

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**FILMES DE POLI(ESTIRENO) E POLI(METACRILATO DE METILA):
CARACTERIZAÇÃO E EFEITO DA COMPOSIÇÃO NA ADESÃO E
CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE CÉLULAS L929**

Adriana de Melo

Florianópolis
2008

Adriana de Melo

**FILMES DE POLI(ESTIRENO) E POLI(METACRILATO DE METILA):
CARACTERIZAÇÃO E EFEITO DA COMPOSIÇÃO NA ADESÃO E
CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE CÉLULAS L929**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para a obtenção do grau de *Mestre em Química*.

Área de concentração: *Físico-Química*.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Soldi

Co-Orientador: Prof. Dr. Nito A. Debacher

Florianópolis

2008

Adriana de Melo

**FILMES DE POLI(ESTIRENO) E POLI(METACRILATO DE METILA):
CARACTERIZAÇÃO E EFEITO DA COMPOSIÇÃO NA ADESÃO E
CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE CÉLULAS L929**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Mestre em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 15 de fevereiro de 2008.

Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdir Soldi
Orientador

Prof. Dr. Nito Angelo Debacher
Co-Orientador

Profa. Dra. Maria Marta de Souza Sierra
Departamento de Química - UFSC

Prof. Dr. José Carlos Gesser
Departamento de Química – UFSC

Prof. Dr. Jamil Assreuy
Departamento de Farmacologia - UFSC

Dedicatória

Ao meu pai Nilton (in memorian) por ter sido sempre o meu herói e meu orgulho, com todo o meu amor e saudade...

*A minha mãe Noemia, que além da vida, me ajudou de todas as formas possíveis e imagináveis para que eu realizasse meu sonho. Pelas lições de amor, honestidade e humildade. Não há faculdade capaz de ensinar as lições de vida que aprendi com você.
Te amo muito...*

*Em especial, ao meu amado esposo Daniel, pelo companheirismo, pela ajuda nos momentos difíceis e compreensão nas horas que precisei estar ausente.
São poucas as certezas que eu tenho na vida, mas a maior delas é que serei sempre feliz ao seu lado. Muito obrigada não só pela ajuda na realização desse trabalho, mas, principalmente, por me fazer feliz. Te amo!!!*

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre presente em minha vida, por ter me iluminado nas minhas decisões.

Ao professor Valdir Soldi por toda a amizade, por todo o auxílio prestado no desenvolvimento deste trabalho e principalmente pela oportunidade de realizar este trabalho. Obrigada pela confiança a mim prestada.

Ao professor Nito Angelo Debacher pela co-orientação e amizade que me acompanha desde a iniciação científica.

Aos professores membros da banca examinadora, Dra. Maria Marta de Souza Sierra, Dr. José Carlos Gesser e Dr. Jamil Assreuy por aceitarem o convite.

À Marly pelo auxílio nas medidas das propriedades térmicas

Ao professor Dr Jamil pela oportunidade de aplicar meu trabalho.

À Ângela Cristina Bet pela ajuda na realização das análises de adesão celular e citotoxicidade.

Ao professor Celso da Engenharia Mecânica por ter disponibilizado o aparelho de ângulo de contato e em especial ao André Michel pelas ajudas nesta análise.

Ao Professor Dr Redouane Borsali, da École Nationale Supérieure de Chimie et Physique de Bordeaux – França pela gentileza em nos doar o copolímero.

Agradeço à Grace e ao Jadir, pela sempre pronta ajuda prestada durante este período.

A todos os professores do departamento de química da UFSC que contribuíram para que eu chegasse até aqui, e em especial, ao professor Eduardo Antônio Pinheiro (*in memoriam*) pelo grande ensinamento na área de físico-química e pelo grande exemplo de seriedade, competência e ética.

Aos colegas e amigos do POLIMAT, especialmente as minhas amigas Cláudia e Ledi pela amizade e pela ajuda em todos os momentos.

A CAPES pelo suporte financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu irmão Agenor, minha cunhada Adriana e meus sobrinhos Felipe e Vinícius pela compreensão quando não consegui estar presente. Amo todos vocês!!!

A minha segunda família, minha Sogra Beatriz pelo carinho, amizade e ajuda nos momentos difíceis da minha vida. Aos meus cunhados Amanda e Matheus pela amizade. Amo vocês!

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo geral.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Engenharia de tecidos	4
3.2 Adesão celular	5
3.3 Citotoxicidade <i>in vitro</i>	7
3.4 Células L929.....	8
3.5 Biomateriais	8
3.6 Polímeros.....	11
3.6.1 Polímeros como biomateriais	12
3.7 Polímeros sintéticos.....	12
3.7.1 Poli(estireno)	14
3.7.2 Poli(metacrilato de metila).....	16
3.7.3 Poli(estireno- <i>b</i> -metacrilato de metila).....	18
3.8 Blendas poliméricas.....	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Materiais	23

4.2 Métodos	24
4.2.1 Solvente para preparo dos filmes.....	24
4.2.2 Preparação dos filmes.....	24
4.2.3 Análise Térmica.....	24
4.2.3.1 Termogravimetria (TG)	24
4.2.3.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	25
4.2.4 Análise estrutural.....	25
4.2.4.1 Espectroscopia na região de infravermelho (FTIR)	25
4.2.4.2 Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C no estado sólido (¹³ C NMR).25	
4.2.5 Determinação do ângulo de contato em água.....	26
4.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)	26
4.2.7 Análise de adesão celular	27
4.2.7.1 Controle negativo.....	27
4.2.7.2 Preparo da cultura de células	27
4.2.7.3 Teste de citotoxicidade	28
4.2.7.4 Análise estatística.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Análise térmica	30
5.1.1 Termogravimetria (TG).....	30
5.1.2 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	37
5.2 Análise Estrutural.....	41
5.2.1 Espectroscopia de infravermelho (FTIR).....	41
5.2.2 Ressonância magnética nuclear de ¹³ C no estado sólido	46
5.3 Análise de Superfície	50
5.3.1 Determinação do ângulo de contato.....	50
5.4 Análise morfológica	53
5.4.1 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)	53
5.5 Análise de adesão celular – estudo <i>in vitro</i>	57
5.5.1 Análise de citotoxicidade indireta - microscopia óptica	57
5.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)	57
5.5.3 Análise estatística	62
6 CONCLUSÕES	64

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
---	-----------

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AH - Ácido Hialurônico

C - Colágeno

¹³C NMR - Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C

CP - Polarização Cruzada

DMEM - Meio de Eagle Modificado por Dulbecco

DSC - Calorimetria Diferencial de Varredura

DTG - Termogravimetria Derivativa

ECM - Matriz Extracelular

EDTA - Etilenodiamino Tetracético

FTIR - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

HC - Hormônio de Crescimento

HCA - Hidroxiapatita Carbonatada

HMB - Hexametil Benzeno

MAS - Segundo o Ângulo Mágico

MDSC - DSC Modulado

PAA - Poli(ácido acrílico)

PBS - Solução Fosfato-Salina

PCL - Poli(ε-caprolactona)

PGA - Poli(ácido glicólico)

PLA - Poli(ácido láctico)

PLGA - Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

PLLA - Poli(L ácido láctico)

PMMA - Poli(metacrilato de metila)

PPD - Poli(ρ-dioxanona)

PS - Poli(estireno)

PS-*b*-PMMA - Poli(estireno-*b*-metacrilato de metila)

PVA - Poli(álcool vinílico)

PVC - Poli(cloreto de vinila)

SEM - Microscopia Eletrônica de Varredura

T_g - Temperatura de transição vítrea

TG - Termogravimetria

THF - Tetrahidrofurano

T_m - Temperatura de fusão

T_{max} - Temperatura de máxima velocidade de degradação

UV - Ultra-Violeta

VCT - Variação de Tempo de Contato

X-PEEM - Microscopia Eletrônica de Foto Emissão de raios-X

α-1-m - α-1-microglobulina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Técnica da engenharia de tecido	5
Figura 2 – Estrutura do monômero do poli(estireno).	14
Figura 3 – Estrutura do monômero de poli(metacrilato de metila).	17
Figura 4 – Estrutura do copolímero poli(estireno- <i>b</i> -metacrilato de metila).	19
Figura 5 – Curvas de TG (—) e DTG (----) para filmes de PS e PMMA puros.....	31
Figura 6 – Curvas de (A) TG e (B) DTG para blendas PS/PMMA e para o copolímero.....	32
Figura 7 – Representação esquemática da reação de perda do grupo metóxi no PMMA	33
Figura 8 – Representação esquemática da quebra da ligação C-C na degradação do PMMA	34
Figura 9 – Processo de degradação do poli(estireno).	34
Figura 10 – Desconvolução das curvas de DTG para blendas PS/PMMA (A) 70/30, (B) 50/50, (C) 30/70 e (D) PS- <i>b</i> -PMMA.....	36
Figura 11 – Curvas de DSC para: (A) filmes de PS e PMMA puros e blendas PS/PMMA e (B) filme de PS- <i>b</i> -PMMA.....	40
Figura 12 – Sobreposição dos espectros de infravermelho para os filmes de PS e PMMA puros e para as blendas em diferentes composições na região de 400 a 4000 cm^{-1}	42

Figura 13 – Sobreposição dos espectros de infravermelho para os filmes de PS e PMMA puros e para as blendas em diferentes composições: (A) região de 1700-1800 cm^{-1} e (B) região de 2950-3100 cm^{-1}	44
Figura 14 – Espectro de infravermelho para o filme de PS- <i>b</i> -PMMA.	45
Figura 15 – Sobreposição dos espectros dos polímeros puros e do copolímero.	46
Figura 16 – Espectros de ^{13}C CP/MAS NMR para os filmes de polímeros puros (A) PS puro e (B) PMMA puro.....	48
Figura 17 – Espectros de ^{13}C CP/MAS NMR para os filmes poliméricos (A) PS puro, (B) PS/PMMA 70/30, (C) PS/PMMA 50/50, (D) PS/PMMA 30/70 e (E) PMMA puro.	49
Figura 18 – Espectro de ^{13}C CP/MAS NMR para o filme de copolímero	50
Figura 19 – Ângulo de contato para a superfície dos filmes (A) PS puro, (B) PS/PMMA 70/30, (C) PS/PMMA 50/50, (D) PS/PMMA 30/70, (E) PMMA puro e (F) PS- <i>b</i> -PMMA.	51
Figura 20 – Imagens de gotas de água na superfície dos filmes de (A) PS puro, (B) PS/PMMA 70/30, (C) PS/PMMA 50/50, (D) PS/PMMA 30/70, (E) PMMA puro e (F) PS- <i>b</i> -PMMA.	53
Figura 21 – Micrografias das superfícies para os filmes poliméricos (A) PS puro, (B) PS/PMMA 70/30, (C) PS/PMMA 50/50, (D) PS/PMMA 30/70, (E) PMMA puro e (F) PS- <i>b</i> -PMMA – aumento de 500x.....	55
Figura 22 – Micrografias das superfícies de fratura para os filmes poliméricos (A) PS puro, (B) PS/PMMA 70/30, (C) PS/PMMA 50/50, (D) PS/PMMA 30/70, (E) PMMA puro e (F) PS- <i>b</i> -PMMA – aumento de 600x.	56

Figura 23 – Análise de microscopia óptica das células L929 após 24 horas de contato com os filmes (A) PS puro, (B) PS/PMMA 70/30, (C) PS/PMMA 50/50, (D) PS/PMMA 30/70, (E) PMMA puro, (F) PS-*b*-PMMA e (G) controle negativo – aumento de 440x.....59

Figura 24 – Análise de SEM das células L929 após 24 horas de contato com os filmes (A) PS puro, (B) PS/PMMA 70/30, (C) PS/PMMA 50/50, (D) PS/PMMA 30/70, (E) PMMA puro, (F) PS-*b*-PMMA e (G) controle negativo – aumento de 50x.60

Figura 25 – Análise de SEM das células L929 após 24 horas de contato com os filmes (A) PS puro, (B) PS/PMMA 70/30, (C) PS/PMMA 50/50, (D) PS/PMMA 30/70, (E) PMMA puro, (F) PS-*b*-PMMA e (G) controle negativo – aumento de 1000x.61

Figura 26 – Contagem de células/campo em filmes poliméricos (A) PS puro, (B) PS/PMMA 70/30, (C) PS/PMMA 50/50, (D) PMMA puro, (E) PS-*b*-PMMA e (F) controle negativo – Aumento de 440x. Resultados representam média \pm desvio-padrão.63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Meio de cultura DMEM utilizado para manutenção das células.....	27
Tabela 2 – Parâmetros termogravimétricos para o sistema de PS, PMMA, PS/PMMA e PS- <i>b</i> -PMMA.	31
Tabela 3 – Resultados da análise de DSC para o sistema de PS e PMMA.	38

RESUMO

Filmes de poli(estireno) (PS), poli(metacrilato de metila) (PMMA), blendas de PS/PMMA (70/30, 50/50 e 30/70) e copolímero de PS-*b*-PMMA foram preparados por evaporação de solvente (casting), caracterizados e avaliados quanto à adesão celular de células de camundongos L929 (linhagem de fibroblastos) e quanto à citotoxicidade. Os filmes estudados foram caracterizados quanto às suas propriedades térmicas (termogravimetria – TG e calorimetria diferencial de varredura – DSC), estruturais (espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR e ressonância magnética nuclear de ^{13}C no estado sólido – ^{13}C NMR), superficiais, por medidas de ângulo de contato, e morfológicas por meio de microscopia eletrônica de varredura – SEM. As análises de TG mostraram que os filmes são termicamente estáveis e, esta estabilidade diminui com o aumento de PMMA na blenda. As análises de DSC indicaram imiscibilidade entre os polímeros puros, comprovada pela existência de duas temperaturas de transição vítrea (T_g 's) para as blendas e para o copolímero. As análises de FTIR e ^{13}C NMR sugeriram que não há interação entre os polímeros puros, concordando com as análises por SEM e DSC. As análises de superfícies realizadas por medidas de ângulo de contato em água mostraram que o filme mais hidrofóbico é o PS puro e o mais hidrofílico é o da blenda 50/50.

O comportamento das células de camundongos L929 foi avaliado sobre os filmes dos polímeros puros, das blendas em diferentes composições e do copolímero. A análise por microscopia óptica revelou que todos os filmes estudados não apresentam citotoxicidade. A análise de SEM realizada após 24 horas de adesão celular mostrou uma morfologia celular diferenciável para os filmes estudados e melhor aderência das células na blenda 50/50. A análise estatística mostrou diferentes quantidades de células para cada filme estudado.

A análise conjunta dos resultados mostra que todos os filmes estudados não apresentaram citotoxicidade, uma vez que as células foram capazes de aderir e proliferar, viabilizando sua utilização em aplicações biomédicas.

ABSTRACT

Polymeric biomaterials are compounds developed to be used as substitutes for damaged tissues. In this work, pure films of poly(styrene) (PS) and poly(methyl methacrylate) (PMMA), blends of PS/PMMA with different compositions (70/30, 50/50 and 30/70) and the copolymer of PS-*b*-PMMA were prepared by casting and evaluated in terms of cell adhesion of rat cell L929 (fibroblasts) concerning the cytotoxicity. The films were characterized in terms of the thermal properties (thermogravimetric analysis – TGA and differential scanning calorimetry – DSC), structure (Fourier transformed infrared spectroscopy – FTIR and ^{13}C solid-state nuclear magnetic resonance – ^{13}C NMR), surface (measurement of contact angle and morphology by scanning electron microscopy – SEM). The TGA showed that the films studied are thermally stable and that stability decreased with the addition of PMMA in the blends. The DSC analysis suggests immiscibility between the components due to the presence of two glass transition (T_g 's) temperatures in the blends and in the copolymer. The FTIR and ^{13}C NMR analysis suggests that there is no interaction between the homopolymers, which agrees with data obtained by SEM and DSC. Surface analysis carried out by means of contact angle measurements in water showed that the most hydrophobic film was PS, whereas the most hydrophilic one was the PS/PMMA blend (50/50).

The adhesion behavior of the L929 mouse cells was evaluated on films of the pure polymers, blends in different compositions and copolymer. Optical microscopy analysis showed that all studied films have negligible or null cytotoxicity. SEM analysis was carried out 24 hours after cell adhesion, showing several distinct cell morphologies in the studied films and strong cell adhesion in 50/50 blend. Statistical analysis showed different amounts of cells in each studied film.

The overall analysis of the results showed that cytotoxicity is absent in all the studied films, as cells could freely adhere and proliferate, been viable to use of such polymeric films in medical devices.

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A perda de um órgão ou de uma parte do corpo gera, além da perda da função, transtornos sociais e psicológicos. Durante séculos, lesões teciduais graves, originadas normalmente de traumas mecânicos ou de doenças degenerativas, foram problemáticas em função dos poucos recursos terapêuticos disponíveis. A remoção da porção lesada era a prática mais comumente utilizada, constituindo-se num fator altamente limitante a um paciente nesta condição. A retirada de grandes porções de tecidos levava a um significativo decréscimo da qualidade de vida do paciente e, por esta razão, a busca por técnicas que possibilitem a substituição de regiões corpóreas danificadas tornou-se um objeto permanente de estudo e pesquisa [1].

Os avanços tecnológicos têm possibilitado o desenvolvimento de materiais de alto desempenho, como metais, cerâmicas, compósitos e polímeros. Por outro lado, em vista da necessidade de avaliação biomédica destes materiais, têm sido propostas simulações biomecânicas e testes *in vitro* para a avaliação de citotoxicidade e da biofuncionalidade destes materiais [2, 3].

A área de biomateriais surgiu com a necessidade de se obter materiais alternativos para solucionar problemas relacionados às lesões causadas por acidentes, traumas ou doenças. Estudos visando à regeneração tecidual através do crescimento e proliferação celular sobre um suporte, geralmente obtido a partir de um biomaterial, têm se caracterizado como uma nova linha de pesquisa dentro da área de biomateriais, a engenharia de tecidos [4].

Neste campo de pesquisa, os recentes avanços têm como base a combinação de técnicas utilizadas na engenharia dos materiais, química, medicina e biologia molecular, com o objetivo de acelerar as reações celulares, reduzindo o tempo para a reparação de tecidos lesados. De modo geral, os estudos nesta área têm como foco principal avaliar o potencial de dispositivos poliméricos para a regeneração de tecidos e órgãos como pele, cartilagem, ossos, vasos sanguíneos, nervos e fígado. Atualmente, muitos pesquisadores têm se dedicado ao desenvolvimento de suportes biocompatíveis, que permitam a proliferação e diferenciação de células e a manutenção do fenótipo celular, para que estas possam desempenhar as funções características dos tecidos, mesmo na utilização de materiais sintéticos. Uma limitação desta técnica, entretanto, é a carência de um

controle preciso dos sinais bioquímicos. Para melhorar este processo, pesquisadores têm se dedicado ao desenvolvimento de materiais substitutos que mimetizem um ambiente extracelular, capaz de gerar sinais biológicos específicos para o crescimento e reorganização tecidual [5]. Em geral, os materiais utilizados na área biomédica devem possuir características biomecânicas 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 e biocompatibilidade.

Neste contexto, no presente estudo foram desenvolvidos filmes formados por poli(estireno) (PS) e poli(metacrilato de metila) (PMMA) puros, misturas PS/PMMA em diferentes proporções e pelo copolímero em bloco poli(estireno-*b*-metacrilato de metila) PS-*b*-PMMA. Os filmes foram avaliados quanto às propriedades de biocompatibilidade, adesão celular e citotoxicidade.

Na dissertação, além da introdução e justificativa (Capítulo 1), objetivos (Capítulo 2), conclusão (Capítulo 6) e referências bibliográficas (Capítulo 7), são apresentados os antecedentes bibliográficos referentes ao assunto (Capítulo 3), procedimentos experimentais (Capítulo 4) e resultados e discussão (Capítulo 5). O capítulo 5 reúne os resultados associados com as propriedades térmicas, estruturais, superficiais e morfológicas, bem como a viabilidade de aplicação desse material na forma de experimentos de adesão celular e citotoxicidade *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Preparar e caracterizar filmes poliméricos formados a partir de poli(estireno) e poli(metacrilato de metila) para estudo da adesão e citotoxicidade de células de camundongos L929 (linhagem de fibroblastos).

2.2 Objetivos específicos

↳ Preparar filmes em diferentes proporções tendo como matéria prima poli(estireno), poli(metacrilato de metila) e poli(estireno-*b*-metacrilato de metila).

↳ Analisar as propriedades térmicas dos filmes através de termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial de varredura (DSC).

↳ Analisar as propriedades estruturais dos filmes por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear de ^{13}C (^{13}C NMR).

↳ Avaliar a hidrofobicidade/hidrofilicidade dos filmes através de medidas de ângulo de contato pelo método da gota pendente.

↳ Analisar a morfologia dos filmes por microscopia eletrônica de varredura (SEM).

↳ Avaliar a adesão celular, proliferação e citotoxicidade dos filmes através de testes qualitativos e quantitativos *in vitro*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos é uma ciência que se destina a produzir materiais substitutos viáveis para a restauração, manutenção ou melhoramento da função dos tecidos ou órgãos humanos. Ao contrário das terapias normais, neste caso os produtos concebidos são células vivas que são integradas ao paciente. Trata-se de um novo campo multidisciplinar que envolve a aplicação dos princípios e métodos da engenharia de materiais junto aos conhecimentos das áreas biológicas e médicas [6].

A Figura 1 ilustra o desenvolvimento adaptado da engenharia de tecidos.

A grande vantagem da engenharia de tecidos é a superação dos limites de tratamentos convencionais baseados em transplantes de órgãos ou implantes de biomateriais dentro do corpo humano. Outras vantagens dos transplantes de células sobre o transplante de órgãos estão no fato de populações de células isoladas expandirem-se *in vitro* com a utilização de técnicas de cultura celular, necessitando somente de um pequeno número de células doadoras para preparar o implante subsequente. O tecido é removido de um doador autólogo (próprio paciente), homólogo (doador da mesma espécie) ou heterólogo (doador de outra espécie) [7], dissociado em células, ou grupos delas, fixadas ou encapsuladas em um suporte e transplantadas ao paciente, sendo desnecessário a parte doadora sacrificar um órgão inteiro. O uso de células isoladas de pacientes autólogos também permite a remoção daquelas indesejáveis, que podem ser alvo de resposta imune, influenciando no processo de rejeição, além das cirurgias entre doadores e receptores e seus riscos inerentes poderem ser evitados e os custos dos procedimentos significativamente reduzidos [8].

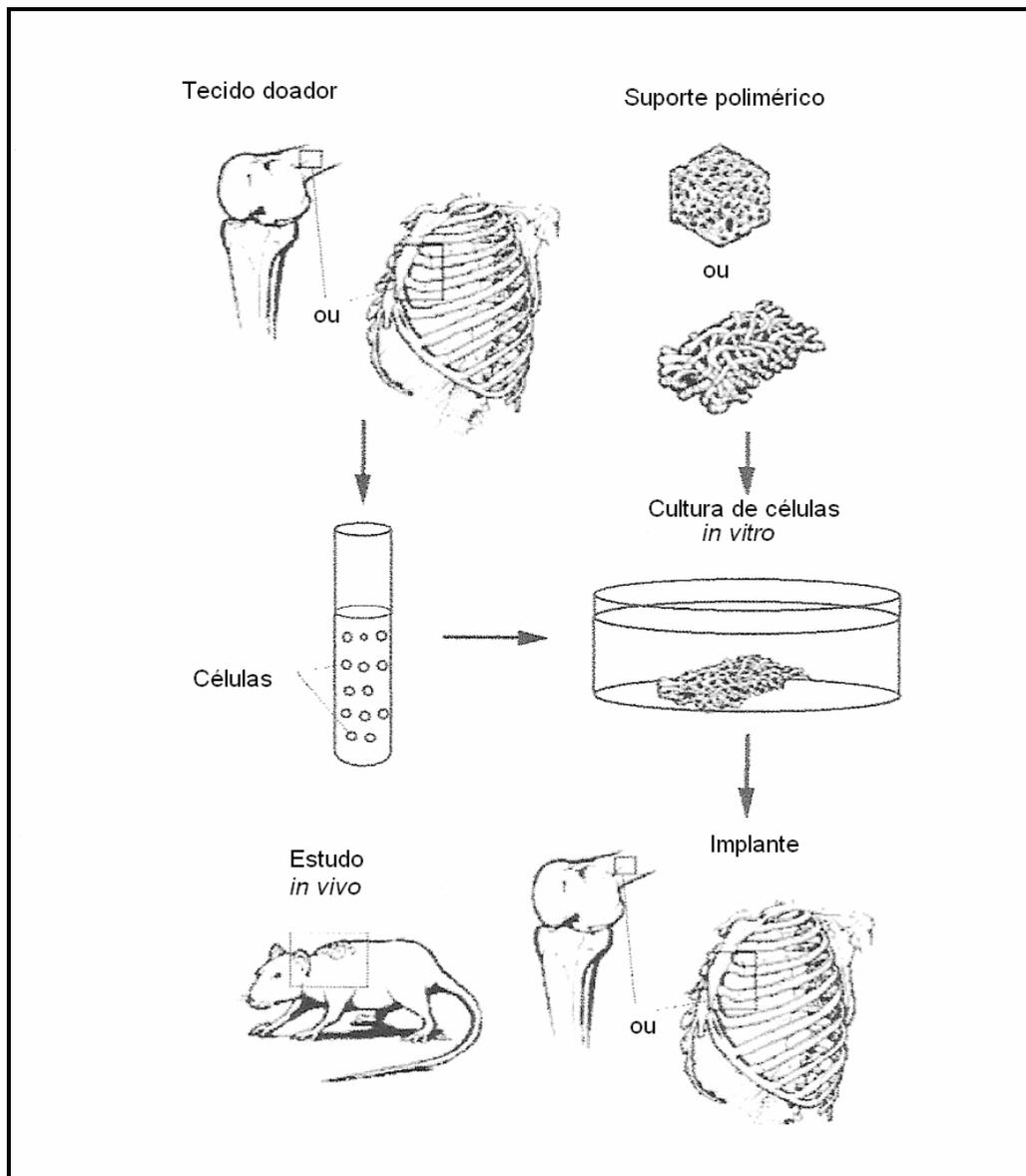


Figura 1 – Técnica da engenharia de tecido [6].

3.2 Adesão celular

Bigerelle e colaboradores [9] definem a fase de adesão celular como um processo que ocorre num curto espaço de tempo, no qual as ligações físico-químicas entre as células e substrato são resultantes de forças iônicas e de van der Waals que se formam entre moléculas do substrato e as várias moléculas biológicas, como as proteínas do citoesqueleto, da membrana celular e de matriz extracelular (ECM). Uma vez aderidas, as células se espalham, ampliando sua área de contato

com o substrato com conseqüentes modificações da forma (influenciada pela topografia do substrato), o que contribui para seu comportamento fenotípico. A natureza da matriz influencia principalmente programas de crescimento, diferenciação e apoptose, sendo que a composição determinará o programa a ser selecionado. As células “percebem” e reagem ao substrato, a exemplo da ECM, por meio de sinais dependentes da ativação das integrinas e mediadores intracelulares. Produzem respostas altamente dinâmica que podem levar à reorganização do citoesqueleto e alterações de funções em resposta a sinais mecânicos externos [10, 11].

Tal sensibilidade ao ambiente se faz necessária devido aos múltiplos desafios aos quais as células estão submetidas durante o desenvolvimento, regeneração de órgãos e respostas celulares, como as imunitárias. Conseqüentemente, a conversão de estímulos mecânicos em sinalização bioquímica intracelular - mecanotransdução - é um processo crítico para o crescimento e desempenho das funções normais dos tecidos [11]. Deste modo, as células respondem aos biomateriais por vias de sinalização inter e intracelulares [10, 11]. Muitos destes sinais se originam e propagam-se a partir dos receptores de componentes de matriz representados por proteínas integrais de membrana, as integrinas, mecanicamente ligadas aos filamentos do citoesqueleto por meio de uma grande variedade de proteínas que se associam para formar os complexos macromoleculares de ancoragem, conhecidos como complexos focais ou adesão focal [10]. Deste modo, as forças mecânicas aplicadas sobre as integrinas são transferidas para pontos distantes no meio intracelular, incluindo o núcleo, por intermédio de microfilamentos, bem como outros elementos do citoesqueleto, microtúbulos e filamentos intermediários, os quais estão interconectados [12, 13].

As características da superfície do material, topografia, composição química e superfície energética, são essenciais à adesão de células nos biomateriais [14]. Além disso, a adesão e a proliferação, que correspondem à primeira fase de interação célula/material, influenciarão a capacidade das células se diferenciarem em contato com o implante [15,16]. Segundo Vogler [17], a taxa de adesão celular inicial é crítica para este processo e é o maior determinante da citocompatibilidade *in vitro*, sugerindo ser uma possível determinante da biocompatibilidade *in vivo* [10, 17].

3.3 Citotoxicidade *in vitro*

Toxicidade é um evento complexo que pode apresentar dano celular direto, efeitos fisiológicos sistêmicos tais como nefrotoxicidade e neurotoxicidade e quase sempre desencadeia resposta inflamatória. O monitoramento de efeitos sistêmicos e fisiológicos *in vitro* é difícil, e desta forma, a maioria dos ensaios determina os efeitos a nível celular, em termos de citotoxicidade [18]. Os testes de citotoxicidade são usados como uma pré-seleção para detectar se o material em questão provoca morte das células ou outros efeitos negativos nas funções celulares [19].

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de dispositivos para uso em seres humanos, principalmente aqueles de aplicação clínica, que não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo do paciente [3].

A fim de avaliar a toxicidade de um material, vários métodos *in vitro* foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Existem dois tipos de testes *in vitro*: métodos de contato direto e métodos de contato indireto. No primeiro, as células são colocadas em contato com o material em teste, sendo normalmente semeadas na forma de uma suspensão celular sobre o material. Já os métodos de contato indireto podem ser divididos em dois tipos: aqueles em que o material a ser testado é separado das células por uma barreira de difusão (ágar ou agarose) e o segundo tipo no qual substâncias são extraídas do material a ser testado, através de um solvente e colocadas em contato com as células [19]. Normalmente, utilizam-se nestes testes células de linhagens estabelecidas, o que soluciona o problema da reprodutibilidade dos experimentos, uma vez que se pode utilizar uma mesma população celular por um longo período de tempo. Assim, além de resolver os problemas éticos e técnicos, os ensaios em culturas de células são ainda vantajosos pela rapidez de obtenção de resultados e pela reduzida quantidade do composto teste utilizado [18].

Existem vários mecanismos para analisar as alterações celulares. O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade e a viabilidade celular é o uso de corantes, tais como o corante vermelho neutro.

O corante vermelho neutro é um corante ligeiramente catiônico, que penetra na membrana celular por difusão passiva não-iônica e concentra-se nos lisossomos,

nos quais se fixa através de ligações eletrostáticas a grupos aniônicos, inclusive fosfatos hidrofóbicos da matriz lisossomal. O ensaio é baseado na capacidade de células viáveis incorporarem e ligarem o corante. Muitas substâncias danificam as membranas resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. Portanto, é possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida da intensidade de cor da cultura celular [3, 20].

Os métodos *in vitro* apresentam vantagens quando comparados aos *in vivo*, tais como poder limitar o número de variáveis experimentais e obter dados significativos mais facilmente, além do período de teste ser, em muitos casos, mais curto [3].

3.4 Células L929

As células L929 constituem uma linhagem celular de fibroblastos obtida de tecido subcutâneo de camundongos. Os fibroblastos são as principais células que constituem o tecido conjuntivo e são os mais relevantes produtores de colágenos neste tecido. Estes possuem uma morfologia fusiforme com algumas expansões citoplasmáticas que se estendem para fora da célula. Por se originarem de células mesenquimatosas indiferenciadas, possuem capacidade de diferenciação em múltiplos tipos celulares. Devido à sua relativa resistência e facilidade de manipulação, estas células tendem a um fácil crescimento em meios de cultura. Consequentemente têm sido consideradas como modelos para diversos testes de avaliação de substâncias para uso farmacológico e em biomateriais [21].

Células isoladas não podem formar tecidos, pois requerem um ambiente específico, o qual normalmente inclui a presença de um material suporte (*scaffolds*) que sirva como arcabouço, agindo como uma matriz para o crescimento, servindo como suporte físico e substrato adesivo para o crescimento de células isoladas durante a cultura de células e o subsequente implante [22].

Considerando de forma integrada, tanto sob o aspecto da engenharia de materiais e do tipo de tecido e reparo necessário, o primeiro passo para a reconstrução de um órgão ou tecido visa a seleção do suporte para as células.

3.5 Biomateriais

Quando a estrutura biológica de um órgão ou tecido não pode ser reparada, uma alternativa viável para o restabelecimento das funções normais do paciente é repô-la com um implante feito de um biomaterial [23].

Uma possível definição de biomaterial, segundo Williams [24], é de uma substância ou combinação de duas ou mais substâncias de origem natural ou sintética, idealizada para ser implantada ou incorporada por qualquer período de tempo, com a finalidade de substituir matéria viva que deixou de ter a sua função, podendo ou não servir como veículo, matriz, suporte ou estimulador para o crescimento de novo tecido. São exemplos os materiais que substituem ou induzem o crescimento de tecido ósseo, cartilagens, válvulas cardíacas, vasos, peles e outros tecidos [25].

Algumas características são fundamentais para se utilizar materiais em organismos vivos [26]:

- ser biocompatível;
- não ser tóxico e nem carcinogênico;
- ser quimicamente estável;
- ter estabilidade mecânica adequada;
- ter peso, densidade e forma adequados;
- ser relativamente barato, reprodutível e de fácil fabricação;
- ser bifuncional.

Dentre estas características, a biocompatibilidade é considerada a mais importante, pois a biofuncionalidade do material só poderá se manifestar caso haja biocompatibilidade.

Quando um material estranho entra em contato com os fluídos biológicos, respostas de proteção são desencadeadas e se manifestam como processos inflamatórios ou imunológicos, visando a eliminação do corpo estranho. Portanto, o bom desempenho de um biomaterial pós-implante está associado a um equilíbrio entre biocompatibilidade e biofuncionalidade [24, 26].

Segundo Hench [27], biocompatibilidade não é apenas a ausência de rejeição, mas envolve também a interação entre o implante e o tecido adjacente. Entretanto, podem-se distinguir termos como bioinércia e bioatividade. Bioinércia é

quando ocorre a formação de uma fina camada fibrosa ao redor do implante que impede uma interação entre o implante e o tecido receptor, e bioatividade, quando o material interage com os tecidos vivos de tal modo a estimular processos físico-químicos inerentes a sistemas biológicos capazes de permitir a integração do biomaterial no ambiente receptor [28].

A utilização de biomateriais para o reparo de tecidos vivos tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, devido ao desenvolvimento de novos materiais e a uma melhor compreensão dos mecanismos de sua interação com os organismos vivos. Cada vez mais novos materiais são sugeridos para diferentes aplicações [24, 29, 30], entre eles destacam-se os metais, cerâmicas, compósitos e polímeros [31-39].

Os materiais metálicos têm sido usados na confecção de implantes devido às suas boas propriedades mecânicas, elevada tenacidade, facilidade de fabricação e baixo custo. Elementos metálicos como Fe, Cr, Co, Ni, Ti, Ta, Mo, são tolerados pelo organismo em quantidades limitadas, sendo alguns até essenciais para funções celulares ou metabólicas. Em quantidades elevadas, porém, são altamente agressivos em virtude da corrosão metálica, uma vez que a corrosão é passível de ocorrer em ambiente fisiológico, além de levar à deterioração das propriedades mecânicas do material, comprometendo o desempenho da sua função [40].

Os materiais cerâmicos são compostos inorgânicos tipicamente duros, com vasta aplicação na área médica [40]. Dentre estes materiais destacam-se as cerâmicas microporosas à base de fosfato de cálcio, em razão da semelhança química, mineralógica e cristalográfica à do esqueleto humano, o que favorece a biocompatibilidade e regeneração de tecidos duros [41, 42]. Entretanto, a baixa resistência mecânica limita suas aplicações em regiões sujeitas a solicitações mecânicas elevadas [43].

Materiais compósitos são materiais formados por dois ou mais componentes com distintas composições, estruturas e propriedades e que estão separados por uma única interface. Uma grande vantagem na produção de compósitos é de combinar diferentes materiais para produzir um único dispositivo com propriedades superiores às dos componentes unitários. Dessa forma, compósitos com finalidades biomédicas são facilmente encontrados em dispositivos e sistemas modernos. Em termos de propriedades mecânicas, os compósitos apresentam propriedades mecânicas muito superiores às dos outros materiais, incluindo metais e cerâmicas.

Entretanto, como desvantagem geral dos compósitos pode-se citar a dificuldade de processamento [40].

No intuito de substituir os materiais metálicos, cerâmicos e compósitos, ou torná-los mais resistentes e biointegráveis, vários polímeros têm sido estudados e indicados para aplicações na área médica.

3.6 Polímeros

A palavra polímero origina-se do grego poli (muitos) e mero (partes) e é utilizada para designar moléculas formadas por um grande número de unidades moleculares repetidas (monômeros), ligadas entre si por ligações covalentes, formando compostos com cadeia longa e com alta massa molecular.

Quanto à estrutura, os polímeros podem ser classificados como lineares, ramificados ou reticulados. Um polímero é linear quando a cadeia polimérica é constituída de apenas uma cadeia principal. Já os ramificados possuem prolongamentos partindo da cadeia principal, ou seja, são formados pela substituição dos átomos de hidrogênio da cadeia polimérica por grupos orgânicos, originando grupos laterais, os quais podem variar em número e em comprimento. Nos polímeros reticulados ou tridimensionais, as cadeias poliméricas estão ligadas entre si através de ligações cruzadas (geralmente covalentes) que impedem o livre movimento das cadeias [44, 45].

Os polímeros podem ser classificados quanto ao número de monômeros, podendo ser chamados de homopolímeros e copolímeros. Homopolímeros são polímeros que possuem apenas uma unidade monomérica. Quando dois ou mais tipos diferentes de monômeros formam a cadeia, denomina-se copolímero e a reação que deu origem ao copolímero é chamada de copolimerização [40, 44, 45].

A copolimerização é definida como uma reação na qual dois ou mais monômeros estruturalmente distintos são incorporados na mesma cadeia polimérica. Assim, este método permite que sejam efetuadas mudanças sistemáticas nas propriedades dos polímeros, sendo por isso largamente utilizado na produção de polímeros comerciais e em estudos voltados à relação entre estrutura e propriedades [44, 45].

Em função do modo e distribuição dos monômeros, os copolímeros podem ser divididos em diferentes tipos [40, 44, 45]:

- aleatório, ao acaso ou estatístico: quando não há uma seqüência definida da disposição dos monômeros;
- alternado: apresenta unidades diferentes dispostas de modo alternado perfeitamente regular;
- enxertado ou graftizado: uma cadeia de um homopolímero liga-se covalentemente a outra cadeia polimérica;
- bloco: formação de grandes seqüências de um monômero, alternando a grandes seqüências do outro.

3.6.1 Polímeros como biomateriais

Os polímeros são os materiais mais amplamente empregados como biomateriais devido a sua resistência ao ataque químico, peso, inúmeras propriedades físico-químicas favoráveis e principalmente baixo custo. Podem ser aplicados tanto em locais tensionados, como próteses de substituição óssea, quanto em preparações que visam à aquisição de superfícies macias e moldáveis, como sistemas de liberação de fármacos e membranas com diversas utilizações [46, 47].

Os biomateriais poliméricos podem ser classificados de acordo com sua função em bioinertes, que não induzem reação biológica e não sofrem degradação, bioativos, que induzem resposta no tecido hospedeiro, reabsorvível, que sofre degradação e seus produtos são metabolizados pelo organismo do hospedeiro e biomiméticos, que imitam, mimetizam função ou estrutura de um tecido ou órgão [48].

Os biomateriais poliméricos podem ser classificados em naturais ou sintéticos. Neste trabalho foram utilizados polímeros de origem sintética; sendo assim, apenas este conceito será enfatizado.

3.7 Polímeros sintéticos

Esforços para o desenvolvimento de polímeros sintéticos, particularmente a borracha sintética, foram intensificados após a Segunda Guerra Mundial, quando

muitos materiais naturais não atenderam à alta demanda. Posteriormente surgiram vários tipos de polímeros, que foram responsáveis pelas constantes modificações nos hábitos da população do mundo atual [40, 44].

A síntese dos polímeros sintéticos envolve um processo de polimerização, que pode ser classificado quanto ao número de monômeros, tipo de reação e cinética de polimerização. Os processos de polimerização podem ocorrer em etapas, em cadeia, em cadeia via radicais livres, iônica ou com abertura de anel.

De acordo com a estrutura química do monômero, do tipo de ligação covalente e do tamanho da cadeia, os polímeros podem ser divididos em: termoplásticos, que fundem por aquecimento, se solidificam por resfriamento e são moldáveis; termorrígidos, que por aquecimento ou outra forma de tratamento assumem estrutura tridimensional, com ligações cruzadas, tornando-se insolúveis e infusíveis e em elastômeros, que possuem elevada elasticidade, como a borracha e as fibras, termoplásticos orientados e que possuem alta resistência mecânica. Podem ser classificados ainda em amorfos, que são caracterizados pela temperatura de transição vítrea, ou cristalinos (geralmente semi-cristalinos), com domínios amorfos e cristalinos, caracterizados por temperatura de fusão [40, 44, 45].

Os polímeros sintéticos são os materiais mais extensivamente usados como biomateriais. Possuem como principais propriedades, alta flexibilidade, alta resistência ao impacto, baixas temperaturas de processamento e principalmente excelentes propriedades mecânicas [49].

As primeiras informações sobre a utilização de polímeros sintéticos como biomateriais data de 1940, com a utilização de suturas a base de poliamidas sintéticas (Nylon). Um pouco mais tarde (1945), foram documentadas as primeiras aplicações de poli(metacrilato de metila) (PMMA), poli(tereftalato de etileno) (Dracon) e poli(cloreto de vinila) (PVC). Já em 1950, polímeros como polietileno, poliuretano e poli(tetraflúor etileno) (Teflon) começaram também a ser usados em aplicações biomédicas. Atualmente, diversos polímeros sintéticos são usados neste tipo de aplicação [40].

Dentre os polímeros sintéticos mais utilizados como biomateriais destacam-se o polietileno, polipropileno, fluorpolímeros, poliamidas, poliacrilatos e poliésteres [50-55].

Os poli(α -hidróxi ácidos) são representantes de uma classe de poliésteres alifáticos sintéticos, da qual fazem parte o poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido

lático) (PLA), poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), seus copolímeros e outros. Originalmente usados como fios de sutura, atualmente os poli(α -hidróxi ácidos) podem ser encontrados em diversos produtos comerciais de fixação óssea [56-58]. O poli(álcool vinílico) (PVA) é bastante utilizado em aplicações biomédicas, como pâncreas artificial e em hemodiálise [59-61].

3.7.1 Poli(estireno)

As resinas de poli(estireno) (PS) foram descobertas acidentalmente em 1839 por Eduard Simon, em Berlim, a partir de uma resina de âmbar destilada, mas somente adquiriram grande importância industrial no início da Segunda Guerra Mundial. Na década de 90 foi um dos termoplásticos mais consumidos, devido ao baixo custo, baixa densidade e absorção de umidade, boas propriedades elétricas (baixa condutividade elétrica), transparência, alto brilho, boa resistência a alguns ácidos fortes e facilidade de processamento [62].

O PS (Figura 2) é um homopolímero derivado da polimerização do monômero aromático estireno, que é um hidrocarboneto líquido e é fabricado a partir do petróleo. Pode ser obtido industrialmente a partir de vários processos; entretanto, o mais utilizado consiste na desidrogenação do etil-benzeno.

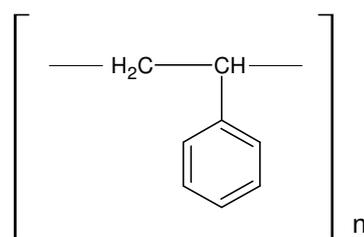


Figura 2 – Estrutura do monômero do poli(estireno).

O PS é uma resina do grupo dos termoplásticos, cuja característica reside na sua fácil flexibilidade ou moldabilidade. Sob a ação do calor, a resina toma a forma líquida ou pastosa, moldando-se com facilidade. Com o resfriamento após a moldagem, o produto readquire o estado sólido [62, 63].

Existem quatro tipos básicos de PS [62, 63]:

- **PS cristal ou comum:** homopolímero amorfo, duro, com brilho e elevado índice de refração. Pode receber pequenas quantidades de lubrificantes para facilitar o fluxo e a moldagem. Usado em artigos de baixo custo, notadamente peças descartáveis tais como copos.

- **PS resistente ao calor:** basicamente igual ao comum, mas devido à alta massa molar seu processamento é mais difícil. É ideal para confecção de peças de máquinas ou automóveis, gabinetes de rádios e TV, grades de ar condicionado, peças internas e externas de eletrodomésticos e aparelhos eletrônicos.

- **PS de alto impacto:** contém de 5 a 10% de elastômero (borracha), que é incorporado através de mistura mecânica ou diretamente no processo de polimerização através de enxerto na cadeia polimérica. Muito usado na fabricação de utensílios domésticos (gavetas de geladeira) e brinquedos.

- **PS expandido:** espuma semi-rígida com marca comercial “Isopor”. O plástico é polimerizado na presença do agente expensor ou o mesmo pode ser absorvido posteriormente. Durante o processamento do material aquecido volatiliza, gerando as células no material. Apresenta baixa densidade e bom isolamento térmico. É aplicado como bandejas para embalagem, protetor de equipamentos, isolantes térmicos, pranchas para flutuação e geladeiras isotérmicas.

Estudos do uso de PS como biomaterial limitam-se aos relacionados à adsorção de proteínas. Bouafsoun e colaboradores [64] afirmam que a adsorção de proteínas desempenha um papel importante nas interações interfaciais necessárias para melhorar a bioespecificidade de implantes e que o PS é um biomaterial comumente utilizado para implantes vasculares, pela adesão diferencial de proteínas como fibronectina, colágeno, albumina, heparina e imunoglobulina G.

Santin e colaboradores [65] estudaram o potencial da α -1-microglobulina (α -1-m) na mediação de *Pseudomonas aeruginosa* em PS. Os autores concluíram que a facilidade de desorção de α -1-m derivada de urina pôde ser correlacionada com a hidrofobicidade da superfície do biomaterial.

O estudo de adsorção de colágeno tipo I de uma solução contendo Pluronic' F68 foi realizado por Dewez e colaboradores [66]. Os autores mostraram que este último previne a adsorção de colágeno em PS e não previne sua adsorção em PS com superfície oxidada. Isto explica o controle de adesão de células pela hidrofobicidade superficial do substrato e composição da solução pré-condicionadora. Com base nisto, a adesão seletiva de diferentes tipos de células em superfícies padronizadas foi alcançada. Portanto, trilhos de hidrofobicidade reduzida foram produzidos em PS por tratamento com plasma de oxigênio. Após o condicionamento com uma solução contendo Pluronic' F68 e proteína de EMC (colágeno, bronectina), a adsorção ocorreu seletivamente nestes trilhos, permitindo a adesão seletiva das células.

3.7.2 Poli(metacrilato de metila)

A história do laboratório dos monômeros acrílicos começou em 1843, quando foi sintetizado o ácido acrílico. A isso seguiu-se em 1865 a preparação do etilmetacrilato, por Frankland e Duppa, enquanto em 1877, Fittig e Paul notaram que ele possuía certa tendência para a polimerização. Por volta de 1900 a maioria dos acrílicos mais comuns haviam sido preparados em laboratório e ao mesmo tempo já existiam alguns trabalhos sobre a sua polimerização. Em 1901, o Dr. Rohn, na Alemanha, começou um trabalho sistemático no campo dos acrílicos e mais tarde tomou parte ativa no desenvolvimento industrial do éster acrílico naquele país [67].

O poli(metacrilato de metila) (PMMA) foi o primeiro polímero acrílico produzido industrialmente por Rohn e Maas, em 1927. Foi vendido como uma solução do polímero em solvente orgânico e foi usada principalmente em lacas e formulações para revestimentos superficiais. Mais tarde Rowland Hill estudou o metacrilato e sua polimerização, enquanto que Crawford desenvolveu um método econômico para a fabricação dos monômeros [67].

O PMMA apresenta como características: densidade de $1,19 \text{ g cm}^{-3}$ (cerca de metade da densidade do vidro), é inquebrável, pode ser moldado por aquecimento a temperaturas relativamente baixas (cerca de $100 \text{ }^\circ\text{C}$), é macio e sensível à abrasão e rachaduras, é mais transparente que o vidro à luz visível e é transparente à

radiação infravermelha até 2800 cm^{-1} , mas bloqueia comprimentos de onda maiores [68, 69].

O PMMA é um homopolímero derivado do monômero metacrilato de metila (MMA), e sua estrutura está representada na Figura 3.

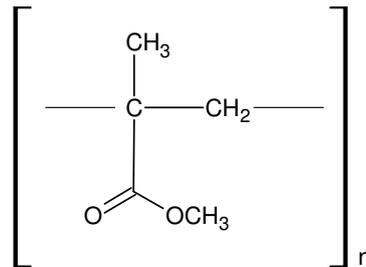


Figura 3 – Estrutura do monômero de poli(metacrilato de metila).

O PMMA é usado para confecção de peças em diversos setores, como o de ótica (lentes), o automotivo (faróis, painel indicador, protetor de tacômetros e triângulos) e o de saúde (embalagens de comprimidos, sondas, incubadoras e materiais esterilizáveis) [68, 69].

Existem alguns tipos de PMMA que bloqueiam a luz visível e deixam a radiação de infravermelho passar em certo intervalo de frequência (usados, por exemplo, em controle remoto e em sensores de fonte de calor) [68, 69].

O PMMA é utilizado como biomaterial desde 1950, principalmente na ortopedia (próteses ósseas), próteses dentárias, em pastilhas para ingestão por via oral e na oftalmologia (em lentes utilizadas dentro do olho) [70-73],

Júnior e colaboradores [74] sintetizaram compósitos a partir da polimerização em massa de metacrilato de metila na presença de partículas de vidro bioativo (vidro de silicato de cálcio, fósforo e sódio). Partículas de vidro foram adicionadas ao monômero em diversas concentrações para permitir a variação das propriedades mecânicas e da bioatividade desses compósitos. A bioatividade dos materiais produzidos foi avaliada através de testes *in vitro*. O procedimento de síntese mostrou-se eficaz na produção de compósitos com diferentes frações volumétricas

de partículas distribuídas homoganeamente pelo material. Os resultados dos testes *in vitro* revelaram a deposição de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) na superfície dos materiais, comprovando a bioatividade dos compósitos.

3.7.3 Poli(estireno-*b*-metacrilato de metila)

As técnicas de polimerização viva não são úteis somente para controlar massas molares e distribuições de massas molares de polímeros, mas também para sintetizar copolímeros em bloco [75].

Copolímeros bloco são formados pelo arranjo linear de vários blocos de monômeros, isto é, pela combinação de dois ou mais polímeros ligados cabeça-cauda por ligações covalentes [44, 45, 76].

Os copolímeros bloco representam uma importante classe de materiais multicomponentes que tem recebido muita atenção, particularmente a partir de 1960. A união de polímeros diferentes em uma macromolécula fornece materiais com propriedades mecânicas, óticas e estruturais únicas. Estes copolímeros são uma classe única de materiais poliméricos que sofrem separação de fase de ordem nanométrica e têm uma variedade de aplicações, inclusive como dispersantes, compatibilizantes, modificadores de viscosidade, adesivos, aditivos em borrachas, revestimentos e membranas [75, 76].

Há dois métodos gerais para síntese de copolímero bloco. No primeiro são criados sítios ativos em uma cadeia de um polímero já existente e então se inicia a polimerização do segundo monômero. A polimerização pode ser radicalar, aniônica ou catiônica. No segundo método, que é usualmente chamado de condensação, ocorre uma reação entre grupos funcionais presentes nas extremidades das cadeias dos diferentes polímeros. Desses métodos, a polimerização aniônica tem se mostrado mais eficiente para preparar copolímeros aproximadamente monodispersos e de arquiteturas bem definidas [75, 76].

Quanto à morfologia, copolímeros em bloco compostos por blocos imiscíveis e não cristalizáveis apresentam domínios com tamanho controlado. Como os blocos são ligados covalentemente uns aos outros, as fases não podem adquirir dimensões maiores que a própria dimensão da macromolécula. Os blocos individuais assumem

conformação enovelada dentro de cada domínio e as junções entre os blocos se localizam na interface que separa os domínios A e B [77-79].

É bem conhecido que copolímeros em bloco do tipo AB adotam estruturas de microdomínio no regime de forte segregação, isto é, forte interação repulsiva entre as cadeias dos blocos constituintes. Neste caso, polímeros A(B) segregam em microdomínios de A(B), com as junções químicas dos blocos localizadas próximas à região interfacial. A região interfacial característica no interior do copolímero dibloco é relatada como sendo igual ou menor que 20 Å, à temperatura ambiente [77-79].

Neste trabalho, foi estudado o copolímero formado pelos monômeros estireno e metacrilato de metila, o copolímero dibloco PS-*b*-PMMA (Figura 4). Os copolímeros derivados destes monômeros têm propriedades bem definidas e são largamente utilizados na indústria. Dentre as vantagens destes copolímeros em relação ao PS incluem-se o aumento da resistência às intempéries e estabilidade à luz, maior transparência e dureza. Além disso, a incorporação de pelo menos 30% em massa do estireno aumenta a estabilidade térmica desse material em relação ao PMMA, que degrada em temperaturas superiores a 250 °C devido à despolimerização [80, 81].

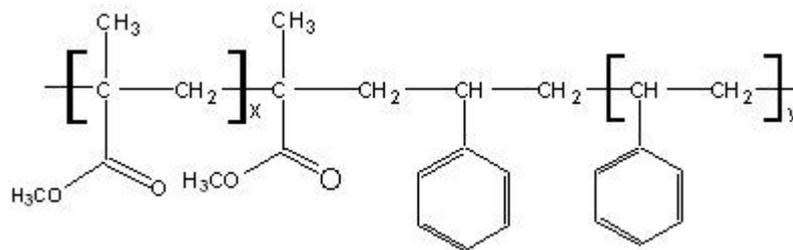


Figura 4 – Estrutura do copolímero poli(estireno-*b*-metacrilato de metila).

A aplicação de PS-*b*-PMMA como biomaterial é, entretanto, restrita, de modo que não se conhece, até o momento, nenhuma descrição deste tipo de aplicação.

Os filmes de copolímeros diblocos têm recebido recentemente mais atenção devido a sua habilidade de se organizar em estruturas nanométricas [82-84]. Aissou e colaboradores [85] estudaram este fenômeno modificando primeiramente a superfície do substrato para favorecer a formação de cilindros de PMMA verticais

cercados por uma matriz de PS. Também observaram que a área média de poro dos cilindros aumenta com o número de coordenação. Estes filmes foram usados como máscara de deposição para produzir orifícios bem organizados, pontos e nanopilares.

Kaydarov e colaboradores [86] investigaram a estrutura de superfície de filmes finos de PS-*b*-PMMA em um substrato de silicone. Mostraram que a nanoestrutura depende da massa molecular e da fração de volume dos copolímeros dibloco. Observaram uma estrutura perpendicular lamelar para a amostra de alta massa molar e um padrão de empacotamento hexagonal para a amostra de menor massa molar. Investigaram por espalhamento de raios-X em baixo ângulo que amostras sem modificação hidrotérmica (annealing) não revelaram nenhuma estrutura ordenada. Os autores concluíram que a modificação hidrotérmica de amostras de PS-*b*-PMMA levou a mudanças na estrutura superficial.

3.8 Blendas poliméricas

Logo após a descoberta da natureza macromolecular de algumas espécies de polímeros, houve um crescente interesse na produção e estudo de novos materiais poliméricos de grande importância do ponto de vista tecnológico. No princípio da ciência dos polímeros, novos materiais foram projetados e obtidos pela síntese de novos tipos de unidades monoméricas que originariam polímeros com propriedades diferentes daqueles já existentes. A síntese de polímeros ou a modificação da estrutura química de um polímero já existente são alternativas para a obtenção de novos materiais. Entretanto, a mistura física de dois ou mais polímeros (blendas poliméricas) representa uma alternativa mais econômica e rápida de se obter um novo material com propriedades intermediárias às aquelas apresentadas pelos polímeros puros. A nova propriedade obtida dependerá da natureza e do estado físico dos polímeros originais, da forma de processamento da mistura, da faixa de composição dos componentes misturados e das interações entre estes componentes [87].

O processamento de blendas poliméricas consiste basicamente em duas etapas principais: a de mistura ou preparação e a de moldagem. Estas etapas influenciam nas propriedades finais da blenda polimérica. Na etapa de mistura ou de

preparação da blenda polimérica ocorre a incorporação dos componentes poliméricos, na qual se procura atingir o estado de mistura desejado. Por outro lado, em quase todos os processos de moldagem utiliza-se a blenda polimérica no estado fundido [88].

Blendas poliméricas podem ser classificadas em miscíveis ou imiscíveis. As blendas miscíveis apresentam-se homogêneas em escala molecular, portanto apresentam uma única fase. Nestas blendas existem interações específicas entre os segmentos dos polímeros, impedindo a separação de fases. Blendas imiscíveis apresentam duas fases distintas. Cada fase de uma blenda completamente imiscível contém um componente essencialmente puro enquanto as fases de blendas parcialmente imiscíveis podem conter um pouco de cada material na blenda [89, 90].

Existem vários estudos de blendas poliméricas na área biomédica. Pezzin e colaboradores [91] estudaram a degradação *in vitro* de blendas de poli(ρ -dioxanona)/poli(L ácido láctico) (PPD/PLLA) com diferentes composições preparadas por evaporação de solvente. Os autores concluíram que é possível controlar a taxa de degradação de uma blenda variando-se sua composição. Cascone e colaboradores [92] estudaram blendas utilizando dois polímeros naturais, colágeno (C) e ácido hialurônico (AH), e dois polímeros sintéticos, poli(ácido acrílico) (PAA) e poli(álcool vinílico) (PVA) e utilizaram essas blendas para preparar filmes, esponjas e hidrogéis que foram carregados com hormônio de crescimento (HC) para investigar possível uso em sistemas de liberação controlada. Os resultados mostraram que os HC podem ser liberados em esponjas de AH/PAA e AH/PVA e C/PVA hidrogéis e concluíram que a quantidade de HC liberada era significativamente dependente do AH ou do índice de C dos polímeros.

A literatura sobre estudo de blendas de PS e PMMA para aplicações biomédicas é bastante restrita. Morin e colaboradores [93] usaram microscopia eletrônica de foto emissão de raios-X (X-PEEM) para caracterizar um filme polimérico fino de PS/PMMA segregado, e para mapear a adsorção de fibrinogênio (uma proteína de plasma sanguíneo) nesta superfície de soluções aquosas isotônicas e tamponadas ou de baixa força iônica e não-tamponadas com concentrações variadas de fibrinogênio. Estes resultados demonstraram pela primeira vez que X-PEEM possui sensibilidade para localizar e detectar proteínas adsorvidas no nível sub-monocamada, enquanto simultaneamente detecta a

distribuição espacial das fases, e a distribuição das proteínas relativas às fases na superfície de um substrato polimérico com microfase inferior separada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Todos os polímeros foram utilizados sem nenhuma purificação adicional e nenhuma modificação estrutural.

Os seguintes reagentes foram utilizados durante o desenvolvimento do presente trabalho:

- ↳ Poli(estireno) (PS) - $M_w = 300.500 \text{ g mol}^{-1}$ adquirido da Sigma-Aldrich (Saint. Louis, EUA).
- ↳ Poli(metacrilato de metila) (PMMA) - $M_w = 139.595 \text{ g mol}^{-1}$ adquirido da Sigma-Aldrich (Saint. Louis, EUA).
- ↳ Poli(estireno-*b*-metacrilato de metila) PS-*b*-PMMA - $M_w = 780.000 \text{ g mol}^{-1}$ foi gentilmente cedido pelo professor Dr Redouane Borsali, da École Nationale Supérieure de Chimie et Physique de Bordeaux – França.
- ↳ Acetona (PA) – Nuclear (São Paulo, Brasil).
- ↳ Tetrahidrofurano (THF) (PA) – Nuclear (São Paulo, Brasil).
- ↳ Acetato de etila (PA) – Nuclear (São Paulo, Brasil).
- ↳ Clorofórmio (PA) – Nuclear (São Paulo, Brasil).
- ↳ Controle negativo (laminula de vidro).
- ↳ Células de camundongo L929 (linhagem de fibroblastos). As células foram fornecidas pela American Type Culture Collection, (ATCC, Manassas, USA).
- ↳ Meio de cultura celular Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM - Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO, EUA).
- ↳ Etilenodiamino tetracético (EDTA) 1 mmol L^{-1} .
- ↳ Solução fosfato-salina (PBS).
- ↳ Etanol 70% v/v.
- ↳ Corante May-Grünwald/Giemsa (Sigma Chemical Co. Saint Louis, MO, EUA).

4.2 Métodos

4.2.1 Solvente para preparo dos filmes

Um estudo preliminar foi realizado com quatro tipos de solução para preparação de filmes pelo método de evaporação do solvente (*casting*). Acetona, THF, acetato de etila e clorofórmio foram avaliados. O clorofórmio foi o solvente que solubilizou mais rapidamente os polímeros (2 horas) e possibilitou a obtenção de filmes mais homogêneos.

4.2.2 Preparação dos filmes

Os filmes foram preparados com diferentes proporções de PS e PMMA em clorofórmio, de modo a formar blendas nas composições 100/0, 70/30, 50/50, 30/70 e 0/100 (2% m/v). Em seguida foram acondicionados em frascos fechados e mantidos sob agitação por 24 horas à temperatura ambiente. Após a solubilização dos polímeros no solvente, as soluções poliméricas foram vertidas em placas de PTFE e mantidas em uma capela de exaustão a 25 °C por aproximadamente 24 horas até completa evaporação do solvente. Após a evaporação do solvente os filmes foram acondicionados em dessecadores para análises posteriores. A preparação do filme puro de PS-*b*-PMMA se deu seguindo o mesmo método.

4.2.3 Análise Térmica

4.2.3.1 Termogravimetria (TG)

A análise termogravimétrica foi realizada para identificar alterações estruturais das blendas quando comparadas aos polímeros puros e também para verificar o comportamento térmico dos filmes em estudo. Foi realizada em um analisador termogravimétrico modelo TGA-50 Shimadzu. As medidas foram conduzidas de 50 °C a 600 °C, em atmosfera inerte de nitrogênio com vazão de 50 mL min⁻¹ e taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, utilizando-se aproximadamente 2-7 mg de amostra.

4.2.3.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Este estudo foi realizado para averiguar a temperatura de transição vítrea (T_g) dos filmes dos polímeros puros e das blendas, bem como avaliar a compatibilidade dos polímeros em estudo. As análises foram realizadas utilizando-se um equipamento modelo DSC-50 da Shimadzu. Aproximadamente 4 mg de amostra foram aquecidos de 50 °C a 280 °C em atmosfera inerte de nitrogênio sob vazão de 50 mL min⁻¹ e taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹. A T_g foi calculada no ponto de inflexão na linha base causada pela variação do calor específico da amostra.

A equação de Fox foi utilizada para estimar os valores teóricos para T_g 's das blendas poliméricas. De acordo com a equação 1, T_{AB} , T_A e T_B denotam a T_g (em Kelvin) da blenda e dos polímeros puros A e B, respectivamente, enquanto w_A e w_B são as frações mássicas dos polímeros correspondentes.

$$\frac{1}{T_{AB}} = \frac{w_A}{T_A} + \frac{w_B}{T_B} \quad (1)$$

4.2.4 Análise estrutural

4.2.4.1 Espectroscopia na região de infravermelho (FTIR)

A análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada para verificar possíveis mudanças estruturais, bem como avaliar a compatibilidade dos polímeros estudados. Para a análise de FTIR os filmes foram preparados na concentração de 0,4% m/v. As análises foram realizadas em um instrumento Perkin-Elmer PC-16 com transformada de Fourier, com resolução de 4 cm⁻¹ em um alcance de 4000-400 cm⁻¹.

4.2.4.2 Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C no estado sólido (¹³C NMR)

Esta técnica foi também utilizada para verificar possíveis mudanças estruturais e para avaliar a compatibilidade dos polímeros em estudo. As análises de ¹³C NMR do estado sólido foram realizadas em um equipamento Varian (NMR 400

Hz). Os experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente usando um rotor TORLON (diâmetro de 5 mm), a uma velocidade de 5,5 kHz. O padrão de referência utilizado para análise de ^{13}C foi o hexametil benzeno (HMB), a fim de analisar o deslocamento químico dos átomos de carbono do grupo metila (17,3 ppm). Os experimentos de ^{13}C foram conduzidos utilizando polarização cruzada e rotação da amostra segundo o ângulo mágico (CP/MAS) com pulso de 90° e tempo de relaxação de 4 segundos com variação de tempo de contato (VCT). O tempo de contato foi definido a partir de diferentes taxas de varredura (200-600 μs), de acordo com a intensidade do sinal de ^{13}C .

4.2.5 Determinação do ângulo de contato em água

Esta técnica foi utilizada para verificar as propriedades de hidrofobicidade/hidrofilicidade da superfície dos filmes. Os ângulos de contato foram medidos após deposição de gotas de água destilada e deionizada sobre os filmes em estudo. Para tanto, utilizou-se um goniômetro DATA PHYSICS com *software* Image Tool especialmente concebido para este tipo de análise. As análises foram capturadas com uma câmera fotográfica de alta resolução. Foram realizadas cinco medidas independentes, em diferentes lados de cada filme, sendo que a média dos valores foi considerada.

4.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

Este estudo foi realizado para verificar o comportamento morfológico dos filmes. As amostras foram fraturadas em nitrogênio líquido, para observação da superfície de fratura. As micrografias dos filmes em estudo foram obtidas num microscópio eletrônico Phillips XL-50, com filamento de tungstênio como fonte de elétrons. As amostras foram recobertas com uma camada fina de ouro em um metalizador (ISI - D2 Diode Sputtering System).

4.2.7 Análise de adesão celular

4.2.7.1 Controle negativo

Este controle serviu como parâmetro para determinar a validade do ensaio a partir da resposta das células quando expostas a estas amostras. Neste estudo foi utilizada uma lamínula de vidro como controle negativo, por ser biologicamente não reativa.

4.2.7.2 Preparo da cultura de células

As células foram fornecidas pela American Type Culture Collection (ATCC) e foram mantidas em frascos plásticos sob congelamento a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, em meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM).

Para a utilização das células, foi realizado inicialmente o descongelamento das mesmas. Este descongelamento foi feito rapidamente em banho-maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação. Para o cultivo das células, o conteúdo do tubo criogênico foi transferido para um tubo de ensaio contendo o meio de cultura DMEM (Tabela 1) e centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado levado para garrafas de cultura. Neste momento foi acrescentada a solução DMEM. A suspensão celular foi mantida em incubadora em ambiente úmido a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e em atmosfera de 5% de CO_2 . Após 2-3 dias as células foram destacadas dos frascos com tripsina 0,25% m/v e etilenodiamino tetracético (EDTA) 1 mmol L^{-1} e colocadas em um novo frasco.

Tabela 1 – Meio de cultura DMEM utilizado para manutenção das células.

Solução DMEM
Soro fetal bovino (10% v/v)
Estreptomicina ($100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$)
Penicilina (100 UI mL^{-1})
Glutamina (2 mmol L^{-1})

4.2.7.3 Teste de citotoxicidade

As suspensões celulares foram dispostas em placas com 24 poços e incubadas em estufa a 37 °C e em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Após este período, a placa foi levada ao microscópio óptico para avaliação da viabilidade das células ou possível contaminação das mesmas.

Comprovada a integridade da cultura celular, as placas foram levadas à capela de fluxo laminar, onde cada poço foi lavado com solução fosfato-salina (PBS). A solução foi aspirada utilizando-se uma pipeta, sendo que o processo de lavagem realizado em triplicata para cada poço. Após este procedimento, os filmes poliméricos foram cortados em discos circulares, lavados com etanol 70% v/v, colocados sobre luz ultravioleta (UV) para esterilização e lavados diversas vezes com PBS. Após este período, o ensaio teve prosseguimento com a aplicação das amostras nos poços. Neste experimento, foi utilizada placa de 24 poços, e para evitar a flutuação dos filmes foi usado um anel de vidro para comprimi-los. As células foram destacadas dos frascos, contadas em um hemacitômetro e colocadas sobre as amostras em uma quantidade de 5×10^4 células/poço. A montagem da placa foi feita da seguinte maneira: os dois primeiros poços receberam os filmes de PS puro; nos próximos poços foram colocados, em duplicata, os filmes de PMMA puros, das blendas, do copolímero e por último foi colocado o controle negativo (lamínula de vidro). Em seguida, as placas foram levadas para incubação em estufa a 37 °C e em atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 horas. Após este período, as placas foram removidas da estufa e levadas ao microscópio óptico, ao qual foi acoplada uma câmera fotográfica, para análise dos resultados e obtenção das imagens.

A citotoxicidade foi determinada através de avaliação qualitativa e quantitativa. A avaliação qualitativa foi realizada pelo exame microscópico (óptico e SEM) das células para verificar mudanças na morfologia geral, vacuolização, destacamento e lise celular. O resultado permitiu classificação como atóxica, leve, moderada ou severa citotoxicidade, que também pode ser expressa por números 0, 1, 2 e 3, respectivamente. Para melhor visualização das células, empregou-se o corante May-Grünwald/Giemsa. A metodologia consiste na coloração sucessiva de eosinato de azul-de-metileno (May-Grünwald – 0,2 g may-grünwald diluído em 100 mL de álcool metílico) e de azul-eosina (Giemsa – 0,3 g giemsa em pó, 25 mL de glicerina diluídos em 25 mL de álcool metílico). A avaliação quantitativa foi realizada

pela contagem das células nos filmes e no controle, sendo selecionados 10 campos para cada filme.

4.2.7.4 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média e submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) com pós teste de comparação múltipla de Bonferroni. Os valores médios foram considerados significativamente diferentes quando a probabilidade da diferença caiu abaixo de 5% ($p < 0.05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise térmica

Com o objetivo de avaliar a estabilidade e as transições térmicas dos homopolímeros, blendas e copolímero foram realizados experimentos de termogravimetria e calorimetria diferencial de varredura. Os principais resultados são mostrados a seguir.

5.1.1 Termogravimetria (TG)

A análise da estabilidade térmica para os sistemas utilizados neste estudo é especialmente importante para se conhecer a temperatura máxima de trabalho com um material específico, principalmente quando houver necessidade de esterilização (como implantes em adesão celular). Um segundo aspecto é a possibilidade de se analisar a composição de blendas e do copolímero em termos das porcentagens de cada homopolímero presente. Com este objetivo, além das curvas termogravimétricas (TG) e primeiras derivadas (DTG), foram analisadas as desconvoluções das curvas de DTG.

A termogravimetria (TG) envolve a medida de variação de massa de uma amostra (processo de volatilização), como função da temperatura ou do tempo. A compreensão da degradação térmica de filmes poliméricos constitui um aspecto indispensável para o estabelecimento da aplicabilidade dos mesmos. Quando os materiais poliméricos são submetidos a um tratamento térmico podem apresentar mudanças estruturais caracterizadas pela ruptura de ligações químicas nas cadeias principais e laterais [45]. Desta forma, esta análise foi realizada para avaliar o comportamento térmico dos filmes em estudo, comparando-se os diferentes sistemas utilizados (polímeros puros, blendas e copolímero).

Parâmetros como temperatura na qual a velocidade de degradação é máxima (T_{max}), porcentagem de perda de massa dos principais estágios de degradação e porcentagem de resíduos sólidos gerados para o sistema PS, PMMA, PS/PMMA e PS-*b*-PMMA são mostrados na Tabela 2. As curvas termogravimétricas (TG) correspondentes e derivadas (DTG) para PS, PMMA, PS/PMMA e PS-*b*-PMMA são mostradas nas Figuras 5 e 6.

Tabela 2 – Parâmetros termogravimétricos para o sistema de PS, PMMA, PS/PMMA e PS-*b*-PMMA.

PS/PMMA (% m/v)	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Massa residual a 600 °C (%)
	T	P	T	P	T	P	
100/0	-	-	-	-	440	99,8	0,2
70/30	-	-	-	-	437	97,0	3,0
50/50	65	1,3	192	2,7	436	95,4	0,6
30/70	-	-	182	1,6	398	94,9	3,5
0/100	-	-	194	5,3	396	92,4	2,3
PS- <i>b</i> -PMMA	295	6,4	400	45,9	430	45,4	2,3

T = Temperatura de máxima velocidade de degradação (°C)

P = Porcentagem de perda de massa.

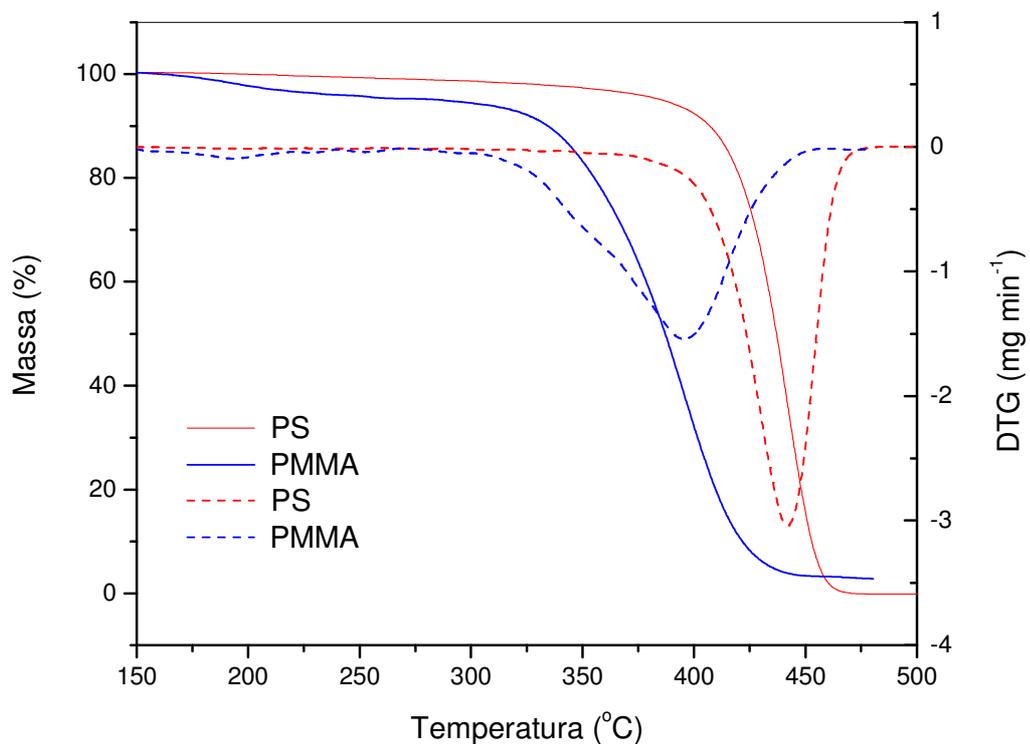


Figura 5 – Curvas de TG (—) e DTG (----) para filmes de PS e PMMA puros.

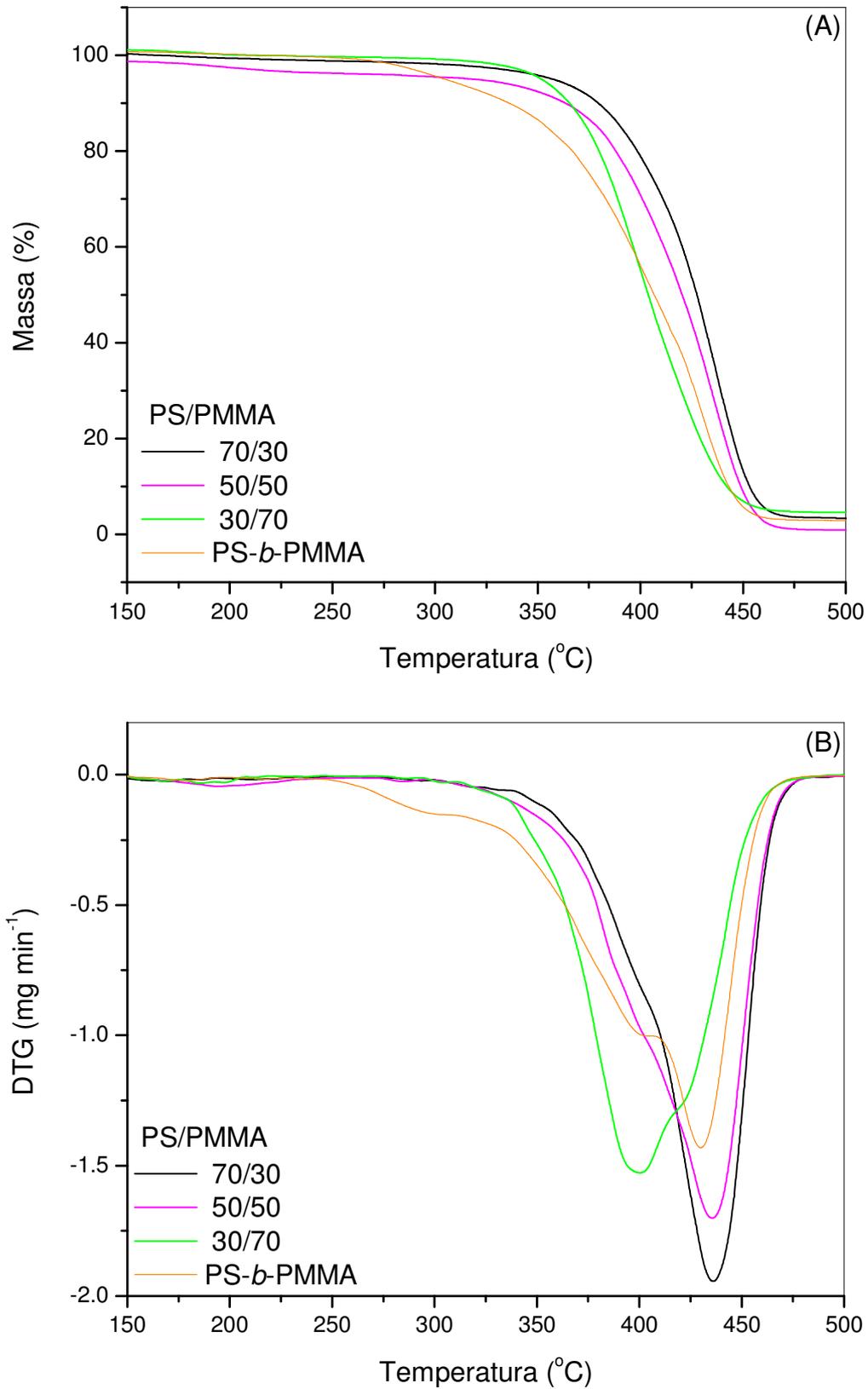


Figura 6 – Curvas de (A) TG e (B) DTG para blendas PS/PMMA e para o copolímero.

Para os sistemas PS e PMMA puros, estágios principais com perdas de massa de 99,8% e 92,4%, respectivamente, foram observados. Estas perdas ocorreram nas faixas de temperatura de 365 a 475 °C ($T_{\max} = 440$ °C) e 300 a 450 °C ($T_{\max} = 396$ °C), respectivamente, sugerindo uma maior estabilidade térmica para o PS.

A blenda com 70% de PS apresentou um único estágio de degradação com T_{\max} de 437 °C com perda de massa de 97 %, ou seja, valores muito próximos ao PS puro, caracterizando a predominância deste componente na blenda.

Ainda, conforme observado na Figura 5, no PMMA o processo de degradação inicia em 160 °C ($T_{\max} = 194$ °C) com 5,3% de perda de massa. Conforme a Tabela 2 e Figura 6, este comportamento foi observado também nas blendas PS/PMMA 50/50 e 30/70 (T_{\max} de 192 °C e 182 °C, respectivamente).

Dados da literatura [94] sugerem que nesta temperatura deve ter início o processo de perda do grupo metóxi (radical), conforme esquema representado na Figura 7. A degradação térmica do PMMA é um processo caracterizado por rendimentos elevados de monômeros nos produtos de degradação e decréscimo lento da massa molar do polímero [94,95]. Esta característica explica o fato dos estágios a aproximadamente 190 °C corresponderem a perdas de massa entre 1,5 e 5,5%, quando comparado ao estágio principal cujos valores de perda de massa são maiores que 90%. Para os mesmos sistemas, os estágios de perda de massa na faixa de temperatura de 396 a 436 °C correspondem à degradação total do polímero, ou seja, ocorre a cisão das ligações C-C (Figura 8) que são as ligações mais estáveis na estrutura do PMMA.

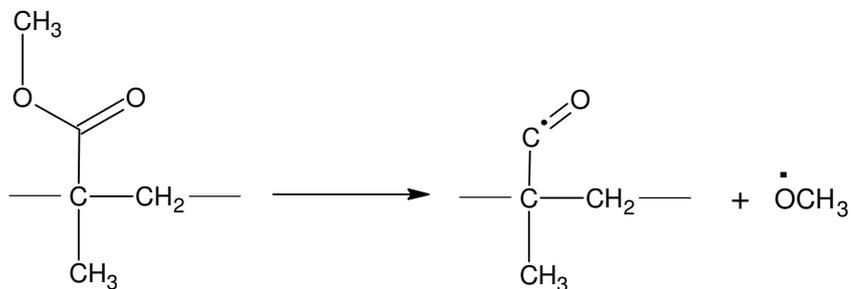


Figura 7 – Representação esquemática da reação de perda do grupo metóxi no PMMA [94].

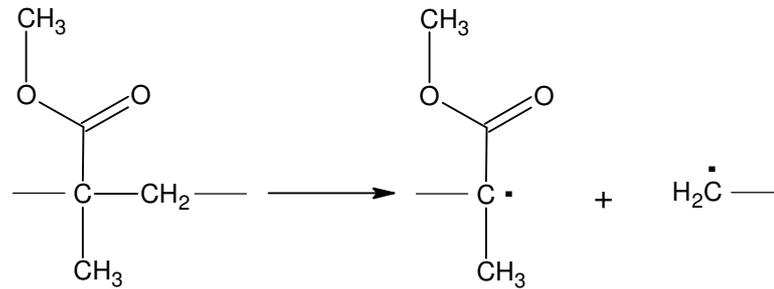


Figura 8 – Representação esquemática da quebra da ligação C-C na degradação do PMMA [94].

No caso da blenda PS/PMMA 50/50, foi observada uma pequena perda de massa a 65 °C (1,3%) atribuída à umidade residual ou presença de solvente na amostra.

Por outro lado, como esperado, o copolímero PS-*b*-PMMA degrada em dois estágios principais de perda de massa: T_{max} em 400 °C e 430 °C com 45,9% e 45,4% de perda de massa, respectivamente [96].

Em termos do mecanismo de degradação, o filme de PS puro que degrada num único estágio ($T_{max} = 440$ °C e 99,8% de perda de massa), tem sido geralmente associado à cisão randômica da cadeia, seguida por transferência intramolecular [94,97], conforme mostrado na Figura 9. O PS despolimeriza via reações de radicais livres e o produto volátil principal é o seu monômero estireno. Entretanto, devido à transferência de cadeia intramolecular, apenas cerca de 40 % do monômero é formado [45].

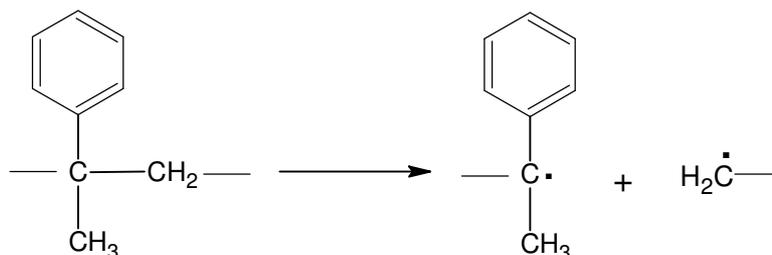


Figura 9 – Processo de degradação do poli(estireno) [94].

Com o objetivo de avaliar a característica das blendas PS/PMMA e do copolímero PS-*b*-PMMA em termos das composições (proporcionalidade entre os homopolímeros), foram realizadas as desconvoluções das curvas de DTG para estes sistemas (Figura 10). Um segundo aspecto da análise é a possibilidade de melhor definir o processo de degradação, principalmente das blendas PS/PMMA 70/30 e 50/50 que, de acordo com a Figura 6, parece ocorrer num único estágio. Os valores percentuais foram calculados considerando somente as áreas dos dois picos principais (soma percentual de 100%).

Para análise dos resultados mostrados na Figura 10 é importante destacar que as massas molares dos homopolímeros PS e PMMA nas blendas são significativamente diferentes e os valores percentuais determinados na desconvolução refletem esta diferença. Parece evidente, no entanto, o fato de que com o aumento da quantidade de PMMA na blenda, ocorre um aumento progressivo da porcentagem correspondente ao primeiro pico de desconvolução (Figuras 10A a 10C), ou seja, do pico associado com a degradação do PMMA, confirmando a maior estabilidade do PS nos sistemas estudados.

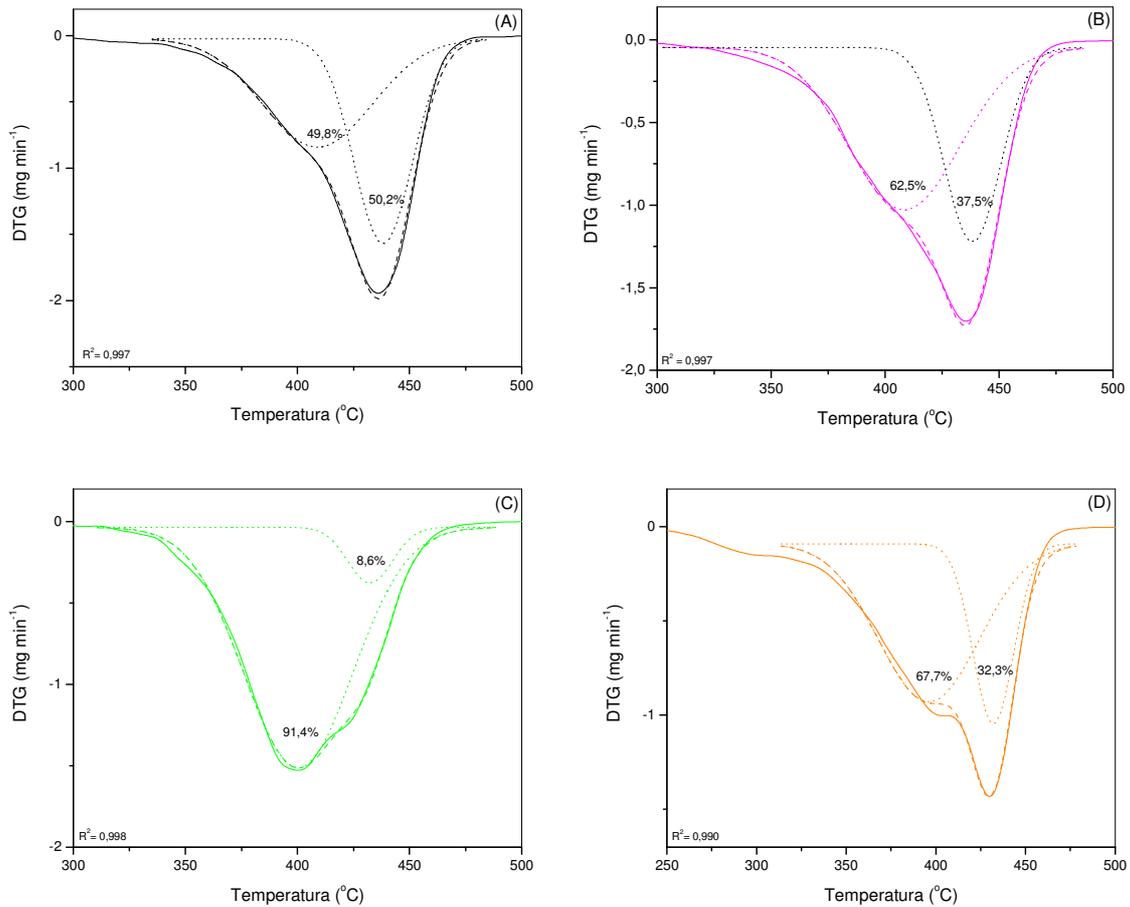


Figura 10 – Desconvolução das curvas de DTG para blendas PS/PMMA (A) 70/30, (B) 50/50, (C) 30/70 e (D) PS-*b*-PMMA.

O copolímero apresenta praticamente o mesmo perfil da blenda PS/PMMA 50/50, inclusive com relação às porcentagens associadas às áreas dos dois picos principais (o terceiro pico em $T_{\max} = 295$ °C não foi considerado na desconvolução). No caso do copolímero, a diferença nas massas moleculares dos homopolímeros ($310.000 \text{ g mol}^{-1}$ (bloco PS) e $470.000 \text{ g mol}^{-1}$ (bloco PMMA)), não é significativamente grande quando comparada aos mesmos dois componentes das blendas ($310.000 \text{ g mol}^{-1}$ (PS) e $139.000 \text{ g mol}^{-1}$ (PMMA)); no entanto, há uma grande similaridade entre as áreas dos picos para a blenda PS/PMMA 50/50 e copolímero.

Em resumo, os estudos associados com a análise termogravimétrica e desconvolução dos picos das derivadas primeiras para as blendas PS/PMMA e

copolímero PS-*b*-PMMA sugerem uma maior estabilidade do PS em relação ao PMMA. Aparentemente, o PMMA, por ser um polímero com uma cadeia mais ramificada (grupos ésteres), é mais suscetível à degradação do que o PS. Por outro lado, é necessário destacar que para o objetivo do presente estudo, tanto os materiais puros como as blendas e copolímero são estáveis termicamente.

5.1.2 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Um dos métodos utilizados para estimar a miscibilidade e compatibilidade em sistemas poliméricos é a determinação da temperatura de transição vítrea (T_g), que pode ser interpretada como a faixa de temperatura em que o movimento das macromoléculas aumenta. A T_g é definida como uma transição de segunda ordem, e é característica de um material amorfo ou semi-cristalino. Uma blenda é considerada miscível quando apresenta um único tipo de domínio e observa-se apenas uma T_g . No caso de blendas imiscíveis, são formados domínios separados e não há interação entre as cadeias poliméricas, apresentando duas T_g 's [45]. As temperaturas de transição vítrea para os polímeros puros, para as blendas em diferentes composições e para o filme do copolímero estão mostradas na Tabela 3.

As curvas de DSC para os filmes do PS e PMMA puros (Figura 11-A) evidenciaram uma única T_g a aproximadamente 88 e 101 °C, respectivamente, e esses valores são concordantes com os descritos na literatura [98,99]. Além disso, pode ser confirmado pela ausência da temperatura de fusão (T_m) que os polímeros estudados são amorfos.

No caso das blendas, as curvas de DSC (Figura 11-A) mostraram duas T_g 's distintas em todas as composições estudadas. As blendas com composições 50/50 e 30/70 apresentaram duas T_g 's muito próximas das T_g 's dos homopolímeros puros.

O valor da T_{g1} (correspondente ao PS puro) para a blenda na composição 30% de PMMA foi de 65,3 °C, apresentando um decréscimo significativo quando comparado ao filme de PS puro (88,2 °C).

Silva e colaboradores [100] avaliaram o comportamento das blendas de PS/PMMA nas composições 40/60, 50/50 e 60/40% m/v preparadas por três diferentes métodos, entre os quais, por evaporação de solvente (casting). Os autores avaliaram as propriedades térmicas das blendas utilizando TGA, DSC e

MDSC (DSC modulado). As blendas estudadas apresentaram duas T_g 's distintas, correspondentes aos polímeros puros, caracterizando um sistema imiscível. A blenda com 40% de PMMA apresentou um surpreendente decréscimo também na T_{g1} quando comparada ao PS puro. De acordo com os autores, esse resultado aponta a existência de uma quantidade de material na interface, no caso de blendas preparadas por casting, embora os autores não considerem esta hipótese conclusiva devido à complexidade do sistema. No caso do presente estudo, na blenda PS/PMMA 70/30 a diminuição da T_{g1} de 88,2 °C para 65,3 °C sugere uma certa compatibilidade entre os componentes devida à melhor distribuição do PMMA (30%) na superfície da matriz principal de PS (70%). Isto concorda, portanto, com os resultados descritos por Silva e colaboradores [100]. Um outro aspecto é o fato de que na análise por microscopia eletrônica de varredura (discutida no item 5.4.1), praticamente não foram observados domínios específicos de um ou outro componente na blenda, sugerindo certa compatibilidade neste sistema.

Tabela 3 – Resultados da análise de DSC para o sistema de PS e PMMA.

PS/PMMA (% m/v)	T_{g1} (°C)	T_{g2} (°C)	T_g Fox (°C)
100/0	88,2	-	88,2
70/30	65,3	94,5	91,7
50/50	82,4	98,0	94,3
30/70	88,0	104,6	96,9
0/100	101,1	-	101,1
P(S- <i>b</i> -MMA)	98,7	122,2	-

Como descrito anteriormente, a determinação da T_g possibilita o conhecimento de miscibilidade dos polímeros que compõem as blendas. Duas T_g 's distintas foram observadas para as blendas em temperaturas muito próximas das T_g 's dos homopolímeros puros (exceto para a blenda com composição 70/30). A primeira corresponde ao PS e a segunda é atribuída ao PMMA, sugerindo imiscibilidade entre os dois polímeros. Outra maneira de avaliar a miscibilidade de blendas poliméricas é comparar o valor da T_g experimental com o valor teórico, e esta comparação pode ser realizada através da equação de Fox (Equação 1).

Caso estivessem ocorrendo interações entre os polímeros, fato que favoreceria a miscibilidade, seria observada uma única T_g e esta deveria ser intermediária às T_g 's dos homopolímeros puros e o valor muito próximo à T_g de Fox (Tabela 3), o que torna mais uma vez evidente a imiscibilidade das blends.

No caso do copolímero, a curva de DSC (Figura 11-B) mostrou duas T_g 's distintas. A primeira corresponde ao bloco de PS e a segunda ao bloco de PMMA. Uma mudança significativa na T_g foi observada quando comparado o valor da T_g correspondente ao bloco de PMMA (122,2 °C) à T_g do PMMA puro (101,1 °C). Neste caso, o aumento da T_g pode ser explicado tanto em função da variação da massa molar como pela mudança estrutural, já que no copolímero as unidades monoméricas estireno e acrilato foram ligadas covalentemente, enquanto que na blenda ocorreu somente a mistura física dos dois homopolímeros (PS e PMMA). Em termos de massas molares, o copolímero do tipo bloco utilizado neste estudo possui massa molar de 780.000 g mol⁻¹, sendo 470.000 g mol⁻¹ correspondente ao bloco de PMMA, enquanto que o PMMA utilizado na blenda possui massa molar de 139.500 g mol⁻¹. O tamanho das cadeias afeta decisivamente a temperatura de transição vítrea, visto que cadeias menores apresentam maior mobilidade que cadeias maiores; sendo assim, o aumento da massa molar da cadeia polimérica favorece o aumento da T_g .

Para o PS bloco, o valor da T_g também foi aumentado em cerca de 10 °C quando comparado ao PS puro. Este caso também pode ser explicado pela influência da massa molar, pois a massa molar do PS bloco (310.000 g mol⁻¹) é um pouco superior ao PS puro (300.500 g mol⁻¹). Neste caso, a diferença da massa molar foi menor; entretanto, a diferença da T_g também será menor quando comparada ao PMMA.

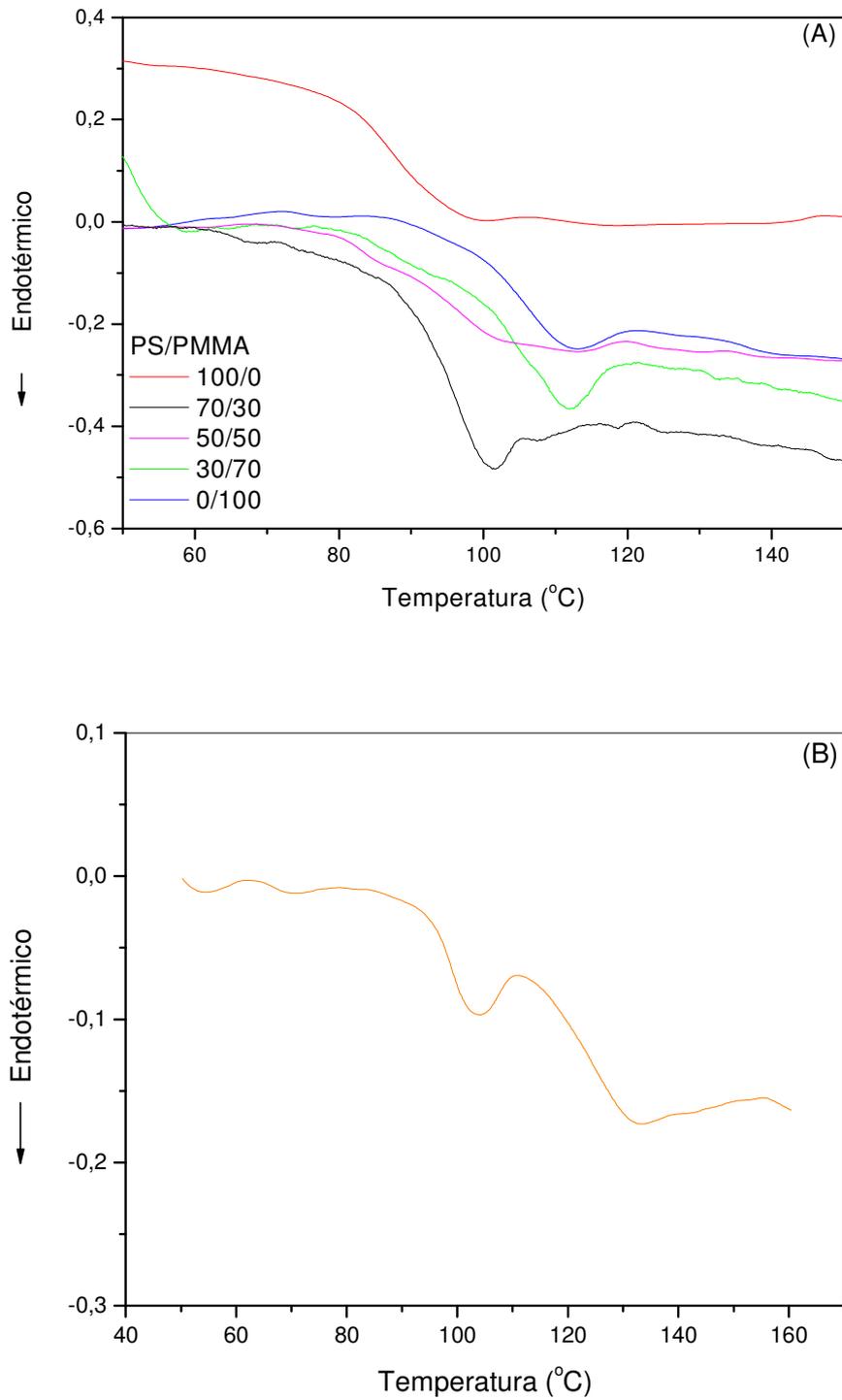


Figura 11 – Curvas de DSC para: (A) filmes de PS e PMMA puros e blendas PS/PMMA e (B) filme de PS-*b*-PMMA.

5.2 Análise Estrutural

5.2.1 Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

Outra técnica utilizada para a avaliação das possíveis interações existentes entre os polímeros na blenda e para o estudo da miscibilidade e/ou compatibilidade foi a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Esta técnica é uma das técnicas de caracterização de polímeros mais utilizada a nível molecular.

A Figura 12 mostra os espectros na região do infravermelho dos filmes de PS e PMMA puros e das blends em diferentes composições.

Para o filme de PS puro, observam-se claramente as bandas de absorção em 3026 cm^{-1} (estiramento da ligação C-H em anel aromático), 2922 cm^{-1} (estiramento assimétrico da ligação C-H alifático), 2852 cm^{-1} (estiramento simétrico da ligação C-H alifático), $2000\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ (ligações harmônicas ou frequências de combinação), 1594 , 1488 e 1447 cm^{-1} (estiramento da ligação C=C do anel aromático), 756 cm^{-1} (deformação angular fora do plano das ligações (C=C)-H do anel aromático) e $800\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ (padrão aromático monossubstituído) [101, 102].

O espectro de FTIR para o filme de PMMA puro apresenta bandas em 2993 , 2950 e 2854 cm^{-1} , correspondentes aos estiramentos vibracionais das ligações de C-H₃ e C-H₂, indicando um grande conteúdo de hidrogênio como C-H_x do PMMA. O espectro mostra também uma banda intensa em aproximadamente 1728 cm^{-1} correspondente ao estiramento C=O. Esta banda não está conjugada com o grupo éster (carbonila livre). A banda com absorção em $1443\text{-}1387\text{ cm}^{-1}$ corresponde aos estiramentos das ligações C-H₃, O-CH₃ e C-H₂. A banda em $1192\text{-}1149\text{ cm}^{-1}$ é característica da deformação angular C-H no plano. A banda em 987 cm^{-1} corresponde ao estiramento simétrico da ligação C-O no C-O-C [103,104]

Analisando primeiramente a sobreposição dos espectros na região $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ para os filmes de PS e PMMA puros e para as blends (Figura 12), pode-se observar que os espectros obtidos para as diferentes composições foram muito semelhantes diferindo apenas na intensidade da resposta, fato este decorrente da própria diferença na composição mássica das blends.

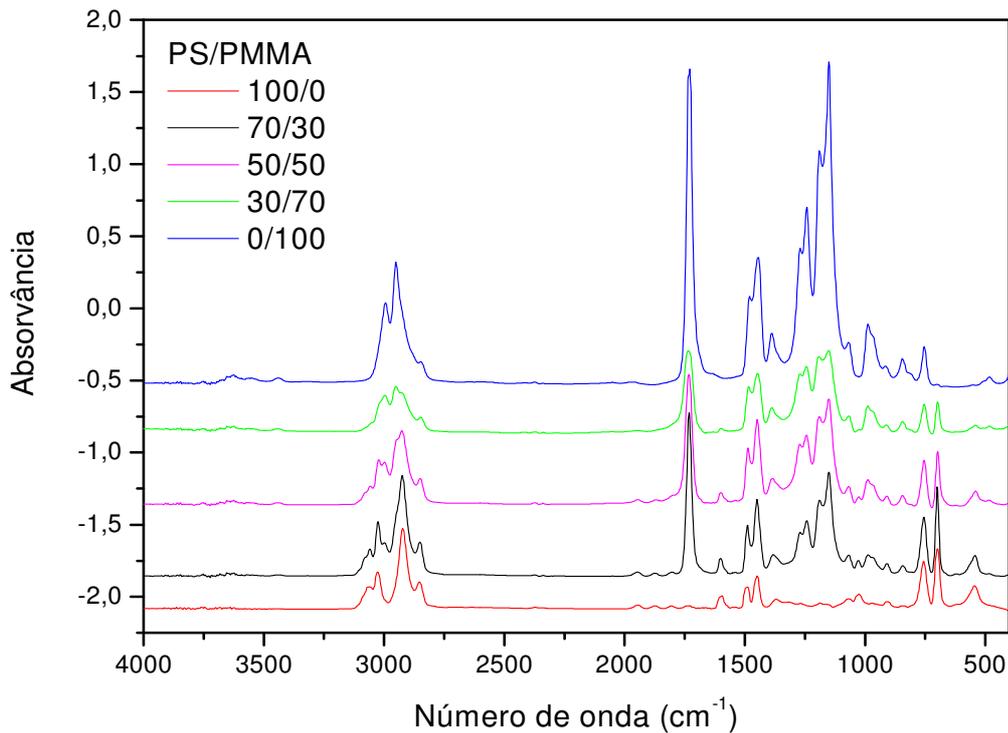


Figura 12 – Sobreposição dos espectros de infravermelho para os filmes de PS e PMMA puros e para as blendas em diferentes composições na região de 400 a 4000 cm^{-1} .

A banda da carbonila é a mais freqüentemente utilizada para analisar a estrutura do PMMA. A Figura 13-A mostra a sobreposição dos espectros na região 1700-1800 cm^{-1} para os filmes de PS e PMMA puros e para as blendas. Com a adição de PMMA nas blendas, não houve nenhum deslocamento considerável para a banda relacionada com o grupo carbonila, apenas mudanças na intensidade e na largura das bandas.

A adição de PMMA nas blendas também provocou diminuição da intensidade de bandas características do PS. Analisando a sobreposição dos espectros na região 2950-3100 cm^{-1} para os filmes de PS e PMMA puros e para as blendas (Figura 13-B), pode-se observar que a banda relacionada ao estiramento de ligações C-H em anel aromático vai diminuindo com a composição de PMMA e desaparece completamente com 70% de PMMA. De acordo com esta análise, pode-se sugerir

que as blendas estudadas são imiscíveis, concordando, portanto, com as análises de DSC. Por outro lado, os pequenos deslocamentos e alargamento de algumas bandas características de PS e PMMA podem estar relacionadas com certo grau de compatibilidade entre os componentes.

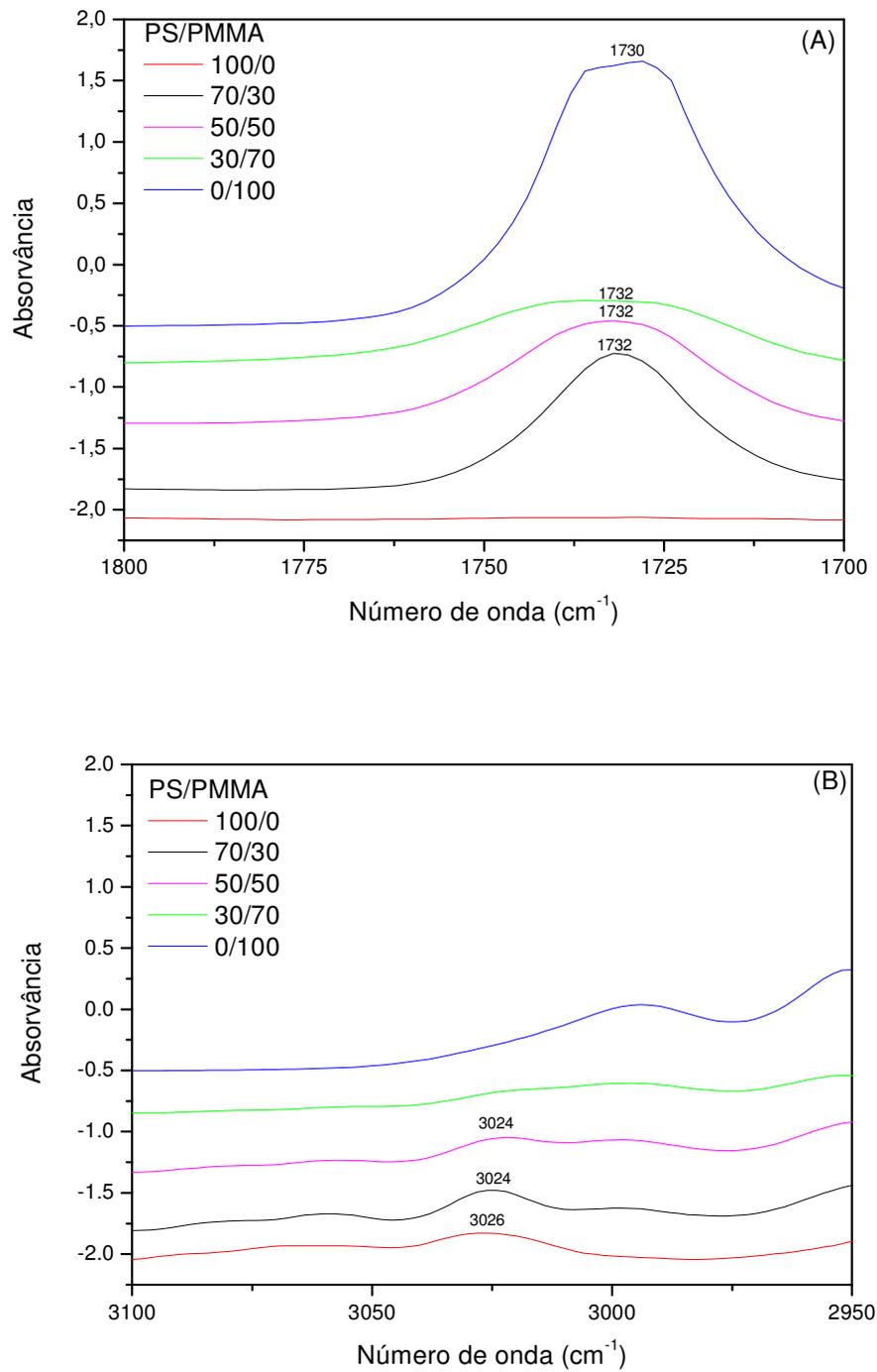


Figura 13 – Sobreposição dos espectros de infravermelho para os filmes de PS e PMMA puros e para as blendas em diferentes composições: (A) região de 1700-1800 cm^{-1} e (B) região de 2950-3100 cm^{-1} .

O espectro do copolímero (Figura 14) apresenta bandas características dos filmes de PS e PMMA puros. As bandas características do PS aparecem em 3026 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento da ligação C-H do anel aromático. Outra banda característica do PS aparece em 1600 cm^{-1} , sendo esta correspondente ao estiramento da ligação C=C do anel aromático. A banda em 2928 cm^{-1} corresponde ao estiramento assimétrico da ligação C-H alifático. As últimas bandas características ao PS aparecem em 696 e 542 cm^{-1} , sendo estas características do padrão aromático monossustituído. As bandas características do PMMA puro aparecem em 2995 cm^{-1} e 2852 cm^{-1} , características dos estiramentos vibracionais das ligações CH_3 e CH_2 , respectivamente; 1730 cm^{-1} característica da banda de estiramento C=O; $1444\text{-}1385\text{ cm}^{-1}$ correspondentes aos estiramentos das ligações CH_3 , O-CH_3 e CH_2 ; 1150 cm^{-1} característica da deformação angular C-H no plano; e 979 cm^{-1} atribuída ao estiramento simétrico da ligação C-O no C-O-C.

Para uma melhor visualização dos espectros dos polímeros puros e do copolímero, a Figura 15 mostra a sobreposição destes espectros, sendo evidente que o espectro do copolímero é praticamente uma sobreposição dos espectros dos homopolímeros, apresentando bandas características do PS e PMMA puros.

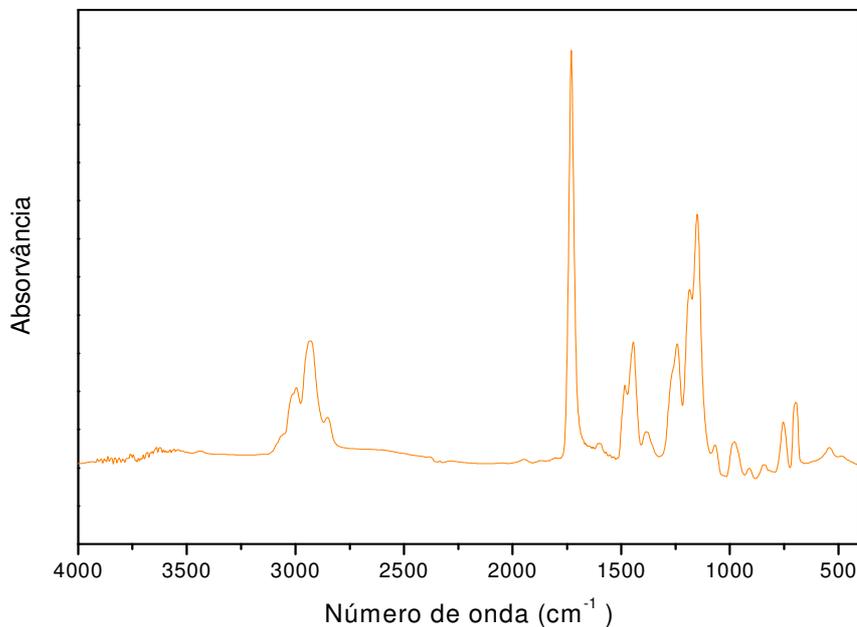


Figura 14 – Espectro de infravermelho para o filme de PS-*b*-PMMA.

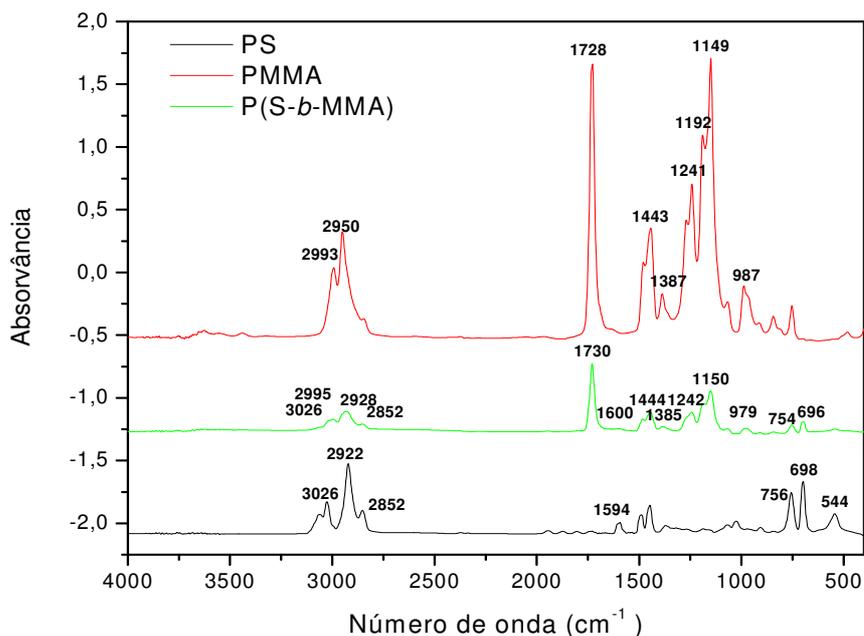


Figura 15 – Sobreposição dos espectros dos polímeros puros e do copolímero.

5.2.2 Ressonância magnética nuclear de ^{13}C no estado sólido

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é uma ferramenta muito útil no estudo e caracterização de materiais poliméricos. A análise de ^{13}C CP/MAS NMR permite obter espectros com alta resolução, quando comparados aos de NMR obtidos em solução. Além disso, o estudo de estrutura-propriedade pode ser investigado com maior precisão [105].

Assim como a análise de FTIR, a análise de ^{13}C CP/MAS NMR permite obter informações quanto à miscibilidade e possível compatibilidade dos polímeros formadores das blendas.

A análise de ^{13}C CP/MAS foi realizada considerando os átomos de carbono numerados de acordo com as estruturas dos polímeros mostradas nas Figuras 16 e 18.

A Figura 16 mostra os espectros correspondentes aos polímeros puros. O espectro correspondente ao PS puro (Figura 16-A) apresenta os seguintes picos e respectivas atribuições: picos na região de 126-145 ppm correspondentes aos

carbonos C₁, C₂, C₃ e C₄ associados ao anel aromático; os carbonos C₅ e C₆ correspondentes aos grupos alifáticos aparecem em aproximadamente 40 ppm [106]. Os sinais que aparecem nos deslocamentos químicos próximos a 70 e a 180-200 ppm podem estar relacionados à presença de umidade na amostra durante as medidas. Já o sinal em 16,6 ppm é característico de bandas laterais formadas ao longo da cadeia polimérica.

O espectro correspondente ao PMMA puro (Figura 16-B) apresenta os seguintes picos e respectivas atribuições: pico em aproximadamente 45 ppm atribuído ao carbono C₁ (carbono do grupo metóxi); o carbono C₂ aparece em aproximadamente 178 ppm e corresponde ao carbono da carbonila, o carbono quaternário C₃ aparece em 40 ppm e os carbonos C₄ e C₅ aparecem em aproximadamente em 52 e 18 ppm, respectivamente [107, 108].

A sobreposição dos espectros para os polímeros puros e para as blendas em diferentes composições é mostrada na Figura 17. Na região de 40-60 ppm aparecem três sinais quando comparado ao PS puro que apresenta apenas um. Os dois sinais que aparecem em 42 e 51 ppm correspondem aos carbonos C₃ e C₄ do PMMA, respectivamente. Os valores destes carbonos na blenda são aproximadamente os mesmos quando comparados ao PMMA puro. Nesta mesma região aparece um sinal em aproximadamente 39 ppm referente aos carbonos C₅ e C₆ do PS.

Com a presença de PMMA nas blendas, somente mudanças nas intensidades dos picos foram observadas. As intensidades variam de acordo com a composição dos componentes nas blendas, sugerindo imiscibilidade entre os componentes, como foi descrito nas outras análises realizadas neste trabalho. Entretanto, mesmo o estudo de ¹³C CP/MAS indicando imiscibilidade, algumas mudanças na linha base foram observadas. A imiscibilidade entre PS e PMMA também foi estudada por Guerrica-Echevarria e colaboradores [109] e Fekete e colaboradores [110], usando análise térmica, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de infravermelho e por Cai e colaboradores [111] por estudos de reologia dinâmica; Yilmaz e colaboradores [112] analisaram a miscibilidade de blendas por viscosidade.

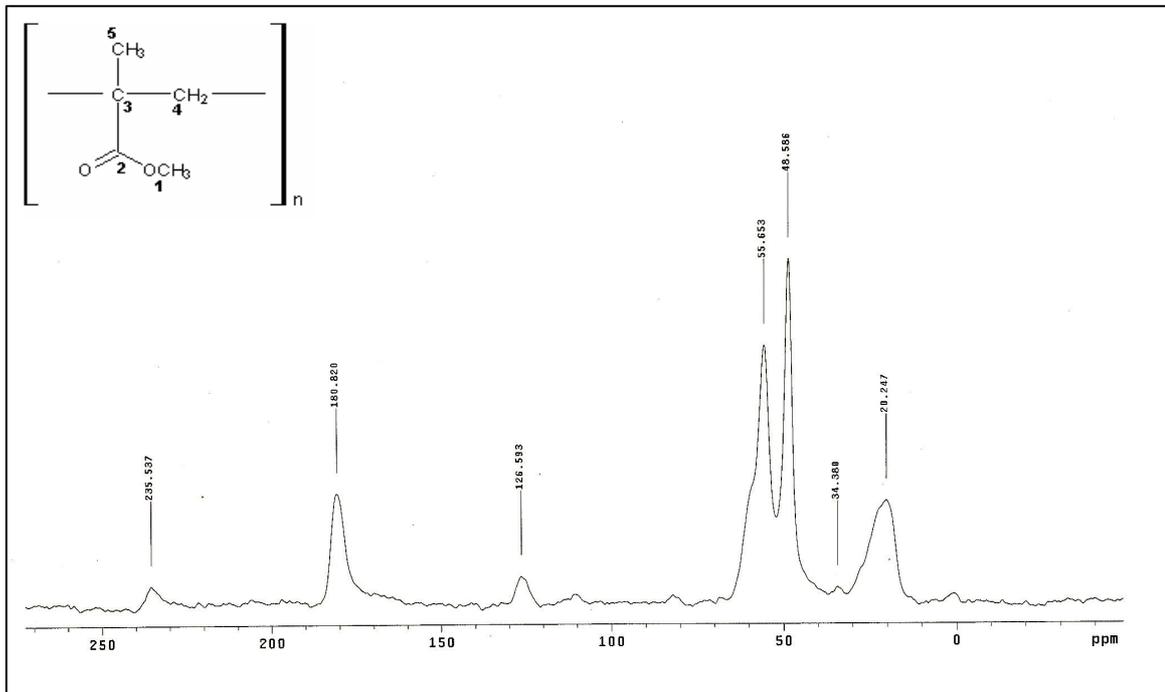
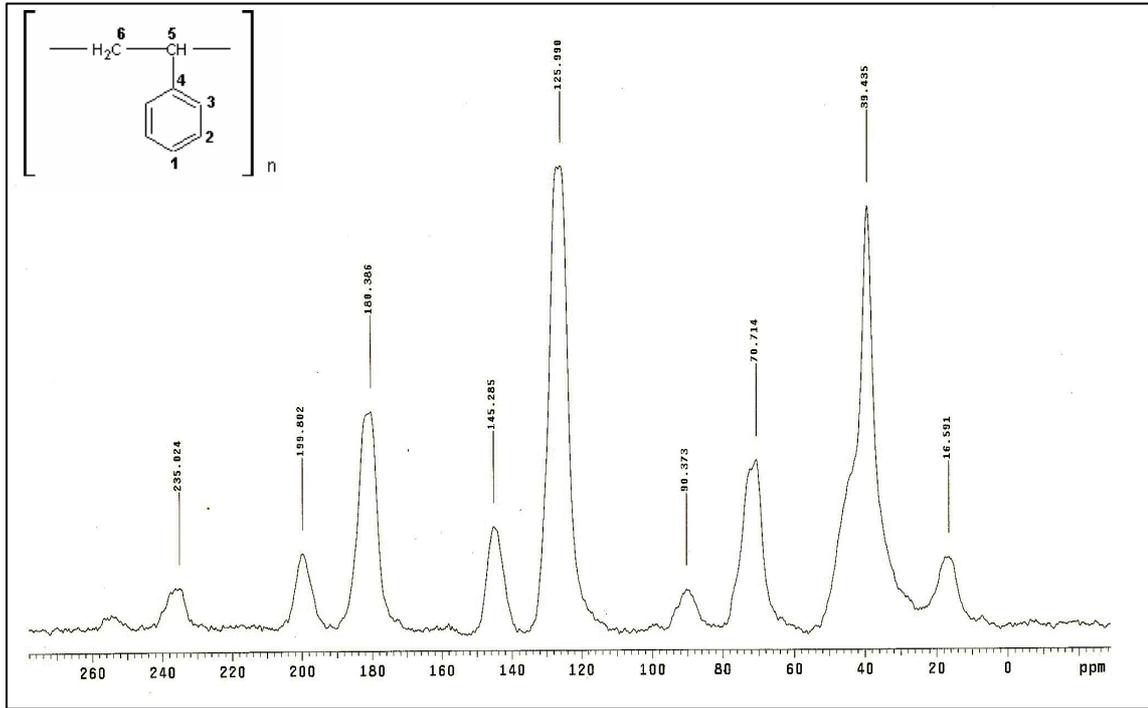


Figura 16 – Espectros de ^{13}C CP/MAS NMR para os filmes de polímeros puros (A) PS puro e (B) PMMA puro.

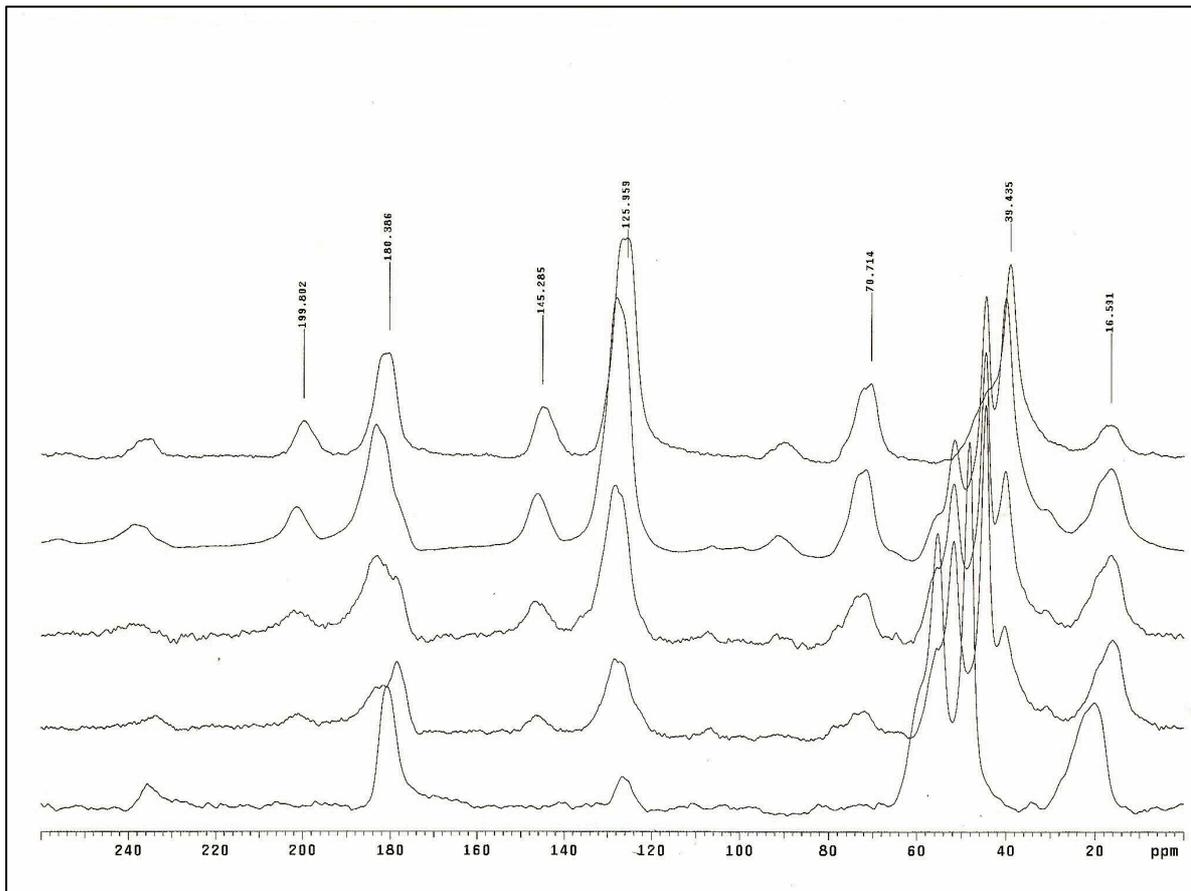


Figura 17 – Espectros de ^{13}C CP/MAS NMR para os filmes poliméricos (A) PS puro, (B) PS/PMMA 70/30, (C) PS/PMMA 50/50, (D) PS/PMMA 30/70 e (E) PMMA puro.

Para efeito de comparação, a Figura 18 mostra o espectro de ^{13}C CP/MAS para o filme do copolímero. O espectro do copolímero apresenta picos correspondentes aos homopolímeros puros. Como exemplo, picos na região de 126 a 145 ppm correspondentes aos átomos de carbono C_1 , C_2 , C_3 e C_4 associados ao anel aromático do PS puro e o pico em 40 ppm corresponde aos átomos de carbono C_5 e C_6 também do PS puro. Além dos picos correspondentes ao PS puro, o espectro do copolímero também apresenta regiões características do PMMA puro. A região de aproximadamente 45 ppm corresponde ao carbono C_1 do PMMA puro; o pico em 178 ppm é correspondente ao átomo de carbono C_2 também do PMMA puro. Através da análise deste espectro pode-se evidenciar novamente a imiscibilidade dos polímeros puros.

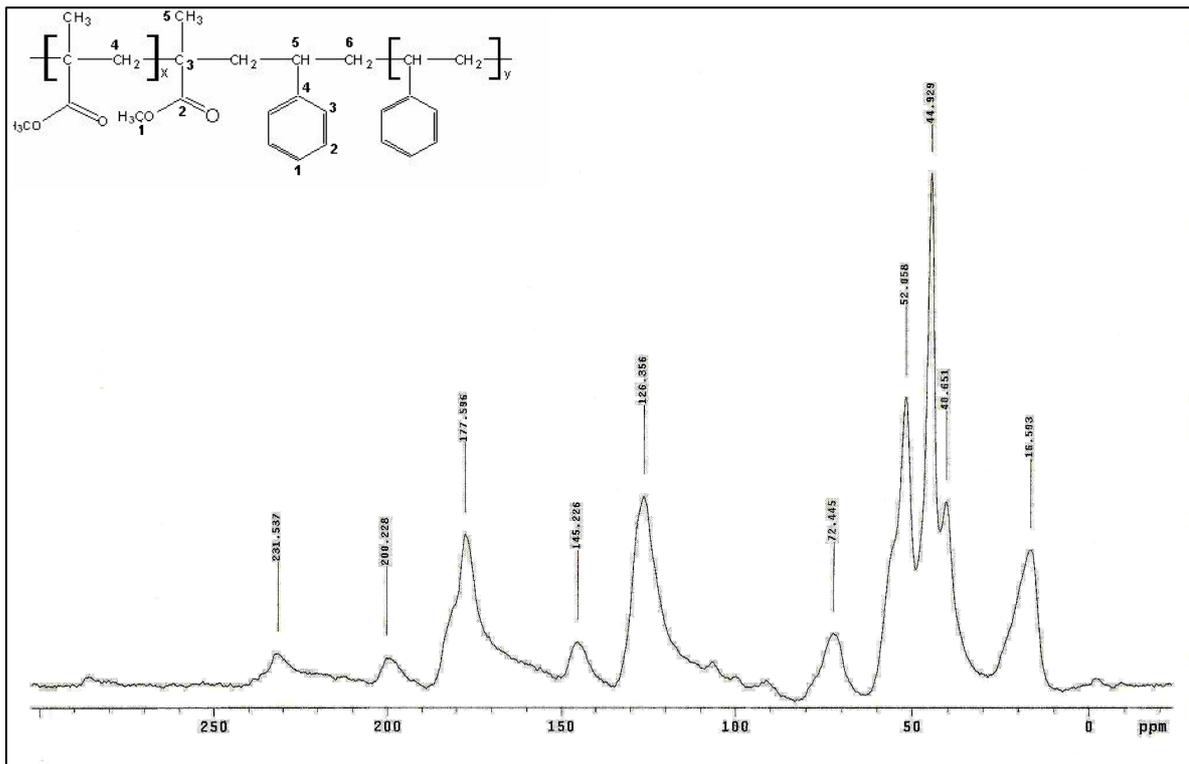


Figura 18 – Espectro de ^{13}C CP/MAS NMR para o filme de copolímero.

5.3 Análise de Superfície

5.3.1 Determinação do ângulo de contato

O ângulo de contato é definido como o ângulo entre um plano tangente a uma gota do líquido e um plano contendo a superfície onde o líquido se encontra depositado. A condição para a completa molhabilidade de uma superfície sólida é obter ângulo de contato é igual à zero. Esta condição é totalmente alcançada quando as forças de atração entre líquido e sólido são iguais ou maiores que as forças da interface líquido-líquido (coesão) [113].

A hidrofiliabilidade é um dos fatores mais importantes que afetam a citocompatibilidade de biomateriais. A adesão e crescimento das células nas superfícies são considerados como fortemente influenciados pelo balanço hidrofiliabilidade/hidrofobicidade, freqüentemente descritos como molhabilidade. Alguns trabalhos demonstraram que a maior parte das células adere, espalha-se e

crece mais facilmente em substratos com hidrofiliidade moderada do que em substratos hidrofóbicos ou muito hidrofílicos [14,114].

Os valores dos ângulos de contato para a superfície dos filmes puros de PS e PMMA, blendas em diferentes composições e copolímero, bem como o perfil das gotas de água na superfície dos filmes estão apresentados na Figura 19 e 20, respectivamente.

O ângulo de contato para os filmes de PS, PS/PMMA 70/30, PS/PMMA 50/50, PS/PMMA 30/70, PMMA puro e PS-*b*-PMMA foram: $94,98^\circ \pm 0,26$, $85,27 \pm 0,45$, $80,75 \pm 0,47$, $82,4 \pm 0,85$, $86,10 \pm 0,29$ e $82,75 \pm 1,79$, respectivamente. Os resultados mostram que o filme de PS puro tem a superfície mais hidrofóbica quando comparado aos demais filmes e o filme de PS/PMMA 50/50 possui a superfície mais hidrofílica.

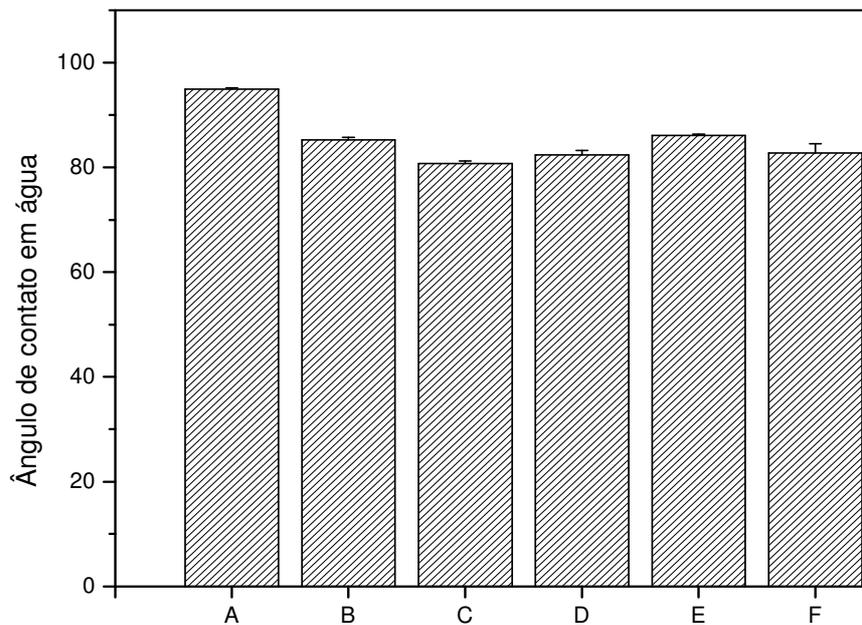


Figura 19 – Ângulo de contato para a superfície dos filmes (A) PS puro, (B) PS/PMMA 70/30, (C) PS/PMMA 50/50, (D) PS/PMMA 30/70, (E) PMMA puro e (F) PS-*b*-PMMA.

De maneira geral, pode-se esperar um pequeno aumento da hidrofiliçidade à medida que é aumentada a composição de PMMA nas blendas, pois a estrutura do PMMA apresenta grupos livres para realizar ligação de hidrogênio com a água. Entretanto, o PMMA puro apresenta ângulo de contato um pouco superior ao das blendas. A explicação reside no fato de que ângulos de contato de superfícies poliméricas são influenciados por fenômenos como rugosidade, heterogeneidade química, orientação molecular e solubilidade parcial do polímero (no caso de misturas poliméricas), que alteram a linha de contato entre sólido-líquido. Será mostrado adiante, através da análise de SEM, que todas as blendas apresentam rugosidades. Como consequência, estas superfícies apresentam histerese do ângulo de contato e a repetitividade das medidas é afetada [115].

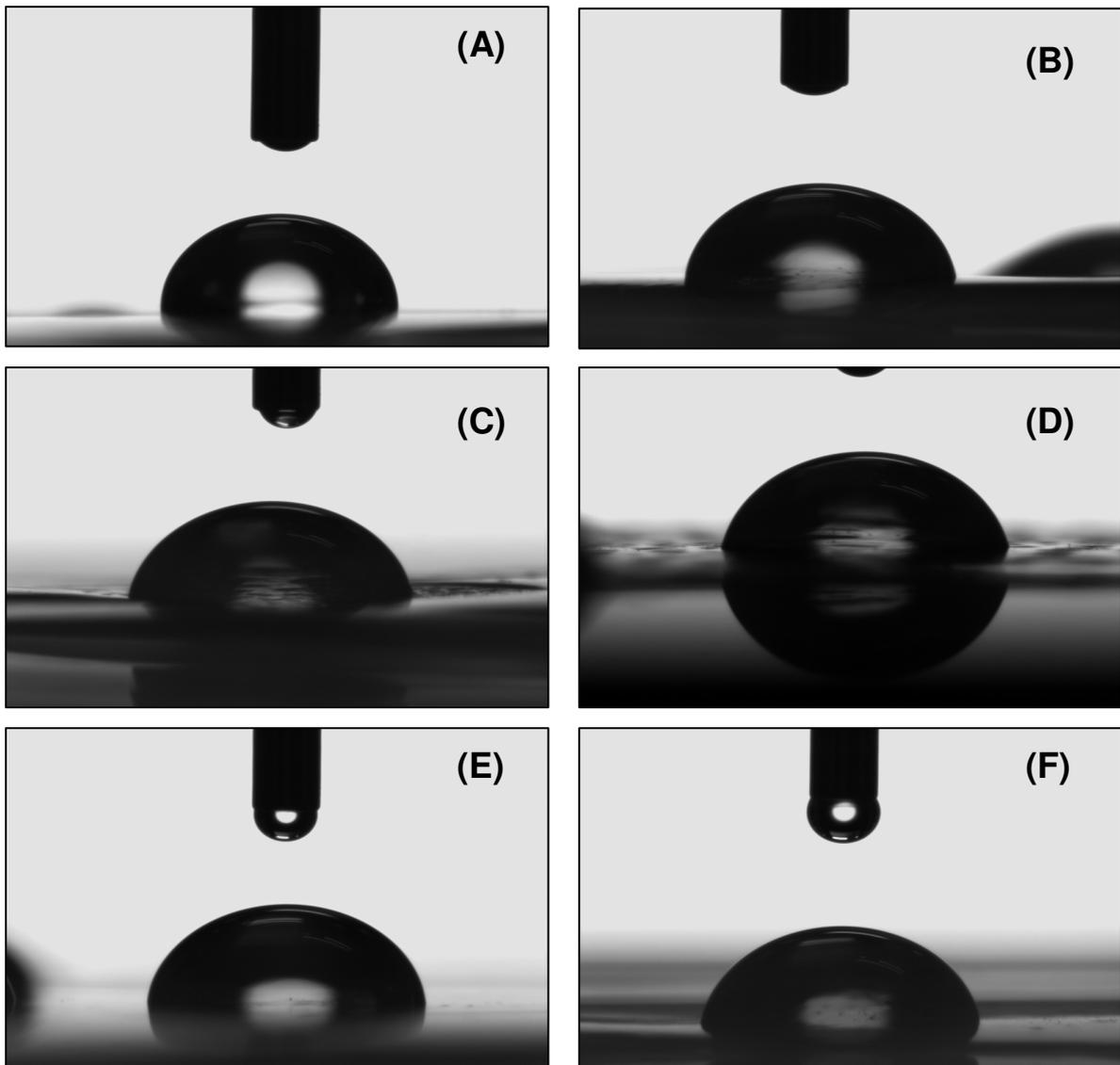


Figura 20 – Imagens de gotas de água na superfície dos filmes de (A) PS puro, (B) PS/PMMA 70/30, (C) PS/PMMA 50/50, (D) PS/PMMA 30/70, (E) PMMA puro e (F) PS-*b*-PMMA.

5.4 Análise morfológica

5.4.1 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

Estudo de microscopia eletrônica de varredura é importante por vários aspectos, e neste caso foi realizado com o intuito de analisar a morfologia dos

filmes, principalmente das blendas. A presença de rugosidades e domínios nas micrografias sugere, geralmente, incompatibilidade entre os componentes da blenda.

A morfologia dos filmes obtidos foi primeiramente investigada por aspectos visuais. Os filmes dos polímeros puros apresentaram um aspecto diferente quando comparados às blendas. Para os polímeros puros, os filmes foram transparentes à temperatura ambiente, homogêneos e maleáveis. No caso das blendas, os filmes foram opacos, heterogêneos e pouco quebradiços, sugerindo separação de fases nas blendas. O filme do copolímero apresentou-se maleável, homogêneo e apresentou uma coloração azulada quando colocado contra luz.

As micrografias da superfície dos filmes de polímeros puros, das blendas em diferentes composições e do copolímero estão mostradas na Figura 21. As micrografias da superfície dos polímeros puros (Figura 21 A e E) mostram características de sistemas densos, homogêneos, ausência de domínios e rugosidades. Conforme observado na Figura 21-B, a micrografia da blenda 70/30 apresenta características próximas às dos polímeros puros e do copolímero, não sendo observada a formação de rugosidades e domínios. Já as micrografias das blendas 50/50 e 30/70 (Figura 21 C e D) mostram formação de domínios discretos. Este comportamento é mais evidente na micrografia da seção transversal dos filmes (Figura 22), onde são observadas rugosidades em todos os filmes estudados, principalmente nas blendas.

As irregularidades observadas nos filmes de PS/PMMA 70/30 (Figura 21-B) e do copolímero (Figura 21-F) devem-se ao processo de deposição de impurezas presentes nas placas de PTFE, na solução ou no momento da evaporação do solvente.

Todos os filmes apresentaram ausência de porosidade e, associando todas as análises dos filmes realizadas com as micrografias de SEM, pode-se afirmar que o sistema não apresenta miscibilidade. No entanto, certa compatibilidade parece ocorrer em blendas com a predominância de um dos polímeros (blendas PS/PMMA 70/30 e 30/70).

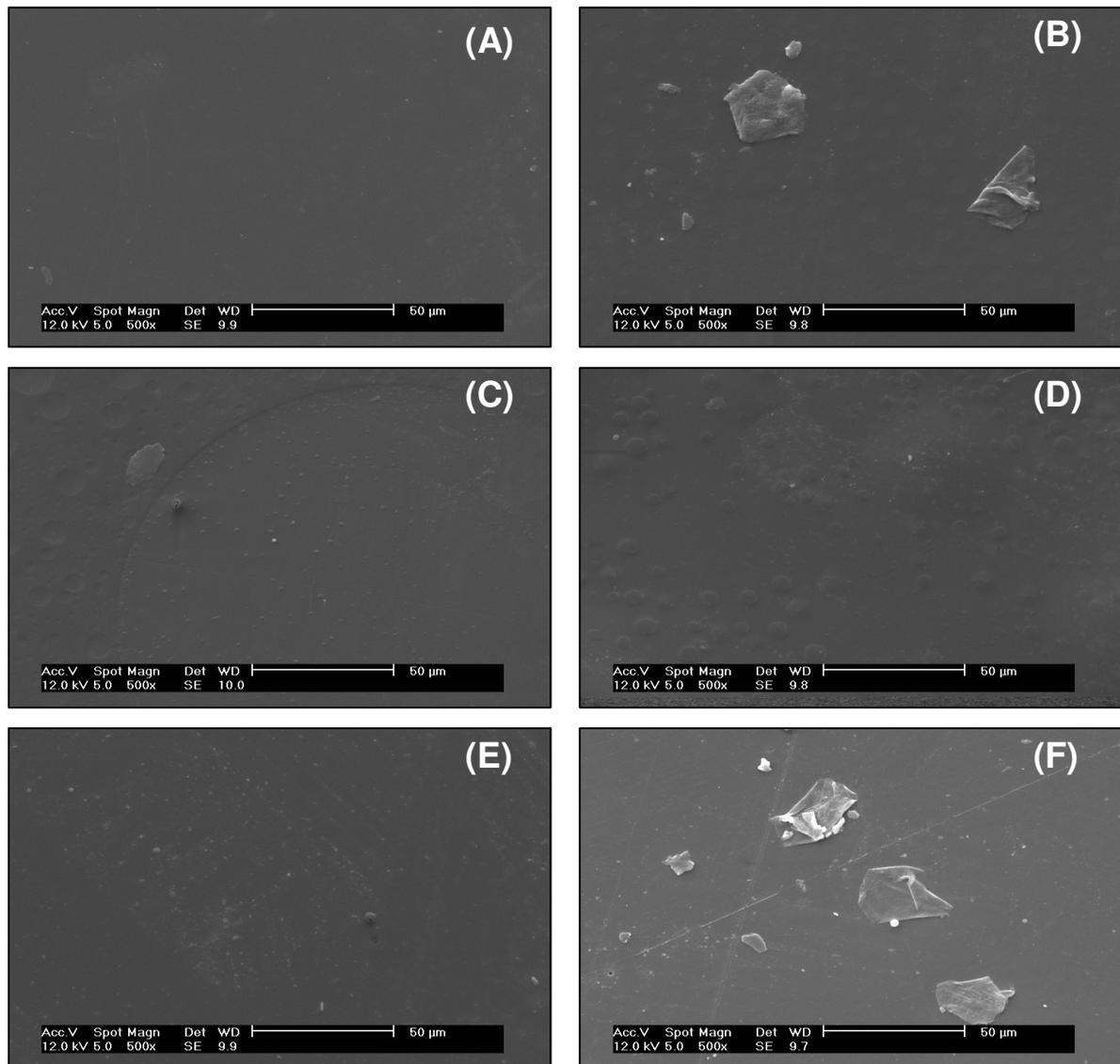


Figura 21 – Micrografias das superfícies para os filmes poliméricos (A) PS puro, (B) PS/PMMA 70/30, (C) PS/PMMA 50/50, (D) PS/PMMA 30/70, (E) PMMA puro e (F) PS-*b*-PMMA – aumento de 500x.

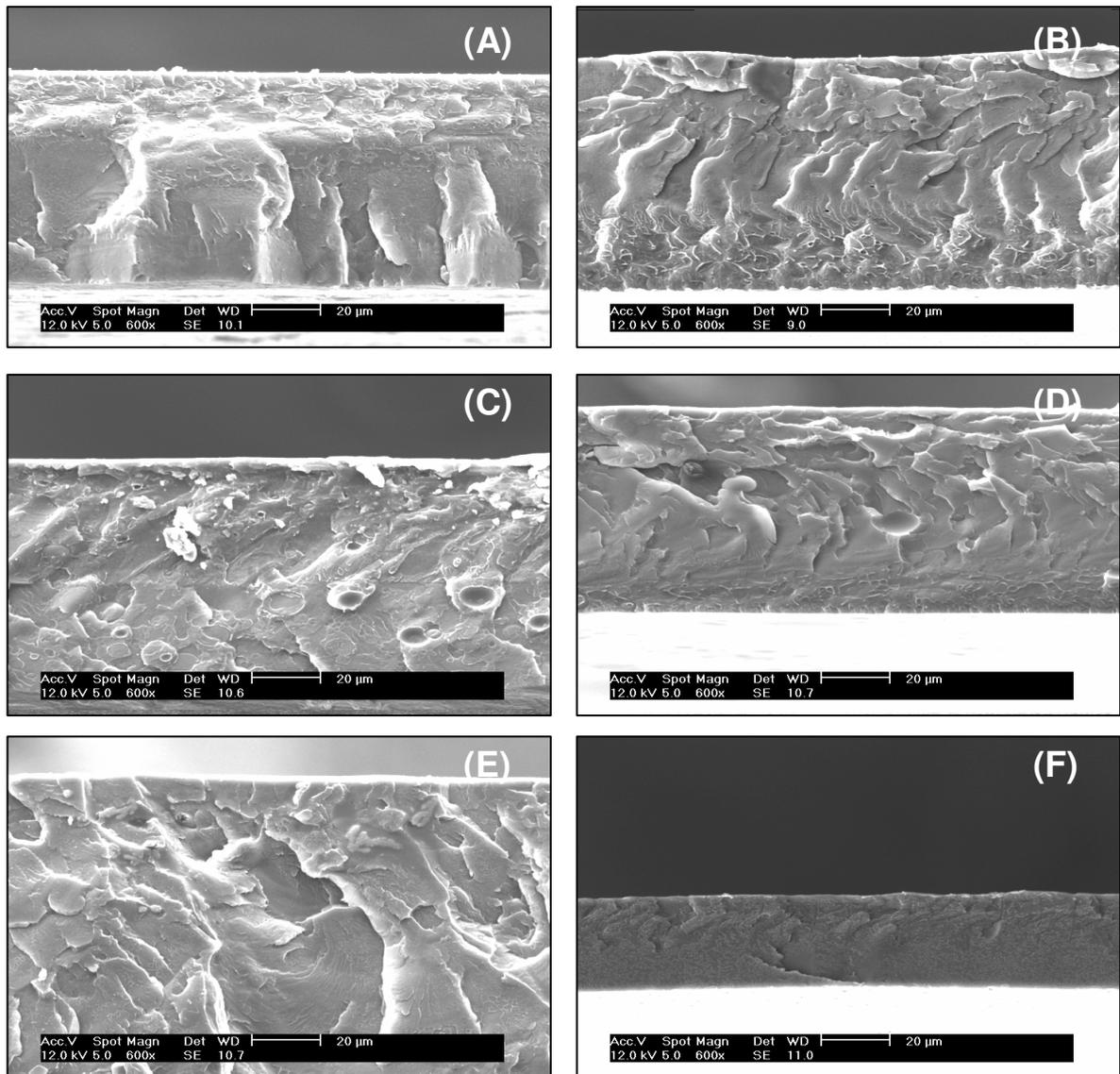


Figura 22 – Micrografias das superfícies de fratura para os filmes poliméricos (A) PS puro, (B) PS/PMMA 70/30, (C) PS/PMMA 50/50, (D) PS/PMMA 30/70, (E) PMMA puro e (F) PS-*b*-PMMA – aumento de 600x.

5.5 Análise de adesão celular – estudo *in vitro*

5.5.1 Análise de citotoxicidade indireta - microscopia óptica

O teste de citotoxicidade indireta avalia se os filmes poliméricos eliminam algum produto solúvel no meio da cultura. Esses possíveis produtos entrariam em contato com as células e, desta maneira, avalia-se a toxicidade dos filmes *in vitro*.

Os resultados obtidos através da análise por microscopia óptica mostraram que as células L929 iniciaram o processo de adesão celular sobre todos os filmes poliméricos estudados (Figura 23). Foi observado que as células que aderiram sobre os filmes poliméricos não mostraram alterações morfológicas quando comparadas com o controle negativo de toxicidade (Figura 23-G). Isto demonstra que os filmes poliméricos não exercem efeito citotóxico para as células que aderem sobre eles e não liberam substâncias tóxicas para o meio.

Como citado no item 5.4.1, os filmes são transparentes e opacos, ou seja, não apresentam coloração, o que tornou necessário colorir as células para que a visualização das mesmas fosse facilitada para, posteriormente, realizar uma análise quantitativa. As células aparecem como pontos vermelhos na Figura 23, exceto para a Figura 23-C, onde as mesmas aparecem na cor roxa.

5.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A análise de SEM pós-adesão foi realizada com o intuito de obter informações mais detalhadas sobre a morfologia das células e também confirmar a não toxicidade dos filmes. Esta análise foi realizada após 24 horas de adesão.

A Figura 24 mostra claramente que não há uma diferença significativa no que concerne a quantidade de células aderidas nos filmes poliméricos e no controle negativo (Figura 24-G).

A análise das células permitiu observar padrões diversos de adesão celular para os diferentes filmes. Nos filmes de PS puro e do copolímero (Figura 25 A e F), as células podem ser vistas relativamente isoladas, mostrando morfologia arredondada ou ligeiramente fusiforme. Os filmes das blendas 70/30, 30/70 e PMMA puro (Figura 25 B, D e E) apresentaram morfologia variando entre alongada,

arredondada e estrelada. No filme da blenda 50/50 (Figura 25-C), a morfologia de células estreladas foi predominante, e verificam-se células ligadas umas às outras através de prolongamentos citoplasmáticos, observando-se morfologia semelhante a das células fibroblásticas [116].

Segundo Yang e colaboradores [14], a hidrofiliabilidade é um fator relevante no estudo de adesão celular. Os filmes poliméricos com hidrofiliabilidade moderada são mais eficientes em promover a adesão das células, sendo este um fator que pode explicar a aderência mais efetiva no filme da blenda 50/50. O ângulo de contato para esta superfície específica é menor quando comparado aos demais filmes estudados, o que classifica o filme da blenda 50/50 com maior caráter hidrofílico, conforme explicado no item 5.3.1. A hidrofobicidade pode explicar uma aderência não muito efetiva no filme de PS puro (Figura 25 A), conforme sugerido pelos experimentos de ângulo de contato.

De maneira geral, pode-se observar uma melhor aderência das células nos filmes poliméricos do que no controle negativo (Figura 25 G), indicando a eficiência dos filmes estudados.

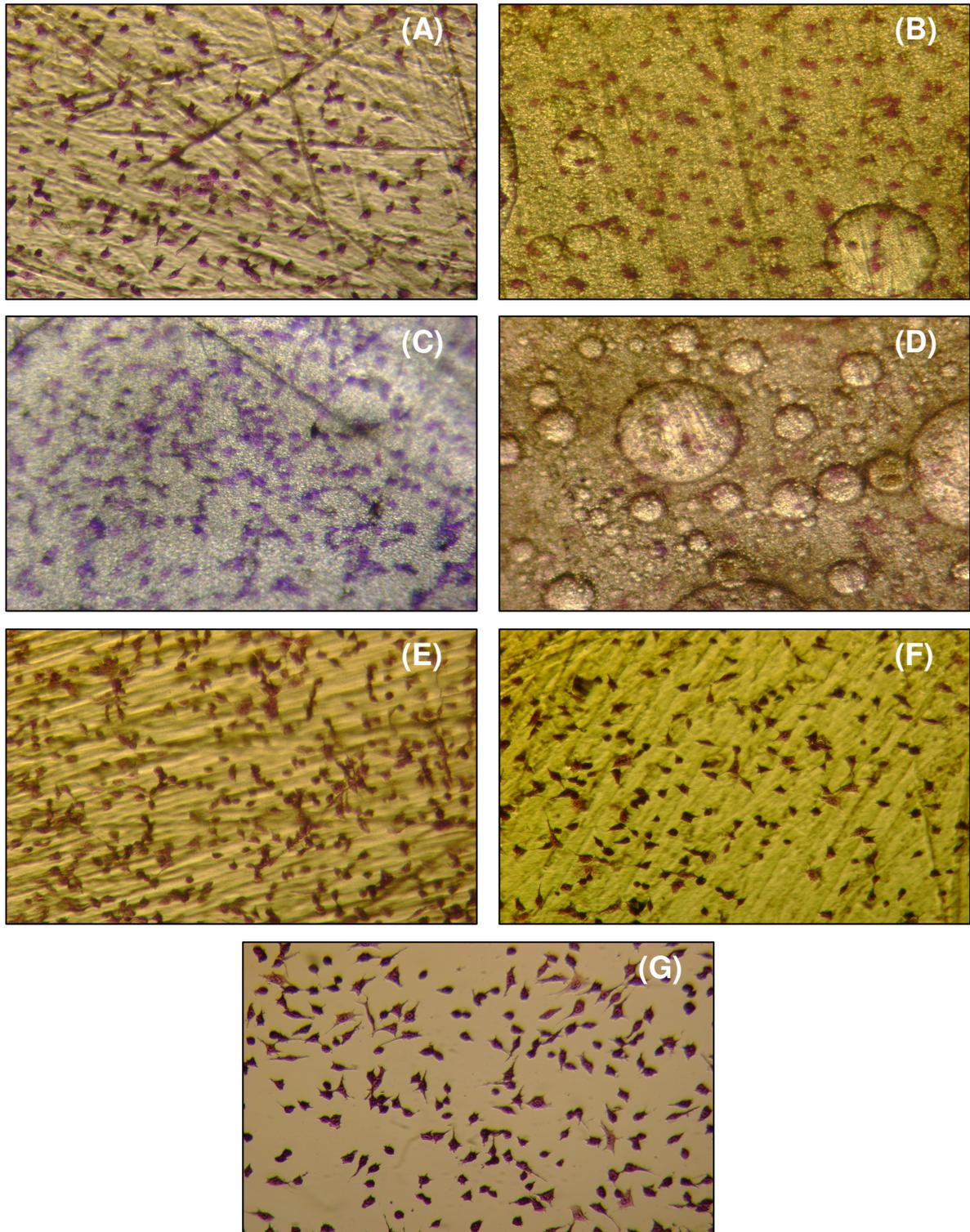


Figura 23 – Análise de microscopia óptica das células L929 após 24 horas de contato com os filmes (A) PS puro, (B) PS/PMMA 70/30, (C) PS/PMMA 50/50, (D) PS/PMMA 30/70, (E) PMMA puro, (F) PS-*b*-PMMA e (G) controle negativo – aumento de 440x.

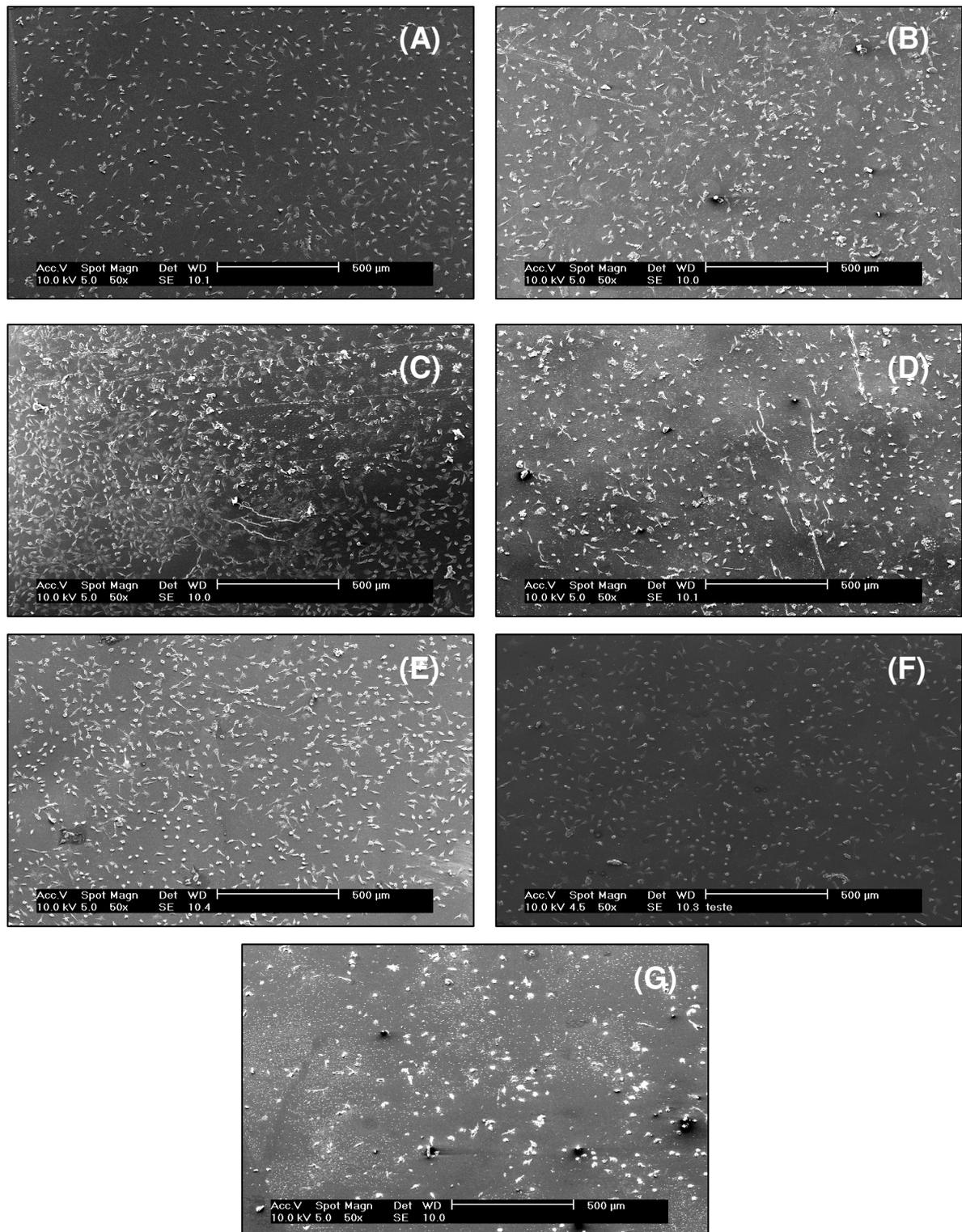


Figura 24 – Análise de SEM das células L929 após 24 horas de contato com os filmes (A) PS puro, (B) PS/PMMA 70/30, (C) PS/PMMA 50/50, (D) PS/PMMA 30/70, (E) PMMA puro, (F) PS-*b*-PMMA e (G) controle negativo – aumento de 50x.

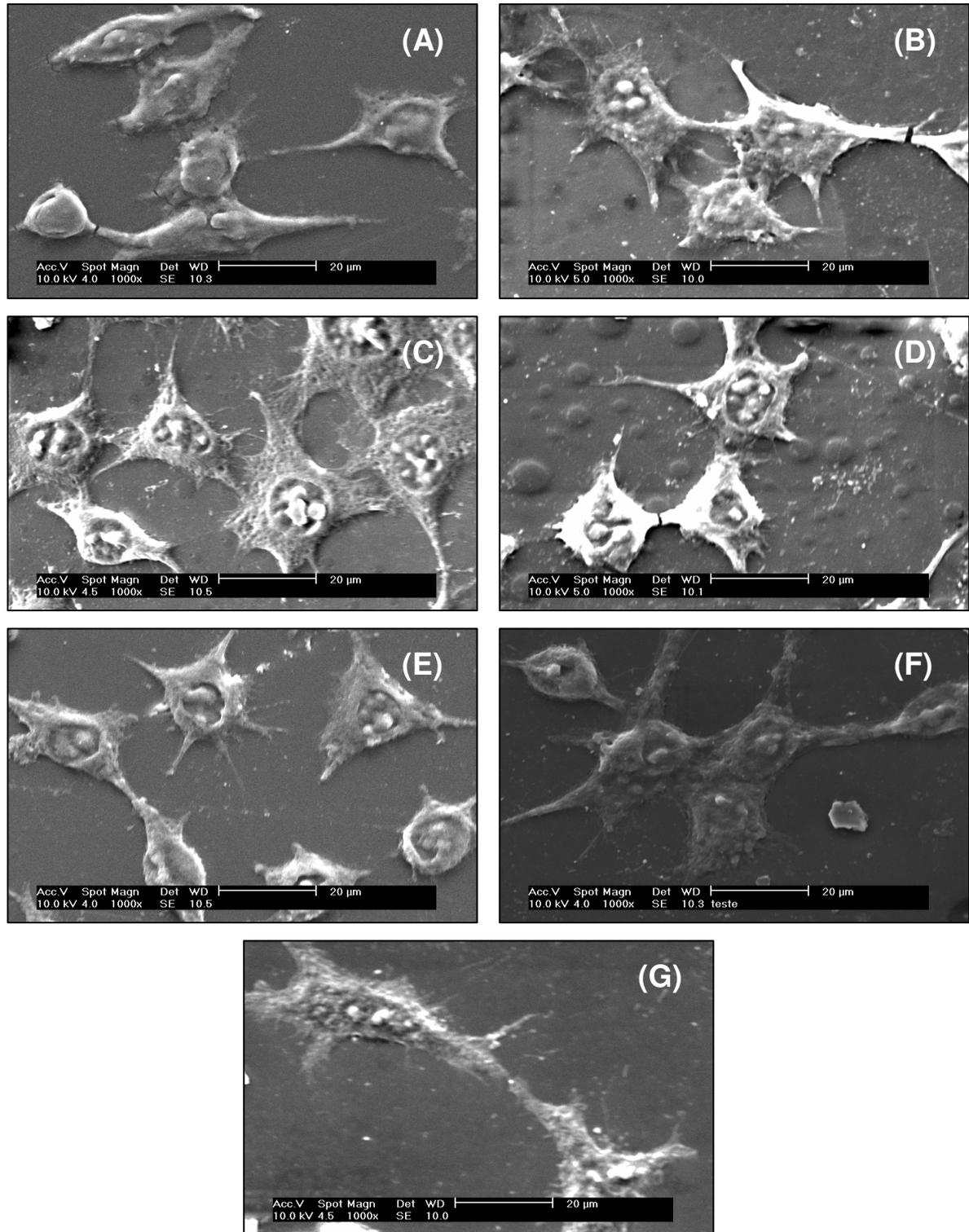


Figura 25 – Análise de SEM das células L929 após 24 horas de contato com os filmes (A) PS puro, (B) PS/PMMA 70/30, (C) PS/PMMA 50/50, (D) PS/PMMA 30/70, (E) PMMA puro, (F) PS-*b*-PMMA e (G) controle negativo – aumento de 1000x.

5.5.3 Análise estatística

A Figura 26 mostra a contagem das células para os filmes dos polímeros puros, das blendas em diferentes composições, do copolímero e do controle negativo.

O controle negativo foi utilizado para mostrar na prática a resposta das células, pois é um material não tóxico, sendo possível utilizá-lo como referência na contagem das células.

Nenhum dos filmes estudados apresentou efeito tóxico (numericamente sendo representado como nível de toxicidade "0"). Resultados muito similares quando comparados ao controle negativo (Figura 26-F) foram encontrados para o copolímero (Figura 26-E). O filme de PMMA puro (Figura 26-D) apresentou número de células superior ao do copolímero e do controle negativo. Os filmes de PS puro (Figura 26-A), da blenda 50/50 (Figura 26-C) e da blenda 70/30 (Figura 26-B) apresentaram números de células ligeiramente mais baixos quando comparados ao controle negativo. Esta pequena diferença obtida para o filme de PS puro pode ser explicada pela sua hidrofobicidade, conforme análise de ângulo de contato mostrada nas Figuras 19 e 20A.

No caso das blendas 50/50 e 70/30, a diferença no número de células pode estar relacionada à morfologia dos filmes. Através da análise de SEM realizada antes do processo de adesão, pode-se observar a presença de domínios e rugosidades na superfície das blendas (Figura 21), que se tornou mais evidente na micrografia da fratura do filme (Figura 22). Estas características podem ter interferido significativamente na adesão. A presença de domínios pode favorecer a migração das células para o interior dos mesmos, o que reduziria ligeiramente o número de células aderidas à superfície. Além disso, o filme da blenda 50/50 não apresentou nenhum halo de toxicidade, pois o número de células originais (5×10^4 células/poço) foi recuperado quase que totalmente, indicando que as células não só adeririam, mas também proliferaram.

Para a blenda 30/70 não foi possível realizar a contagem das células, devido à grande formação de domínios.

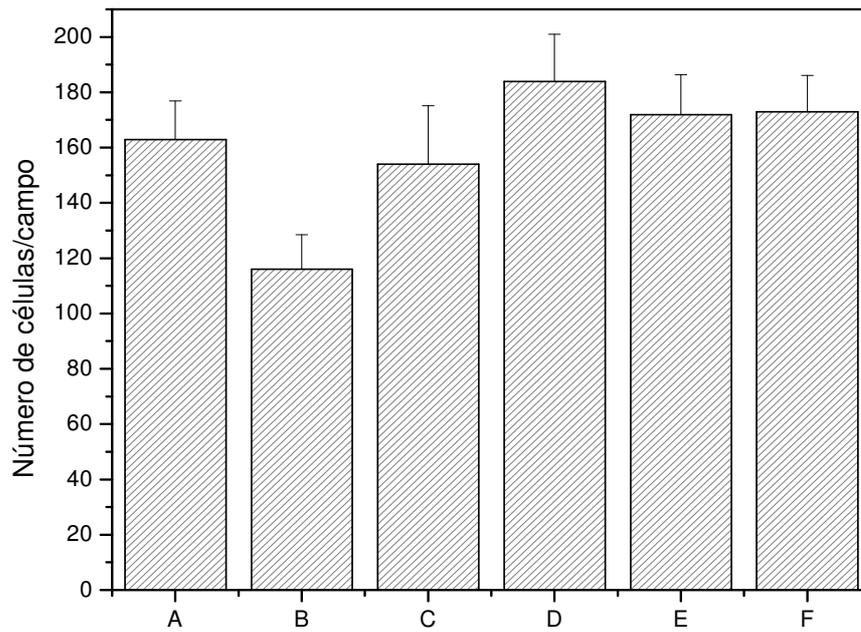


Figura 26 – Contagem de células/campo em filmes poliméricos (A) PS puro, (B) PS/PMMA 70/30, (C) PS/PMMA 50/50, (D) PMMA puro, (E) PS-*b*-PMMA e (F) controle negativo – Aumento de 440x. Resultados representam média \pm desvio-padrão.

6 CONCLUSÕES

Visualmente, os filmes dos polímeros puros foram transparentes, homogêneos e maleáveis. Os filmes formados pela mistura de PS e PMMA mostraram-se opacos, heterogêneos e pouco quebradiços em todas as composições, sugerindo ainda a ocorrência de separação de fase com pequenos domínios de um ou outro componente. O filme do copolímero apresentou-se maleável, homogêneo e de coloração azulada quando colocado contra luz.

A análise de TGA mostrou que os filmes poliméricos são termicamente estáveis e que a adição de PMMA na blenda diminui a estabilidade térmica do PS.

A análise de DSC mostrou a existência de duas T_g 's distintas para as blendas em todas as composições estudadas e para o copolímero, correspondentes aos homopolímeros PS e PMMA, sugerindo imiscibilidade entre os componentes das blendas. Somente a blenda PS/PMMA 70/30 mostrou uma redução da T_g correspondente ao PMMA, sugerindo certo grau de compatibilidade entre os componentes. A imiscibilidade entre PS e PMMA nas blendas foi confirmada através de análises de FTIR, ^{13}C NMR e SEM.

As medidas do ângulo de contato indicaram uma superfície mais hidrofóbica para o filme de PS, enquanto que o filme da blenda PS/PMMA 50/50 apresentou-se como a de superfície mais hidrofílica.

Os testes de adesão e citotoxicidade permitem concluir que os filmes dos polímeros puros, das blendas e do copolímero são apropriados para promover a adesão e a proliferação de células de camundongos L929. Com base nos resultados obtidos, parece vantajoso usar a blenda com composição 50/50 em experimentos futuros, tanto em função dos resultados mais satisfatórios, como para a relação custo-benefício, que é mais favorável comparativamente ao copolímero. Testes de toxicidade e adesão celular *in vivo* são necessários para uma avaliação mais precisa e direta das vantagens e/ou desvantagens do sistema de PS e PMMA estudado neste trabalho.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Hench L L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials** 1998; 19: 1419-1423.
- [2] Katti K S. Biomaterials in total joint replacement. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 2004; 39: 133–142.
- [3] Rogero S O, Lugão A B, Ikeda T I, Cruz A S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research** 2003; 6: 317-320.
- [4] Langer R, Vacanti J P. Tissue Engineering. **Science** 1993; 260: 920-926
- [5] Seal B L, Otero T C, Panitch A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Materials Science and Engineering: R: Reports** 2001; 34: 147-230.
- [6] Barbanti S H, Zavaglia C A C, Duek E A R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia** 2005; 15: 13-21.
- [7] Junqueira L C U, Carneiro J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- [8] Freed L E, Marquis J C, Nohria A, Emmanuel J, Mikos A G, Langer R. Neocartilage formation *in vitro* and *in vivo* using cells cultures on synthetic biodegradable polymers. **Journal of Biomedical Materials Research** 1993; 27: 11-23.
- [9] Bigerelle M, Anselme K. Bootstrap Analysis of the relation between initial adhesive events and long-term cellular functions of human osteoblasts cultured on biocompatible metallic substrates. **Acta Biomaterialia** 2005; 1: 499–510.
- [10] Owen G R, Meredith D O, Gwynn I, Richards R G. Focal adhesion quantification – a new assay of material biocompatibility?: Review. **European Cells and Materials** 2005; 9: 85-96.

- [11] Georges P C, Janmey P A. Cell type-specific response to growth on soft materials. **Journal of Applied Physiology** 2005; 98: 1547-1553.
- [12] Hynes R O. Integrins: A family of cell surface receptors. **Cell** 1987; 48: 549-554.
- [13] Hynes R O. Integrins bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell** 2002; 110: 673-687.
- [14] Yang J, Bei J, Wang S. Enhanced cell affinity of poly(d,l-lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage. **Biomaterials** 2002; 23: 2607-2614.
- [15] Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials** 2000; 21: 667-681.
- [16] Di Silvio L, Dalby M J, Bonfield W. Osteoblast behaviour on HA/PE composite surfaces with different HA volumes. **Biomaterials** 2002; 23: 101-107.
- [17] Vogler E A, Bussian R W. Short-term cell-attachment rates: A surface-sensitive test of cell-substrate compatibility. **Journal of Biomedical Materials Research** 1987; 21: 1197-1211.
- [18] Melo P S, Maria S S, Vidal B C, Haun M, Duran N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal** 2000; 36: 539-543.
- [19] Malmonge S M, Zavaglia C A C, Santos Jr A R, Wada M L F. Avaliação da citotoxicidade de hidrogéis de polihema: um estudo *in vitro*. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica** 1999; 15: 49-54.
- [20] Repetto G, Sanz P. Neutral red uptake, cellular growth and lysosomal function: *In vitro* effects of 24 metals. **ATLA** 1993; 21: 501-507.
- [21] Kettering J D, Torabinejad M. Cytotoxicity of root canal sealers: a study using HeLa cells and fibroblasts. **International Endodontic Journal** 1984; 17: 60-66.

- [22] Atala A. Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application. **Rejuvenation Research** 2004; 7: 15-31.
- [23] Shin H, Jo S, Mikos A G. Biomimetic materials for tissue engineering **Biomaterials** 2003; 24: 4353-4364.
- [24] Willians D F. **Progress in biomaterial engineering: Definition in Biomaterials**. Amsterdam: Elsevier, 1987.
- [25] Tormala P, Pohjonen T, Rokkanen P. Bioabsorbable Polymers: materials technology and surgical applications. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers - Part H: Journal of Engineering in Medicine** 1998; 212: 101-111.
- .
- [26] Silver F, Doillon C. **Biocompatibility, interactions and implantable materials**. New York: VCH, 1989.
- [27] Hench L L, Doillon C. **An introduction to bioceramics**. London: World Scientific, 1993.
- [28] Hench L L. Bioceramics: from concept to clinic. **Journal of the American Ceramic Society** 1991; 74: 1487-1510.
- [29] He B, Wan Y, Bei J, Wang S. Synthesis and cell affinity of functionalized poly(L-lactide-co- β -malic acid) with high molecular weight. **Biomaterials** 2004; 25: 5239-5247.
- [30] Smolko E, Mazzei R, Tadey D, Lombardo D. Attachment and spreadout study of 3T3 cells onto PP track etched films. **Nuclear instruments and Methods in Physics Research B** 2001; 185: 204-209.
- [31] Raabe D, Sander B, Friák M, Ma D, Neugebauer J. Theory-guided bottom-up design of β -titanium alloys as biomaterials based on first principles calculations: Theory and experiments. **Acta Materialia** 2007; 55: 4475-4487.

- [32] Oak J-J, Inoue A. Attempt to develop Ti-based amorphous alloys for biomaterials. **Materials Science and Engineering: A** 2007; 449-451: 220-224.
- [33] Okazaki Y, Gotoh E. Comparison of metal release from various metallic biomaterials *in vitro*. **Biomaterials** 2005; 26: 11-21.
- [34] Liu Y, Sheng X, Dan X, Xiang Q. Preparation of mica/apatite glass ceramics biomaterials. **Materials Science and Engineering: C** 2006; 26: 1390-1394.
- [35] Li S J, Niinomi M, Akahori T, Kasuga T, Yang R, Hao Y L. Fatigue characteristics of bioactive glass-ceramic-coated Ti–29Nb–13Ta–4.6Zr for biomedical application. **Biomaterials** 2004; 25: 3369-3378.
- [36] Guedes e Silva C C, Higa O Z, Bressiani J C. Cytotoxic evaluation of silicon nitride-based ceramics. **Materials Science and Engineering: C** 2004; 24: 643-646.
- [37] Mollica F, Ventre M, Sarracino F, Ambrosio L, Nicolais L. Mechanical properties and modelling of a hydrophilic composite used as a biomaterial. **Composites Science and Technology** 2006; 66: 92-101.
- [38] Yi Z, Yubao L, Jidong L, Xiang Z, Hongbing L, Yuanyuan W, Weihu Y. Novel bio-composite of hydroxyapatite reinforced polyamide and polyethylene: Composition and properties. **Material Science and Engineering A** 2007; 452-453: 512-517.
- [39] Ding S J. Biodegradation behavior of chitosan/calcium phosphate composites. **Journal of Non – Crystalline Solids** 2007; 353: 2367-2373.
- [40] Oréfice R L, Pereira M M, Mansur H S. **Biomateriais Fundamentos e Aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.
- [41] Daculsi G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. **Biomaterials** 1998; 19: 1473-1478.
- [42] Das R N, Bandyopadhyay A, Bose S. Nanocrystalline α -Al₂O₃ using sucrose. **Journal American Ceramic Society** 2001; 84: 2421-2423.

- [43] Zhitomirsky I. Electrophoretic hydroxyapatite coatings and fibers. **Materials Letters** 2000; 42: 262-271.
- [44] Canevarolo Jr S V. **Ciência dos polímeros: Um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. São Paulo: Artliber Editora Ltda, 2002.
- [45] Lucas E F, Soares B G, Monteiro E. **Caracterização de Polímeros-Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. Rio de Janeiro, E-papers Serviços Editoriais, 2001.
- [46] Langer R S, Peppas N A. Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. **Biomaterials** 1981; 2: 201-214.
- [47] Hoffmann A S, Piskin E. **Polymeric biomaterials**. Viena: Springer, 1986.
- [48] Ratner, B D, Hoffman, A S, Schoen, F J, Lemos, J E. **Biomaterials science- An Introduction to Materials in Medicine**. New York: Academic Press, 2004.
- [49] Saito N, Murakami N, Takahashi J, Horiuchi H, Ota H, Kato H, Okada T, Nozaki K, Takaoka K. Synthetic biodegradable polymers as drug delivery systems for bone morphogenetic proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews** 2005; 57: 1037–1048.
- [50] Grayson W L, Ma T, Bunnell B. Human Mesenchymal Stem Cells Tissue Development in 3D PET Matrices. **Biotechnology Program** 2004; 20: 905-912.
- [51] Temenoff J S, Mikos A G. Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. **Biomaterials** 2000; 21: 2405-2412.
- [52] Evans M D M, McLean K M, Hughes, T C, Sweeney D F. A review of the development of a synthetic corneal onlay for refractive correction. **Biomaterials** 2001; 22: 3319-3328.

- [53] Wang H, Li Y, Zuo Y, Li J, Ma S, Cheng L. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials** 2007; 28: 3338-3348.
- [54] Turos E, Shim J-Y, Wang Y, Greenhalgh K, Reddy G S, Dickey S, Lim D V. Antibiotic-conjugated polyacrylate nanoparticles: New opportunities for development of anti-MRSA agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 2007; 17: 53–56.
- [55] Sasmazel H T, Aday S, Gumusderelioglu M. Insulin and heparin co-immobilized 3D polyester fabrics for the cultivation of fibroblasts in low-serum media. **International Journal of Biological Macromolecules** 2007; 41: 338-345.
- [56] Middleton J C, Tipton A J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials** 2000; 21: 2335-2346.
- [57] Marten E, Muller R-J, Deckwer W-D. Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters I. Low molecular mass model esters and aliphatic polyesters. **Polymer Degradation Stability** 2003; 80: 485-501.
- [58] Franchetti S M M, Marconato J C. Polímeros biodegradáveis - uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova** 2006; 29: 811-816.
- [59] Young T-H, Yao N-K, Chang R-F, Chen L-W. Evaluation of asymmetric poly(vinyl alcohol) membranes for use in artificial islets. **Biomaterials** 1996; 17: 2139-2145.
- [60] Burczak K, Gamian E, Kochman A. Long-term *in vivo* performance and biocompatibility of poly(vinyl alcohol) hydrogel macrocapsules for hybrid-type artificial pancreas. **Biomaterials** 1996; 17: 2351-2356.
- [61] Paul W, Sharma C P. Acetylsalicylic acid loaded poly(vinyl alcohol) hemodialysis membranes: effect of drug release on blood compatibility and permeability. **Journal Biomedical Science Polymer** 1997; 8: 755-764.

[62] Corazza Filho E C. **Termoplásticos, os materiais e suas transformações**. São Paulo, 1995.

[63] Brydson J A. **Plastics Materials**. London: Butterworth-Heinemann, 1999.

[64] Bouafsoun A, Ponsonnet L, Kerkeni A, Jaffrézic N, Othmane A. Comparative wettability study of polystyrene functionalized with different proteins. **Materials Science and Engineering: C** 2007; 27: 709-715.

[65] Santin M, Wassall M A, Peluso G, Denyer S P. Adsorption of de α -1-microglobulin from biological fluids onto polymer surfaces. **Biomaterials** 1997, 18: 823-827.

[66] Dewez J-L, Lhoest J-B, Detrait E, Berger V, Dupont-Gillain C C, Vicent L M, Schneider Y-J, Bertrand P, Rouxhet P G. Adhesion of mammalian cells to polymer surfaces: from physical chemistry of surfaces to selective adhesion on defined patterns. **Biomaterials** 1998; 19: 1441-1445.

[67] Briston J H, Miles D C. **Tecnologia dos polímeros**. São Paulo: Polígono, 1975.

[68] Chisholm M S. Artificial Glass-The Versatility of Poly(methyl methacrylate) from Its Early Exploitation to the New Millennium **Journal of Chemical Education** 2000; 77: 841-845.

[69] Kine B B, Novak R H. Acrylic and metacrylic ester polymers In: Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. New York, 1985.

[70] Junior O O M, Nakashima A F, Barbosa E P, Junior H P P, Nakashima Y. Opacificação tardia de lente intra-ocular de poli(metilmetacrilato) (PMMA): relato de caso. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia** 2005; 68: 683-685.

- [71] González R P, Leyva A, Melo R A B, Moreira R D M, Pessoa C, Farias R F, Moraes M O. Método para o estudo *in vivo* da angiogênese: indução de neovascularização na córnea de coelho. **Acta Cirúrgica Brasileira** 2000; 15: 168-173.
- [72] Locatelli C I, Englert, G E, Kwitko S, Simonetti A B. Aderência bacteriana *in vitro* a lentes intra-oculares de polimetilmetacrilato e silicone. **Arquivos Brasileiros de Oftamologia** 2004; 67: 241-248.
- [73] Trindade M C D, Lind M, Suun D, Schurman D J, Goodman S B, Smith L. *In vitro* reaction to orthopaedic biomaterials by macrophages and lymphocytes isolated from patients undergoing revision surgery. **Biomaterials** 2001; 22: 253-259.
- [74] Junior P E S, Oréfice R L. Compósitos bioativos obtidos a partir da inserção de vidro bioativo em matriz de poli(metacrilato de metila). **Polímeros: Ciência e Tecnologia** 2001; 11: 109-115.
- [75] Moreira J C, Wang S H. Síntese de Copolímeros em Bloco de p-Acetoxiestireno com Isopreno através de Polimerização “Viva” via Radical Livre. **Polímeros: Ciência e Tecnologia** 2004; 14: 171-175.
- [76] Riess G, Hurtrez G, Bahadur P. Block copolymers. In Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. New York, 1985.
- [77] Hashimoto T, Todo A, Itoi H, Kawai H. Domain-boundary structure of styrene-isoprene block copolymer films cast from solution. 2. Quantitative estimation of the interfacial thickness of lamellar microphase system. **Macromolecules** 1977; 10: 377-384.
- [78] Fujimura M, Hashimoto H, Kurahashi k, Hashimoto T, Kawai H. Domain-boundary structure of styrene-isoprene block copolymer films cast from solution. 6. Effect of temperature on spherical microdomains structure. **Macromolecules** 1981; 14: 1196-1202.

- [79] Hashimoto H, Fujimura M, Hashimoto T, Kawai H. Domain-boundary structure of styrene-isoprene block copolymer films cast from solution. 7. Quantitative studies of solubilization of homopolymers in spherical domains systems. **Macromolecules** 1981; 14: 844-851.
- [80] Paul D R, Barlow J W. A binary interaction model for miscibility of copolymers in blends. **Polymer** 1984; 25: 487-494.
- [81] Seymour R B, Carraher Jr C E. **Polymer Chemistry**. New York: Marcel Decker, 1981.
- [82] Hozumi A, Asakura S, Fuwa A, Shirahata N. Photochemical fabrication of a well-defined diblock copolymer nanotemplate using 172-nm vacuum ultraviolet light. **Colloid and Interface Science** 2005; 285: 875-878.
- [83] Hahm J, Sibener S J. Time-resolved atomic force microscopy imaging studies of asymmetric PS-*b*-PMMA ultrathin films: Dislocation and disclination transformations, defect mobility, and evolution of nanoscale morphology. **Journal of Chemical Physics** 2001; 114: 4730-4740.
- [84] Xu T, Kim H C, DeRouchey J, Seney C, Levesque C, Martin P, Stafford C M, Russell T P. The influence of molecular weight on nanoporous polymer films. **Polymer** 2001; 42: 9091-9095.
- [85] Aissou K, Kogelschatz M, Baron T, Gentile P. Self-assembled block polymer templates as high resolution lithographic masks. **Surface Science** 2007; 601: 2611-2614.
- [86] Khaydarov A A, Hamley I W, Legge T M, Perrier S. Surface structure of thin asymmetric PS-*b*-PMMA diblock copolymers investigated by atomic force microscopy. **European Polymer Journal** 2007; 43: 789-796.
- [87] Elias H-G. **Macromolecules: synthesis, materials, and technology**. USA: Plenum Publishing Corporation, 1984.

- [88] Ito E N, Pessan L A, Hage Jr E, Covas J A. Análise do desenvolvimento morfológico da blenda polimérica PBT/ABS durante as etapas de mistura por extrusão e moldagem por injeção. **Polímeros: Ciência e Tecnologia** 2004; 14: 83-92, 2004.
- [89] Corradini E, Rubira A F, Muniz E C. Miscibility of PVC/EVA hydrolysed blends by viscosimetric, microscopic and thermal analysis. **European Polymer Journal** 1997; 33: 1651-1658.
- [90] Neiro S M S, Dragunski D C, Rubira A F, Muniz E C. Miscibility of PVC/PEO blends by viscosimetric, microscopic and thermal analyses. **European Polymer Journal** 2000; 36: 583-5899.
- [91] Pezzin A P T, Zavaglia C A C, Duek E A R. Estudo da degradação *in vitro* de blendas de Poli(ρ -dioxanona)/Poli(L Ácido Láctico) (PPD/PLLA) preparadas por evaporação do solvente. **Polímeros: Ciência e Tecnologia** 2002; 12: 285-294.
- [92] Cascone M G, Sim B, Downes S. Blends of synthetic and natural polymers as drug delivery systems for growth hormone. **Biomaterial's** 1995; 16: 569-574.
- [93] Morin C, Hitchcock A P, Cornelius R M, Brash J L, Urquhart S G, Scholl A, Doran A. Selective adsorption of protein on polymer surfaces studied by soft X-ray photoemission electron microscopy. **Journal of Electron Spectroscopy** 2004; 137-140: 785-794.
- [94] David K, Dan N, Tannenbaum R. Competitive adsorption of polymers on metal nanoparticles. **Surface Science** 2007; 601: 1781-1788.
- [95] Kashiwagi T, Inaba A, Brown J E, Hatada K, Kitayama T, Masuda E. Effects of weak linkages on the thermal and oxidative degradation of poly(methyl methacrylate). **Macromolecules** 1986; 19: 2160-2168.

- [96] Nanda A K, Kishore K. Catalytic radical polymerization of vinyl monomers by cobalt porphyrin complex and metamorphosis of block-into-block copolymer. **Polymer** 2001; 42: 2365-2372.
- [97] Stack S, O'Donoghue O, Birkinshaw C. The thermal stability and thermal degradation of blends of syndiotactic polystyrene and polyphenylene ether. **Polymer Degradation and Stability** 2003; 79: 29-36.
- [98] Lovera D, Ruckdaschel H, Goldel A, Behrendt N, Frese T, Sandler J K W, Altstadt V, Giesa R, Schmidt H-W. Tailored polymer electrets based on poly(2,6-dimethyl -1,4-phenylene ether) and its blends with polystyrene. **European Polymer Journal** 2007; 43: 1195-1201.
- [99] Vyazovkin S, Dranca I. Activation energies derived from the pre-glass transition annealing peaks. **Thermochimica Acta** 2006; 446: 140-146.
- [100] Silva G G, Rocha P M F, Oliveira P S, Neves B R A. Domain size effects on the thermal properties of PS/PMMA blends. **Applied surface science** 2004; 238: 64-72.
- [101] Lee H, Archer L A. Functionalizing polymer surface migration of copolymer additives: role of additive molecular weight. **Polymer** 2002; 43: 2721-2728.
- [102] Oréfice R L, Vasconcelos W L, Moraes M A S. Estabilidade de fases em blendas de policarbonato-poliestireno avaliada por micro-FTIR, análise térmica e microscopia eletrônica de varredura. **Polímeros: Ciência e Tecnologia** 2004; 14: 129-133.
- [103] Tighilt F Z, Gabouze N, Sam S, Belhousse S, Beldjilali K. Morphology and specific interaction of PMMA coating with the surface of porous silicon. **Surface science** 2007; 601: 421-4221.
- [104] Meneghetti P, Qutubuddin S, Webber A. Synthesis of polymer gel electrolyte with high molecular weight poly(methyl methacrylate)-clay nanocomposite. **Electrochimica Acta** 2004; 49: 4923-4931.

- [105] Canevarolo Jr S V. **Técnica de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2004.
- [106] Wu R-R, Kao H-M, Chiang J C, Woo E M. Solid-state NMR studies on phase behavior and motional mobility in binary blends of polystyrene and poly(cyclohexyl methacrylate). **Polymer** 2002; 43: 171-176.
- [107] Kuo S W, Chang F C. Miscibility and hydrogen bonding in blends of poly(vinylphenol-co-methyl methacrylate) with poly(ethylene oxide). **Macromolecules** 2001; 34: 4089-4097.
- [108] Kuo S-W, Kao H-C, Chang F-C. Thermal behavior and specific interaction in high glass transition temperature PMMA copolymer. **Polymer** 2003; 44: 6873-6882.
- [109] Guerrica- Echevarría G, Eguiazábal J I, Nazábal J. Interfacial tension as a parameter to characterize the miscibility level of polymer blends. **Polymer testing** 2000; 19: 849-854.
- [110] Fekete E, Foldes E, Pukánszky B. Effect of molecular interactions on the miscibility and structure of polymer blends. **European Polymer Journal** 2005; 41: 727-736.
- [111] Cai H, Ait-Kadi A, Brisson J. Dynamic rheological analysis of a miscible blend showing strong interactions. **Polymer** 2004; 44: 1481-1489.
- [112] Yilmaz E, Yilmaz O, Caner H. Miscibility studies on polystyrene /poly(ethylene oxide) and polybutadiene-*graf*-polystyrene/poly(ethylene oxide) blends by dilute solution viscometry. **European Polymer Journal** 1996; 32: 927-933.
- [113] Shaw D J. **Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975.

[114] Tezcaner A, Bugra K, Hasirci V. Retinal Pigment Epithelium Cell Culture on Surface Modified poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) Thin Films. **Biomaterials** 2003; 24: 4573-4583.

[115] Thiré R M S M, Simão R A, Araújo P J G, Achete C A, Andrade C T. Redução da hidrofobicidade de filmes biodegradáveis à base de amido por meio de polimerização por plasma. **Polímeros: Ciência e Tecnologia** 2004; 14: 57-62.

[116] Genari S C, Dolder M A H, Wada M L F. Scannig and Transmission Electron Microscopy of Transformed Vero Cells, with Altered *in vitro* Growth Characteristics. **Journal Submicroscopy Cytology Pathology** 1996: 28: 565-572.