.7- Medidas de condutividade elétrica específica superficial (Método das Quatro Pontas)

As amostras foram condicionadas a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $50 \pm 5\%$  (Hygro-Thermometer, Instrutherm) de umidade relativa por 48h. As medidas foram realizadas nos filmes de amido/sorbitol/polipirrol contendo diferentes concentrações de agente oxidante, utilizando uma fonte de corrente programável (Keithley Modelo 6220), a leitura de voltagem foi feita em eletrômetro (Keithley Modelo 6517A).

O princípio do método de medida<sup>[91-92]</sup> utilizado (esquema mostrado na Figura 15) consiste na aplicação de uma corrente elétrica (numa escala de 2nA a 6nA) entre os terminais externos medindo-se uma diferença de potencial (da ordem de milivolts) entre os dois terminais internos. No caso de amostras pouco espessas, a condutividade é dada pela equação 2, onde  $e$  é a espessura da amostra (cm),  $I$  é a corrente aplicada (A) e  $V$  a tensão registrada (V).

$$\sigma = \frac{I \ln 2}{V \pi e} \quad (2)$$



**Figura 15-** Ilustração do sistema de medição de condutividade elétrica pelo método das quatro pontas, onde  $s$  é a distância entre as pontas<sup>[93]</sup>.

#### 4.8- Difração de raios-X

As medidas de difração de raio-X foram realizadas em amido de milho e polipirrol (em pó) e filmes de amido em aparelho X-PERT Philips Diffractometer com radiação Cu-K $\alpha$  ( $\lambda$ :1,5406Å), submetido a 40kV/ 0,030A.

#### **4.9- Termogravimetria (TG)**

A análise térmica foi conduzida de acordo com o procedimento descrito no item 3.5 (capítulo 3).

#### **4.10- Análise de FT-IR**

Os espectros de FTIR dos filmes de amido, amido/sorbitol, amido/sorbitol/ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e amido/sorbitol/PPi foram obtidos de duas maneiras: (1) usando um espectrômetro de transmissão (Bomem, FTLA 2000) com resolução de  $4\text{cm}^{-1}$  na faixa de  $4000\text{cm}^{-1}$  a  $400\text{cm}^{-1}$  e (2) usando um espectrômetro (Varian, 3100 FT-IR) constituído de um sistema ATR (reflectância total atenuada) com resolução de  $2\text{cm}^{-1}$  na faixa de  $4000\text{cm}^{-1}$  a  $400\text{cm}^{-1}$ .

#### **4.11- Ensaio mecânicos**

Os ensaios de tensão máxima de ruptura, alongação na ruptura e módulo de elasticidade (módulo de Young) foram realizados de acordo com a metodologia descrita no item 3.7 (capítulo 3) em amostras de filmes de amido de milho, amido contendo  $20\%_{\text{m/v}}$  de sorbitol e filmes de amido contendo  $20\%_{\text{m/v}}$  de sorbitol e  $5\%_{\text{m/v}}$  de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  após 24h de exposição aos vapores de pirrol.

#### **4.12- Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

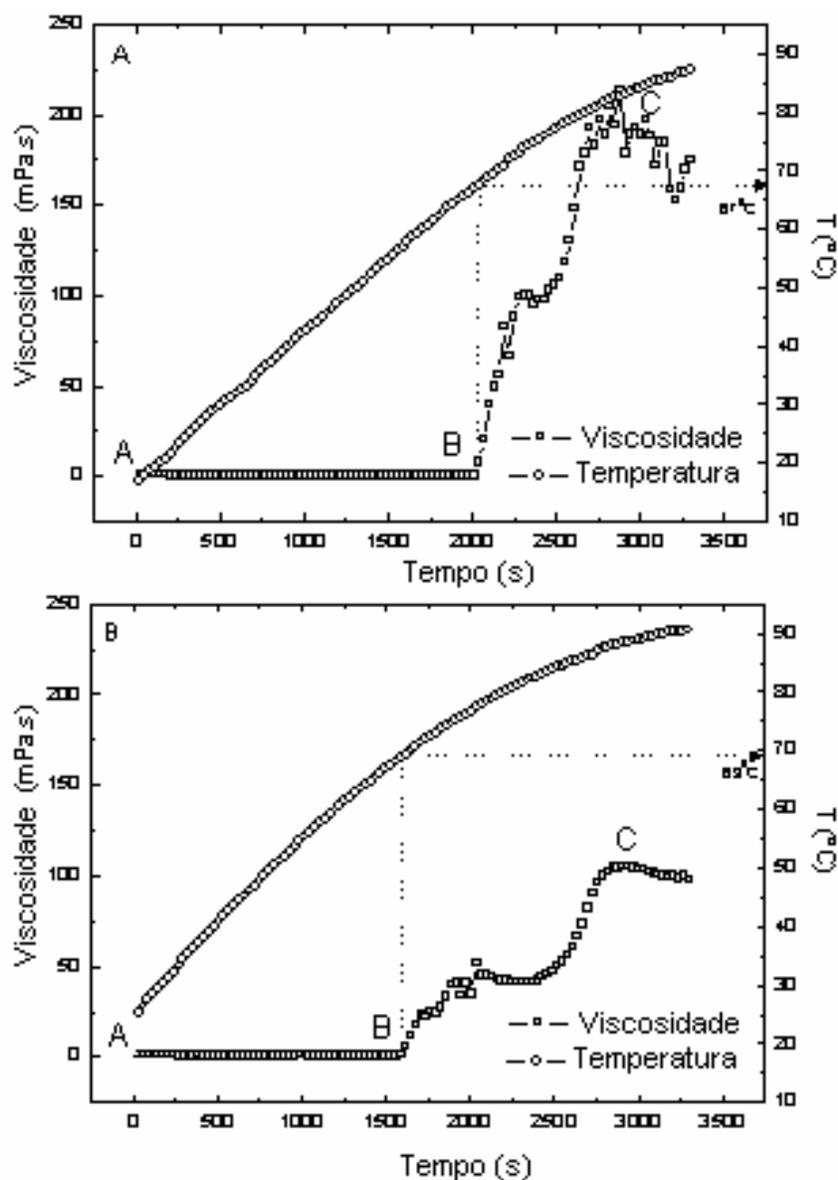
A morfologia dos filmes de amido de milho, amido/sorbitol, amido/sorbitol/ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e amido/sorbitol/polipirrol foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura conforme descrito no item 3.9 (capítulo 3).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.13- Reologia das soluções de amido de milho e sorbitol

As mudanças nos grânulos de amido dispersos em meio aquoso (na ausência e presença de plastificante-sorbitol), durante aquecimento a uma taxa constante, foram observadas através de medidas reológicas. Este experimento foi realizado com objetivo de confirmar a metodologia utilizada na preparação dos filmes de amido com adição de sorbitol quanto à capacidade de promover a gelatinização dos grânulos de amido na suspensão, avaliando a influência do sorbitol nas condições de gelatinização. A Figura 16A e 16B ilustra o comportamento reológico da suspensão de amido (na ausência e presença de sorbitol, respectivamente) durante aquecimento a uma taxa de deformação constante.

No início do experimento reológico (estágio A na Figura 16A e 16B), a suspensão de amido estava abaixo de 25°C com valores de viscosidade similares ao da água (1mPa.s). Nessa condição, os grânulos de amido permaneceram insolúveis em água. A análise morfológica (não mostrada), dos grânulos de amido no estágio A, apresentou uma mescla de grânulos arredondados e angulares com um hilo central tipicamente observado em grânulos de amido em seu estado nativo<sup>[94-95]</sup>. Com o processo de aquecimento iniciado, a viscosidade da suspensão permaneceu inalterada até 67°C quando ocorreu um aumento repentino de viscosidade indicando o início da gelatinização do amido de milho com sorbitol (estágio B, Fig 16A). Nessas condições ocorre um intumescimento dos grânulos de amido com absorção de água e um aumento de volume. Esse processo também foi observado a temperatura de 69°C para suspensão de amido de milho contendo sorbitol. Com aumento de temperatura os valores de viscosidade continuaram a aumentar como resultado do intumescimento até um máximo de 212,5mPa.s a



**Figura 16-** Perfil de viscosidade e temperatura de uma suspensão aquosa de amido de milho (6%<sub>m/v</sub>): A) Sem sorbitol e B) Com sorbitol (20%<sub>m/v</sub> concentração relativa a quantidade de amido) obtida durante aquecimento em reômetro a uma taxa de cisalhamento de 93s<sup>-1</sup>.

82,8°C, para suspensão de amido (Fig 16A) e 105,5mPa.s a 88,3°C para suspensão contendo sorbitol (Figura 16B). Após este ponto um decréscimo na viscosidade foi observado devido à

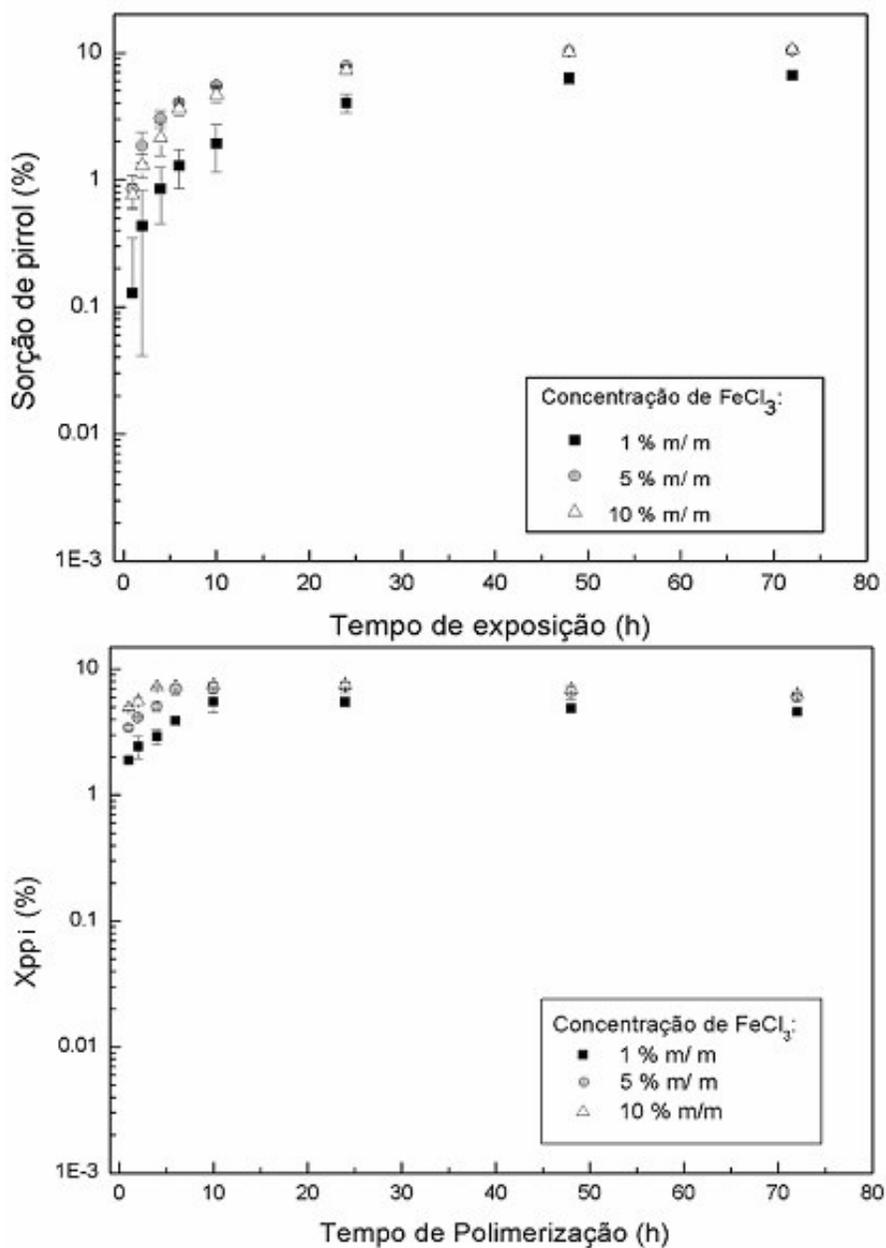
ruptura dos grânulos de amido, indicando que o método de preparação permitiu uma completa gelatinização do amido. Nenhuma influência marcante nas condições de gelatinização dos grânulos de amido devido à presença de sorbitol foi observada.

#### 4.14- Síntese do polipirrol sobre os filmes de amido de milho/sorbitol/ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

O método descrito nesse trabalho consiste na incorporação do agente oxidante ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) na solução de amido/sorbitol (após a gelatinização), permitindo a obtenção de filmes homogêneos, quase lisos, com uma espessura de  $(0,173 \pm 0,002)\text{mm}$ . Filmes contendo diferentes concentrações de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1-10%<sub>m/v</sub>) foram produzidos com objetivo de determinar as condições ótimas de síntese de polipirrol nas matrizes de amido. As Figura 17A e 17B apresentam o comportamento de sorção e polimerização de pirrol respectivamente em função do tempo de exposição aos vapores do monômero.

Em geral, as matrizes expostas aos vapores de pirrol apresentaram uma mudança de coloração do amarelo escuro para preto após cerca de uma hora de exposição ao monômero, indicando uma reação de polimerização sobre os filmes. É importante salientar que os filmes mantiveram a flexibilidade inicial inclusive após o fim do experimento.

Foi observado que o equilíbrio de sorção de pirrol foi de 6,6%<sub>m/m</sub>, 10,5%<sub>m/m</sub>, e 10,6%<sub>m/m</sub> para filmes contendo 1%<sub>m/v</sub>, 5%<sub>m/v</sub> e 10%<sub>m/v</sub> de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  alcançado após aproximadamente 60h de exposição aos vapores de pirrol (Figura 17A). Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Zoppi<sup>[55]</sup> e Zoppi *et al.*<sup>[63]</sup>, para Polipirrol/Etileno-propileno-



**Figura 17-** Gráficos de: A) Sorção de pirrol e B) Fração de polipirrol polymerizado em função do tempo de exposição aos vapores de pirrol dos filmes de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e diferentes concentrações de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O.

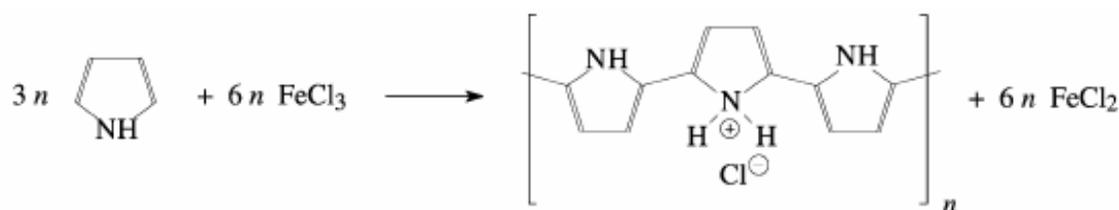
5-etilideno-2-norborneno semi-interpenetrante obtidos por mistura mecânica de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O como agente oxidante, sobre as matrizes de borracha, seguido da exposição aos vapores de

pirrol.

Como pode ser observado na Figura 17B, a reação de polimerização estabiliza após 10h de exposição aos vapores de pirrol, para todas composições testadas. Considerando que o monômero estava em excesso durante a reação de polimerização e que a presença de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  que não reagiu poderia diminuir a estabilidade do filme de amido, os resultados sugerem que 5%<sub>m/v</sub> de agente oxidante são suficientes para promover a polimerização de pirrol sobre filmes a base de amido.

#### 4.15- Análise elementar

Para confirmar a condição ótima de polimerização, Polipirrol foi quimicamente preparado com a mesma massa (0,05g) de oxidante usado para preparar os filmes de amido contendo 5%<sub>m/v</sub> de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . A análise elementar do material sintetizado indicou a presença de 53,6%<sub>m/m</sub> de carbono, 4,0%<sub>m/m</sub> de hidrogênio e 16,5%<sub>m/m</sub> de nitrogênio. A quantidade esperada em PPI (62,2%<sub>m/m</sub> de carbono, 4,3%<sub>m/m</sub> de hidrogênio e 18,1%<sub>m/m</sub> de nitrogênio) foi calculada assumindo que para três anéis de pirrol, é criada uma carga positiva, a qual é balanceada pelo ânion da molécula oxidante<sup>[65]</sup>. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Omastová *et al*<sup>[64,65,66]</sup> em estudos de polimerização química usando  $\text{FeCl}_3$  em meio ácido, cujo rendimento de polimerização foi de  $1,15\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Omastová *et al.*<sup>[64,65,66]</sup> e Machida *et al*<sup>[96]</sup> também observaram que a razão molar ótima de  $\text{FeCl}_3$ /pirrol é 2,3 (Esquema 2).



**Esquema 2-** Equação de polimerização do polipirrol a partir de pirrol e cloreto férrico como agente oxidante. Para cada três unidades constituídas uma é protonada.

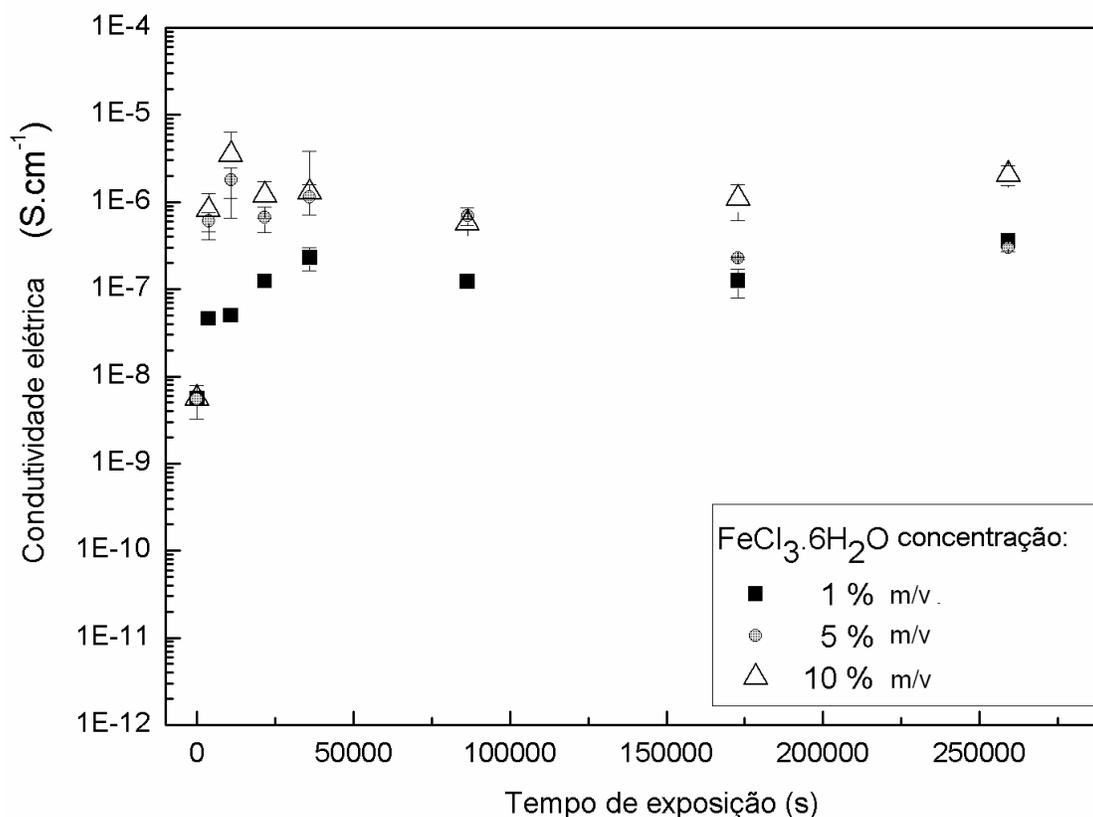
A diferença entre a composição elementar experimental e calculada na amostra de PPI pode ser em parte explicada pelo fato de o polipirrol ser higroscópico e conter 4,4%<sub>m/m</sub> de água, como observado na curva de TG (não mostrada) <sup>[64,65,66]</sup>. Somado a isto, o polipirrol também contém oxigênio, a presença de ligações C-O, C-OH e C=O foi evidenciada nas amostras de PPI <sup>[97,98]</sup>. Esse oxigênio deve entrar na estrutura do PPI durante o processo de polimerização como consequência da presença de água no filme de amido, bem como pelo fato da reação ser preparada em atmosfera de ar.

A condutividade do PPI preparado quimicamente depende das condições de preparação, temperatura e principalmente do agente oxidante utilizado <sup>[99,100]</sup>. Cloreto férrico é frequentemente utilizado para oxidação química do pirrol, já que este possibilita uma maior condutividade do produto final formado, comparada a outros oxidantes. PPI pode atingir condutividades de 1 a 40 S.cm<sup>-1</sup> <sup>[100]</sup>. Omastová *et al* <sup>[64,66]</sup> observaram uma condutividade de 1,5 ± 0,4S.cm<sup>-1</sup> para o polipirrol preparado quimicamente usando FeCl<sub>3</sub> como oxidante em meio ácido (HCl). Nesse trabalho, os valor de condutividade medidos para PPI (preparado na mesma composição daquele para análise elementar) foi de 4,6x10<sup>-4</sup>±1,26x10<sup>-4</sup>S.cm<sup>-1</sup>.

#### 4.16- Medidas de condutividade elétrica específica superficial (Método das Quatro Pontas)

A Figura 18 apresenta a condutividade elétrica medida nos filmes de amido preparados com diferentes concentrações de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  em função do tempo de exposição aos vapores de pirrol. De maneira geral, foi observado que os valores de condutividade elétrica tendem a aumentar com o tempo de exposição e permanecem quase constantes após 10h de exposição ao monômero. Considerando a concentração do agente oxidante nos filmes de amido, os maiores valores de condutividade medidos para filmes contendo 1%<sub>m/v</sub> de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  foram de aproximadamente  $3,6 \times 10^{-7} \text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Nenhuma diferença marcante foi observada nos valores de condutividade dos filmes preparados com 5%<sub>m/v</sub> ou 10%<sub>m/v</sub> de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , alcançando um máximo de aproximadamente  $2,07 \times 10^{-6} \text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Esses valores tendem a aumentar em meio líquido.

Os valores sugerem que a concentração de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (5%<sub>m/v</sub>) e 10h de exposição aos vapores do monômero são suficientes para sintetizar o polipirrol sobre os filmes de amido, para obter um rendimento de polimerização e condutividade elétrica adequados. Dessa forma, para permitir uma completa reação de polimerização, filmes de amido/sorbitol/PPi foram preparados com 5%<sub>m/v</sub> de agente oxidante e expostos por 24h aos vapores de pirrol antes da caracterização.



**Figura 18-** Gráficos de condutividade elétrica de em função do tempo de exposição ao pirrol dos filmes de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e diferentes concentrações de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O.

#### 4.17- Difração de raios-X

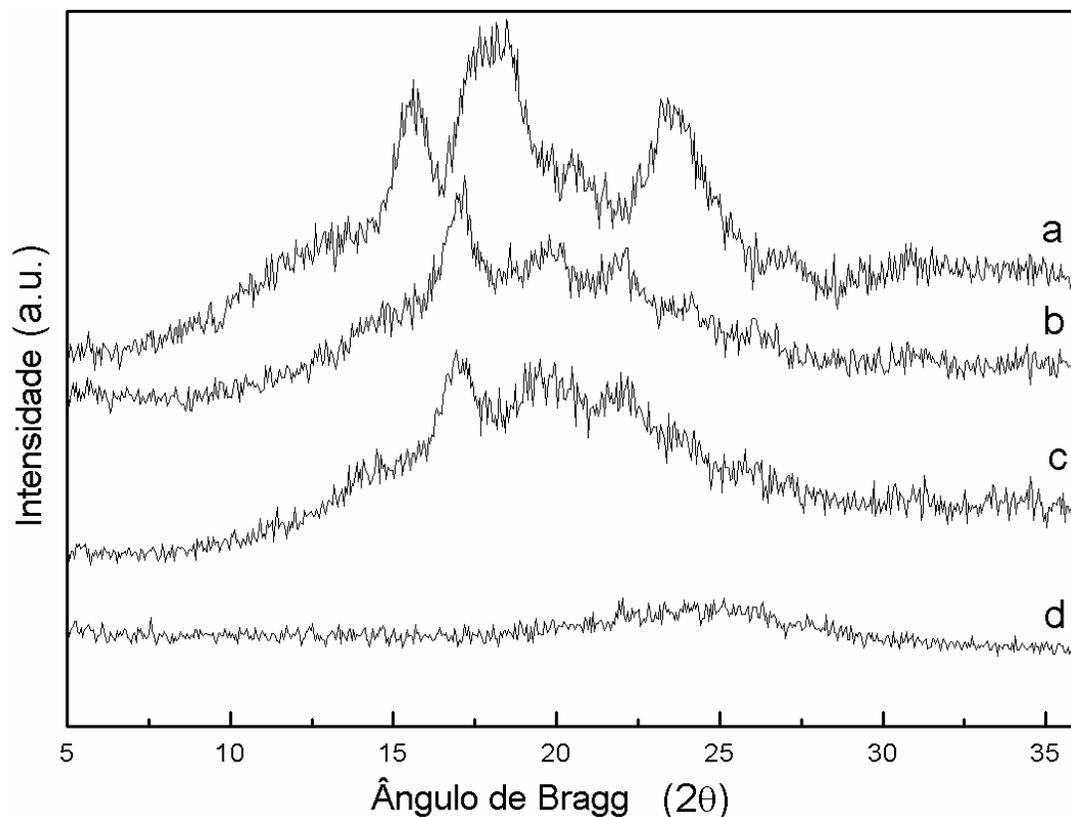
A cristalinidade dos grânulos de amido é atribuída principalmente a amilopectina, uma molécula altamente ramificada, que se entrelaça para formar estruturas duplas hélice, as quais são à base dos cristais<sup>[38]</sup>. Existem três tipos de estruturas cristalinas classificadas por Katz e Van Itallie<sup>[41]</sup> conhecidas como tipo-A, característico de amido de cereais, tipo-B encontrado

em amido de tubérculos e amidos de vagens denominados tipo-C.

Na forma nativa (Figura19a) o amido de milho apresenta picos de difração em aproximadamente  $15^\circ$ ,  $18^\circ$  e  $23^\circ$  ( $2\theta$ ) que corresponde a uma estrutura cristalina típica de amido de cereais (tipo-A) <sup>[38,101,102]</sup>.

O processo de gelatinização promove uma ruptura dos grânulos de amido em solução. E ainda, após a secagem dos filmes uma nova estrutura, diferente da original, é formada, cujos picos de difração ocorrem a aproximadamente  $17^\circ$ ,  $19^\circ$  e  $22^\circ$  como pode ser observado no difratograma do filme de amido imediatamente após a secagem (Figura19b). Considerando que o sorbitol pode interferir na organização da cadeia polimérica e que as ligações de hidrogênio diminuem a interação do polímero e natureza coesiva é bem provável que ocorra também um efeito na cristalinidade, bem como em outras propriedades físicas dos filmes <sup>[103]</sup>. Quanto ao cloreto férrico, existem relatos na literatura sobre a formação de um complexo com o amido, com estrutura e propriedades diferentes daquelas do amido em seu estado nativo <sup>[104]</sup>.

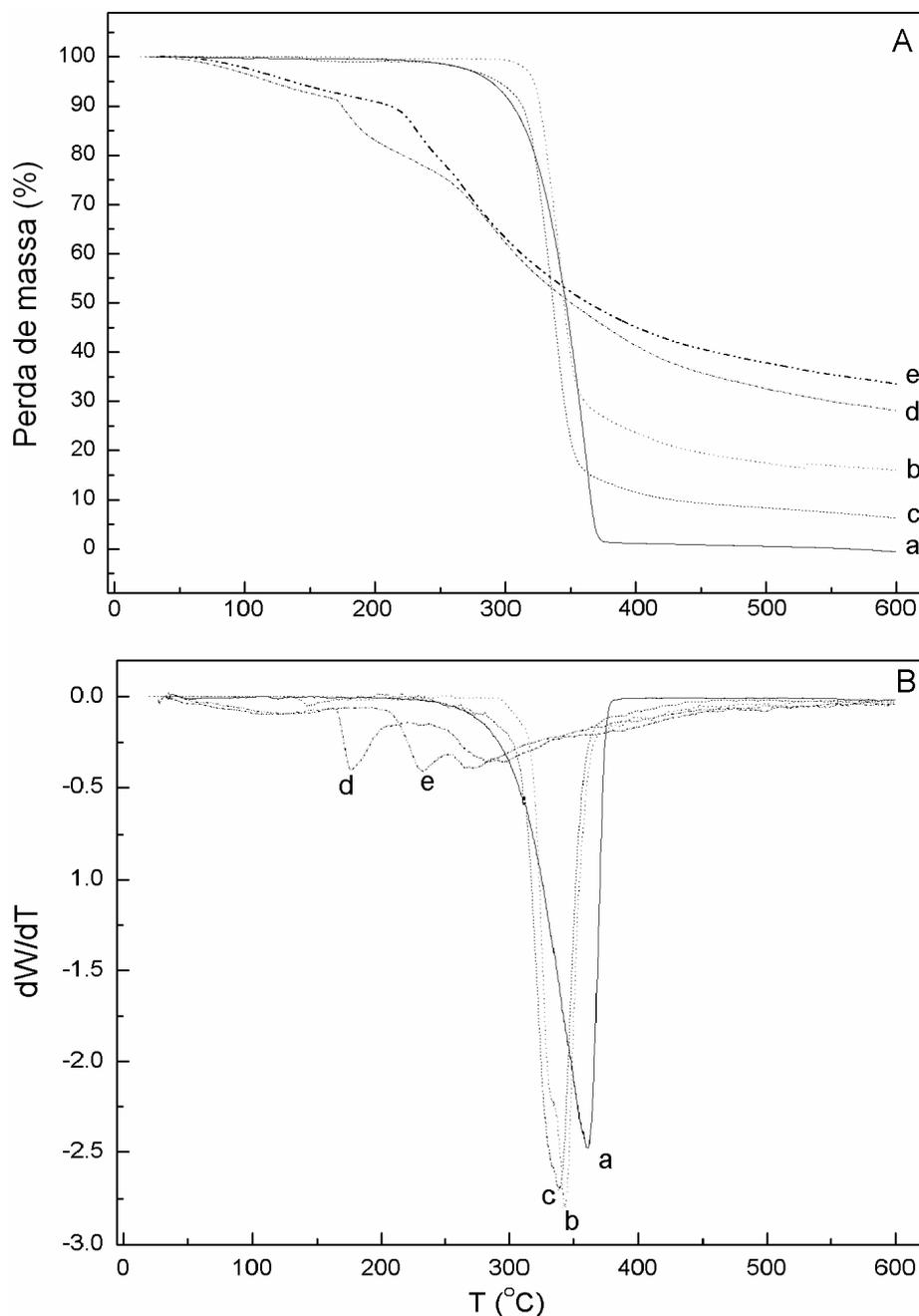
Esse comportamento não foi praticamente influenciado pela presença do polipirrol (Figura19c) provavelmente porque o polipirrol (Figura19d) apresenta um caráter amorfo. Uma extensa reflexão na faixa de  $15-35^\circ$  indica uma baixa ordem de cristalinidade, característica de polipirrol de acordo com o relatado por Visy *et al* <sup>[105]</sup> e He *et al* <sup>[106]</sup> em estudos de polimerização de polipirrol usando  $\text{FeCl}_3$  como agente oxidante.



**Figura 19-** Difratoograma de raios-x de: a) amido de milho (pó in natura); b) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O; c) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O após 24h de exposição aos vapores de pirrol; d) polipirrol (pó).

#### 4.18- Termogravimetria (TG)

As Figuras 20A e 20B apresentam as curvas de TG e DTG do plastificante (sorbitol), do filme de amido e de filmes de amido em diferentes estágios de modificação de superfície.



**Figura 20-** A ) Curvas de TG e B) curvas de DTG de: a) sorbitol; b) filme de amido de milho; c) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol; d) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; e) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  após 24h de exposição aos vapores de pirrol.

A decisão de adicionar um plastificante foi motivada pela necessidade de diminuir a fragilidade dos filmes de amido, bem como melhorar propriedades de flexibilidade e extensibilidade. O plastificante deve ser compatível com o polímero utilizado, reduzir forças intermoleculares e aumentar a mobilidade de cadeias poliméricas polares. Compostos hidrofílicos tais como polióis (glicerol, sorbitol e polietileno glicol) são comumente usados como plastificantes na formação de filmes hidrofílicos<sup>[50]</sup>. O plastificante efetivamente reduz ligações de hidrogênio internas enquanto aumenta o espaçamento intermolecular<sup>[107]</sup>, diminuindo a fragilidade.

Os termogramas de sorbitol, filme de amido e filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol (curvas *a*, *b* e *c* na Figura 20A) mostram uma única etapa de degradação com início em aproximadamente 323°C, 322°C (para amido e sorbitol) e 313°C para os filmes de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol. Além disso, observa-se a que a temperatura máxima de degradação (pico máximo da curva da DTG na Figura 20B) foi 361°C, 344°C e 338°C, para sorbitol, amido e para filmes contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol respectivamente, mostrando que o filme de amido contendo plastificante apresentou uma estabilidade menor do que a do filme de amido puro. Esse comportamento se deve as ligações do sorbitol com as moléculas de amido sugerindo que as tensões coesivas das moléculas nas cadeias poliméricas ligadas enfraquecem. Além disso, o sorbitol está homogeneamente incorporado à rede de ligações de hidrogênio no amido, tornando os filmes mais flexíveis e transparentes.

A influência da presença do agente oxidante ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) e do polipirrol na estabilidade térmica dos filmes (contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol) pode ser observada nas curvas *d* e *e* nas Figura 20A e 20B.

Considerando a curva *d* (Figura 20A e 20B) foi observado que a presença de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  diminui a estabilidade térmica do filme de amido devido a esse caráter oxidante. Sendo a temperatura de ebulição do sorbitol cerca de 290°C<sup>[108]</sup>, a perda de massa abaixo de

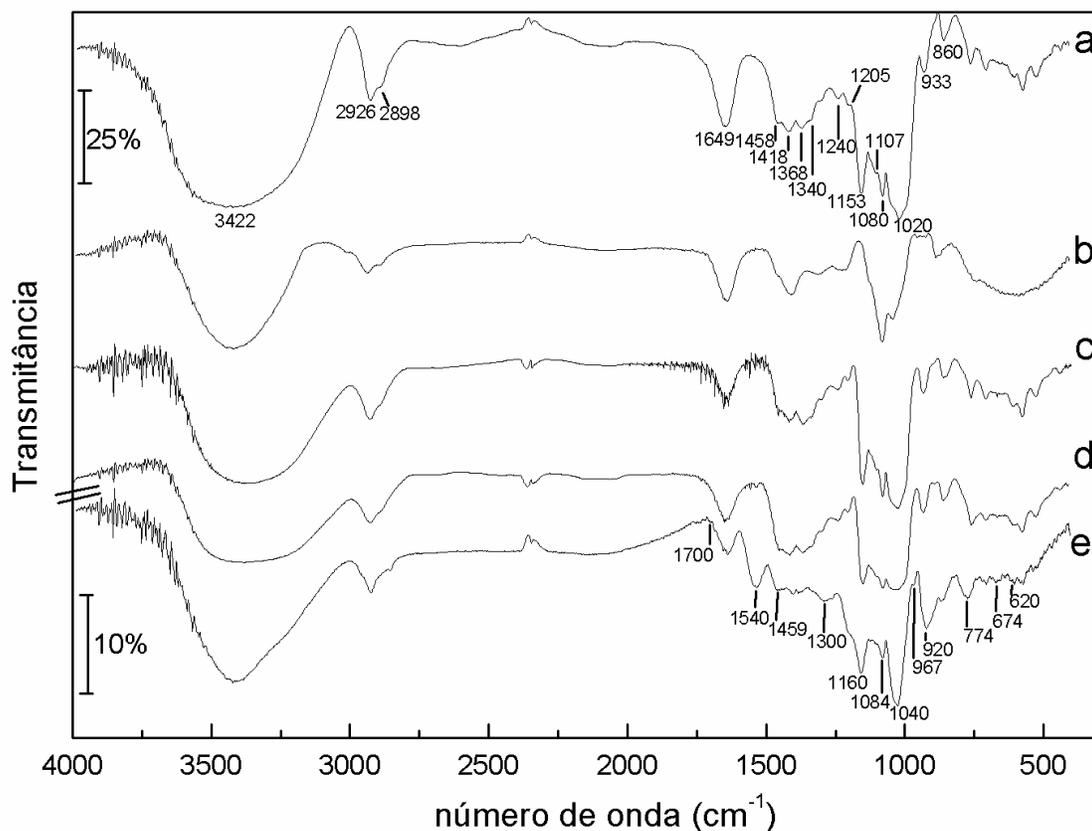
100°C refere-se principalmente a perda de água adsorvida, enquanto que entre 100°C e a temperatura de início da decomposição ocorre a volatilização de água ligada. Ao final dessa perda de massa (cerca de 165°C) foi encontrado um resíduo de 8,3%<sub>m/m</sub>. A segunda perda de massa dessa curva está provavelmente relacionada à formação de um complexo entre o amido e o cloreto férrico<sup>[104]</sup>. A temperatura correspondente ao final dessa perda, (proximadamente 195°C), apresentou um resíduo de 12,4%<sub>m/m</sub>. Uma terceira perda de massa relativa ainda à curva *d* (Figuras 20A e 20B) referente ao amido sugere a formação de ligações cruzadas. No final dessa perda (cerca de 377°C) foi observado um resíduo de 51,4%<sub>m/m</sub>.

A influência do polipirrol na estabilidade do filme de amido pode ser observada na curva *e* (Figuras 20A e 20B). Comparada a curva *d* à primeira perda de massa é estendida a temperaturas mais altas (cerca de 195°C), a qual pode estar relacionada à perda de massa e ao complexo formado entre o amido e o cloreto férrico, Omastová *et al*<sup>[65]</sup> encontraram em estudos de análise termogravimétrica de polipirrol preparado com FeCl<sub>3</sub> como agente oxidante à primeira perda de massa significativa a temperaturas entre 30°C e 100°C relativa à evaporação de água residual, devido ao caráter higroscópico do polipirrol. A segunda perda de massa está provavelmente relacionada à degradação do polipirrol, enquanto que a terceira perda de massa que inicia em aproximadamente 250°C, corresponde a degradação do amido e do sorbitol<sup>[108,109]</sup>. Comparando-se a curva *d* (filme de amido contendo FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) observa-se que a presença de polipirrol evita parcialmente a oxidação do amido promovida pelo FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, elevando a estabilidade térmica do filme a qual é mantida até 195°C.

#### 4.19- Análise de FT-IR

Os sistemas, sorbitol e polipirrol (ambos na forma de pó), filmes de amido e das misturas amido/sorbitol/ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  antes e após a exposição aos vapores de pirrol, foram avaliados por infravermelho no modo transmissão (Figura 21) e reflectância total atenuada (ATR) (Figura 22). Embora os espectros dos filmes de amido e das misturas amido/sorbitol/ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  apareçam nas duas figuras, ambas foram mantidas e discutidas no texto em função da melhor resolução dos espectros no modo ATR. Numa primeira análise é possível observar que a condição de obtenção dos espectros no modo ATR foi diferente, ou seja, os espectros sugerem a quase total ausência de água livre nos sistemas (ausência de bandas na região  $3400\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ ). Embora os filmes analisados sejam os mesmos, porém em períodos diferentes, duas situações poderiam ser consideradas: i) os filmes estocados por mais tempo (em dessecador) poderiam ter perdido a água adsorvida na superfície, e ii) como consequência, no espectro de ATR, que analisa essencialmente a superfície do filme, somente a hidroxilas formando ligações de hidrogênio são detectadas (bandas na região  $3280\text{-}3290\text{ cm}^{-1}$ ). É necessário destacar ainda que os espectros das Figuras 21a, 21c e 21d que correspondem ao filme de amido de milho, filme de amido contendo  $20\%_{\text{m/v}}$  de sorbitol e  $5\%_{\text{m/v}}$  de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  antes e após 24h de exposição aos vapores de pirrol, respectivamente, mostram na região de  $3200\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$  vibrações típicas (bandas intensas e alargadas) de hidroxilas livres e de hidroxilas formando ligações de hidrogênio.

O espectro da Figura 21b que corresponde ao sorbitol puro (em pó) mostra bandas típicas em  $\sim 3420\text{ cm}^{-1}$  e  $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$  (grupos hidroxilas da estrutura do sorbitol e água adsorvida),  $\sim 1460\text{ cm}^{-1}$  (grupos  $\text{CH}_2$ ) e na região  $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$  (vibrações C–O).



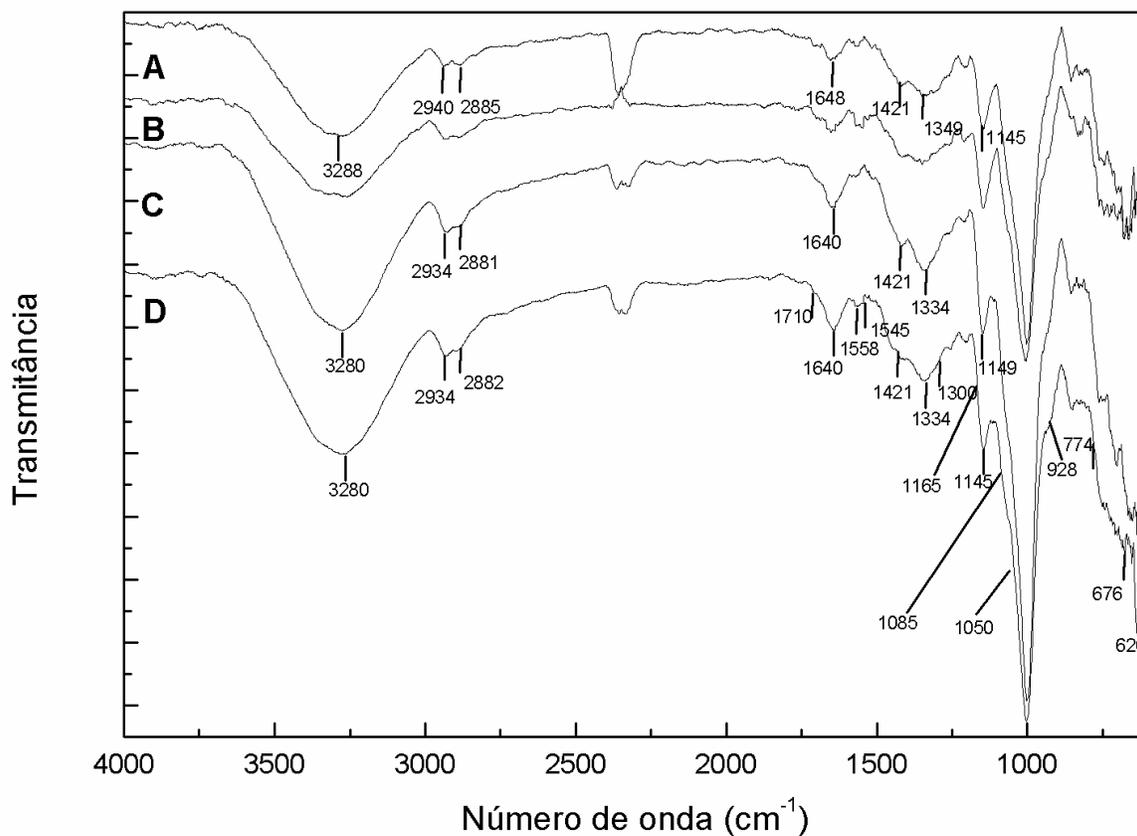
**Figura 21-** Espectros de FTIR de: a) filme de amido de milho; b) sorbitol (pó); c) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O; d) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O após 24h de exposição aos vapores de pirrol; e) polipirrol (pó).

Os modos de vibração do polipirrol tem sido descritos por vários autores<sup>[65,110,111]</sup>. O espectro de transmitância de polipirrol puro (em pó), oxidado com cloreto férrico (Figura 21e) contém picos característicos de polipirrol oxidado. Considerando a similaridade nas vibrações com os espectros 22C e 22D (Figura 22) associados a mistura amido/sorbitol/FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O e a melhor resolução dos espectros no modo ATR, entendemos como desnecessário discutir o

espectro 21e (Figura 21). Por outro lado, considerando a melhor resolução dos espectros obtidos no modo ATR, para a análise de FTIR das misturas amido/sorbitol/ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  serão considerados somente os espectros da Figura 22.

O espectro de FTIR do filme de amido (Figura 22A) apresenta bandas em:  $3288 \text{ cm}^{-1}$ , associada a grupos hidroxila ligados do amido;  $2940 \text{ cm}^{-1}$  e  $2885 \text{ cm}^{-1}$  devido ao estiramento C-H;  $1648 \text{ cm}^{-1}$  correspondente à água ligada e entre  $1400\text{-}1460 \text{ cm}^{-1}$  referente a C-C e C-O-H<sup>[72]</sup>. A posição da banda relativa à água residual é dependente da cristalinidade do polissacarídeo. Em estudos sobre a cristalinidade da trealose (um dissacarídeo), por exemplo, foi relatado o aparecimento de uma banda de absorção de água a  $1685 \text{ cm}^{-1}$ , indicando a presença de fortes ligações de hidrogênio, entretanto para trealose amorfa essa banda foi observada a  $1648 \text{ cm}^{-1}$ <sup>[72]</sup>. Bandas localizadas a aproximadamente  $1458 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1257$  e  $855 \text{ cm}^{-1}$  caracterizam vibrações associadas aos grupos  $\text{CH}_2$ <sup>[73]</sup>. As absorções a aproximadamente  $1349 \text{ cm}^{-1}$  e  $1002 \text{ cm}^{-1}$  tem sido relacionadas a deformações de grupos C-OH<sup>[72]</sup>. Os modos vibracionais relacionados a deformações CCH foram identificados em  $1421 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1208 \text{ cm}^{-1}$  e  $1080 \text{ cm}^{-1}$ , enquanto que estiramentos C-O e C-C tiveram bandas relatadas em  $1154 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1113 \text{ cm}^{-1}$  e  $933 \text{ cm}^{-1}$ <sup>[73]</sup>. As bandas associadas com C-O e C-O-H tem sido designadas a ligações glicosídicas<sup>[74]</sup>.

O espectro da Figura 22B refere-se ao filme de amido/sorbitol. Os plastificantes representam um papel muito importante na formação de filmes, afetando a estrutura e conseqüentemente suas propriedades<sup>[115]</sup>. As funções básicas dos plastificantes são atrair as moléculas de água, reduzir interações intermoleculares entre as cadeias poliméricas e aumentar a flexibilidade dos filmes<sup>[116]</sup>. Sem plastificante os filmes de amido tornam-se facilmente quebradiços. O sítio ativo nos plastificantes e nos amidos são as regiões hidrofílicas, como os grupos hidroxila. Portanto, glicerol, sorbitol são preferencialmente escolhidos na produção de filmes de amido<sup>[117]</sup>.



**Figura 22-** Espectros de FTIR –ATR de: A) filme de amido de milho; B) filme de amido/sorbitol; C) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O; D) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O após 24h de exposição aos vapores de pirrol.

Nesse trabalho, o uso do sorbitol como plastificante tornou os filmes de amido mais flexíveis e aparentemente lisos. Considerando essas afirmações e comparando os espectros 22B e 22A, nenhum deslocamento significativo nos modos de vibração do amido foi observado com a adição de sorbitol. Especificamente o pico a 1648 cm<sup>-1</sup> no espectro A correspondente à água ligada não sofreu nenhuma modificação no espectro B.

Portanto, pode-se concluir que o sorbitol agiu como plastificante, reduzindo eficientemente a interação entre as cadeias poliméricas.

Zhang and Han<sup>[116]</sup> em estudos sobre plastificantes de amido de ervilha com vários monossacarídeos e polióis, também relataram que nenhuma modificação nos espectros de FTIR do amido de ervilha foi observada devido a presença de sorbitol. Esses autores sugerem que o sorbitol comporta-se como monossacarídeo nos filmes de amido. Além disso, Yang e Paulson relatam que o sorbitol é um produto de hidrogenação da glicose e supõem que essas moléculas apresentam uma conformação do anel similar às moléculas de glicose.

Os espectros 22C e 22D (Figura 22) refere-se ao filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O antes e após 24h de exposição aos vapores de pirrol. Em função da similaridade dos dois espectros, somente o 22D foi analisado com detalhes. Segundo a literatura<sup>[104]</sup>, a presença de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O nos filmes de amido, pode favorecer a formação de um complexo de inclusão cloreto férrico/amido que pode ser facilmente hidrolisado em um complexo amido-Fe(O)OH. Contrariamente, este pó ferro-carbonílico pode reagir com uma pasta de amido a 37°C para formar o ferrato de amido. Estes compostos apresentam diferentes estruturas e propriedades, especialmente aquelas relacionadas à capacidade de ligação de água e solubilidade em meio aquoso. Tomasik *et al*<sup>[104]</sup> também relataram que as propriedades do complexo de amido e do complexo resultante da hidrólise qualitativamente assemelham-se as propriedades de complexos descritos por outros autores. No presente trabalho, a banda observada no espectro de amido (Figura 22A) em torno de 3288 cm<sup>-1</sup> (grupos hidroxila) foi deslocada para números de onda menores nos espectros C e D. Além disso, as bandas localizadas em 2940cm<sup>-1</sup> e 2885cm<sup>-1</sup> (Figura 22A) também sofreram deslocamentos para números de onda menores nos

espectros C e D. Isto sugere que as mudanças na quantidade efetiva dos grupos hidroxilas existentes no filme não são devidas ao sorbitol, mas provavelmente a presença de um complexo com o  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , cuja estrutura e as propriedades são diferentes do filme de amido original. Essa afirmação baseia-se também num deslocamento da banda correspondente à água ligada de  $1648 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 22A) para  $1640 \text{ cm}^{-1}$ , bem como no decréscimo de solubilidade em água dos filmes de amido contendo o agente oxidante e nos resultados anteriormente mencionados de TGA e difração de raios-x.

O espectro do filme de amido/sorbitol/polipirrol, oxidado com cloreto férrico (Figura 22D) contém picos característicos de polipirrol oxidado. A banda a  $1545 \text{ cm}^{-1}$  corresponde a vibrações de estiramento C-C do anel de pirrol também observada em PPI-Cl<sup>[65]</sup>. A banda a  $1450 \text{ cm}^{-1}$  no espectro de PPI-Cl corresponde a vibrações de estiramento C-N do anel de pirrol<sup>[65]</sup>. Uma banda larga de  $1400\text{-}1250 \text{ cm}^{-1}$  é atribuída modos de deformação C-H ou C-N (estiramento de amins aromáticas secundárias) e tem um máximo em aproximadamente  $1300 \text{ cm}^{-1}$  para PPI-Cl. Estas bandas também foram observadas por Omastová *et al* a  $1308 \text{ cm}^{-1}$ <sup>[65]</sup> e por Wang *et al*<sup>[112]</sup>. Bandas na região de  $1250$  a  $1107 \text{ cm}^{-1}$  correspondem a vibrações do anel de pirrol.<sup>[65]</sup> Um máximo foi observado por Omastová *et al*<sup>[65]</sup> em aproximadamente  $1165 \text{ cm}^{-1}$  no PPI-Cl, correspondente no espectro 22D. De acordo com a literatura as deformações C-H e N-H em  $1145$  e  $1002 \text{ cm}^{-1}$  são provavelmente influenciadas por vibrações C-O de unidades hidroxipirrol formadas por ataque nucleofílico da água durante a preparação<sup>[65]</sup>. Os grupos hidroxila introduzidos no anel por esse ataque produziram finalmente grupos carbonila por tautomerismo ceto-enol<sup>[113]</sup>. Uma banda a  $1710 \text{ cm}^{-1}$  no espectro de PPI-SO<sub>4</sub> correspondente a grupos carbonila foi observado por Omastová *et al*<sup>[65]</sup>. No presente trabalho, uma vibração fraca

a  $1710\text{ cm}^{-1}$  também foi observada para PPI-Cl. O pico observado por Omastová *et al*<sup>[65]</sup> a  $1094\text{ cm}^{-1}$  está presente no espectro de PPI-Cl deste trabalho a  $1085\text{ cm}^{-1}$ . Foi sugerido pelos mesmos autores que esse pico corresponde a deformação de  $\text{N}^+\text{H}_2$  que é formada na cadeia de polipirrol por protonação (Esquema 1). A banda de deformação C-H e N-H citada na literatura aparece no espectro 21D a  $1061\text{ cm}^{-1}$  para PPI-Cl. A banda de deformação C-H fora do plano do anel teve um máximo a aproximadamente  $928\text{ cm}^{-1}$  para PPI-Cl<sup>[65,114]</sup>. Os picos a  $796\text{ cm}^{-1}$  e  $678\text{ cm}^{-1}$  (observado no espectro 22D a  $774\text{ cm}^{-1}$  e  $676\text{ cm}^{-1}$ ) estão referenciados na literatura como deformação C-H fora do plano e como deformação C-C fora do plano do anel, respectivamente<sup>[65]</sup>.

#### 4.20- Ensaios mecânicos

As propriedades mecânicas dos filmes de amido de milho foram analisadas em função da adição do sorbitol e do polímero codutor. Os valores de módulo de elasticidade, tensão máxima na ruptura e alongamento estão apresentados na Tabela 6.

O valores do módulo de elasticidade e tensão máxima de ruptura do filme de amido após a adição do sorbitol ( $122,6\text{ MPa}$  e  $19,0\text{ MPa}$ , respectivamente) diminuíram em relação ao filme de amido puro ( $261,3\text{ MPa}$  e  $29,7\text{ MPa}$ , respectivamente). Este comportamento foi também observado por Laohakunjit e Noomhorm em estudos sobre o efeito de plastificantes nas propriedades mecânicas de filmes de amido de arroz<sup>[50]</sup>. Sem plastificante os filmes de amido tornam-se facilmente quebradiços. O sítio ativo nos plastificantes e nos amidos são as regiões hidrofílicas, como os grupos hidroxila.

**Tabela 6-** Propriedades mecânicas dos filmes de amido, amido/sorbitol e amido/sorbitol/polipirrol.

Sistemas	Módulo de Elasticidade (MPa)	Tensão máxima de ruptura(MPa)	Alongamento na Ruptura (%)	UR (%)
Amido de Milho	261,3±1,1	29,7±4,9	2,2±0,8	43
Amido de milho/20% <sub>m/v</sub> sorbitol	122,6±10,2	19,0±6,0	4,2±0,4	43
Amido de milho/20% <sub>m/v</sub> sorbitol/PPi	112,6±17,2	23,0±9,5	4,0±1,4	43

Em geral a literatura descreve que os efeitos da adição de sorbitol em filmes de amido se deve a substituição das ligações polímero-polímero por ligações de hidrogênio formada entre as cadeias do polissacarídeo e os grupos OH do plastificante<sup>[50]</sup>. Já os valores observados para o alongamento na ruptura dos filmes de amido de milho após a adição de sorbitol aumentaram em relação à do filme de amido puro. Esse aumento pode ser atribuído à natureza hidrofílica da molécula de sorbitol responsável pela formação de novas interações plastificante-água, que provavelmente são formadas por ligações de hidrogênio.

Geralmente, como o filme perde a estrutura rígida, diminui o módulo de elasticidade e aumenta o alongamento na ruptura. Um alongamento maior na ruptura indica que o filme se tornou mais flexível quando sujeito a tensão ou força mecânica<sup>[50]</sup>.

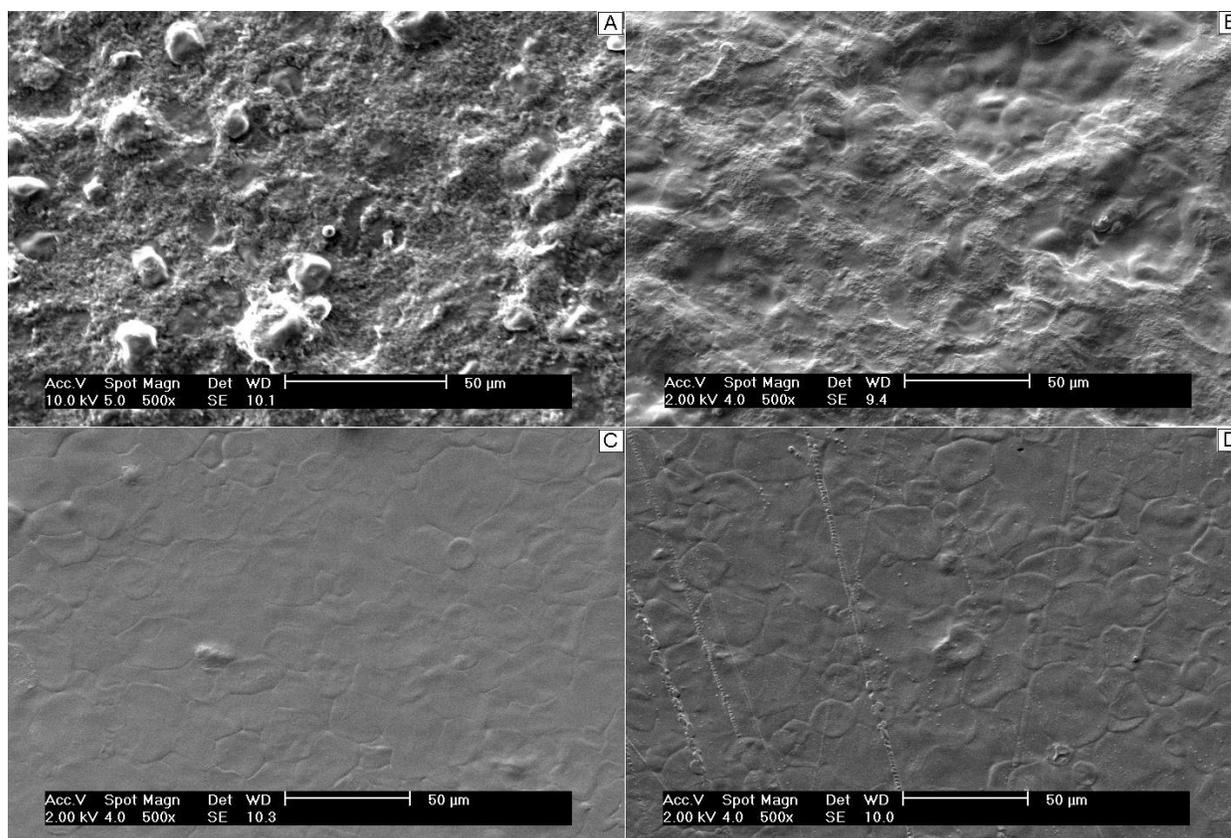
Quanto as propriedades mecânicas avaliadas (módulo de elasticidade, tensão máxima e alongamento na ruptura) para o filme de amido/sorbitol/PPi em relação ao filme de amido puro, um comportamento similar ao filme de amido e sorbitol foi observado, sugerindo que o

principal responsável pela melhor flexibilidade do filme é o sorbitol, uma vez que nenhuma variação significativa (levando-se em conta o desvio padrão das amostras) foi observada após a adição do polímero condutor.

#### 4.21- Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Buscando alguma modificação na morfologia dos filmes como indício de possível interação entre os polímeros envolvidos no sistema, filme de amido de milho, amido/sorbitol, amido/sorbitol/ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e filme de amido/sorbitol/PPi, foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura da superfície e seção transversal.

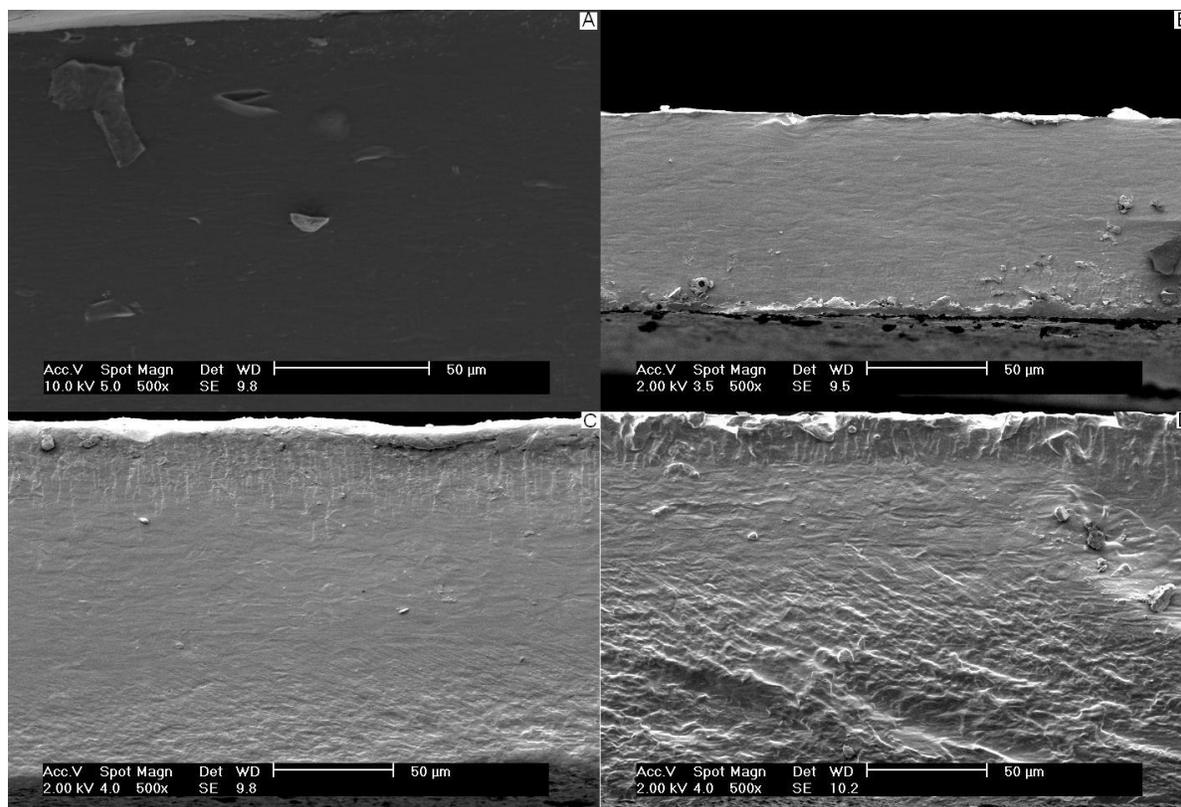
As micrografias das superfícies e fraturas dos filmes de amido de milho, amido/sorbitol, amido/sorbitol/ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e do filme de amido/sorbitol/PPi estão representadas nas Figuras 23 e 24, respectivamente. Como observado na Figura 23A, o filme de amido puro apresenta uma superfície rugosa, característica essa não observada na fratura (Figura 24A). As micrografias revelam uma seção transversal do filme de amido puro bastante lisa e compacta. O filme na presença de 20% de sorbitol não apresentou separação de fases como pode ser observado na seção transversal (Figura 24B). A rugosidade observada na superfície do filme de amido puro, neste caso é menos evidente (Figura 23B). À medida que foi adicionado o cloreto férrico (Figura 23C) a superfície do filme tornou-se evidentemente mais lisa comparada ao filme de amido puro, mostrando uma forte interação, provavelmente devida a formação de um complexo entre o amido e o cloreto férrico<sup>[105]</sup>. Além disso, na análise da seção transversal do filme de amido/sorbitol/ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  um aspecto compacto um pouco menos liso foi observado (Figura 24C). A Figura 23D referente à superfície do filme de amido/sorbitol/polipirrol aparentemente



**Figura 23-** Micrografias eletrônica de varredura (superfície): A) filme de amido de milho; B) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol; C) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O; D) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O após 24h de exposição aos vapores de pirrol.

não apresentou mudanças significativas em relação à condição anterior (amido/sorbitol/FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O).

Entretanto, com relação à seção transversal uma leve rugosidade foi observada (Figura 24D), indicando algum tipo de interação do filme de amido/sorbitol/FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O após a polimerização do polipirrol.



**Figura 24-** Micrografias eletrônica de varredura (seção transversal): A) filme de amido de milho; B) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol; C) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O; D) filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O após 24h de exposição aos vapores de pirrol.

## CONCLUSÕES

O equilíbrio de sorção de pirrol alcançado após aproximadamente 60h de exposição aos vapores foi de 6,6%<sub>m/m</sub>, 10,5%<sub>m/m</sub>, e 10,6%<sub>m/m</sub> para filmes contendo 1%<sub>m/m</sub>, 5%<sub>m/m</sub> e 10%<sub>m/m</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, respectivamente.

A reação de formação de polipirrol atingiu seu equilíbrio após 10h de exposição aos vapores de pirrol, para todas composições testadas. Considerando que o monômero foi usado em

excesso na reação de polimerização e que a presença de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  que não reagiu poderia diminuir a estabilidade do filme de amido, os resultados sugerem que 5%  $\text{m/v}$  de agente oxidante são suficientes para promover a polimerização de pirrol sobre filmes a base de amido.

Os valores de condutividade sugerem que a concentração de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (5%  $\text{m/v}$ ) e 10h de exposição aos vapores do monômero são suficientes para sintetizar o polipirrol sobre os filmes de amido, obtendo-se assim um rendimento de polimerização e condutividade elétrica adequados. Portanto, para permitir uma completa reação de polimerização os filmes de amido/sorbitol/PPI foram preparados com 5%  $\text{m/v}$  de agente oxidante e expostos por 24h aos vapores de pirrol.

Na forma nativa o amido de milho apresentou picos de difração típico de amido de cereais (tipo-A). Uma nova estrutura diferente do amido em seu estado nativo foi observada por difração de raios-x após a adição de sorbitol e  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , sugerindo a formação de um complexo entre o cloreto férrico e amido. A presença de polipirrol não influenciou o comportamento dos filmes de amido por possuir um caráter amorfo.

A presença de sorbitol e  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  diminuiu a estabilidade térmica do filme de amido.

Algumas diferenças nos espectros de FTIR dos filmes de amido de milho/sorbitol/ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , bem como dos filmes de amido/sorbitol/ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  após 24h de exposição aos vapores de pirrol em relação ao filme de amido foram observadas: (i) deslocamento das banda a  $3288 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2940 \text{ cm}^{-1}$   $2885 \text{ cm}^{-1}$  para números de onda menores, os quais sugerem uma mudança nos níveis de ligação de hidrogênio devido possivelmente a formação do complexo entre o amido e o cloreto férrico; (ii) um deslocamento da banda de absorção a  $1648 \text{ cm}^{-1}$  para valores menores provavelmente devido a fortes ligações de hidrogênio; (iii) A presença dos modos de vibração do polipirrol no filme de amido após a exposição aos vapores de pirrol, indicando que a metodologia de síntese foi adequada para esse sistema .

Uma diminuição nos valores de módulo de elasticidade e tensão máxima de ruptura, bem como um aumento no alongamento na ruptura dos filmes de amido/sorbitol e amido/sorbitol/polipirrol, evidenciou que o plastificante exerceu suas funções básicas que são: atrair as moléculas de água, reduzir interações intermoleculares entre as cadeias poliméricas e aumentar a flexibilidade dos filmes.

As micrografias da superfície dos filmes de amido, amido/sorbitol, amido/sorbitol/ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e amido/sorbitol/polipirrol apresentaram uma perda de rugosidade tornando a superfície dos filmes mais lisa a medida que os outros componentes foram adicionados a matriz de amido. Entretanto, ao contrário do observado nas micrografias da superfície, na seção transversal houve um aumento na rugosidade com a adição dos outros componentes na matriz de amido.

Finalmente, a metodologia de preparação química de filmes condutores a base de amido descrita nesse capítulo é apresentada como uma alternativa de baixo custo para modificar e melhorar propriedades térmicas, mecânicas e de condutividade dos filmes de amido.

## **CAPÍTULO 5**

### **5. ESTUDO DA VIABILIDADE DE UM NOVO BIOMATERIAL A BASE DE AMIDO DE MILHO, SORBITOL E POLIPIRROL PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

Um biomaterial ideal para implante deve reunir características biológicas e mecânicas compatíveis com o tecido vivo. Além disso, o implante ideal para aplicações temporárias deve também possuir uma cinética de degradação *in vivo* adequada, que evite a necessidade de uma cirurgia para remoção, bem como comportamento biocompatível. A escolha do amido de milho, um polímero natural, como matriz para o estudo proposto foi em função da sua biodegradabilidade e baixo custo de obtenção.

No capítulo 4 foi avaliada a melhor condição do sistema para modificação da superfície do amido de milho propriamente dita e sua caracterização por diversas técnicas. Nesse capítulo serão abordadas várias técnicas de caracterização para esses filmes a base de amido, referentes ao seu comportamento frente a várias situações e aspectos biológicos. Os próximos experimentos têm como finalidade determinar a viabilidade desse material para utilização para fins biomédicos.

#### **METODOLOGIA EXPERIMENTAL**

##### **5.1- Preparação de filmes poliméricos a base de amido de milho sorbitol e polipirrol**

Com base nos resultados discutidos no capítulo 4 as concentrações de plastificante e agente oxidante adequados para modificação da superfície dos filmes de amido de milho para

aplicação como biomaterial foram: 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, respectivamente. Os filmes foram preparados de acordo com a metodologia descrita nos itens 3.1 (capítulo 3) e 4.1 (capítulo 4) e expostos aos vapores de pirrol por 24h.

## 5.2- Ensaio mecânicos

Os ensaios de tensão máxima de ruptura, alongamento na ruptura e módulo de elasticidade foram realizados de acordo com a metodologia descrita no item 3.7 do capítulo 3 em amostras de filmes de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol, bem como em filmes de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O após 24h de exposição aos vapores de pirrol. Antes da análise, as amostras foram mantidas em dessecador com umidade relativa controlada de 43 % e 75% (cloreto de sódio) e temperatura de 23°C por 20 dias.

## 5.3- Grau de intumescimento

Na determinação do grau de intumescimento ( $Q$ ) de amostras de filmes de amido contendo sorbitol e FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, bem como de filmes de amido contendo sorbitol e FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O após 24h de exposição aos vapores de pirrol foi utilizada a metodologia descrita no item 3.6 do capítulo 3.

## 5.4- Degradação *in vitro* em diferentes pH

A degradação frente a diferentes pH foi avaliada com objetivo de prever o comportamento dos filmes em diferentes situações fisiológicas. Filmes de amido contendo sorbitol e FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O após 24h de exposição aos vapores de pirrol foram mantidos em tubos com soluções de diferentes pH 3,0, 5,6 e 7,4 (tampão fosfato) sob agitação em banho

termostatizado (Yamato, Water Bath Incubator BT25) a 37°C durante 1, 5, 7, 14, 28 e 42 dias. As amostras foram previamente secas em estufa (DELEO) a 40°C por 48h, pesadas e imersas nos tubos contendo 10mL de cada solução. Ao final de cada tempo pré-determinado as amostras (em triplicata) foram retiradas dos tubos e novamente secas em estufa até peso constante. A percentagem de perda de massa foi calculada de acordo com a equação 3. A taxa de degradação foi determinada pela relação entre a perda de massa e o tempo de imersão<sup>[118]</sup>. Na equação 3  $M_o$  representa massa inicial antes da imersão nas soluções e  $M_T$  a massa final de amostra degradada.

$$\Delta M(\%) = \frac{(M_o - M_T)}{M_o} \times 100 \quad (3)$$

### 5.5- Teste de bioatividade *in vitro*

Amostras de filmes de amido contendo sorbitol e polipirrol foram imersas em 50mL solução simuladora de plasma (SBF pH= 7,4)<sup>[119]</sup> mantidas em banho termostatizado (Yamato, Water Bath Incubator BT25) a 37°C sob agitação constante por 1, 3, 7 dias. Após o período de agitação as amostras foram cuidadosamente lavadas em água destilada e secas a 23°C. A superfície dos filmes foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (como descrito no item 4.7 capítulo 4) com intuito de observar possíveis modificações na morfologia dos filmes com a formação de uma camada bioativa de Ca-P precipitada sobre o filme. Essa camada bioativa foi analisada por meio de espectrometria de energia dispersiva (EDX, EDAX) acoplada ao microscópio eletrônico de varredura<sup>[23]</sup>.

### 5.6- Degradação *in vitro* frente a ataque enzimático

O estudo da ação de uma enzima frente aos sistemas é extremamente importante para

aplicação de biomateriais na área médica. As principais enzimas envolvidas na hidrólise do amido são:  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase, glicoamilase,  $\alpha$ -glicosidase, entre outras. A glicoamilase libera a  $\alpha$ -D-glicose do final da cadeia do amido não redutora e está presente no intestino humano. A  $\alpha$ -amilase é uma enzima endo-específica presente não somente na saliva mas também no sangue que catalisa a hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,4 glicosídicas do amido, reduzindo o tamanho da molécula. A enzima escolhida para este experimento foi a  $\alpha$ -amilase, a qual se encontra diretamente envolvida na degradação de biomateriais a base de amido<sup>[120]</sup>. Filmes poliméricos de massa conhecida foram colocados em frascos em solução tampão fosfato (PBS, pH= 7,4) contendo diferentes concentrações de enzima ( $\alpha$ -amilase, Bacteriana TERMOMYL 120L, Novozyme) em banho termostatizado (Yamato, Water Bath Incubator BT25) a 37°C sob agitação constante por seis semanas. A concentração de enzimas utilizada foi de 0,6 e 2,4 mg/mL. Azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ , Riedel) foi adicionada à solução tampão a fim de prevenir o crescimento microbiano. Após esse período de tempo os materiais foram retirados da solução e lavados com água deionizada para retirada da enzima. A extensão da degradação enzimática foi avaliada através de análise da morfologia da superfície dos filmes de amido contendo sorbitol e polipirrol por microscopia eletrônica de varredura (item 4.7 capítulo 4), bem como pela quantificação do grau de hidrólise das ligações glicosídicas do amido através da concentração de açúcares redutores em solução<sup>[120]</sup>. A atividade da enzima e a concentração de açúcares redutores liberados na solução foi determinada através do método (DNS – ácido 3,5-dinitrosalicílico)<sup>[121]</sup>. O método baseia-se na redução em meio alcalino do ácido 3,5-dinitrosalicílico em ácido 3-amino-5-nitrosalicílico por ação dos açúcares redutores, originando um complexo de cor acastanhada que por sua vez é dosado espectrofotometricamente a 540nm. Para essa determinação foi utilizada uma curva de calibração com um padrão monossacarídeo (glicose), obtida através de leitura de absorbância a 540nm em espectrômetro UV/Vis (Perkin Elmer, Lambda 11/BIO). Esse método baseia-se na capacidade que os açúcares redutores possuem de

reduzir metais e átomos em determinadas moléculas em meio alcalino.

Nesse estudo foi avaliado o efeito da concentração de  $\alpha$ -amilase na degradação dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol a fim de determinar o perfil de degradação frente ao ataque enzimático para possíveis aplicações na área biomédica. A atividade de cada concentração de enzima foi determinada pela incubação da própria enzima diluída com uma solução de amido de milho (1%<sub>m/v</sub>) em PBS (pH=7,4) a 37°C por 10min. Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a hidrólise de ligações  $\alpha$ -1,4- glicosídicas no amido com liberação de 1 $\mu$ mol de açúcares redutores, medidas como glicose, por minuto.

### 5.7- Análise de adesão celular

Para esse ensaio foi previamente preparado um cultivo de células. O método consistiu na determinação da quantidade de células que aderiram ao filme após um período de incubação definido. A adesão celular ao filme foi conduzida através da metodologia descrita abaixo e posteriormente avaliado por microscopia óptica de reflexão (Microscópio óptico, Leica-DM4000M) com um aumento de 500x.

No ensaio de adesão celular foi empregada uma linhagem células de músculo liso de aorta (células A7r5 - de aderência) plaqueadas na concentração de 100.000 células/poço em placas de 24 poços. Foram formados três grupos: poços que receberam lamínulas circulares com adição de células, com o filme sem adição de células e com filme com adição de células. A placa foi encubada em uma estufa com 5% CO<sub>2</sub> (Ultrasafe UV HF 212), elevada umidade e a uma temperatura de 37°C. Após quatro horas de incubação (tempo necessário para adesão celular), as lamínulas e os filmes foram retirados dos poços e lavados em solução tampão (PBS, pH= 7,4) a 37°C para a retirada das células não aderentes. Posteriormente incubaram-se as lamínulas e os fragmentos dos filmes em paraformaldeído 4% (Riedel), durante 30 minutos, para fixação

celular. Em seguida, retirou-se o fixador e os filmes e lamínulas foram novamente lavados em solução tampão. Os filmes incubados com e sem células foram avaliados por comparação das superfícies, tendo como base as células fixadas na lamínula, na tentativa de observar a de adesão celular.

### **5.8- Análise de citotoxicidade**

A toxicidade de um biomaterial definida como a capacidade de liberar substâncias que possam causar danos ou morte celular, direta ou indiretamente, através da inibição de vias metabólicas foi conduzida de acordo com a metodologia a seguir.

Para esse ensaio um cultivo de células linhagem celular de músculo liso de aorta (A7r5) foi previamente preparado. Essas foram plaqueadas na concentração de 50.000 células/poço nas placas de 24 poços. Após duas horas do plaqueamento (tempo necessário para adesão das células na base da placa), foi adicionado um fragmento do filme de amido/sorbitol/polipirrol com área de 0,25cm<sup>2</sup> por poço. Cada poço contendo um fragmento do filme foi acompanhado de um controle sem a presença do mesmo. A placa foi colocada em uma estufa (Ultrasafe UV HF 212) com 5% CO<sub>2</sub>, umidade elevada e a uma temperatura de 37°C por vinte e quatro horas. Após este período retirou-se a placa da estufa e cuidadosamente retiraram-se os fragmentos dos filmes e o meio de cultura. Os poços contendo as células foram lavados duas vezes em solução tampão (PBS, pH=7,4) a 37°C, para remoção total do meio de cultura. Procedeu-se então, a adição de 200 µL de tripsina 0,25% e EDTA 0,03%, como meio para descolamento das células do fundo das placas, para verificação das células que ficaram em suspensão. Além disso, 50 µL de meio de cultura foram adicionados para inibição da ação da tripsina, e ainda para evitar a lise das células. Finalmente, realizou-se a contagem do número de células por poço com auxílio de uma câmara de Neubauer (Boeco, Germany). Os resultados finais foram comparados com o número inicial de

células plaqueadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.9- Ensaios mecânicos

As propriedades mecânicas dos filmes de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O após a exposição aos vapores de pirrol foram comparadas em diferentes umidades relativas. Os filmes foram expostos a diferentes umidades relativas (43% UR e 75% UR) por 20 dias antes da realização dos ensaios mecânicos. Os valores do módulo de elasticidade, tensão máxima e alongamento na ruptura, apresentados na Tabela 7 mostraram uma variação entre os filmes de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O após a exposição aos vapores de pirrol devido a diferença de umidade relativa. Os valores do módulo de elasticidade e tensão máxima de ruptura do filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 75% de umidade relativa (14,3MPa e 3,7MPa, respectivamente) diminuiram em relação ao filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 43% de umidade relativa (122,6MPa e 19,0MPa, respectivamente). O aumento de umidade relativa provoca também um efeito plastificante e por isso o esperado para os filmes é uma diminuição do módulo de elasticidade e tensão de resistência máxima. Os filmes de amido/sorbitol/polipirrol acompanharam a tendência observada nos filmes de amido e sorbitol para diferentes umidades relativas.

Os valores do módulo de elasticidade e da tensão máxima de ruptura foram 7,5MPa e 1,7MPa para 75% de umidade relativa e 112,6MPa e 23,0MPa para 43% de umidade relativa, respectivamente. A diferença dos valores do módulo de elasticidade e da tensão máxima de ruptura dos filmes de amido/sorbitol para valores menores, no caso da umidade relativa de 75%, observado nos filmes de amido/sorbitol/polipirrol pode estar relacionada ao caráter higroscópico

**Tabela 7-** Propriedades mecânicas dos filmes de amido/sorbitol e amido/sorbitol/polipirrol em diferentes umidades relativas.

Condições dos Filmes de Amido de Milho	Módulo de Elasticidade (MPa)	Tensão máxima de ruptura(MPa)	Alongamento na Ruptura (%)	UR (%)
Amido de milho/20% <sub>m/v</sub> sorbitol	122,6±10,2	19,0±6,0	4,2±0,4	43
	14,3±0,2	3,7±0,6	18,1±2,7	75
Amido de milho/20% <sub>m/v</sub> sorbitol/PPi	112,6±17,2	23,0±9,5	4,0±1,4	43
	7,5±0,3	1,7±1,5	14,1±0,4	75

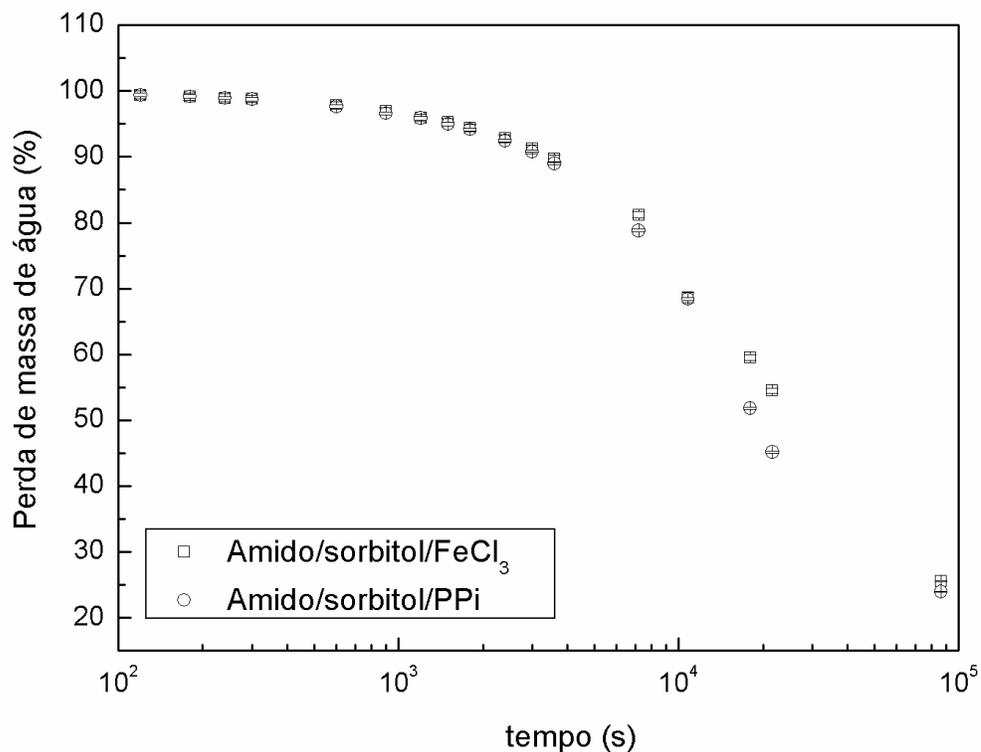
do polipirrol, mostrando nesse caso uma diferença quando comparado aos valores observados em 43% de umidade relativa. Como esperado, a percentagem de alongamento na ruptura dos filmes de amido/sorbitol e amido/sorbitol/polipirrol aumentou significativamente com o aumento da umidade relativa. Esse aumento pode ser atribuído à natureza hidrofílica da molécula de sorbitol responsável pela formação de interações plastificante-água via ligações de hidrogênio, e ainda a exposição ao aumento de umidade relativa de 43% para 75%. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Kristo e Biliaderis<sup>[122,123]</sup>.

### 5.10- Grau de intumescimento

Avaliar o grau de intumescimento em sistemas poliméricos que possam ser empregados na produção de biomateriais para implantes é importante, uma vez que a capacidade de reter água, bem como o comportamento de dissolução do material pode influenciar parâmetros como propriedades mecânicas, entre outros.

Com o objetivo de observar o efeito do filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O antes e após a exposição aos vapores de pirrol sobre sua dissolução em meio aquoso, a perda de massa foi monitorada gravimetricamente em função do tempo (Figura 25) até 24h de evaporação a 20°C. Após esse período, a taxa de evaporação diminuiu abruptamente e nenhuma perda significativa foi observada.

Os filmes de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O antes e após a exposição aos vapores de pirrol permaneceram aparentemente insolúveis por até 72h de imersão e apresentaram um grau de intumescimento de 2,9 e 3,2 respectivamente. Esses valores sugerem que os filmes de amido antes e após a exposição aos vapores de pirrol adquiriram uma maior resistência à dissolução, fato este comprovado também pelas curvas de TG e pelos espectros do FTIR, provavelmente devido à formação de um complexo entre o amido e o cloreto férrico.



**Figura 25-** Perda de massa vs tempo de evaporação dos filmes de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O e dos filmes contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol, 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O após 24h de exposição aos vapores de pirrol.

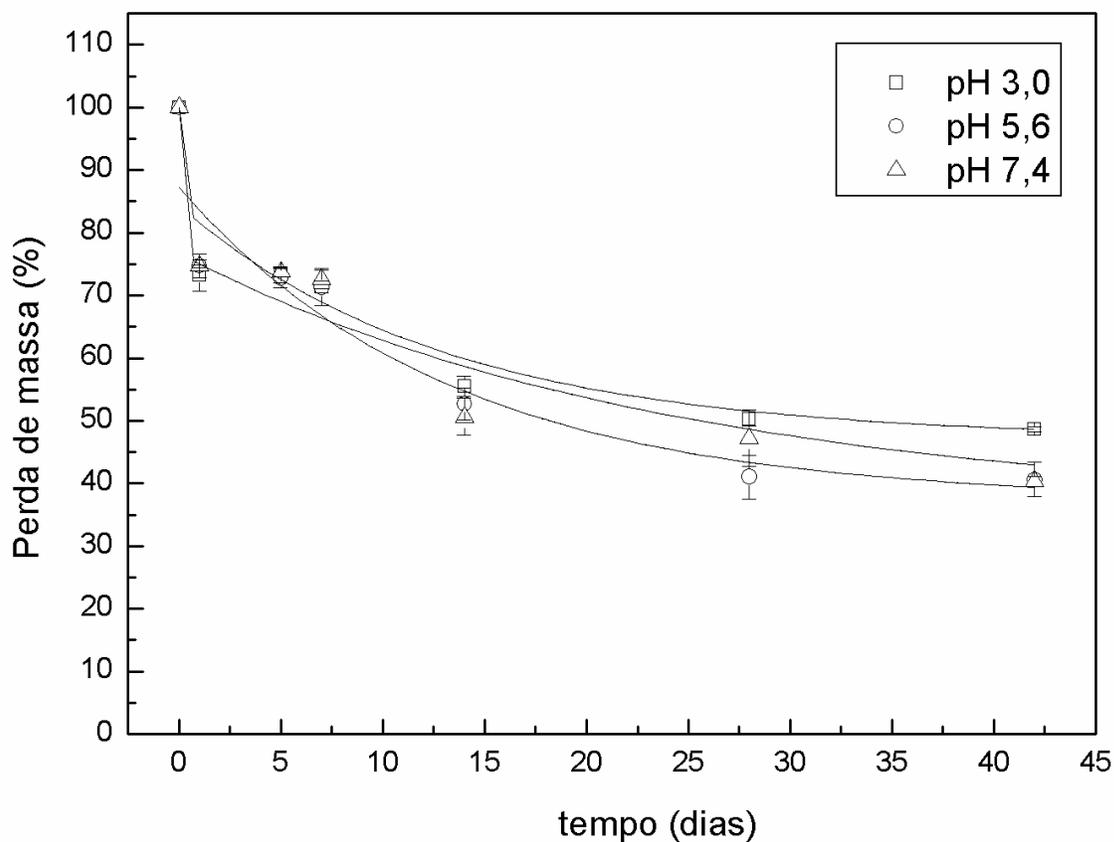
### 5.11- Degradação *in vitro* em diferentes pH

O processo de degradação em diferentes pH tem grande importância na avaliação de um biomaterial. Por exemplo, quando um biomaterial é implantado, mais especificamente no momento que ocorre a fratura, uma série de reações acontece e deste momento até a consolidação total do osso ocorrem várias alterações no pH do meio, as quais influenciam no tempo de degradação do material implantado e, portanto estão diretamente relacionado com a

regeneração do tecido ósseo.

A taxa de degradação dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol em soluções de pH= 3,0, pH= 5,6 e pH= 7,4 foi calculada pela relação entre a perda de massa e o tempo de imersão que variou de 0-42 dias<sup>[118]</sup>.

A Figura 26 apresenta o comportamento de degradação do filme de amido/sorbitol/polipirrol nas condições estudadas. A percentagem de perda de massa aumenta com o tempo de imersão das amostras. Para uma análise mais adequada da tendência de perda de



**Figura 26-** Perda de massa vs tempo de degradação dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol.

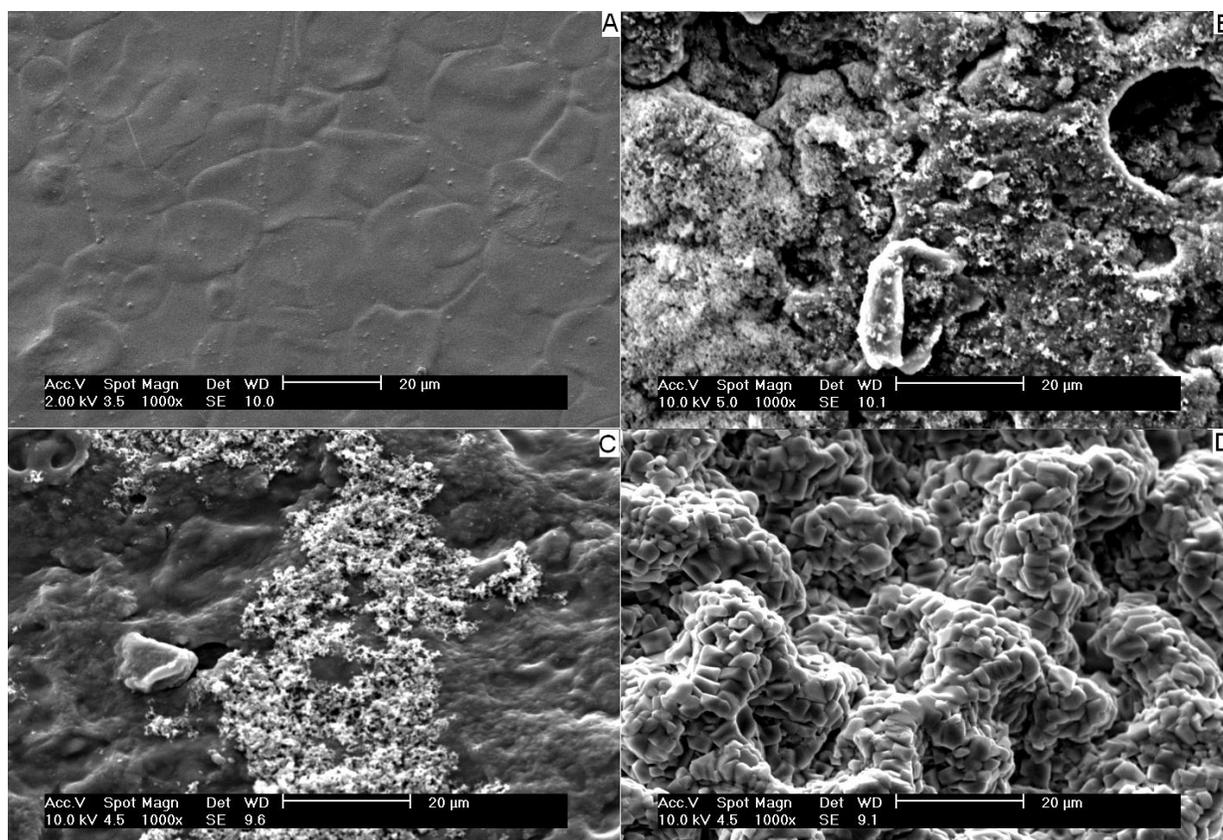
massa foram obtidas as curvas sólidas através de um decréscimo exponencial de terceira ordem.

Após 42 dias de imersão, a maior taxa de degradação (redução de 60% de massa) foi observada para a solução a pH= 5,6. Em pH= 3,0, para o mesmo período, a redução de massa foi de 50%. Um valor similar foi observado para a solução a pH= 7,4 (pH neutro), sugerindo que a degradação do filme amido/sorbitol/polipirrol é praticamente independente do pH do meio.

### 5.12- Teste de bioatividade *in vitro*

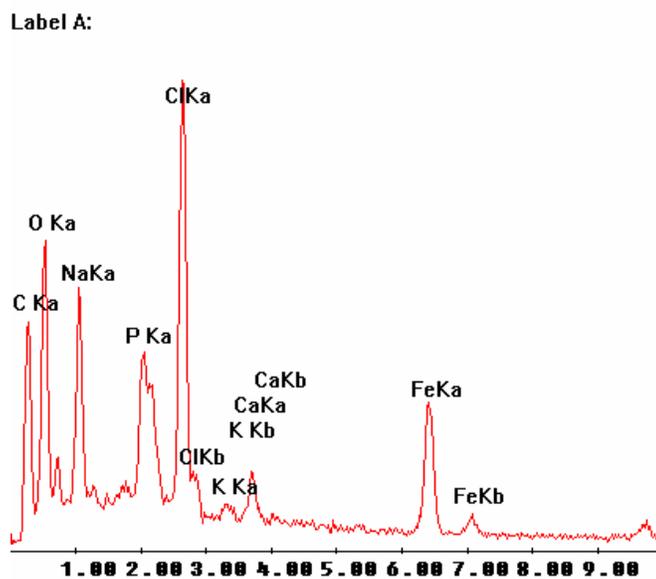
A necessidade de avaliar a bioatividade de um material para aplicação em seres vivos passa necessariamente pela sua capacidade de interação com o tecido ósseo. Esse comportamento pode ser observado através de uma análise da superfície do biomaterial. A presença de uma camada de Ca-P sobre a superfície do material a ser implantado caracteriza a bioatividade e, portanto a possibilidade de aplicação *in vivo*.

A Figura 27 apresenta as micrografias das superfícies dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol. Como esperado para uma material bioativo foi observada a formação de uma camada de Ca-P sobre a superfície do filme de amido/sorbitol/polipirrol. A partir do primeiro dia de imersão (Figura 27B) pode-se observar a formação de um precipitado na superfície do filme, o qual não foi observado no filme controle (Figura 27A). Esse mesmo precipitado, também foi observado na superfície dos filmes após o terceiro e sétimo dia de imersão (Figuras 27C e D). Uma morfologia do tipo “couve-flor”, característica da formação de cristais de Ca-P, pode ser claramente observada nas micrografias (Figuras 27B, C e D). A presença de Ca-P foi comprovada através de espectroscopia de energia dispersiva como mostrado nas Figuras 28, 29 e 30, referentes ao primeiro, terceiro e sétimo dia de imersão em SBF, respectivamente. Um comportamento bioativo nesse caso pode ser atribuído ao caráter

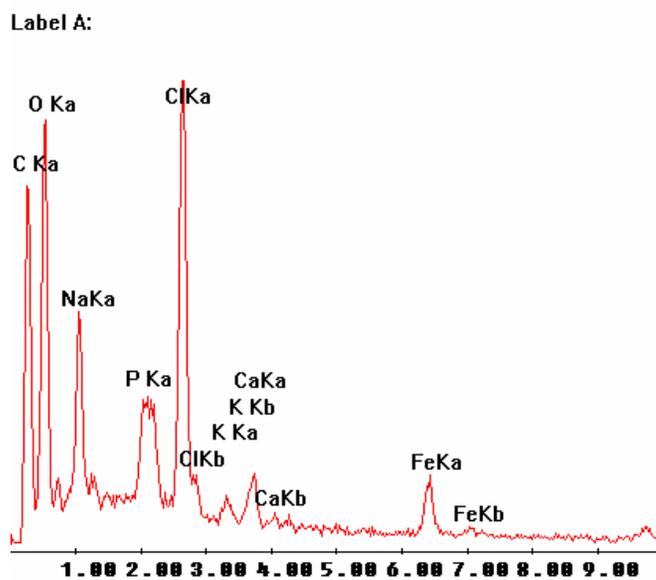


**Figura 27-** Micrografias eletrônicas de varredura dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol: A) Filme controle (antes da imersão em SBF); B) 1 dia após imersão em SBF; C) 3 dias após imersão em SBF; D) 7 dias após imersão em SBF com aumento de 1000x.

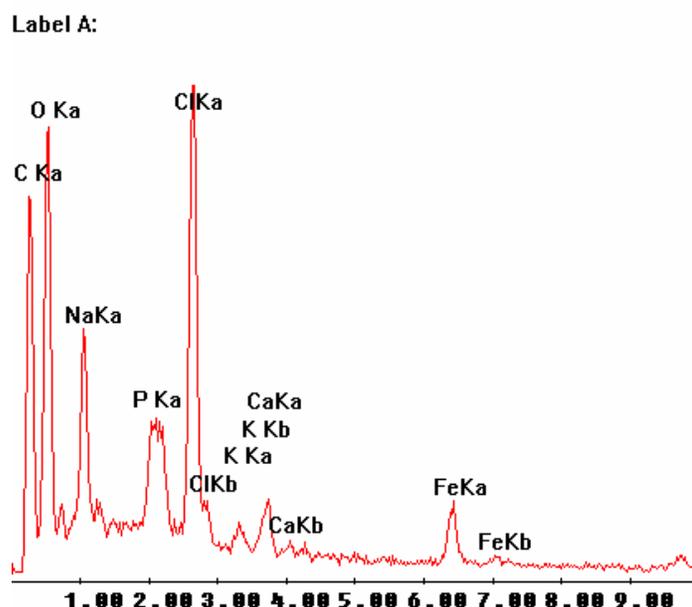
hidrofílico do filme de amido, o qual permite o acesso das partículas exatamente abaixo da camada superficial criando núcleos favoráveis à formação da camada de Ca-P<sup>[23]</sup>.



**Figura 28-** Espectro de espectroscopia de energia dispersiva dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol após 1 dia imersão em SBF.



**Figura 29-** Espectro de espectroscopia de energia dispersiva dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol após 3 dias imersão em SBF.



**Figura 30-** Espectro de espectroscopia de energia dispersiva dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol após 7 dias imersão em SBF.

### 5.13- Degradação *in vitro* frente a ataque enzimático

A habilidade de um material ser reabsorvido com o tempo é uma propriedade importante em muitas aplicações biomédicas. Esse aspecto pode ser necessário para executar determinadas funções biológicas, como por exemplo, quando o biomaterial é usado como suporte de crescimento celular. À medida que o material vai sendo reabsorvido ocorre uma completa reposição de matriz e regeneração do tecido normal. Essa característica tem como finalidade evitar complicações que podem estar associadas à presença de um material estranho por um longo período de tempo (como no caso de implantes permanentes).

Nesse sentido, um fator importante a ser observado no processo de degradação de um biomaterial é seu comportamento frente ao ataque enzimático, principalmente quando se refere a

um material a base de biopolímeros. As principais enzimas envolvidas na hidrólise do amido são:  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase, glicoamilase,  $\alpha$ -glicosidase, entre outras.

Na tabela 8 constam as condições do teste de degradação enzimática utilizadas neste estudo.

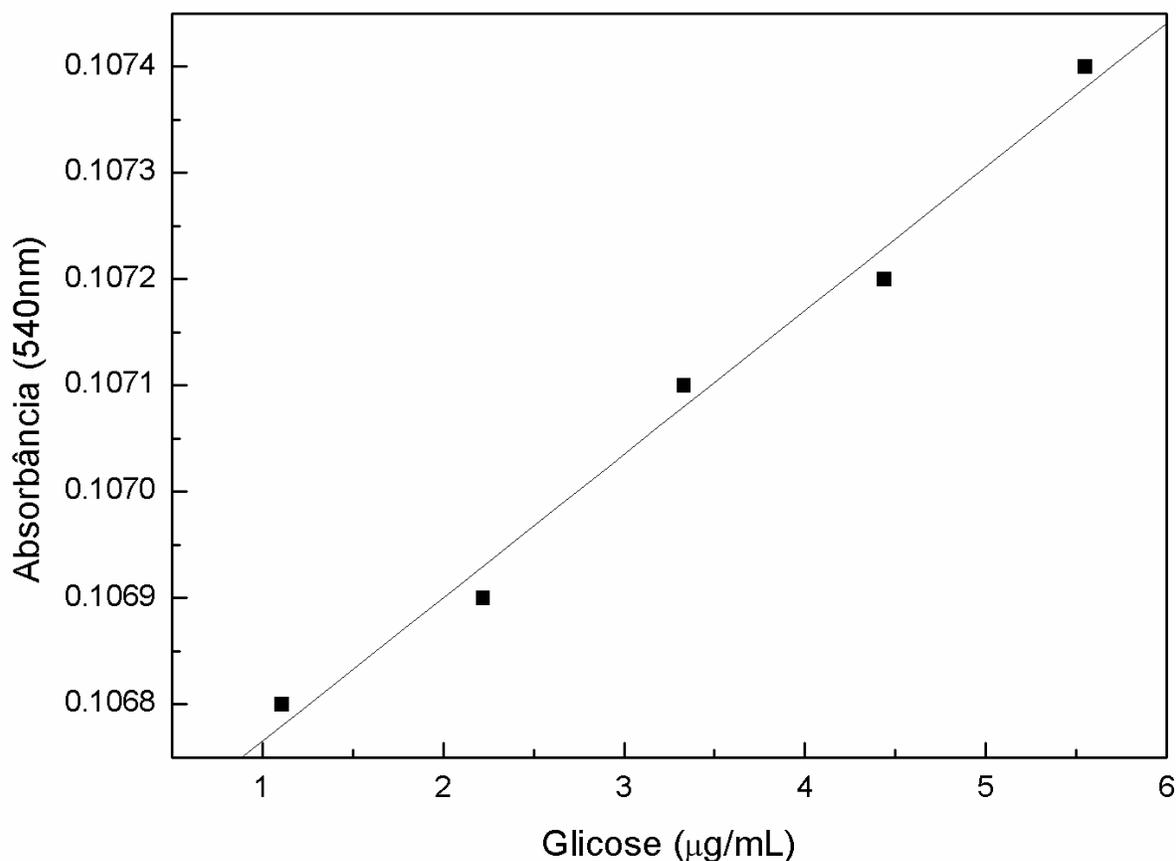
**Tabela 8- Descrição do teste de degradação enzimática**

Condição	Descrição	Atividade enzimática (U/mL)
PBS	Controle	0
$\alpha$ -amilase	0,6 mg/mL	45
$\alpha$ -amilase	2,4 mg/mL	72

A Figura 31 apresenta a curva de calibração contruída a partir das leituras de absorbância em função da concentração de glicose.

Através desse método a quantidade de açúcares redutores, presente na solução contendo os filmes de amido/sorbitol/polipirrol foi determinada. Após seis semanas imersão não foi detectada nenhuma quantidade de açúcares redutores na solução de degradação do controle (filme com PBS). Entretanto, na solução de degradação dos filmes contendo duas concentrações diferentes de  $\alpha$ -amilase utilizadas, foi observado um aumento significativo de açúcares redutores (Figura 32), comprovando a hidrólise enzimática dos filmes. Os resultados mostram também que a degradação enzimática é dependente da concentração da enzima.

A análise da solução após a degradação, por meio de determinação de açúcares redutores liberados na solução fornece uma informação adicional sobre o modo de ação das enzimas em

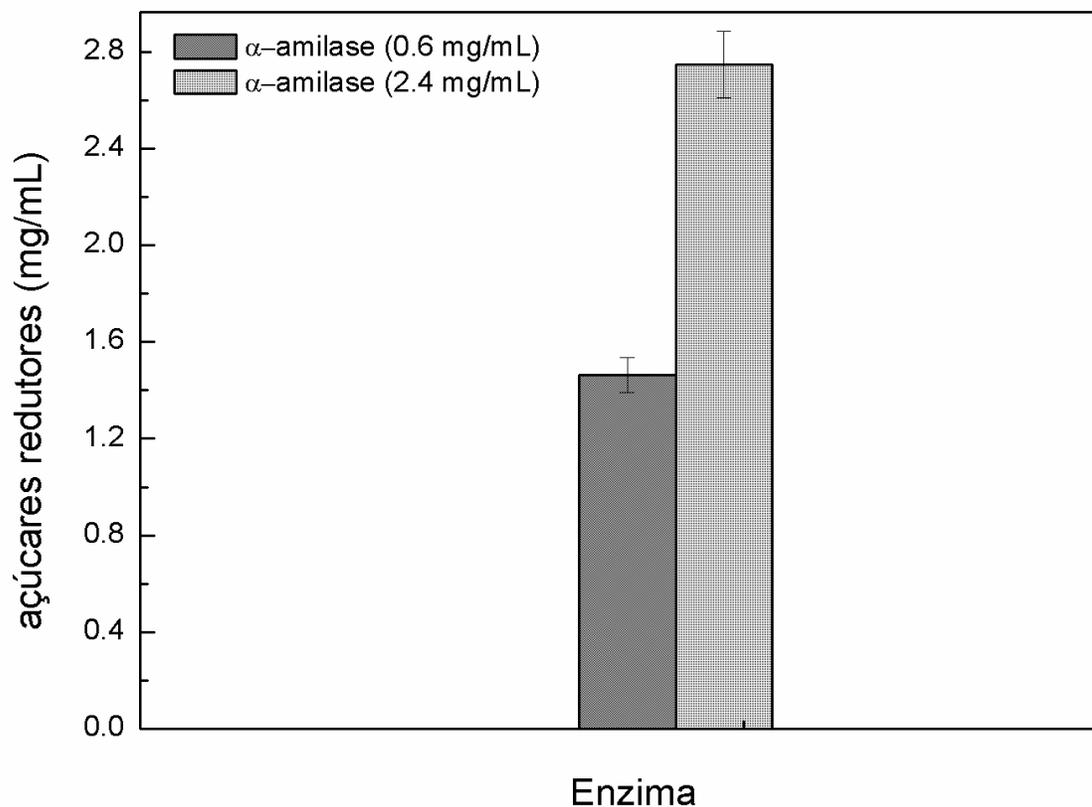


**Figura 31-** Curva de calibração para glicose na presença de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), a 25°C ( $R^2=0,9934$ ).

diferentes substratos.

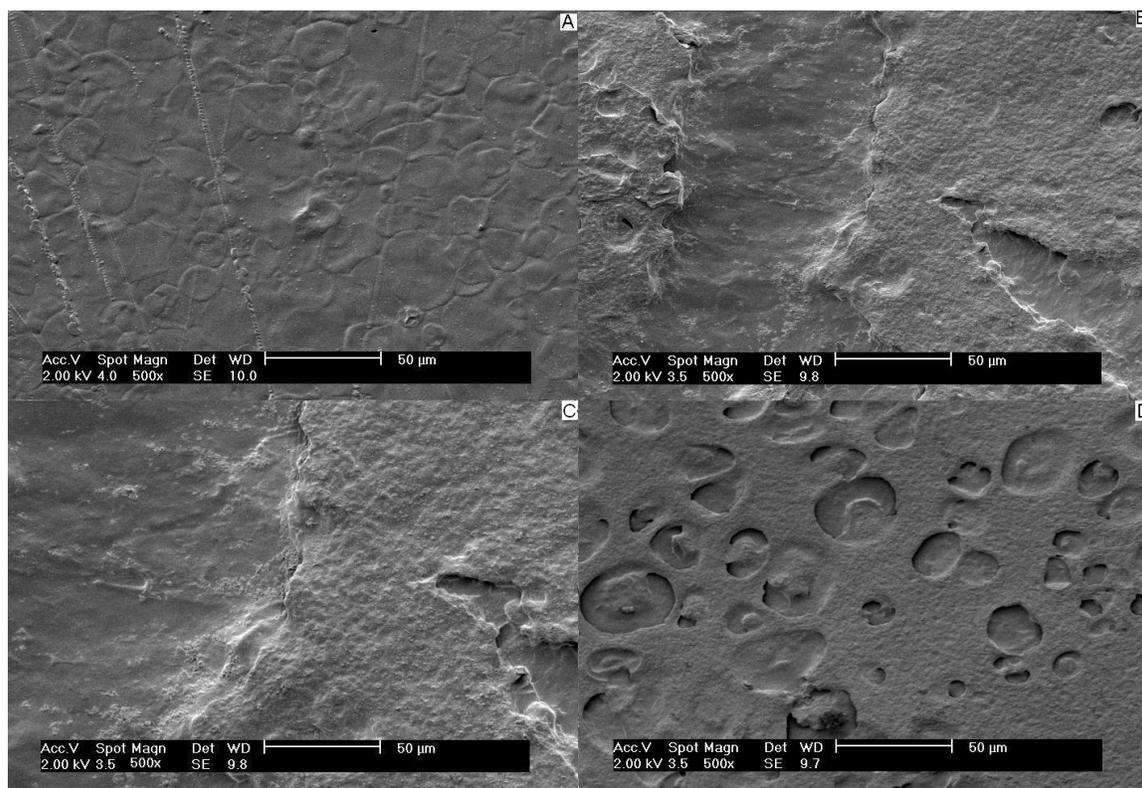
A degradação frente ao ataque enzimático sobre os filmes de amido/sorbitol/polipirrol também foi analisada por microscopia eletrônica de varredura. As micrografias estão apresentadas na Figura 33.

A micrografia da superfície do filme de amido/sorbitol/polipirrol não exposta a ataque enzimático está representada na Figura 33A como referência de amostra não degradada. Durante o experimento de degradação enzimática um filme controle foi preparado e somente imerso em



**Figura 32-** Concentração de açúcares redutores liberados na solução após seis semanas de incubação dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol em diferentes soluções de enzima a 37°C.

PBS (Figura 33B). É possível observar na morfologia dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol após 6 semanas de degradação enzimática, quando incubadas com  $\alpha$ -amilase, uma superfície mais áspera (Figura 33C), provavelmente devida a cisão de cadeias como resultado da degradação. As micrografias da superfície também apresentam fraturas, as quais aparecem tanto nos filmes imersos somente em PBS (Figura 33B, controle) quanto nos filmes imersos na concentração menor de enzima, podendo não somente estar relacionadas com a degradação enzimática, mas também a degradação em pH= 7,4 discutida no item 5.11.



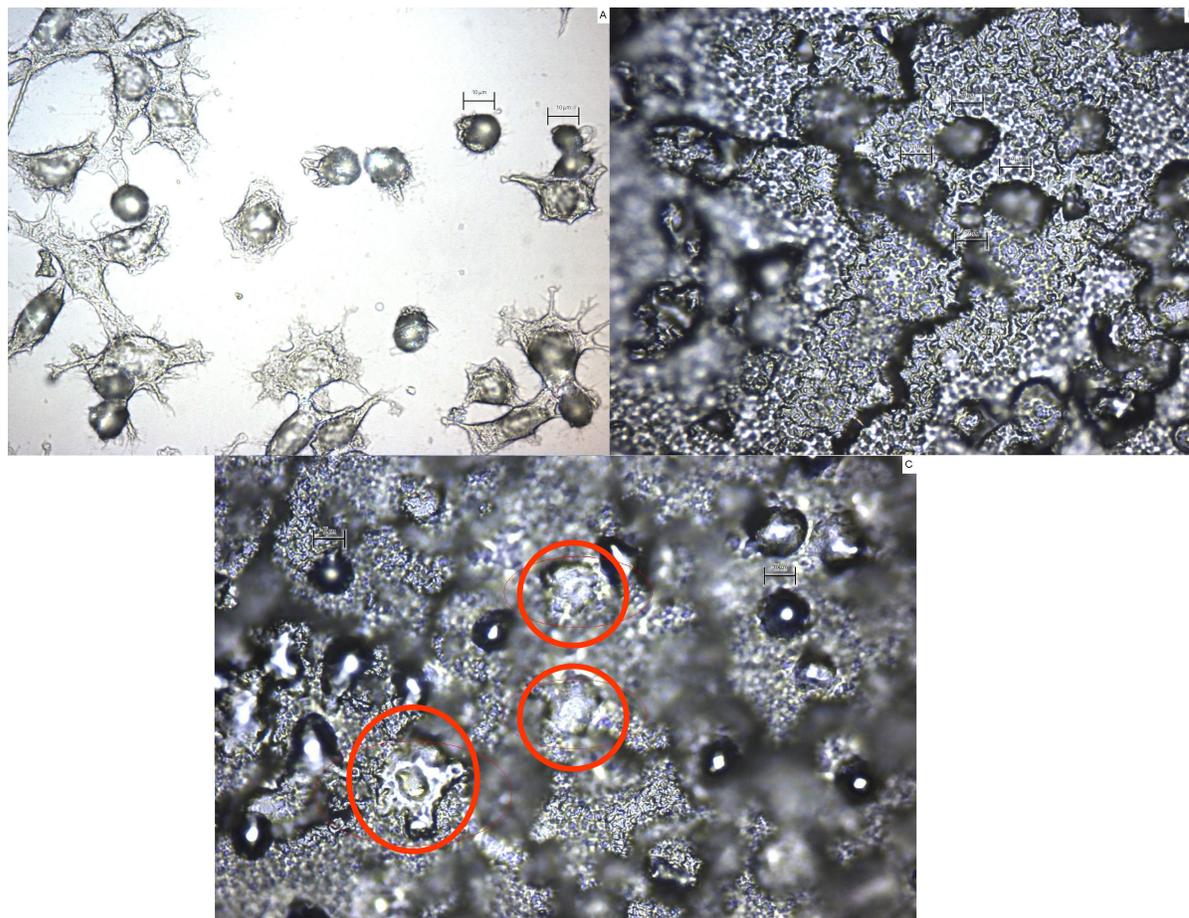
**Figura 33-** Micrografias eletrônicas de varredura da superfície dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol após seis semanas de incubação em diferentes soluções de enzima a 37°C: A) sem tratamento; B) PBS; C)  $\alpha$ -amilase (0,6mg/mL); D)  $\alpha$ -amilase (2,4mg/mL).

Entretanto, a Figura 33D apresenta uma morfologia diferente das Figuras 33B e C com depressões bem definidas de vários tamanhos, que possivelmente foram formados pelo efeito da degradação enzimática do material pela maior concentração de enzima. Esse resultados estão de acordo com os citados por Azevedo *et al* em estudos de degradação enzimática *in vitro* de alguns materiais a base de amido<sup>[120]</sup>. Uma análise das micrografias da superfície desses filmes mostra que após 6 semanas o material já começa a perder parte de sua integridade devido ao efeito da degradação enzimática.

#### 5.14- Análise de adesão celular

Um resultado positivo no ensaio de adesão celular é determinante para aplicação de um biomaterial *in vivo*. A interação entre o material e a célula pode ser convenientemente caracterizada por algumas evidências como fixação e distribuição da célula no substrato. Geralmente as células se fixam ao substrato após 4h de incubação. Entretanto, o tempo de fixação depende tanto das características do substrato quanto do tipo de células <sup>[124]</sup>. Para esse experimento foi previamente preparado um cultivo de células A7r5 – células de aderência - (linhagem celular de músculo liso de aorta). O método consistiu na determinação da quantidade de células que aderiram ao filme após um período de incubação definido. A avaliação foi apenas qualitativa baseada na observação da superfície dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol através de um microscópio de reflexão.

A Figura 34 apresenta as micrografias obtidas em ensaios preliminares de adesão celular. A micrografia apresentada na Figura 34A representa o controle utilizado como referência das células utilizadas nesse experimento. Na superfície dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol analisadas por microscopia óptica, foi possível observar uma discreta diferença entre a membrana que foi incubada na presença de células (Figura 34C) em comparação com a incubada na ausência de células (Figura 34B). A morfologia observada na (Figura 34C) destacada revela um comportamento típico da célula quando aderida ao substrato, caracterizada pela presença de núcleo e citoplasma, que por sua vez infere ao material uma capacidade de aderência celular. Ainda na Figura 34C é possível observar a presença de células de formato arredondado aderidas ao filme, estas células não estão bem definidas quanto a núcleo e citoplasma, essa modificação estrutural provavelmente devida a ação do fixador (paraformaldeído) durante a fixação das células. Entretanto, o alto grau de intumescimento característico dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol, sua coloração escura e opacidade, bem como o alto índice de



**Figura 34-** Micrografias da superfície dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol após ensaio de adesão celular: A) células fixadas na lamínula com paraformaldeído 4%; B) fragmento de filme incubado sem célula; C) fragmento de filme incubado com célula fixada com paraformaldeído 4%. Com aumento de 500x.

porosidade, acabam dificultando a visualização das células aderidas, as quais podem possivelmente ter migrado para o interior dos poros. Ensaios mais elaborados e com outras técnicas são necessários para melhor visualização das células aderidas.

### 5.15- Análise de citotoxicidade

A toxicidade de um biomaterial pode ser definida como a capacidade de liberar substâncias que possam causar danos ou morte celular, direta ou indiretamente, através da inibição de vias metabólicas. Avaliar a citotoxicidade de um material a ser implantado, sem dúvida é um dos primeiros passos para uma provável aplicação *in vivo*.

As células A7r5 foram plaqueadas na concentração de 50.000 células/poço nas placas de 24 poços. Após duas horas do plaqueamento (tempo necessário para adesão das células na base da placa), foi adicionado um fragmento da membrana. Cada poço contendo um fragmento da membrana foi acompanhado por um controle sem a presença do mesmo de acordo com a Tabela 9, na qual constam os resultados referentes à análise de citotoxicidade dos filmes de amido/sorbitol/PPi.

**Tabela 9-** Número de células por poço após 24 hs do plaqueamento.

	Poços <i>sem</i> filme de amido/sorbitol/PPi (unidade)	Poços <i>com</i> filme de amido/sorbitol/PPi (unidade)
1)	85.000	50.000
2)	82.500	42.500
3)	80.000	45.000
4)	75.000	57.500
5)	77.500	55.000
6)	75.000	42.500
Média±desvio padrão	79.167±4.082	48.750±6.470

Os resultados sugerem que os filmes de amido/sorbitol/PPi estariam inibindo a proliferação celular. Entretanto, existe a possibilidade de uma alta afinidade dos filmes de

amido/sorbitol/PPI pelas células como sugerido no ensaio de adesão celular, ocasionando uma migração dessas para o interior dos poros dos filmes e conseqüentemente uma diminuição do número de células contadas na superfície. Essa hipótese é bem provável, visto que as análises de microscopia eletrônica de varredura dos filmes apresentaram uma seção transversal aparentemente rugosa, a qual poderia favorecer essa migração. Além disso, a membrana não parece estar causando nenhuma citotoxicidade, uma vez que o número de células originalmente plaqueado (50.000 células/poço) é recuperado quase na sua totalidade nos poços contendo as membranas.

## CONCLUSÕES

Os valores do módulo de elasticidade e tensão máxima de ruptura do filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 75% de umidade relativa diminuíram em relação ao filme de amido contendo 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 43% de umidade relativa. A diferença dos valores do módulo de elasticidade e da tensão máxima de ruptura dos filmes de amido/sorbitol para valores menores, no caso da umidade relativa de 75%, observado nos filmes de amido/sorbitol/polipirrol pode estar relacionada ao caráter higroscópico do polipirrol, mostrando nesse caso uma diferença significativa que não foi observada em 43% de umidade relativa. A percentagem de alongamento na ruptura dos filmes de amido/sorbitol e amido/sorbitol/polipirrol aumentou significativamente com o aumento da umidade relativa como esperado.

Os filmes de amido (20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) antes e após a exposição aos vapores de pirrol permaneceram aparentemente insolúveis por até 72h de imersão e apresentaram um grau de intumescimento de 2,89 e 3,15 respectivamente. Esses valores sugerem que os filmes de amido antes e após a exposição aos vapores de pirrol adquiriram uma estabilidade maior a dissolução, provavelmente devido à formação de um complexo entre o

amido e o cloreto férrico.

A percentagem de perda de massa tende a aumentar com o tempo de imersão das amostras. A degradação do filme amido/sorbitol/polipirrol é praticamente independente do pH do meio.

A presença de Ca-P na superfície dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol foi comprovada através de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva, sugerindo bioatividade.

A presença de açúcares redutores na solução de degradação dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol comprovou o ataque enzimático sofrido pelos filmes. Esses resultados foram confirmados pela microscopia eletrônica de varredura.

Na análise da superfície dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol por microscopia óptica foi possível observar uma discreta diferença entre a membrana que foi incubada na presença de células comparada àquela incubada na ausência de células, a qual infere ao material uma capacidade de aderência celular.

Os filmes de amido/sorbitol/polipirrol não parecem estar causando nenhuma citotoxicidade, uma vez que o número de células originalmente plaqueado é recuperado na sua totalidade nos poços contendo as membranas.

Finalmente, as avaliações citológicas do filme de amido/sorbitol/polipirrol descritas nesse capítulo sugerem a viabilidade desse material para aplicações biomédicas.

## CAPÍTULO 6

### CONCLUSÕES FINAIS

O presente trabalho teve como objetivo principal a preparação, caracterização e análise das propriedades inerentes a biocompatibilidade do sistema constituído por amido de milho, sorbitol e polipirrol. As conclusões finais apresentadas a seguir referem-se aos resultados obtidos considerando-se: i) a estabilidade térmica de filmes de amido/sorbitol; ii) a caracterização e propriedades mecânicas, morfológicas e de condutividade de filmes de amido/sorbitol/ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  antes e após exposição aos vapores de pirrol; iii) identificação e análise das propriedades que inferem ao sistema amido/sorbitol/polipirrol características e viabilidade para utilização como biomaterial.

Filmes de amido de milho tratados termicamente ( $100^\circ\text{C}$  por 120min) mostraram aumento na energia de ativação do processo de degradação e nos valores do módulo de elasticidade e tensão máxima na ruptura, comparativamente aos não-tratados. Por outro lado, os mesmos filmes foram menos solúveis em solução aquosa e apresentaram uma estrutura mais compacta relativamente aos não-tratados termicamente. Estas características sugerem um aumento na estabilidade dos filmes tratados termicamente.

As propriedades dos filmes de amido/sorbitol/ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  antes e após exposição aos vapores de pirrol foram afetadas pela adição dos constituintes plastificante e oxidante. A polimerização do pirrol foi mais efetiva para uma concentração de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  de  $5\%_{m/v}$  e 24h de exposição aos vapores do monômero. Nestas condições foram obtidos valores de condutividade elétrica adequados aos objetivos propostos. A presença do sorbitol como plastificante diminuiu

o módulo de elasticidade e tensão máxima na ruptura e o aumentou o alongamento na ruptura. A morfologia da superfície dos filmes de amido tornou-se mais densa e lisa devido a presença de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Por outro lado, um efeito contrário, aumento de rugosidade, foi observado na superfície de fratura dos mesmos filmes.

Os graus de intumescimento dos filmes de amido (com 20%<sub>m/v</sub> de sorbitol e 5%<sub>m/v</sub> de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) antes e após a exposição aos vapores de pirrol, foram 2,89 e 3,15, respectivamente, permanecendo aparentemente insolúveis por até 72h de imersão. A bioatividade dos filmes de amido/sorbitol/polipirrol foi confirmada pela presença de Ca-P na superfície dos filmes. A biodegradabilidade dos mesmos filmes foi confirmada pela formação de açúcares redutores na solução de degradação e pela morfologia dos filmes após o ataque enzimático. Análises por microscopia óptica sugerem viabilidade para adesão e crescimento celular. A ausência de citotoxicidade na presença de filmes de amido/sorbitol/polipirrol foi confirmada pela total recuperação do número de células originalmente plaqueado nos poços analisados.

Considerando, portanto, os objetivos propostos, a metodologia experimental utilizada e as propriedades identificadas e analisadas, é possível inferir ao sistema amido/sorbitol/polipirrol características de biomaterial.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. R. L. Oréface, M. M. Pereira, H. S. Mansur, *Biomateriais Fundamentos e Aplicações*. Cultura Médica. 2006.
2. M. G. Riesco, *Alterações da superfície do titânio comercialmente puro submetido aos processos de esterilização pelo calor*. Universidade de São Paulo: Bauru. 1997.
3. E. De Giglio, M. R. Guascito, L. Sabbatini, G. Zambonin, *Electropolymerization of pyrrole on titanium substrates for the future development of new biocompatible surfaces*. *Biomaterials*. **22**: p. 2609-16. 2001.
4. E. De Giglio, L. Sabbatini, S. Colluci, G. Zambonin, *Synthesis, analytical characterization, and osteoblast adhesion properties on RGD-grafted polypyrrole coatings on titanium substrates*. *J. Biomater. Sci Polymer Edn*. **11**(10): p. 1073-83. 2000.
5. E. De Giglio, L. Sabbatini, G. Zambonin, *Development and analytical characterization of cysteine-grafted polypyrrole films electrosynthesized on Pt- and Ti-substrates as precursors of bioactive interfaces*. *J. Biomater. Sci Polymer Edn*. **10**(8): p. 845-58. 1999.
6. Y. Okazaki, E. Gotoh, *Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro*. *Biomaterials*. **26**: p. 11-21. 2005.
7. I. B. Leonor, R. A. Sousa, A. M. Cunha, R. L. Reis, Z. P. Zhong, D. Greenspan, *Novel starch thermoplastic/Bioglass® composites: Mechanical properties, degradation behavior and in-vitro bioactivity*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. **13**: p. 939-45. 2002.
8. G. A. Silva, F. J. Costa, O. P. Coutinho, S. Radin, P. Ducheyne, R. L. Reis, *Synthesis and evaluation of novel bioactive composite starch/bioactive glass microparticles*. *Journal*

- Biomedical Material Research. **70A**: p. 442-49. 2004.
9. E. Neves, A. L. Spiller, D. Tridapalli, H. G. Riella. *Development of Anorthite Crystals in Glasses*. in *Second Brazilian Symposium on Structorology*. 2001. Minas Gerais.
  10. R. A. Sousa, R. L. Reis, A. M. Cunha, M. J. Bevis, *Processing and properties of bone-analogue biodegradable and bioinert polymeric composites*. *Composites Science and Technology*. **63**: p. 389-402. 2003.
  11. W. J. Ciccone II, C. Motz, C. Bentley, J. P. Tasto, *Bioabsorbable Implants in Orthopaedics: New Development and Clinical Application*. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. **9**: p. 280-88. 2001.
  12. L. Bacáková, E. Filová, F. Rypáček, V. Svorčík, V. Starý, *Cell Adhesion on Artificial materials for Tissue Engineering*. *Physiol. Res*. **53**: p. 35-45. 2004.
  13. L. Bacáková, V. Mares, V. Lisá, V. Svorčík, *Molecular mechanism of improved adhesion and growth of an endothelial cell line cultured on polystyrene implanted with fluorine ions*. *Biomaterials*. **21**: p. 1173-79. 2000b.
  14. L. Pothuaud, J. C. Fricain, S. Pallu, R. Bareille, M. Renard, M-C Durrieu, M. Dard, M. Vernzeau J. Amédée, *Mathematical modelling of the distribution of newly formed bone in bone tissue engineering*. *Biomaterials*. **26**: p. 6788-97. 2005.
  15. S. Verrier, S. Pallu, *Function of linear and cyclic RGD-containing peptides in osteoprogenitor cell adhesion process*. *Biomaterials*. **23**: p. 585-96. 2002.
  16. M. C. Porte-Durrieu, F. Guillemot, S. Pallu, C. Labrugère, B. Brouillaud, R. Bareille, J. Amédée, N. Barthe, M. Dard, C. H Baquey, *Cyclo-(DfKRG) grafting onto Ti-6Al-4V: physical characterization and interest towards humam osteoprogenitor cells adhesion*. *Biomaterials*. **25**: p. 4837-46. 2004.
  17. D. M. Ferris, G. D. Moodie, P. M. Dimond, C. W. Giorami, M. G. Ehrlich, R. F.

- Valentini, *RGD-coated titanium implants stimulate increased bone formation in vivo*. *Biomaterial*. **20**: p. 2323-31. 1999.
18. B. Elmengaard, J. E. Bechtold, K. Soballe, *In vivo study of the effect of RGD treatment on bone ongrowth on press-fit titanium alloy implants*. *Biomaterials*. **25**: p. 3521-26. 2005.
19. ASTM-F813 Practice for direct contact cell culture evaluation of materials for medical devices. *Annual Book of ASTM Standards*. 13.01 F813:233-236. 1995 a.
20. ASTM-F895 Standard test method for agar diffusion cell culture screening for cytotoxicity. *Annual Book of ASTM Standards*. 13.01 F895:247-250. 1995 b
21. V. Hasirci, K. Lewandrowski, J. D. Gresser, D.L. Wise, D. J. Trantolo *Versatility of Biodegradable biopolymers: Degradability and in vivo application*. *Journal of Biotechnology*. **86**: p 135-150. 2001.
22. F. O. Bobbio, P. A. Bobbio, *Introdução à Química de Alimentos*. 2 ed. Livraria varela. 1995.
23. I. Espigares. C. Elvira, J. F. Mano, B. Vázquez, J. S. Román, R. L. Reis, *New partially degradable and bioactive acrylic bone cements based on starch and ceramic fillers*. *Biomaterials*. **23**: p. 1883-95. 2002.
24. C. T. Andrade, F. M. B. Coutinho, M. L. Dias, E. F. Lucas, C. M. F. Oliveira, D. Tabak, *Dicionário de Polímeros*. Editora Interciência LTDA. 2001.
25. R. Palahi, R. P. Singh, *Ultrasonic and rheological investigations on interacting blend solution of poly (acrylic acid) with poly (vinyl pyrrolidone) or poly (vinyl alcohol)*. *European Polymer Journal*. **30**: p. 251-57. 1994.
26. N. Tudorachi, C. N. Cascaval, M. Rusu, M. Pruteanu, *Testing of polyvinil alcohol and starch mixtures as biodegradable polymeric materials*. *Polymer Testing*. **19**: p. 785-99.

- 2000.
27. T. Ke, X. S. Sun, *Starch, Poly(lactic acid), and Poly(vinyl alcohol) Blends*. Journal of Polymers and the Environment. **11**(1): p. 7-14. 2003.
28. H. Yavuz, C. Babaç, *Preparation and Biodegradation of Starch/Polycaprolactone Films*. Journal of Polymers and the Environment. **11**(3): p. 107-13. 2003.
29. P. Matzinos, V. Tserki, A. Kontoyiannis, C. Panayiotou, *Processing and characterization of starch/polycaprolactone products*. Polymer Degradation and stability. **77**: p. 17-24. 2002.
30. S. Godbole, S. Gote, M. Latkar, T. Chakrabarti, *Preparation and characterization of biodegradable poly-3-hidroxybutyrate-starch blends films*. Bioresource Technology. **86**: p. 33-37. 2003.
31. D. R. Paul. S. Newman, *Polymer Blends*. Academic Press, INC. 1978.
32. E. F. Lucas, B. G. Soares, E. Monteiro, *Caracterização de Polímeros Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica*. E-papers. 2001.
33. W. D. Callister Jr., *Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução*. 5° ed. LTC. 2002.
34. R. H. Garret, C. M Grisham, *Biochemistry*. Forth Worth, Saunders, 1995.
35. K. Krogars, J. H. M. Karjalainen, J. Rantanen, P. Luukkonen, J. Yliruusi, *Development and characterization of aqueous amylose-rich maize starch dispersion for film formation*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. **56**: p. 215-21. 2003.
36. I. Pashkuleva, A. P. Marques, F. Vaz, R. L. Reis, *Surface modification of starch based blends using potassium acid system permanganate-nitric acid and its effect on the adhesion and proliferation of osteoblast-like cells*. Journal of Materials Science-Materials in Medicine. **16**(1): p. 81-92. 2005.

37. R. M. S. M. Thiré, R. A. Simão, P. J. G. Araújo, C. A. Achete, C. T. Andrade, *Redução da Hidrofilicidade de Filmes Biodegradáveis à Base de Amido por meio de Polimerização por Plasma*. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. **4**(1): p. 57-62. 2004.
38. A. M. Donald, *Starch in Food: Structure, function and Applications. Chapter 5: Understanding starch structure and functionality*. Professor Anne-Charlotte Eliasson Woodhead Publishing, 2004.
39. J-M. Guenet, *Thermoreversible Gelation of Polymer and biopolymers*. Academic Press INC. 1992.
40. E. Corradini, C. Lotti, E. S. Medeiros, A. J. F. Carvalho, A. A. S. Curvelo, L. H. C. Mattoso, *Estudo Comparativo de Amidos Termoplásticos Derivados do Milho com Diferentes Teores de Amilose*. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. **15**(4): p. 268-73. 2005.
41. J. R. Katz, T. B. Van Itallie, “*Abhandlungen zur physikalischen Chemie der Stärke und der Brotbereitung. V. Alle Stärkearten haben das gleiche Retrogradationsspektrum*”. *Z. Physikal Chem*. **150**: p. 90-99. 1930.
42. L. F. Boesel, M. H. V. Fernandes, R. L. Reis, *The behavior of Novel Hydrophilic Composite Bone Cements in Simulated Body Fluids*. *Journal Biomedical Material Research Part B:Appl Biomater*. **70B**: p. 368-77. 2004.
43. C. Elvira, J. F. Mano, J. San Román, R. L. Reis, *Starch Based Biodegradable Hidrogels with Potential Biomedical Applications as Drug Delivery Systems*. *Biomaterials*. **23**: p. 1955-66. 2002.
44. M. E. Gomes, J. S. Godinho, D. Tchalamov, A. M. Cunha, R. L. Reis, *Alternative Tissue Engineering Scaffolds Based on Starch: processing methodologies, morphology, degradation and mechanical properties*. *Material Science & Engineering C*. **20**: p. 19-26. 2002.

45. M. E. Gomes, A. S. Ribeiro, P. B. Malafaya, R. L. Reis, A. M. Cunha, *A New Approach based on injection moulding to produce biodegradable starch-based polymeric scaffolds: morphology, mechanical and degradation behavior*. *Biomaterials*. **22**: p. 883-89. 2001.
46. A. J. Salgado, M. E. Gomes, A. Chou, O. P. Coutinho, R. L. Reis, D. W. Hutmacher, *Preliminary study on the adhesion and proliferation of human osteoblasts on starch-based scaffolds*. *Material Science & Engineering C*. **20**: p. 27-33. 2002.
47. C. M. Vaz, R. L. Reis, A. M. Cunha, *Use of coupling agents to enhance the interfacial interactions in starch-EVOH/hydroxylapatite composites*. *Biomaterials*. **23**: p. 629-35. 2002.
48. I. B. Leonor, A. Ito, K. Onuma, N. Kanzaki, R. L. Reis, *In vitro bioactivity of starch thermoplastic/hydroxyapatite coposite biomaterials: an in study using atomic force microscopy*. *Biomaterials*. **24**: p. 579-85. 2003.
49. M. Rabello, *Aditivação de Polímeros*. Artliber. 242 p. 2000.
50. N. Laohakunjit, A. Noomhorm, *Effect of Plasticizers on Mechanical and Barrier Properties of Rice Starch Film*. *Starch/Starke*. **56**: p. 348-56. 2004.
51. M. W. Rutemberg, D. Solarek, *Starch: Chemistry and Technology*. Academic Press inc. 2°ed. p: 324. 1984.
52. H. D. Belitz, W. Grosh, *Food Chemistry*. Springer 2°ed. 1999.
53. S. C. Domenech, *Novos Materiais Condutores para Estudos Biomecânicos: Produção de Misturas Físicas Poliméricas Constituídas por Polianilina e Borracha EPDM*. Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis. p. 211. 2002.
54. R. Faez, C. Reis, P. S. Freitas, O. K. Kosima, G. I. Rugger, M. A. De Paoli, *Polímeros Condutores*. *Química Nova na Escola*. **11**: p. 13-18. 2000.

55. R. A. Zoppi, *Materiais Condutores constituídos de Polipirrol e Borracha de EPDM*. UNICAMP: Campinas. p. 126. 1994.
56. D. S. Minehan, K. A. Marx, S. K. Tripathy, *Kinetics of DNA Binding to Electrically Conducting Polypyrrole Films*. *Macromolecules*. **27**: p. 777-83. 1994.
57. B. Garner, A. Georgevich, A. J. Hodgson, L. Liu, G. G. Wallace, *Polypyrrole-heparin composites as stimulus-responsive substrates for endothelial cell growth*. *J. Biomed Mater Res*. **44**: p. 121-29. 1999.
58. J. H. Collier, J. P. Camp, T. W. Hudson, C. E. Schimdt, *Synthesis and characterization of polypyrrole-hyaluronic acid composite biomaterials for tissue engineering application*. *J. Biomed Mater Res*. **50**: p. 574-84. 2000.
59. R. E. Nofle, D. Pletcher., *The mechanism of electrodeposition of composite polymers including polypyrrole*. *Journal Electroanal. Chem*. **227**: p. 229-35. 1987.
60. W. Prissanaroon, N. Brack., P. J. Pigram, J. Liesegang, *Electropolymerization of polypyrrole on copper in aqueous media*. *Synthetic Metals*. **142**: p. 25-34. 2004.
61. C. A. Ferreira, S. C. Domenech., P. C. Lacaze, *Synthesis and characterization of polypyrrole/TiO<sub>2</sub> composites on mild steel*. *Journal of Applied Electrochemistry*. **31**: p. 49-56. 2001.
62. K. S. Jang, H. Lee, B. Moon, *Synthesis and characterization of water soluble polypyrrole doped with functional dopants*. *Synthetic Metals*. **143**: p. 289-94. 2004.
63. R. A. Zoppi, M. A. De Paoli., *Chemical preparation of conductive elastomeric blends: polypyrrole/EPDM-II. Utilization of matrices containing crosslinking agents, reinforcement fillers and stabilizers*. *Polymer*. **37**(10): p. 1999-2009. 1996.

64. M. Omastová, M. Trchová, J. Pionteck, J. Prokeš, J. Stejskal, *Effect of polymerization conditions on the properties of polypyrrole prepared in the presence of sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate*. *Synthetic Metals* **143**: p. 153–161. 2004.
65. M. Omastová, M. Trchová, J. Kovařová, J. Stejskal, *Synthesis and structural study of polypyrroles prepared in the presence of surfactants*. *Synthetic Metals* **138**: p. 447–455. 2003.
66. M. Omastová, J. Pionteck, M. Trchová, *Properties and morphology of polypyrrole containing a surfactant*. *Synthetic Metals*. **135-136**: p.437-438. 2003.
67. T. Ozawa: *A New Method of Analyzing Thermogravimetric Data*. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. **38**: p. 1881-1886. 1965.
68. S. C. Domenech, J. H. Bortoluzzi, V. Soldi, C. V. Franco, W. Gronski, H.-J. Radusch: *Characterization, Morphology, Thermal and Mechanical Properties of Conductive Polyaniline-functionalized EPDM Elastomers Obtained by Casting*. *J Polym Sci: Part B: Polym Phys*, **42**: p.1767-1782. 2004.
69. ASTM D882 (Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Films).
70. C. O. Moore, J. V. Tuschhoff, C. W. Hastings, R. V. Schanefelt: *Applications of Starches in Foods*, in: *Starch: Chemistry and Technology*. (Ed. R. L. Whistler, J. N. Bemiller, E. F. Paschall) Academic Press, Orlando, FL, 1984.
71. J. A. Radley, *Examination and Analysis of Starch and Starch Products*. Applied Science Publishers LTD. 1988
72. W. F. Wolkers, A. E. Oliver, F. Tablin, J. H. Crowe, *A Fourier-transform Infrared Spectroscopy Study of Sugar Glasses*. *Carbohydr Res*. **339**: p. 1077-1085. 2004.
73. S. Pavlovic, P. R. G. Brandão, *Adsorption of Starch, Amylose, Amylopectin and Glucose Monomer and their Effect on the Flotation of Hematite and Quartz*. *Minerals Engineering*. **16**, 1117-1122. 2003

74. M. Kacurakova, M. Mathlouthi, *FTIR and Laser-Raman Spectra of Oligosaccharides in Water: Characterization of the Glycosidic Bond*. Carbohydr Res. **284**: p. 145-157. 1996.
75. J. Scheirs, G. Camino, W. Tumiatti, *Overview of Water Evolution During the Thermal Degradation of Cellulose*. Eur Polym J. **37**: p. 933-942. 2001.
76. J. Piskorz, D. Radlein, D. S. Scott, *On the Mechanism of the Rapid Pyrolysis of Cellulose*. J Anal Appl Pyrol. **9**: p. 121-137. 1989.
77. M. A. Villetti, J. S. Crespo, M. S. Soldi, A. T. N. Pires, R. Borsali, V. Soldi, *Thermal Degradation of Natural Polymers*. J Therm Anal Calorim., **67**: p. 295-303. 2002.
78. J. M. Krochta, S. J. Tillin, J. S. Hudson, *Degradation of Polysaccharides in Alkaline Solution to Organic Acids: Product Characterization and Identification*. J Appl Polym Sci. **33**: p. 1413-1425. 1987.
79. F. Shafizadeh: *Introduction to Pyrolysis of Biomass*. J Anal Appl Pyrol. **3**: p. 283-305. 1982.
80. R. Ruseckaite, A. Jiménez, *Thermal Degradation of Mixtures of Polycaprolactone with Cellulose Derivatives*. Polym Degrad Stab. **81**: p. 353-358. 2003.
81. P. Aggarwal, D. Dolimore, *A Thermal Analysis Investigation of Partially Hydrolyzed Starch*. Thermochim Acta. **319**: p. 17-25. 1998.
82. X. Zhang, J. Golding, I. Burgar, *Thermal Decomposition Chemistry of Starch Studied by <sup>13</sup>C High-resolution Solid-state NMR Spectroscopy*. Polymer. **43**: p. 5791-5796. 2002.
83. A. D. Pouwels, G. E. Eijkel, J. J. Boon, *Curie-point Pyrolysis-capillary Gas Chromatography-high-resolution Mass Spectrometry of Microcrystalline Cellulose*. J Anal Appl Pyrol. **14**: p. 237-280. 1989.
84. E. Jakab, M. Blazsó, O. Faix, *Thermal Decomposition of Mixtures of Vinyl Polymers and Lignocellulosic Materials*. J Anal Appl Pyrol. **58**: p. 49-62. 2001.

85. J. L. Banyasz, S. Li, J. Lyons-Hart, K. H. Shafer, *Gas Evolution and the Mechanism of Cellulose Pyrolysis*. *Fuel*, **80**: p. 1757-1763. 2001.
86. R. M. Silverstein, G. C. Bassler, T. C. Morrill, *Spectrometric identification of organic compounds*. John Wiley & Sons. 1991.
87. A. N. Garcia, M. M. Esperanza, R. Font, *Comparison Between Product Yields in the Pyrolysis and Combustion of Different Refuse*. *J Anal Appl Pyrol*, **68**: p. 577-598. 2003.
88. E. Berwig, S. L. S. Severgnini, M. S. Soldi, G. Bianco, E. A. Pinheiro, A. T. N. Pires, V. Soldi, *Thermal Degradation of Ionene Polymers in Inert Atmosphere*. *Polym Degrad Stab*. **79**: p. 93-98. 2003.
89. V. D. Athawale, V. Lele, *Thermal Studies on Granular Maize Starch and its Graft Copolymers with Vinyl Monomers*. *Starch/Stärke*. **52**: p. 205-213. 2000.
90. G. N. Richards, F. Shafizadeh, *Formation of "Glucometasaccharinolactones" in the Pyrolysis of Curdlan, A (1→3)-β -l-glucan*. *Carbohidr Res*. **106**: p. 83-91. 1982.
91. S. M. Smits, *Measurement of Sheet Resistivities with the Four Point Probe*. *The Bell System Technical Journal*. p. 711. 1958.
92. V. Zucolotto, *Processamento por fusão de compósitos poliméricos condutores elétricos*. Universidade Federal de São Carlos: São Carlos. Brazil, 1999.
93. V. Zucolotto, J. Avlyanov, L. H. C. Mattoso, *Elastomeric Conductive Composites based on Conducting Polymer-Modified Carbon Black*. *Polymer Composites*. **25**: p. 2004.
94. C. O. Moore, J. V. Tuschhoff, C. W. Hastings, R. V. Schanefelt, *Applications of Starches in Foods*, in: *Starch: Chemistry and Technology*. (Ed. R. L. Whistler, J. N. Bemiller, E. F. Paschall) Academic Press. Orlando, Fl, 1984.
95. J. A. Radley, *Examination and Analysis of Starch and Starch Products*. Applied Science Publishers LTD. **1988**.

96. S. Machida, S. Miyata, A. Techagumpuch, *Chemical Synthesis of Highly electrically conductive polypyrrole*. Synth. Met. **31**: p. 311. 1989.
97. B. Tian, G. Zerbi, *Lattice-dynamics and vibrational-spectra of polypirrole*. J. Chem. Phys. **92(6)**: p. 3886-3891. 1990.
98. J. M. Ribo, A. Dicko, M. A. Valles, N. Ferrer, R. Bonnett, D. Bloor, *Polypyrrole with dipyrinone end groups*. Synthetic Metals. **33(3)**: p. 403-408. 1989.
99. N. Toshima, S. Hara, *Direct synthesis of conducting polymers from simple monomers*. Prog. Polym. Sci. **20(1)**: p. 155-183. 1995.
100. M. F. Planche, J. C. Thiéblemont, N. Mazars, G. Bidan, *Kinetic study of pyrrole polymerization with iron (III) chloride in water*. Journal of Applied Polymer Science. **52(13)**: p. 1867-1877. 1994.
101. P. Collona, A. Buleon, C. Mercier, in: T. Galliard (Ed.), *Starches: Properties and Potential*. John Wiley. Chichester. 1987.
102. L. S. Guinesi, A. L. da Róz, E. Corradini, L. H. C. Mattoso, E. M. Teixeira, A. A. da S. Curvelo, *Kinetics of thermal degradation applied to starches from different botanical origins by non-isothermal procedures*. Thermochemica Acta. **447(2)**: p. 190-196. 2006.
103. A. D. Beerler, D. C. Finney, *Plasticizers, in Modern Plastics Encyclopedia*. Mc Graw-Hill. New York. 1983.
104. P. Tomasik, J-J. Jane, K. Spence, J. W. Andernegg, *Starch Ferrates*. Starch/Stärke. **47(2)**: p. 68-72. 1995.
105. C. Visy, E. Pintér, T. Flüei, R. Patakfalvi, *Characterization of electronically conducting polypyrrole based composite materials*. Synthetic Metals. **152(1-3)**: p. 13-16. 2005.
106. C. He, C. Yang, Y. Li, *Chemical synthesis of coral-like nanowires and nanowire networks of conducting polypyrrole*. Synthetic Metals. **139(2)** p. 539-545. 2003

107. E. R. Lieberman, S. G. Guilbert, *Gas permeation of collagen films as effected by cross-linkage, moisture and plasticizer content*. J. Polym. Sci. **41**: p. 33-43. 1973.
108. J. Yang, J. Yu, X. Ma, *Study on the properties of ethylenebisformamide and sorbitol plasticized corn starch (ESPTPS)*. Carbohydrate Polymers. **66**: p. 110–116. 2006.
- 109 S. Mali, M. V. E. Grossmann, M. A. Garcia, M. N. Martino, N. Z. Zaritzky, *Microstructural characterization of yam starch films*. Carbohydr Polym. **50**: p. 379–86. 2002.
110. M. Omastová, M. Lazár, S. Košina, *Combined electrochemical and chemical synthesis of thick polypyrrole layers and their characterization*. Polymer International. **34**(2): p. 151-156. 1994.
111. Y. Furukawa, S. Tazawa, Y. Fujii and I. Harada, *Raman spectra of polypyrrole and its 2,5-<sup>13</sup>C-substituted and C-deuterated analogues in doped and undoped states*. Synthetic Metals. **24**(4): p. 329-341. 1988.
112. J. Wang, K. G. Neoh, E. T. Kang, *Comparative study of chemically synthesized and plasma polymerized pyrrole and thiophene thin films*. Thin Solid Films. **446**(2): p. 205-217. 2004.
- 113 W. Prissanaroon, L. Ruangchuay, A. Sirivat, J. Schwank, *Electrical conductivity response of dodecylbenzene sulfonic acid-doped polypyrrole films to SO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> mixtures*. Synthetic Metals. **114**(1): p. 65-72. 2000.
- 114 Mohammadi, M. -A. Hasan, B. Liedberg, I. Lundström e W. R. Salaneck, *Chemical vapour deposition (CVD) of conducting polymers: Polypyrrole*. Synthetic Metals. **14**(3): p. 189-197. 1986.
115. T. Ke, X. Sun, *Thermal and mechanical properties of poly (lactic acid) and starch blends with various plasticizers*. Trans ASAE **44**: p. 945–53. 2001.

- 116 Y. Zhang; J. H. Han, *Plasticization of Pea Starch Films with Monosaccharides and Polyols*. Journal of Food Science. 71(6) 2006.
117. L. Yang, A. T. Paulson, *Mechanical and water vapor barrier properties of edible gellan films*. Food Res Int. **33**: p. 563–70. 2000.
118. C-H.Yao, B-H. Liu, S-H. Hsu, Y-S. Chen, *Preparation of Networks of Gelatin and Genipin as Degradable Biomaterial*. Materials Chemistry and Physics. **83**: p. 204-208. 2004.
- 119 Y. Kokubo e T. Yamamuro, *Apatite Coating on Ceramics, Metals and Polymers Utilizing a Biological Process*. Journal of Material Science: Materials in Medicine. **1**: p. 233. 1990.
120. H. S. Azevedo, F. M. Gama, R. L. Reis, *In vitro Assessment of the Enzymatic degradation of Several Starch Based Biomaterials*. Biomacromolecules. **4**: p. 1703-12. 2003.
121. G. L. Miller, *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagents for Determination of Reducing Sugar*. Analytical Chemistry. **31**: p.426. 1956.
122. E. Kristo, C. G. Biliaderis, *Water Sorption and Thermo-Mechanical Properties of Water/Sorbitol-Plasticized Composite Biopolymer Films: Caseinate-Pullulan Bilayers and Blends*. Food Hydrocolloids. **20**: p. 1057-1071. 2006.
123. E. Kristo, C. G. Biliaderis, *Physical Properties of Starch Nanocrystal-Reinforced Pullulan Film*. Carbohydrate Polymers. *Article in press*. 2006.
124. S. C. Rizzi, D. J. Health, A. G. A. Coombes, N. Bock, M. Textor, S. Downes, *Biodegradable Polymer/Hydroxyapatite Composites: Surface Analysis and Initial Attachment of Human Osteoblasts*. J. Biomed. Mater. Res. **55**: p. 475-486. 2001.