Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Desenvolvimento de blendas reticuladas de gelatina e PVA para uso em *phantoms* para treinamento em procedimentos médicos guiados por ultrassom

Michelle Ferreira da Costa Abrahão

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**.

RIBEIRÃO PRETO –SP

2017

MICHELLE FERREIRA DA COSTA ABRAHÃO

Desenvolvimento de blendas reticuladas de gelatina e PVA para uso em *phantoms* para treinamento em procedimentos médicos guiados por ultrassom

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química

Orientadora: Delia Rita Tapia Blácido

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Abrahão, Michelle Ferreira da Costa

Desenvolvimento de blendas reticuladas de gelatina e PVA para uso em *phantoms* para treinamento em procedimentos médicos guiados por ultrassom. Ribeirão Preto, 2017.

71 p: il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/ USP. Área concentração: Química

Orientadora: Blácido, Delia Rita Tapia

1. Blendas, 2. Gelatina, 3. PVA, 4. Glutaraldeído, 5. Material mimetizador do tecido 6. Ultrassom.

Nome: ABRAHÃO, Michelle Ferreira da Costa

Título: Desenvolvimento de blendas reticuladas de gelatina e PVA para uso em *phantoms* para treinamento em procedimentos médicos guiados por ultrassom

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À minha mãe Edna, por me desafiar a enfrentar meus medos e tomar a decisão que mudou minha vida e me fez chegar até aqui. Muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Antônio e Edna, e irmãos Danilo e Alexander, pelo apoio, carinho e amor constantes, e pelo abraço apertado que sempre me dá a gostosa sensação de ter voltado para casa. Em especial agradeço à minha mãe por ser além de mãe dedicada, uma grande amiga e meu maior exemplo de força, determinação e coragem. Obrigada principalmente pela sabedoria de amar, proteger e direcionar sem interferir em minhas decisões, o que me possibilitou a oportunidade de amadurecer com os meus próprios erros e acertos.

Aos meus avós Alaor (*in memoriam*) e Iolanda pelo carinho, amor, dedicação e suporte emocional e pelo grande exemplo de vida. A todos os meus familiares que sempre estiveram presentes nos momentos mais difíceis e me ensinaram o real sentido do que é união. Em especial aos tios Adalberto e Rosa pelo suporte, companheirismo e amor.

Ao meu marido Daniel pelo carinho, amor, companheirismo, paciência e por compreender os meus momentos de ausência e principalmente por apoiar minhas decisões mesmo sem concordar com elas. À minha nova família Daniela, Raphael, Mario e Maria Alair pelo amor e carinho, em especial aos meus sogros por me receberem como filha. Ao meu filho amado Enrico por me ensinar o que é o amor sem limites e por dar um novo sentido à minha vida.

À todos os amigos conquistados durante a graduação e pós-graduação, em especial Mirian, Aline, Jaqueline, Mirian França, Thiago, Braulio, Beny, Ebenezzer, Olimpia e Tamires, vocês são muito especiais.

À Profa. Dra. Delia Rita Tapia Blácido por aceitar ser minha orientadora nesse trabalho científico em uma área diferente da sua área de pesquisa. Muito obrigada pela compreensão, paciência e por dividir seus conhecimentos comigo.

Ao Prof. Dr. Antonio Adilton Oliveira Carneiro pela oportunidade de iniciar minhas atividades nesse universo fantástico e desafiador que é a pesquisa científica, pela amizade e por encorajar a busca por novas oportunidades, dividir seus conhecimentos e abrir as portas do grupo GIIMUS para a realização das atividades essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do laboratório pelo apoio, em especial à Roberta, Bianca, Thamiris e Denisse pela amizade e por deixarem essa caminhada mais agradável.

Aos amigos do grupo GIIMUS pela parceria, companheirismo e amizade. Ao Prof. Theo Pavan pelas observações que enriqueceram o trabalho. Em especial meu eterno agradecimento aos amigos Luciana Cabrelli e Felipe Grillo pela amizade, parceria, apoio e conversas que sempre contribuem para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Ana Paula Ramos por disponibilizar o equipamento para as análises de ângulo de contato.

À Profa. Dra. Milena Martelli Tosi por possibilitar as análises no FTIR e pelas contribuições ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Grégoire J. F. Demets pelas sugestões durante o meu exame de qualificação que enriquecem o trabalho.

Aos técnicos do departamento de química Janaína de Godoy Gonçalves e Rodrigo Ferreira Silva (MEV) e do departamento de física Agnelo dos Santos Bastos, José Luiz Aziani e Carlos Renato da Silva que foram fundamentais para a execução desta pesquisa.

As agências de fomento CNPq e Fapesp pelo suporte financeiro.

RESUMO

ABRAHÃO, M.F.C. **Desenvolvimento de blendas reticuladas de gelatina e PVA para uso em *phantoms* para treinamento em procedimentos médicos guiados por ultrassom.** 2017. 71 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Mimetizadores do tecido biológico são objetos capazes de simular as propriedades mecânicas e acústicas do tecido biológico e são comumente chamados de *phantoms*. São utilizados para avaliar e calibrar equipamentos de ultrassom, auxiliar no desenvolvimento de transdutores, sistemas computacionais ou técnicas de diagnóstico e para treinamento em procedimentos médicos guiados por ultrassom, tais como biópsia de tireóide e mama, anestesia regional, entre outros. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da reticulação com glutaraldeído sobre as propriedades das blendas gelatina/poli (álcool vinílico) visando à produção de um material para ser usado como mimetizador do tecido biológico para ultrassonografia (*phantoms*). Inicialmente blendas de gelatina/PVA com diferentes concentrações dos polímeros na mistura (80/20, 60/40 e 40/60) foram preparadas e caracterizadas. Posteriormente, estas blendas foram reticuladas com 0,5% de glutaraldeído em pH 4 e 5 durante 5, 15, 30 e 60 min, e também com 1,0% de glutaraldeído em pH 5 durante 5min, pois observou-se que este tempo foi suficiente para obter um material com boas propriedades. As blendas foram caracterizadas em função de suas propriedades mecânicas, ângulo de contato, perda de umidade, velocidade de propagação do som e coeficiente de atenuação acústica. A concentração dos polímeros na blenda influenciou nas propriedades mecânicas, higroscópicidade e na perda de umidade dos géis formados. Assim, um aumento na concentração de PVA diminuiu a rigidez e o módulo de Young, e aumentou a velocidade do som das blendas gelatina/PVA. Acima de 60% de PVA houve separação de fases nas blendas com e sem reticulação. A reticulação com glutaraldeído aumentou a rigidez e diminuiu a hidrofiliabilidade da blenda. A blenda gelatina/PVA 80/20 reticulada com 0,5% de glutaraldeído em pH 5 apresentou as características mais promissoras para o desenvolvimento de materiais mimetizadores do tecido biológico.

Palavras-chave: Blendas, Gelatina, PVA, Glutaraldeído, Material mimetizador do tecido Ultrassom.

ABSTRACT

ABRAHÃO, M.F.C. **Development of cross-linked gelatin/PVA blends applied in ultrasound-guided training phantoms. 2017. 71 p.** Dissertation (master). Faculty of Philosophy, Science and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Tissue mimicking materials are objects capable of mimic mechanical and acoustic properties of biological tissues and are commonly called phantoms. These objects are used to evaluate and calibrate ultrasound machines, development ultrasound transducer, informatics system or diagnostic techniques and for ultrasound-guided procedures training such as thyroid and breast biopsy, regional anesthesia, and others. The aim of this study was to evaluate the effect of the cross-linked of gelatin/polyvinyl alcohol (PVA) blends utilizing glutaraldehyde, resulting in a material for applications in ultrasound guided training phantoms. Gelatin/PVA blends were prepared with different concentrations of each polymer (80/20, 60/40, and 40/60) and characterized. Also, the same concentrations of the blends were cross-linked using 0.5% glutaraldehyde at pH4 and 5 for 5, 15, 30 and 60 minutes, and 1.0 % of glutaraldehyde at pH 5 for 5 minutes. The resulting blends were characterized by mechanical properties, contact angle, moisture loss, speed of sound and acoustic attenuation. The concentration of the polymers influenced over the mechanical properties, hygroscopicity e moisture loss of the manufactured blends. The increase of the amount of the PVA in the manufactured blends decreased the stiffness and increased the acoustic attenuation, moisture loss, hygroscopicity and speed of sound. Blends with more than 60% of PVA resulting in phase separation of the material. Glutaraldehyde cross-linked gelatin/PVA blend with a proportion of 80/20 with 0.5% of glutaraldehyde at pH 5 presented the most suitable properties for ultrasound-guided training phantoms.

Keywords: Blends, Gelatin, PVA, Glutaraldehyde, Tissue mimicking materials, Ultrasound.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de propriedades acústicas para alguns tecidos biológicos humanos (Adaptado de CULJAT, 2010).	5
Tabela 2. Valores de módulo de Young para o tecido mamário normal e lesões mamárias avaliadas a 5% de compressão e 1,0 Hz (Adaptado de KROUSKOP, 1998)..	6
Tabela 3. Força de ruptura (N) e módulo de Young (kPa) das blendas.	25
Tabela 4. Teor de umidade dos géis de gelatina e PVA puros e das blendas gelatina /PVA.	27
Tabela 5. Velocidade do som (m/s) e coeficiente de atenuação (dB/cm) para os géis de gelatina, PVA e as blendas gelatina/PVA.	30
Tabela 6. Força de ruptura (N) e módulo de Young (kPa) da blenda com 80/20 de gelatina/PVA em função do tempo e pH.	37
Tabela 7. Nomenclatura utilizada para as amostras.	42
Tabela 8. Força de ruptura (N) e módulo de Young (kPa) dos géis de gelatina pura, PVA puro, gel de gelatina reticulada e blenda com e sem reticulação.....	43
Tabela 9. Umidade dos géis de gelatina pura, PVA puro, gel de gelatina reticulada e blendas com e sem reticulação.	44
Tabela 10. Número de onda dos géis de gelatina, PVA e blenda 80/20 sem reticulação, relacionados com os modos vibracionais a que se referem.	46
Tabela 11. Número de onda dos géis de gelatina reticulada e das blendas 80/20 reticuladas em pH 4 e 5, relacionados com os modos vibracionais a que se referem. ...	47
Tabela 12. Velocidade do som (m/s) e coeficiente de atenuação (dB/cm) para os géis de gelatina pura, PVA puro, gelatina reticulada e blenda de 80/20% gelatina/PVA com e sem reticulação.	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos 20 aminoácidos comuns em proteínas. (Adaptado de LEHNINGER, 2006).....	7
Figura 2. Estrutura química do PVA (configuração “cabeça-a-cabeça”) (Adaptado de PEPPAS, 1984).....	9
Figura 3. Estrutura química do glutaraldeído.	12
Figura 4. Representação simplificada de uma reação de grupos amina com grupos aldeídos do glutaraldeído.....	13
Figura 5 Reações de reticulação de proteínas com glutaraldeído em condições ácidas ou neutras.....	14
Figura 6. Reação de reticulação do PVA com glutaraldeído.....	14
Figura 7. Curva de tensão (Pa) x deformação (%) para o gel de 100% de gelatina.	19
Figura 8. Imagem do ângulo formado entre a gota de água e a superfície do gel de 100% de gelatina.....	21
Figura 9. Aparato experimental para as medidas de velocidade do som e atenuação acústica.	22
Figura 10. A) gelatina pura; B) PVA puro e Blendas de gelatina/PVA: C) 80/20; D) 60/40; E) 40/60 com evidente separação de fases.	25
Figura 11. Cinética da perda de umidade dos géis de gelatina pura (100/0), do PVA puro (0/100) e das blendas (80/20, 60/40, 40/60 % de gelatina/PVA respectivamente).	28
Figura 12. Ângulo de contato da gelatina pura (100/0), PVA puro (0/100) e das blendas gelatina/PVA 80/20, 60/40, 40/60.	30
Figura 13. Microscopias dos géis de A) gelatina pura, B) PVA puro e das blendas de C) 80/20 gelatina/PVA, D) 60/40 gelatina/PVA e E) 40/60 gelatina/PVA.....	33

Figura 14. Precipitação do glutaraldeído na blenda de 80/20% de gelatina/PVA reticulada com 0,5% de glutaraldeído em pH 9.....	34
Figura 15. Foto das blendas após a reticulação. Blendas 80/20 em A) pH5 e B) pH4; 60/40 em C) pH 5, D) pH 4, e 40/60 em E) pH5 e F) pH4.	35
Figura 16. Força de ruptura para blenda reticulada de 80/20% de gelatina/PVA em função do tempo de reticulação em pH 4 e 5. A blenda sem reticulação está representada em 0 min.	38
Figura 17. Módulo de Young para blenda reticulada de 80/20% de gelatina/PVA em função do tempo de reticulação em pH 4 e 5. A blenda sem reticulação está representada em 0 min.	39
Figura 18. Ângulo de contato para blenda reticulada de 80/20 de gelatina/PVA em função do tempo de reticulação em pH 4 e 5. A blenda sem reticulação está representada em 0 min.	40
Figura 19. Dessorção de umidade em função do tempo de exposição à UR de 95% para blenda reticulada de 80/20% de gelatina/PVA nos tempos de reticulação de 5, 15, 30 e 60 min em pH 4 e 5. A blenda sem reticulação está representada em 0 min.	41
Figura 20. Ângulo de contato de A) gelatina pura, B) PVA puro, C) Blenda 80/20, D) Gelatina 0,5% Glu.pH4, E) Blenda 0,5 Glu.pH4, F) Gelatina 0,5% Glu.pH5 e G) Blenda 0,5% Glu.pH5.....	45
Figura 21. Espectros de infravermelho dos géis de gelatina pura, PVA puro, blenda 80/20, gelatina reticulada em pH 4 e 5 e blendas 80/20 reticuladas com 0,5% de glutaraldeído em pH 4 e 5.....	48
Figura 22. Microscopias dos géis de A) gelatina pura, B) Blenda 80/20, C) Blenda 0,5% Glu.pH 4 e D) Blenda 0,5% Glu.pH 5 e E) Blenda 1,0% Glu.pH 5.....	50
Figura 23. Imagem modo B das blendas de 80/20 gelatina/PVA reticulada com 0,5% de glutaraldeído em pH 4 (a) e pH 5 (b).	52

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVO	4
2.1.	Objetivo geral	4
2.2.	Objetivos específicos	4
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1.	Materiais mimetizadores do tecido biológico	5
3.2.	Gelatina	6
3.3.	Poli (álcool vinílico) (PVA)	8
3.4.	Blendas poliméricas	10
3.4.1.	Blendas de Gelatina/PVA	10
3.5.	Reticulação de polímeros	11
3.5.1.	Glutaraldeído como agente reticulante	12
3.6.	Ultrassom	15
3.6.1.	Velocidade do som	16
3.6.2.	Atenuação	17
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1.	Materiais	17
4.2.	Preparação das blendas de Gelatina/PVA	17
4.3.	Reticulação com glutaraldeído	18
4.4.	Propriedades mecânicas em testes de compressão	19
4.5.	Teor de umidade e análise de sorção de umidade das blendas	19
4.6.	Determinação do ângulo de contato	20
4.7.	Avaliação dos parâmetros acústicos	21
4.8.	Espectros de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR)	23
4.9.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	23
4.10.	Análise estatística	23
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
5.1.	Blendas de gelatina/PVA	24
5.1.1.	Aspecto visual	24
5.1.2.	Propriedades mecânicas das blendas	25
5.1.3.	Teor de umidade, sorção de umidade e ângulo de contato	27

5.1.4.	Velocidade do som e coeficiente de atenuação acústica	30
5.1.5.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	31
5.2.	Reticulação das blendas de Gelatina/PVA com glutaraldeído	34
5.2.1.	Testes preliminares	34
5.3.	Efeito do tempo de reticulação nas propriedades das blendas gelatina/PVA.....	36
5.3.1.	Propriedades mecânicas	36
5.3.2.	Ângulo de contato e perda de umidade	39
5.4.	Efeito da concentração do reticulante nas propriedades da blenda 80/20 de gelatina/PVA.....	42
5.4.1.	Propriedades mecânicas	43
5.4.2.	Umidade e Ângulo de contato.....	44
5.4.3.	FTIR-ATR.....	46
5.4.4.	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	49
5.4.5.	Propriedades acústicas.....	50
6.	CONCLUSÃO	53
7.	TRABALHOS FUTUROS.....	53
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

A utilização do ultrassom como guia nos procedimentos médicos de biópsia, acesso venoso central, anestesia regional, entre outros, assegura a visualização da progressão da agulha e diminuição das tentativas de punção, evita lesões em estruturas como vasos, pleura e músculos, além de ser um procedimento de baixo custo, minimamente invasivo e ideal para o fornecimento de diagnósticos precisos.

Esses procedimentos médicos devem ser desenvolvidos com a maior precisão possível para que se possa preservar a saúde e segurança do paciente, sendo necessário treinamento. Objetos simuladores como *phantom* podem ser utilizados para obter a habilidade na manipulação dos equipamentos por parte do executor do procedimento. Sendo assim, não se aconselha que o treinamento de profissionais da saúde seja realizado em seres humanos, já que existe a possibilidade de causar traumas e transtornos aos pacientes devido à falta de habilidade ou coordenação motora dos olhos e mãos.

Visando a realização de um treinamento eficaz que possibilite a diminuição dos inconvenientes gerados aos pacientes, os profissionais da saúde podem utilizar um objeto que simule as propriedades mecânicas e acústicas do tecido biológico humano. Esse objeto é comumente chamado de *phantom* e pode ser utilizado para avaliar e calibrar equipamentos de ultrassom, auxiliar no desenvolvimento de transdutores, sistemas computacionais ou técnicas de diagnóstico e para treinamento em procedimentos médicos guiados por ultrassom, tais como biópsia de tireóide e mama, anestesia regional, entre outros (CULJAT, 2010). Dessa forma, através de um treinamento simulado utilizando os *phantoms*, esses profissionais poderão obter um maior controle na manipulação dos instrumentos durante um procedimento real, e isso elevará sua autoconfiança, reduzirá os constrangimentos ao paciente e expandirá a precisão nos resultados dos procedimentos.

O Instituto Americano de Ultrassom em Medicina (AIUM 1990) determina os padrões para mimetizadores do tecido biológico (*phantoms*) e recomenda uma velocidade do som de 1540 m/s, e coeficiente de atenuação de 0,5 e 0,7 dB/cm/MHz para uma frequência entre 2 e 15 MHz com uma resposta linear da atenuação com a frequência.

Os principais materiais citados na literatura para a produção de *phantoms* para ultrassonografia são: o ágar, gelatina, poli (álcool vinílico) (PVA), poliacrilamida, parafina-

gel WAX, blenda de parafina gel com siloxano e blenda de copolímero estireno-etileno/butileno-estireno (SEBS) e polietileno de baixa densidade (PEBD).

Agar e gelatina são polímeros naturais muito utilizados para a produção de *phantoms*, uma vez que as características acústicas do material mimetizador podem ser controladas facilmente no seu processo de produção (e são estáveis em pequenas variações de temperatura). Porém, esses polímeros possuem a desvantagem de ter pouca durabilidade, devido a serem suscetíveis ao ataque de bactérias e necessitam de cuidados especiais de armazenamento para evitar sua degradação. A velocidade do som na gelatina pode ser controlada adicionando-se n-propanol, glicerol e propilenoglicol ao material de base; apresentando valores entre 1520,0 m/s a 1650,0 m/s de acordo com a concentração do álcool adicionado (MADSEN, 1978; MADSEN, 2006; CANNON, 2010). Também podem ser adicionados à gelatina micropartículas de pó de vidro, pó de PVC, grafite, entre outros, para ajustar o coeficiente de atenuação.

O Poli (álcool vinílico) (PVA) possui a vantagem de ter alta rigidez, ser durável e de baixo custo, porém sua principal desvantagem é o tempo de preparação que requer vários ciclos de congelamento e descongelamento, apresentando velocidade de propagação do som entre 1520,0 m/s a 1610,0 m/s dependendo do método de preparação (KHARINE, 2003; SURRY, 2004; Cournane, 2010).

A poliacrilamida é formada por polimerização do monômero acrilamida, porém esse monômero é tóxico e sua manipulação requer precauções durante a preparação. Além disso, é suscetível à desidratação e apresenta velocidade do som de 1580 m/s e coeficiente de atenuação de 0,7 dB/cm a 5MHz. (ZELL *et.al.* 2007).

Os *phantoms* produzidos com materiais solúveis em óleo como a parafina-gel WAX (VIEIRA, 2013), blenda de parafina gel e siloxano (GRILLO, 2015) e blenda do copolímero SEBS com PEBD (CABRELLI, 2015) possuem boas propriedades mecânicas, são estáveis em baixas variações de temperatura, porém apresentam velocidade de propagação do som menor do que a média para os tecidos biológicos, sendo entre 1425,0 m/s a 1480,0 m/s para a parafina-gel WAX; de 1385,0 m/s a 1480,0 m/s para a blenda de parafina gel e siloxano ; e de 1458,6 m/s a 1480,0 m/s para a blenda do copolímero SEBS com PEBD.

A formação de uma blenda possibilita a melhora das propriedades químicas e mecânicas do material. As propriedades das blendas dependem da concentração dos polímeros presentes e da compatibilidade termodinâmica entre eles. A separação de fases é

um problema comum na formação de blendas como resultado da incompatibilidade dos polímeros em uma determinada concentração (SPERLING, 2005).

A reticulação das cadeias poliméricas pode melhorar a compatibilidade entre os polímeros em uma blenda e evitar a separação de fases, pois introduz ligações covalentes entre as cadeias poliméricas aumentando sua estabilidade térmica e mecânica, controle de degradação e resistência à umidade, portanto permite obter um material com melhores propriedades (CRISTIANO, 2009; MATSUDA, 1999; MANSUR, 2008).

Com o intuito de avaliar a influência da proporção dos polímeros para a produção das blendas e o efeito da reticulação do material foram avaliadas as seguintes propriedades:

- Propriedades mecânicas: módulo de Young e força de ruptura pelo método de perfuração utilizando um texturômetro.
- Propriedades acústicas: velocidade de propagação do som e coeficiente de atenuação acústica pelo método de transmissão da onda de ultrassom.
- Perda de umidade através das curvas de dessorção de umidade
- Afinidade do material com a água utilizando a análise de ângulo de contato
- Morfologia: Microscopia Eletrônica de Varredura
- Eficiência da reticulação (ligações químicas): Espectroscopia de reflexão total atenuada no Infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR).

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Desenvolver uma blenda de gelatina/PVA reticulada com glutaraldeído para ser utilizada como material mimetizador do tecido biológico (*phantom*)

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar as propriedades mecânicas e acústicas das blendas de gelatina/PVA utilizando diferentes proporções dos polímeros.
- Avaliar o efeito do tempo e pH sobre as propriedades das blendas reticuladas gelatina/PVA
- Obter blendas reticuladas com menor capacidade de dessorção de água

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Materiais mimetizadores do tecido biológico

Materiais que imitam as características do tecido biológico mole devem mimetizar o tecido com respeito a: velocidade do som, atenuação acústica e retroespalhamento ultrassônico. A Tabela 1 apresenta alguns valores de características acústicas para tecidos biológicos humanos.

Tabela 1. Valores de propriedades acústicas para alguns tecidos biológicos humanos (Adaptado de CULJAT, 2010).

Tecido	Velocidade do som (m/s)	Coefficiente de atenuação (dB/cm)
Sangue	1584	0,2
Osso	3476	6,9
Mama	1510	0,75
Gordura	1478	0,48
Músculo	1547	1,09
Fígado	1595	0,5

Phantoms para treinamento em biópsia de mama e tireóide guiados por ultrassom mimetizam além do tecido biológico normal, algumas lesões presentes nesses órgãos. Essas patologias podem não apresentar diferenças na ecogenicidade do tecido e uma característica importante para a detecção dessas lesões é o módulo de Young, já que algumas patologias provocam mudanças na rigidez do tecido biológico (KROUSKOP, 1998). A Tabela 2 exemplifica alguns valores de módulo de Young do tecido mamário normal e de algumas lesões mamárias.

Tabela 2. Valores de módulo de Young para o tecido mamário normal e lesões mamárias avaliadas a 5% de compressão e 1,0 Hz (Adaptado de KROUSKOP, 1998).

Tecido mamário	Módulo de Young (kPa)
Tecido gorduroso normal	19
Tecido glandular normal	33
Tecido fibroso	107
Carcinoma ductal	25
Carcinoma ductal invasivo	93

3.2. Gelatina

A gelatina é sintetizada através da hidrólise controlada do colágeno que é extraído a partir de ossos de gado, pele de porco, aves e peixes; sendo que a fonte mais abundante para a produção de gelatina é a pele de porco (46%), o couro bovino (29%) e porco e ossos de gado (23%) (GMIA, 2012; DUCONSEILLE, 2015). É uma proteína solúvel em água e possui de 8 a 13% de umidade e densidade relativa de 1,3 a 1,4 (g/mL) (GMIA, 2012).

O material cru (pele de porco, ossos de gado, etc) passa por um pré-tratamento químico e físico para a retirada de minerais (no caso de ossos), gorduras e albuminóides (encontrados na pele) para a produção de um colágeno purificado. O material pré-tratado é hidrolisado para produzir a gelatina solúvel em água quente (GMIA, 2012). Existem dois tipos de gelatina: a do tipo A que é obtida a partir dos ossos e couro de porco e é derivada do colágeno com pré-tratamento ácido e a do tipo B derivada do tratamento alcalino e obtida a partir do couro e ossos bovinos (CRISTIANO, 2009; GMIA, 2012; DUCONSEILLE, 2015).

Em solução aquosa a gelatina é anfótera, ou seja, é capaz de atuar como ácido ou base dependendo do pH do meio. A gelatina bovina é composta em sua maioria por resíduos de aminoácidos não polares (glicina, alanina, prolina, valina, leucina) e aminoácidos carregados positivamente (lisina, arginina, histidina) e carregados negativamente (aspartato e glutamato) (GMIA, 2012). Não contém triptofano e é deficiente em isoleucina, treonina e metionina e resíduos de aminoácidos com enxofre (cisteína e cistina) (CRISTIANO, 2009). Sendo que a matéria-prima e o processo de produção utilizado para a obtenção da gelatina influencia na quantidade e variedade desses aminoácidos. Por exemplo, o pré-tratamento alcalino modifica a glutamina para ácido glutâmico e a asparagina para ácido aspártico, e

portanto, a proporção desses resíduos de aminoácidos são maiores na gelatina do tipo B do que na do tipo A (CRISTIANO, 2009; DUCONSEILLE, 2015).

Os aminoácidos estão unidos de forma covalente por meio de uma ligação chamada de ligação peptídica. As estruturas dos 20 aminoácidos comuns em proteínas estão apresentadas na Figura 1 (LEHNINGER, 2006).

Figura 1. Estrutura química dos 20 aminoácidos comuns em proteínas. (Adaptado de LEHNINGER, 2006).

A reticulação da gelatina depende da reatividade dos resíduos de aminoácidos das cadeias laterais e da especificidade do reagente de reticulação utilizado. Apenas os resíduos de aminoácidos que não estão no centro da atividade da gelatina ou que não participam das interações responsáveis pela formação da estrutura tridimensional estão disponíveis para modificações químicas (WONG, 1991).

As cadeias alquil nos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos dos grupos não polares e alifáticos são inertes e os grupos hidroxil alifáticos da serina e treonina possuem baixa reatividade. Os resíduos de aminoácidos quimicamente ativos são: a) os grupos N-terminais dos aminoácidos e ϵ -amino do grupo da lisina, b) grupo carboxil do aspartato, glutamato e C-terminal dos aminoácidos, c) sulfidril da cisteína, d) grupo tioeter da metionina, e) grupo imidazol da histidina, f) grupo guanidinil da arginina, g) grupo fenólico da tirosina e h) indolil do triptofano (WONG, 1991). O ponto isoelétrico da gelatina – pI (ponto no qual a carga líquida dos resíduos de aminoácidos é zero) está compreendida entre pH 4,7 e 5,4 (SU, 2008; GMIA, 2012). Quando a gelatina forma blendas o seu pI desloca-se para valores mais baixos de pH (SU, 2008).

3.3. Poli (álcool vinílico) (PVA)

Em 1932, W.O. Hermann e colaboradores estudaram um método de obtenção do PVA a partir da reação do éster polivinílico com álcool absoluto na presença de álcali como catalisador. O princípio de trans-esterificação é utilizado até hoje pelos produtores de PVA (KIRK, 1982).

O PVA comercial é produzido a partir do poli (acetato de vinila) (PVAc), pois o monômero álcool vinílico não existe em uma forma estável, é tautômero do aldeído acético (MANO et. al., 2004; PEPPAS, 1984). O PVAc é sintetizado a partir da polimerização do acetato de vinila, e este é então hidrolisado para produzir o PVA. A estrutura química do PVA está representada na Figura 2.

Figura 2. Estrutura química do PVA (configuração “cabeça-a-cabeça”) (Adaptado de PEPPAS, 1984).

A polimerização do PVAc pode produzir PVA com três estruturas estereoregulares: isotático, atático e sindiotático e configuração “cabeça-cabeça”¹ contendo 1,2-glicol ligados. O PVA comercial é uma mistura das três estruturas, sendo o atático a estrutura predominante. A configuração “cabeça-a-cabeça” representando 1 a 2% do total (PEPPAS, 1984).

A relação entre o percentual de hidroxilas no polímero final, após a reação de hidrólise, e o número total inicial de radicais ácido acético representa o grau de hidrólise do PVA. Esse parâmetro é importante na caracterização das propriedades deste polímero. Um aumento do grau de hidrólise implica em redução da solubilidade na água, associada à estabilização energética promovida pelas ligações de hidrogênio intra e intercadeias poliméricas, e no aumento da adesão em superfícies hidrofílicas, da viscosidade e da resistência à tração (COSTA & MANSUR, 2008). Os grupos acetato no PVA são altamente hidrofóbicos (PEPPAS, 1984).

O PVA comercial é disponível com alto grau de hidrólise (grande número de hidroxilas na estrutura química, acima de 98,5%) ou parcialmente hidrolisado (possui grupos acetato residuais em sua estrutura química, de 80 a 98,5% de hidrólise).

O PVA é um dos poucos polímeros semicristalinos solúveis em água com boas características interfaciais e mecânicas, sua resistência à passagem de oxigênio é superior à de qualquer polímero conhecido. Além de apresentar uma capacidade de estabilização de dispersões, excelente resistência química e biocompatibilidade (COSTA & MANSUR, 2008). O hidrogel de PVA possui excelente transparência, consistência macia quando na forma de membrana (LIN et al., 2006).

¹ As unidades meros dos polímeros podem ligar-se a átomos de carbono alternados formando uma configuração “cabeça-a-cabala” na qual a extremidade anterior de um mero se liga à extremidade posterior de um outro mero, ou ligar-se a carbonos vizinhos formando a configuração “cabeça-a-cabeça” na qual a extremidade anterior de um mero liga-se a extremidade anterior de outro mero.

3.4. Blendas poliméricas

A mistura de polímeros diferentes possibilita a obtenção de novos materiais com propriedades muitas vezes superiores às dos componentes puros. Blendas viabilizam a comercialização de polímeros com preços proibitivos quando puros. No desenvolvimento de blendas poliméricas é possível aproveitar a tecnologia de produção dos materiais de partida, sem envolver a síntese sofisticada de um novo polímero com as mesmas propriedades finais, sendo uma alternativa mais econômica (CABRAL, 2017; SIQUEIRA et al., 1993). As blendas poliméricas podem ser produzidas sem haver reações químicas entre os componentes, objetivando a melhora de suas propriedades com a obtenção de um novo material com propriedades intermediárias às dos polímeros puros (SPERLING, 2005).

As blendas poliméricas podem ser produzidas por dois métodos principais: solução ou mistura mecânica no estado fundido. A produção por solução ocorre por meio da dissolução dos polímeros puros separadamente na fração em massa desejada seguida da mistura das soluções. A solubilização dos polímeros puros é um processo que não altera as propriedades químicas dos polímeros (CABRAL, 2017). A obtenção de blendas pelo método do estado fundido é através da mistura de dois ou mais polímeros no estado fundido ou amolecido por meio de uma extrusora ou misturador fechado utilizando trabalho mecânico e calor.

3.4.1. Blendas de Gelatina/PVA

Blendas entre gelatina e PVA são uma mistura de um polímero natural com um polímero sintético e possuem muitas aplicações e são muito utilizadas na engenharia de tecidos, produção de filmes e “drug delivery” (SU, 2009).

A gelatina é um polímero natural anfótero devido à presença dos grupos amina e carboxílicos que possuem uma grande capacidade de resposta às mudanças de pH e, portanto, a miscibilidade das blendas de gelatina e PVA podem ser determinadas pela alteração do pH.

Segundo Su (2009) em condições abaixo do ponto isoelétrico da gelatina ($pI \sim 4,7$) os grupos amina dos resíduos de aminoácidos da gelatina estarão carregados positivamente e os grupos hidroxila do PVA serão atraídos pelo $-NH_3^+$ por interações carga dipolo e a blenda entre gelatina e PVA é miscível. Em condições básicas a gelatina estará carregada negativamente e a cadeia molecular da gelatina tende a alongar devido à força eletrostática repulsiva ocorrendo a quebra das ligações de hidrogênio. Dessa forma haverá a quebra da

estrutura terciária da gelatina, o que possibilita uma maior aproximação das cadeias polimérica do PVA e assim ocorrerá uma interação parcial entre os polímeros.

Ainda de acordo com Su (2009) em pH próximo ao ponto isoelétrico da gelatina, os resíduos de aminoácidos da gelatina estão carregados positiva e negativamente, ou seja, os grupos amina protonados ($-\text{NH}_3^+$) e os grupos carboxílicos desprotonados ($-\text{COO}^-$), e assim o grande número de cargas positivas e negativas fazem com que as interações entre gelatina-gelatina e PVA-PVA sejam mais dominantes do que as interações entre os polímeros e assim haverá a separação de fases.

Não existem pesquisas relacionadas a blendas de Gelatina e PVA para uso como material mimetizador do tecido biológico para ultrassom.

3.5. Reticulação de polímeros

A reticulação das cadeias poliméricas, também denominado de reação de entrecruzamento, é um tipo de modificação química que visa unir as cadeias poliméricas, ou ainda, ligar as cadeias às de outros polímeros gerando redes poliméricas híbridas. Este processo torna o polímero mais resistente ao calor, luz e outros agentes físicos, providenciando alto grau de estabilidade, resistência mecânica, química e a solventes (BHATTACHARYA & RAY, 2009). O processo de reticulação sofre influência tanto de algumas características físico-químicas dos polímeros utilizados quanto das condições reacionais adotadas como temperatura, pH e tempo. A concentração e o tipo de agente reticulante também influenciam no processo de reticulação (GONSALVES & ARAÚJO, 2011). Com a elevação do grau de reticulação, reduz-se a porosidade do material obtido, a permeabilidade à água e a difusão de possíveis substâncias aprisionadas nas redes poliméricas formadas (BERGER et al., 2004).

Em polissacarídeos, a introdução de vários graus de reticulação dentro das moléculas pode gerar longos agregados de moléculas com alta viscosidade ou insolúveis produtos com ampla faixa de características de inchamento (DUMITRIU et al., 1996). A reticulação de proteínas consiste na formação de ligações covantes entre cadeias polipeptídicas dentro da estrutura da proteína (reticulação intramolecular) ou entre proteínas (reticulação intermolecular). Portanto, a rede polimérica formada por proteínas pode estabelecer fortes ligações covalentes intermoleculares para alcançar estrutura compacta e reduzir a mobilidade

polimérica (WIHODO & MORARU, 2013). A reação de reticulação pode ser realizada usando diferentes métodos: químico, térmico, radiação e enzimático.

3.5.1. Glutaraldeído como agente reticulante

Agentes reticulantes são moléculas de peso molecular muito menor que o peso molecular da cadeia principal entre duas ligações cruzadas consecutivas e normalmente apresentam, no mínimo, dois grupos funcionais reativos que permitam a formação de ponte entre cadeias poliméricas (COSTA & MANSUR, 2008).

O glutaraldeído (GTA) (Figura 3) é um aldeído capaz de reticular gelatina e PVA e é muito utilizado devido à sua eficiência, baixo custo, pequeno tempo de reação e baixo efeito tóxico em pequenas concentrações (MATSUDA, 1999; MIGNEAUT, 2004).

Figura 3. Estrutura química do glutaraldeído.

O glutaraldeído (GA) é um agente reticulante normalmente usado na formação de redes de polipeptídios e proteínas devido à reatividade dos grupos aldeídos, que prontamente formam bases de Schiff com os grupos amino das proteínas. É também usado como agente reticulante do PVA e alguns polissacarídeos, tais como a heparina, o ácido hialurônico e a quitosana (LIN et al., 2006; ROKHADE et al., 2007).

A maioria das reações envolvendo modificação de proteínas são reações nucleofílicas, sendo que a nucleofilicidade é função da reatividade química dos resíduos de aminoácidos. O GTA reage com os resíduos de aminoácidos laterais da gelatina formando ligações covalentes preferencialmente com os grupos reativos e-NH₂ da lisina e hidroxilisina (HABBEB, 1968; WONG, 1991; MATSUDA, 1998; MIGNEAUT, 2004, FARRIS, 2010). O grupo R-NH₂ tem um par de elétrons não ligante consideravelmente básico, sendo um nucleófilo forte que ataca facilmente o carbono carbonílico do GTA (Figura 4) (CONSTANTINO, 2008). O pH do meio afeta a taxa de muitas reações nucleofílicas e a

protonação dos resíduos de aminoácidos diminui a nucleofilicidade da espécie (WONG, 1991).

Figura 4. Representação simplificada de uma reação de grupos amina com grupos aldeídos do glutaraldeído.

O glutaraldeído em solução aquosa existe como uma mistura de formas hidratadas e poliméricas todas em equilíbrio, sendo que as variações do pH das soluções influenciam nessa formação. Soluções de glutaraldeído em condições ácida e neutra existem como uma mistura de monômeros (glutaraldeído livre e hemiacetal cíclico hidratado, I e II na Figura 5, respectivamente) ou polimérica (oligômero de hemiacetal cíclico, III na Figura 5). À medida que o pH da solução de glutaraldeído torna-se mais básico existe a possibilidade de formação de formas poliméricas que podem precipitar em solução (MIGNEAUT, 2004,).

A reação do glutaraldeído livre com gelatina em pH ácido (reação 1 na Figura 5) é instável e regenera em aldeído e amina. As reações mais prováveis para proteínas e glutaraldeído geralmente ocorre entre as formas hidratadas (hemiacetal e oligômero) do glutaraldeído (reações 2 e 3 na Figura 5) (HABBEB, 1968; OKUDA, 1991; WALT, 1994; MATSUDA, 1998; MIGNEAUT, 2004, FARRIS, 2010).

Figura 5 Reações de reticulação de proteínas com glutaraldeído em condições ácidas ou neutras.

O GTA também reage com os grupos funcionais hidroxilas das cadeias poliméricas do PVA formando ligações acetal, sendo a reação catalisada por ácido clorídrico em pH 2 (MANSUR, 2008) (Figura 6).

Figura 6. Reação de reticulação do PVA com glutaraldeído.

3.6. Ultrassom

O som é uma energia mecânica transmitida por ondas de pressão, envolvendo movimentos físicos (vibrações) das moléculas e partículas, sendo necessário para sua propagação, um meio material. As características da onda sonora ao longo da sua propagação por um meio material são definidas por variáveis como pressão, temperatura, densidade do meio e mobilidade das partículas (CABRELLI, 2015; CAVALCANTI, 2012; ZAGEBSKI, 1996).

Dessa forma a propagação da onda sonora provoca perturbações no meio material, produzindo deformações em relação à sua direção de propagação gerando áreas de compressão (na qual a densidade de moléculas e pressão são elevadas) e áreas de rarefação (densidade de moléculas e pressão são menores). A distância entre duas áreas de compressão é equivalente ao comprimento da onda acústica. O ultrassom são ondas mecânicas com frequências acima das audíveis pelos seres humanos, sendo de 20kHz até centenas de MHz (CAVALCANTI, 2012; GRILLO, 2015; ZAGEBSKI, 1996). Parâmetros como velocidade do som, atenuação acústica e impedância acústica, caracterizam o meio no qual a onda se propaga.

A utilização do ultrassom para a determinação da localização, tamanho, textura de um objeto e velocidade do som em um meio, baseia-se na emissão de um pulso ultrassônico que se propaga no meio e quando interage com um objeto/obstáculo com impedância mecânica diferente ele é parcialmente refletido pelas interfaces deste e retorna como um eco, e é captado por um dispositivo que transmite e recebe o sinal. Este dispositivo é chamado de transdutor piezoelétrico (CAVALCANTI, 2012).

Um transdutor é composto por material piezoelétrico e por meio de uma diferença de potencial é capaz de converter energia elétrica em vibrações mecânicas e a recíproca também é verdadeira. Estes transdutores são capazes de emitir e receber os ecos gerados pelas interfaces do tecido. (CAVALCANTI, 2012; VIEIRA, 2005).

Uma utilização do ultrassom é para o diagnóstico por imagem no qual um mapeamento acústico associa uma imagem com as propriedades mecânicas do meio. Os valores de amplitude das ondas ultrassônicas que percorrem o meio e retornam sendo captadas pelo transdutor são convertidos em uma escala de cinza, e dessa forma a imagem em modo B é construída. Em cada material as ondas ultrassônicas se propagam com propriedades

acústicas características tais como atenuação, velocidade de propagação da onda e impedância mecânica.

Se uma onda emitida pelo transdutor se propaga pelas estruturas internas dos tecidos biológicos que apresentam diferença de impedância mecânica (uma modificação da resistência à passagem da onda) no meio de propagação, ela é refletida, refratada ou absorvida. Quando a onda é refletida, ela é recebida pelo transdutor e imagens de ultrassom podem ser geradas, através de uma conversão de sinais analógicos para digitais. A diferença acústica entre duas estruturas próximas é responsável pela intensidade da onda refletida (eco) (VIEIRA, 2005).

3.6.1. Velocidade do som

A velocidade de propagação do som em um meio material é determinada primeiramente pelas características do meio, e é dependente das propriedades viscoelásticas e da densidade do material (ZAGZEBSKI, 1996).

A propriedade dos tecidos que tem influência na intensidade ou amplitude da onda refletida é a impedância acústica (Equação 1), Z , que é o produto da densidade do meio (ρ) e velocidade do som (c) (ZAGZEBSKI, 1996).

$$Z = \rho c \quad (1)$$

A velocidade do som é dada pela Equação 2

$$c = \sqrt{\frac{B}{\rho}} \quad (2)$$

no qual β é o módulo de *Bulk* (que é função da rigidez do material e está relacionado à resistência do material ao ser comprimido) e ρ a densidade (ZAGZEBSKI, 1996).

3.6.2. Atenuação

A atenuação da energia acústica no interior do tecido biológico se dá principalmente por um processo de perda de energia e pode ocorrer por espalhamento ou absorção da onda (GRILLO, 2015; VIEIRA, 2005).

O espalhamento tem relação direta entre a dimensão do alvo e o comprimento da onda, dessa forma, o feixe ultrassônico dentro do tecido pode ser espalhado tanto por uma célula ($\sim 10 \mu m$) quanto pelo contorno dos órgãos. Quando a estrutura é maior que o comprimento de onda (diafragma, veias e tecido, por exemplo) o espalhamento ocorre por causa da reflexão e refração e é o que mais atenua o feixe ultrassônico dentro do tecido. Nesses casos o espalhamento não depende da frequência. Já em estruturas com dimensões equivalentes ao comprimento de onda (como o tecido hepático por exemplo), o espalhamento predominante ocorre por difração e o coeficiente de atenuação varia com a segunda potência da frequência. Em estruturas com dimensão menor do que o comprimento de onda (como o sangue, por exemplo) o espalhamento é mais fraco e varia com a quarta potência da frequência (VIEIRA, 2005).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Os materiais utilizados para a preparação das blendas foram Gelatina bovina (alimentícia, 240 bloom, Gelitta, Brasil), Poli (álcool vinílico) (99-100% de hidrólise, MW 86.000, ACROSS ORGANICS), Glutaraldeído (solução de 25%, da Sigma Aldrich) e Ácido clorídrico concentrado P.A (38% de concentração, LS Chemicals).

4.2. Preparação das blendas de Gelatina/PVA

As blendas de gelatina (solução A) e PVA (solução B) foram preparadas em três diferentes proporções: 80/20, 60/40 e 40/60 % (w/w) de gelatina/PVA, respectivamente. Também foram preparados os controles 0/100 e 100/0 de gelatina/PVA. A concentração total de sólidos (gelatina e PVA) na solução foi de 15%.

A solução A foi preparada hidratando a gelatina em água destilada fria mantendo-a em agitação por 30 minutos, seguida de aquecimento por 30 minutos a 60°C e a solução B foi preparada hidratando o PVA em água destilada fria por 30 minutos, seguida de aquecimento por 30 minutos a 90°C. Após o aquecimento as soluções A e B foram misturadas e mantidas em agitação por 30 minutos.

A mistura foi deixada em repouso a temperatura ambiente por 10 minutos para a remoção das bolhas de ar formadas no processo de preparação. O material resultante foi disperso em porta amostras cilíndricos de PVC com 5,0 cm de diâmetro e 2,5 cm de espessura selados com filme de PVC para caracterização das propriedades acústicas; e em potes cilíndricos de 4,0 cm de altura e 3,7 cm de diâmetro para avaliação das propriedades mecânicas; e em placas Petri para análise do ângulo de contato. Todas as amostras foram condicionadas em refrigeração a 10 °C por 24 horas antes da determinação de suas propriedades.

4.3. Reticulação com glutaraldeído

Para a reticulação das blendas de gelatina/PVA, as soluções A e B foram preparadas como descrito acima e tiveram o seu pH ajustado a 4 e 5 com uma solução de ácido clorídrico concentrado. O ajuste do pH foi realizado para evitar a reação de polimerização do glutaraldeído que pode ocorrer em pH neutro e básico, o que foi confirmado por meio de testes preliminares. Em seguida, foi adicionado à solução das blendas com o pH ajustado 0,5% de glutaraldeído, com a solução à 60 °C. As blendas foram reticuladas em tempos de 5min, 15min, 30min e 60 min em constante agitação. Após o período de reticulação, as blendas foram mantidas a temperatura ambiente por 10 min para a remoção das bolhas de ar formadas no processo de preparação; e em seguida dispersas em porta amostras cilíndricos de PVC com 5,0 cm de diâmetro e 2,5 cm de espessura selados com filme de PVC para caracterização das propriedades acústicas; e em potes cilíndricos de 4,0 cm de altura e 3,7 cm de diâmetro para avaliação das propriedades mecânicas; e em placas Petri para análise do ângulo de contato. Todas as amostras foram condicionadas em refrigeração a 10 °C por 24 horas antes da determinação de suas propriedades.

4.4. Propriedades mecânicas em testes de compressão

Os testes mecânicos foram realizados com um texturômetro (TA.TX Plus Texture Analyzer, Stable Micro Systems, localizado no Departamento de Química da Universidade de São Paulo, *campus* de Ribeirão Preto) segundo a metodologia padrão para análise de géis a base de gelatina da GMIA (Gelatin Manufactures Institute of America) que está disponível no “*Application Guide*” do equipamento. Utilizou-se uma ponta de prova cilíndrica de 20 mm de diâmetro (P/0,5) lubrificada com óleo de silicone para minimizar a fricção entre as amostras e a ponta de prova. A perfuração das amostras foi realizada a uma velocidade do teste de 1,0 mm/s, velocidade do pós-teste de 1,0 mm/s com a ponta de prova penetrando na amostra a 10 mm da altura original da amostra. Foram obtidas as curvas de tensão vs deformação e força vs deformação. A força máxima de ruptura foi determinada diretamente do gráfico de Força vs Deformação (Figura 7).

O módulo de Young foi determinado pelo coeficiente angular da parte linear da curva de tensão x deformação (Figura 7).

As análises foram realizadas em triplicata.

Figura 7. Curva de tensão (Pa) x deformação (%) para o gel de 100% de gelatina.

4.5. Teor de umidade e análise de sorção de umidade das blendas

Para avaliar a umidade presente nas blendas com e sem reticulação, 3g de amostra foram pesadas em balança analítica em placas Petri e levadas à estufa a 80°C por 24 horas.

Após esse período as amostras foram condicionadas em dessecador com sílica por 30 min e a massa final foi pesada em balança analítica. A umidade das amostras foi calculada a partir da Equação 3.

$$\text{Umidade}\% = \frac{M_0 - M_t}{M_0} \times 100 \quad (3)$$

Sendo:

M_0 a massa inicial das amostras, e M_t a massa das amostras no tempo t após aquecimento à 80 °C por 24 horas.

Para avaliar a sorção de umidade das blendas, com e sem reticulação, foram pesadas 3 g de amostra em placas Petri e colocadas em um dessecador contendo solução saturada de Na_2SO_4 , para garantir uma umidade relativa (UR) de 95% a 25 °C. As amostras foram removidas periodicamente e pesadas em balança analítica. Durante as primeiras 12 horas, as amostras foram pesadas a cada hora, e em seguida a pesagem foi feita a cada 12 horas por um período de 120 horas. As análises foram conduzidas em triplicata.

A perda de umidade das amostras foi calculada a partir da Equação 4.

$$\% \text{W.L} = \frac{M_0 - M_t}{M_0} \times 100 \quad (4)$$

Sendo:

M_0 a massa inicial das amostras, e M_t a massa das amostras no tempo t após serem expostas à umidade relativa de 95%.

As análises foram realizadas em triplicata.

4.6. Determinação do ângulo de contato

O ângulo de contato das amostras das blendas (1 cm largura x 2 cm de comprimento e 4 mm de espessura) foram medidas utilizando o equipamento OCA-20 Dataphysics – (Alemanha), que gera imagens de uma gota de água na superfície das amostras a 25°C. O medidor de ângulo de contato utiliza uma câmera para a aquisição das imagens e uma fonte de luz para a formação de uma imagem nítida da gota do líquido sobre a superfície estudada. As

imagens foram analisadas pelo software SCA20 de tratamento de imagem que afere a tangente e o ângulo de contato formado entre a gota e a superfície (Figura 8).

Figura 8. Imagem do ângulo formado entre a gota de água e a superfície do gel de 100% de gelatina.

4.7. Avaliação dos parâmetros acústicos.

A avaliação dos parâmetros acústicos foi realizada no Grupo de Inovação em Instrumentação Médica e Ultrassom –GIIMUS do Departamento de Física da Universidade de São Paulo, *campus* de Ribeirão Preto.

Os parâmetros acústicos de velocidade de propagação do som e atenuação acústica das blendas foram determinados pelo método de transmissão da onda. Para a caracterização das propriedades acústicas foi utilizado o aparato experimental mostrado na Figura 9. Foram utilizados dois transdutores monocanais de frequência central de 1 MHz, posicionados um em frente ao outro a uma distância de $100\text{ mm} \pm 0,05\text{ mm}$, em um recipiente cúbico de acrílico contendo água destilada a 21°C , sendo a temperatura da água mantida constante e monitorada utilizando-se um termômetro digital (Incoterm, escala de -50 a 300°C , exatidão 1°C) durante a análise das amostras. Um dos transdutores foi conectado a um *pulse/receiver* (5800, Olympus-Panametrics-NDT, Massachusetts, Estados Unidos), a uma frequência de repetição de pulsos em 1000 Hz e energia de $12,5\text{ }\mu\text{J}$, que foi responsável pela geração do pulso ultrassônico. O segundo transdutor foi conectado a um osciloscópio digital (MSO7104B, Agilent Technologies) e foi responsável pela recepção das ondas ultrassônicas transmitidas.

As amostras foram posicionadas no centro do recipiente de acrílico e a recepção da onda ultrassônica foi o resultado da interação da onda ultrassônica com o material. A velocidade do som e atenuação acústica das amostras foi calculada utilizando a velocidade do som na água como referência.

Figura 9. Aparato experimental para as medidas de velocidade do som e atenuação acústica.

A velocidade do som na água C_a , é estimada por meio da Equação 5, sendo d_0 a distância entre os transdutores e τ_0 o tempo de trânsito do pulso ultrassônico na água.

$$C_a = \frac{d_0}{\tau_0} \quad (5)$$

A velocidade do som nas amostras C_m é calculada pela Equação 6, sendo que d é a espessura das amostras, $\Delta\tau = \tau_0 - \tau_1$ a diferença de tempo do pulso na água τ_0 e quando as amostras estão imersas na água τ_1 .

$$C_m = C_a \left(1 + \frac{C_a \Delta\tau}{d}\right)^{-1} \quad (6)$$

O coeficiente de atenuação nas amostras α é calculado com a Equação 7, na qual A_0 é a amplitude do pulso ultrassônico transmitido na água e A é a amplitude do pulso ultrassônico transmitido quando a amostra está imersa na água.

$$\alpha = \frac{20}{d} \log \left(\frac{A_0}{A} \right) \quad (7)$$

As análises foram realizadas em triplicata.

4.8. Espectros de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR)

Os géis de gelatina pura, PVA puro e as blendas de 80/20% gelatina/PVA com e sem reticulação foram analisados na região do infravermelho com o espectrofotômetro IR PRESTIGE – 21 (Shimadzu, Japan) com Transformada de Fourier (ATR) na região de 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} , com 20 varreduras.

4.9. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia dos géis de gelatina e PVA (controles) e das blendas foram analisadas utilizando o microscópio eletrônico de varredura MEV-ZEISS EVO 50, Cambrige (UK), operando em 20Kv em alto vácuo. Todas as amostras foram fraturadas com nitrogênio líquido e então metalizadas pelo processo de pulverização catódica com tempo de ouro de 200 s com o sistema de metalização da marca Bal-Tec, mod. SCD 050 Sputter Coater, Fürstentum Liechtenstein.

4.10. Análise estatística

O teste de Tukey foi utilizado para determinar a diferença entre as médias das propriedades das blendas estudadas, utilizando a um nível de significância de 95% com ajuda do programa Statistica 12.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Blendas de gelatina/PVA

5.1.1. Aspecto visual

As fotografias dos géis de gelatina (100/0), PVA (0/100) e das blendas gelatina/PVA (80/20, 60/40 e 40/60) são mostradas na Figura 10, na qual pode ser observado que o gel formado com 100% de gelatina (Figura 10 A) apresenta uma superfície lisa e homogênea, além de uma coloração amarelada. Entretanto, o gel formado com 100% de PVA (Figura 10 B) não formou um gel sólido como a gelatina, mas sim um gel mole e transparente. Por outro lado, as blendas com proporções de 80/20 e 60/40 de gelatina/PVA (Figura 10 C, D) também foram homogêneas sem aparente separação de fases, mas observou-se que seu aspecto sólido diminuiu com o aumento de PVA. A blenda 40/60 (gelatina/PVA) (Figura 10 E) não formou um material homogêneo apresentando duas fases, as quais foram visíveis com a presença de duas colorações no gel, uma branca relacionada com o PVA e uma amarela relacionada com a gelatina.

Segundo Run Su (2008), a maior interação entre a gelatina e o PVA é através das interações íon-dipolo entre os grupos amina carregados positivamente e os grupos hidroxila do PVA. Em pH neutro (acima do ponto isoelétrico da gelatina) a maioria dos resíduos de aminoácidos da gelatina estão carregados negativamente devido à desprotonação dos grupos carboxila dos resíduos de aminoácidos ($-\text{COO}^-$) e assim haverá uma força repulsiva com o oxigênio eletronegativo dos grupos hidroxila do PVA, e como na blenda gelatina/PVA (40/60), a proporção de PVA é maior do que a de gelatina, a repulsão entre os dois polímeros leva à separação de fases do material.

Figura 10. A) gelatina pura; B) PVA puro e Blendas de gelatina/PVA: C) 80/20; D) 60/40; E) 40/60 com evidente separação de fases.

5.1.2. Propriedades mecânicas das blendas

Os resultados das propriedades mecânicas dos géis de gelatina, PVA, e das blendas gelatina/PVA encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Força de ruptura (N) e módulo de Young (kPa) das blendas.

Gelatina/PVA (%)	Força de ruptura (N)	Módulo Young (kPa)
100/0	$15,45 \pm 2,51^a$	$54,50 \pm 1,59^a$
80/20	$6,40 \pm 0,42^b$	$40,22 \pm 3,05^b$
60/40	$3,70 \pm 0,14^b$	$22,41 \pm 1,66^c$
40/60	$0,27 \pm 0,02^c$	$1,47 \pm 0,22^d$
0/100	$0,17 \pm 0,01^c$	$0,31 \pm 0,04^d$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as médias, determinadas pelo teste de Tukey, usando o programa *Statistica*.

Observa-se nos resultados da Tabela 3 que os géis de 100% de gelatina são mais resistentes à compressão do que os géis de 100 % de PVA. Portanto, pode-se dizer que a gelatina formou um gel com a estrutura de um sólido e o PVA formou um gel mole com uma característica mais viscosa. Nesse sentido à medida que aumentou a concentração de PVA na blenda gelatina/PVA, a força de ruptura na perfuração e o módulo de Young diminuíram quando comparado com os géis de 100% de gelatina, apresentando características de um gel mole e viscoso como o formado pelo PVA puro. Isto indica que as propriedades mecânicas das blendas foram fortemente influenciadas pela concentração dos polímeros na mistura e que a presença do PVA enfraquece a rede polimérica formada pela gelatina, mesmo em pequenas concentrações.

Também foi observado que existe uma concentração crítica dos polímeros com evidente separação de fases, a qual aconteceu quando a concentração do PVA foi 1,5 vezes maior do que a gelatina (blenda 40/60). Nesta concentração de PVA, poucas interações gelatina-PVA são formadas, sendo mais predominantes as interações gelatina-gelatina e PVA-PVA produzindo a separação de fases e géis mais fracos. Nesta concentração dos polímeros observou-se uma queda drástica da resistência do gel, o qual pode ser verificado pelo módulo de Young.

Comparando os valores de módulo de Young apresentados na Tabela 2 com os valores obtidos nas blendas de gelatina/PVA da Tabela 3, as blendas de 80/20 e 60/40 de gelatina/PVA possuem módulos de Young próximos ao tecido glandular mamário normal e poderiam ser utilizadas para simular a mama.

5.1.3. Teor de umidade, sorção de umidade e ângulo de contato

Os valores médios de umidade dos géis de gelatina (100/0) e PVA (0/100) e das blendas de gelatina/PVA estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Teor de umidade dos géis de gelatina e PVA puros e das blendas gelatina /PVA.

Gelatina/PVA (%)	Umidade (%)
100/0	85,64 ± 0,07
80/20	85,47 ± 0,06
60/40	85,25 ± 0,03
40/60	85,10 ± 0,11
0/100	85,10 ± 0,18

Observa-se pelos valores de umidade apresentados na Tabela 4 que os géis de gelatina e PVA, assim como as blendas de gelatina/PVA apresentaram alto teor de umidade, sendo estes valores semelhantes para todas as amostras estudadas. O alto teor de umidade das blendas indica alta retenção de moléculas de água na matriz polimérica formada pela gelatina e PVA, devido à característica hidrofílica destes polímeros.

As cinéticas de perda de umidade dos géis armazenados em 95% de UR estão apresentadas na Figura 11. Observa-se que os géis de 100% de gelatina e PVA (controle) apresentaram semelhante comportamento de perda de umidade durante o período estudado. Assim, ambos os géis apresentaram uma alta taxa de perda de umidade até às 18 horas de armazenamento com perda de umidade de aproximadamente 15%. Após esse período, a taxa de perda de umidade é mais lenta, mas não sendo estabilizada em todo o período estudado (120 horas), obtendo-se uma perda de 20% de umidade em 120 horas de armazenamento.

As curvas de perda de umidade das blendas gelatina/PVA também apresentaram maiores taxas de perda de umidade nas primeiras 18 horas de armazenamento, depois desse período essa taxa foi mais lenta até as 120 horas analisadas. A blenda gelatina/PVA com maior concentração de gelatina (80/20) mostrou um comportamento semelhante no processo de dessorção da água quando comparados aos géis de gelatina e PVA puros. Entretanto, a blenda 60/40 (gelatina/PVA) apresentou menor dessorção de umidade durante o período estudado, perdendo ao redor de 18% de umidade em 120 horas. Portanto, pode-se dizer que neste gel as moléculas de água estão ligadas de forma homogênea por meio de pontes de

hidrogênio com os grupos hidrofílicos da gelatina e PVA, formando uma rede homogênea e sem separação de fases. Contrário a este comportamento, a blenda 40/60 apresentou maior perda de umidade durante o período estudado (~27 %). Como esta blenda apresentou separação de fases, a interação entre as moléculas de água com os grupos hidrofílicos presentes no PVA e gelatina pode não ter ocorrido de forma homogênea, portanto foram facilmente removidos do sistema quando comparado com as blends 80/20 e 60/40 (gelatina/PVA) . Baseado nestes resultados, pode-se dizer que quanto maior a interação entre a gelatina e o PVA, menor será a mobilidade das cadeias dos polímeros e assim as moléculas de água ficam mais retidas dentro da rede do gel.

Figura 11. Cinética da perda de umidade dos géis de gelatina pura (100/0), do PVA puro (0/100) e das blends (80/20, 60/40, 40/60 % de gelatina/PVA respectivamente).

Na Figura 12 estão apresentados os valores de ângulo de contato dos géis de gelatina (100/0) e PVA (0/100) controle e as blendas gelatina/PVA (80/20, 60/40 e 40/60). A medida do ângulo de contato formado entre a gota de água e a superfície do material avalia a interação intermolecular entre as moléculas de água com as moléculas presentes na superfície do material. Quanto maior for a interação com a água, menor será o ângulo de contato, pois a gota irá interagir com os grupos polares do material se espalhando pela superfície do mesmo.

Na Figura 12, nota-se que o gel de 100 % PVA tem menor ângulo de contato ($6,32^\circ$) do que o gel de 100% gelatina ($38,23^\circ$), isto indica que o PVA forma um gel mais hidrofílico do que a gelatina devido à grande quantidade de grupos hidroxilas presentes em sua estrutura química (99-100% de hidrólise). Esta característica foi afetada com o aumento da concentração de gelatina na blenda, obtendo-se géis menos hidrofílicos. Um aumento da concentração de gelatina nas blendas 80/20 e 60/40 proporcionaram características mais hidrofóbicas ao gel, sendo que o ângulo de contato para esses géis foi de $56,97^\circ$ e $62,23^\circ$, respectivamente. Na blenda 60/40 de gelatina/PVA, a concentração dos polímeros presentes permitiu obter maior valor de ângulo de contato, indicando que nesta condição ocorreu uma maior interação entre os polímeros, já que o PVA interage com os grupos polares da gelatina, e assim menos grupos hidroxilas ficam disponíveis na superfície do material para interagir com as moléculas de água da gota. Observa-se que esta blenda também apresentou a menor capacidade de dessorção, indicando que as moléculas de água encontram-se interagindo fortemente com os grupos hidrofílicos da gelatina e PVA, estando menos disponíveis para interagirem com o meio externo.

Figura 12. Ângulo de contato da gelatina pura (100/0), PVA puro (0/100) e das blendas gelatina/PVA 80/20, 60/40, 40/60.

5.1.4. Velocidade do som e coeficiente de atenuação acústica

Os resultados de velocidade do som e coeficiente de atenuação para os géis de 100% de gelatina e PVA, assim como as blendas 80/20, 60/40 e 40/60 gelatina/PVA estão representados na Tabela 5.

Tabela 5. Velocidade do som (m/s) e coeficiente de atenuação (dB/cm) para os géis de gelatina, PVA e as blendas gelatina/PVA.

Blendas	Velocidade (m/s)	Atenuação (dB/cm)
100/0	1542,75 ± 2,50 ^b	0,24 ± 0,03 ^a
80/20	1541,34 ± 1,13 ^b	0,23 ± 0,01 ^a
60/40	1544,68 ± 0,92 ^b	0,23 ± 0,07 ^a
40/60	1550,33 ± 1,43 ^a	0,11 ± 0,02 ^b
0/100	1552,50 ± 1,19 ^a	0,13 ± 0,09 ^b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as médias, determinadas pelo teste de Tukey, usando o programa Statistica.

O gel de 100% de gelatina e 100% de PVA puro apresentaram velocidade de propagação do som próximas à velocidade média dos tecidos biológicos (1540,0 m/s) (AIUM, 1990). Estes valores estão de acordo com a literatura de 1520 m/s a 1650 m/s para a gelatina e 1520 m/s a 1610 m/s para o PVA (CULJAT, 2010), já o coeficiente de atenuação ficou abaixo da média dos tecidos biológicos (0,5 dB/cm) (AIUM, 1990).

Na Tabela 5 observa-se que concentrações menores do que 40% de PVA não causaram efeito significativo na velocidade do som quando comparado com os géis de 100% de gelatina. Entretanto, os géis de gelatina/PVA 80/20 e 60/40 apresentaram menor velocidade de som do que o gel de 100% de PVA. As blendas com as proporções 80/20 e 60/40 % de gelatina/PVA apresentaram valores de velocidade do som satisfatórios, já que se aproximam da velocidade média do tecido biológico de 1540 m/s.

Também se observa na Tabela 5 que a adição de baixa concentração de PVA nos géis de gelatina (concentrações menores do que 40%) não causou um efeito significativo no coeficiente de atenuação quando comparado com o gel de gelatina pura. Entretanto uma maior concentração de PVA na blenda (>60%) causou uma redução no coeficiente de atenuação quando comparado com o gel de 100% de gelatina, o que pode ser justificado pela separação de fases observada na blenda 60/40.

O coeficiente de atenuação das blendas gelatina/PVA 80/20 e 60/40 foi aproximadamente 0,2 dB/cm, que está abaixo do valor médio para tecidos biológicos, porém outros pesquisadores comprovaram que o coeficiente de atenuação em materiais à base de gelatina pode ser facilmente controlado com a adição de micropartículas de vidro ou grafite ao material (MADSEN, 1978; HALL, 1997).

5.1.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As microscopias dos géis de gelatina (100/0) e PVA (0/100) controle e das blendas gelatina/PVA estão apresentados na Figura 13. Os géis de gelatina mostraram uma estrutura compacta e com presença de relevos (Figura 13 A), ao contrário dos géis de PVA que apresentaram uma superfície mais lisa, mas com presença de grietas ou fissuras (Figura 13 B).

As blendas com alto teor de gelatina (80/20 e 60/40) (Figura 13 C e 13 D) mostraram a estrutura compacta e com presença de relevos, como observada para a gelatina pura, mas com presença de gotículas de diferentes tamanhos que podem estar relacionadas à presença de

PVA e água na blenda. Estas emulsões foram mais homogeneamente distribuídas na matriz da blenda com alto teor de gelatina (80/20) (Figura 13 C), mas em blendas com alta concentração de PVA (60/40) (Figura 13 E), observou-se gotículas de maior tamanho e com uma distribuição heterogênea e superfície diferente do observado na gelatina pura, e a presença de grietas e relevos foram evidentes e confirmaram a separação de fases mostrado na Figura 10.

As gotículas observadas nas blendas gelatina/PVA 80/20 e 60/40 apresentaram dimensão média de 70 μm como pode ser observado na Figura 13 C e 13 D. A presença dessas gotículas atenuam a onda ultrassônica por espalhamento e como a dimensão das gotículas é menor do que o comprimento de onda do ultrassom (100 μm a 770 μm) (CABRELLI, 2015) e esse tipo de espalhamento tem baixa contribuição para a atenuação da onda ultrassônica justificando os valores baixos de atenuação (GRILLO, 2015; VIEIRA, 2005).

Figura 13. Microscopias dos géis de A) gelatina pura, B) PVA puro e das blendas de C) 80/20 gelatina/PVA, D) 60/40 gelatina/PVA e E) 40/60 gelatina/PVA.

5.2. Reticulação das blendas de Gelatina/PVA com glutaraldeído

5.2.1. Testes preliminares

Inicialmente, a fim de definir a metodologia de reticulação, foram realizadas testes preliminares de reticulação na blenda de 80/20 usando 0,5% de glutaraldeído em 5 min de reticulação sem correção do pH. Porém, nestas condições, foi observada a presença de precipitado no gel formado. Posteriormente, a blenda 80/20 foi reticulada com 0,5% de glutaraldeído durante 5 min, em pH 5 e 9. Observou-se que em pH 5 não ocorreu a formação do precipitado, mas em pH 9 houve a formação de precipitado (Figura 14); indicando que em pH acima de 6 ocorre precipitação do glutaraldeído. De acordo com Migneault (2004), a medida que a solução de glutaraldeído passa de pH ácido para neutro até pH básico, o glutaraldeído sofre reações de polimerização e precipita em solução. Portanto foram escolhidos os pHs 4 e 5 para a reticulação das blendas.

Figura 14. Precipitação do glutaraldeído na blenda de 80/20% de gelatina/PVA reticulada com 0,5% de glutaraldeído em pH 9.

Posteriormente, as blendas gelatina/PVA 80/20, 60/40 e 40/60 foram reticuladas com glutaraldeído a pH 4 e pH 5 (Figura 15). A blenda gelatina/PVA (80/20) reticulada com glutaraldeído a pH 4 e 5 (Figuras 15 A e 15 B), formou géis mais homogêneos, com consistência sólida, rígidos e com superfície menos úmida. Entretanto, as blendas 60/40 (gelatina/PVA) reticuladas com 0,5% de glutaraldeído em pH 4 e pH 5 apresentaram separação de fases (Figura 15 C e 15 D): uma sólida e a outra viscosa e pegajosa; com diferenças na coloração das fases: uma clara e transparente e a outra amarelada. Isto indica que a alteração do pH da solução provocou a separação de fases das blendas 60/40 de gelatina/PVA e que a reticulação em pH ácido não estabilizou a blenda nessa proporção, pois esta blenda sem reticular não apresentou este comportamento.

A blenda gelatina/PVA 40/60 reticulada com glutaraldeído (Figura 15 F e 15 G) também apresentou separação de fase da mesma forma como foi observado na blenda sem reticular, porém o material formado não apresentou a consistência de um gel. Este gel teve a consistência de um fluido viscoso.

Figura 15. Foto das blendas após a reticulação. Blendas 80/20 em A) pH5 e B) pH4; 60/40 em C) pH 5, D) pH 4, e 40/60 em E) pH5 e F) pH4.

O ponto isoelétrico (pI) da gelatina bovina está entre pH 4,7 e 5,4 (SU 2008; GMIA, 2012). Com a formação de blendas o pI da gelatina desloca-se para valores mais baixos de pH (SU 2008). Em pH acima do ponto isoelétrico existe uma grande densidade de carga negativa, o que significa uma maior desprotonação dos grupos carboxila dos resíduos de aminoácidos ($-\text{COO}^-$) e uma maior concentração de grupos amina desprotonados ($-\text{NH}_2$) (FARRIS, 2010). Em pH abaixo do pI da gelatina existe um aumento da densidade de carga positiva (grupos amina protonados ($-\text{NH}_3^+$)).

A reticulação entre a gelatina e o glutaraldeído é favorecida pelos grupos amina desprotonados (WONG, 1991; MIGNEAUT, 2004; FARRIS, 2010) e a interação da gelatina com o PVA pela atração íon-dipolo entre os grupos amina protonados e os grupos hidroxila do PVA (SU, 2008). Portanto tanto o favorecimento da reticulação (com o aumento dos grupos amina desprotonados) quanto o aumento da concentração de PVA nas blendas de gelatina/PVA 60/40 e 40/60 são responsáveis pela redução dos grupamentos amino disponíveis para interagir com o PVA, favorecendo assim a separação de fases nas blendas.

A reticulação do PVA com o glutaraldeído nas condições experimentais não foi favorecida devido ao pH do meio estar acima do necessário para catalisar a reação (pH 2) (MANSUR, 2008).

Assim, apenas a blenda 80/20 (gelatina/PVA) reticulada com glutaraldeído formou um material promissor para aplicação em *phantoms* e, portanto, essa proporção foi escolhida para avaliar a influência do pH ácido e do tempo de reticulação nas características do material.

5.3. Efeito do tempo de reticulação nas propriedades das blendas gelatina/PVA.

5.3.1. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas da blenda gelatina/PVA 80/20 reticulada com glutaraldeído em pH 4 e 5 em tempos de reticulação de 5, 15, 30 e 60 min, assim como da blenda controle (sem reticulação) estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Força de ruptura (N) e módulo de Young (kPa) da blenda com 80/20 de gelatina/PVA em função do tempo e pH.

pH	Tempo (min)	Força de Ruptura (N)	Módulo de Young (kPa)
4	0	6,40 ± 0,42 ^{e,A}	40,21 ± 3,05 ^{c,A}
	5	14,07 ± 0,22 ^{a,b,B}	56,43 ± 0,28 ^{a,B}
	15	14,99 ± 1,27 ^{a,B}	57,33 ± 3,00 ^{a,B}
	30	13,24 ± 0,31 ^{c,b,B}	52,88 ± 0,61 ^{a,B}
	60	11,85 ± 0,27 ^{d,B}	45,75 ± 2,19 ^{b,B}
5	0	6,40 ± 0,42 ^{c,A}	40,22 ± 3,05 ^{c,A}
	5	18,44 ± 0,61 ^{a,A}	86,21 ± 3,76 ^{a,A}
	15	18,82 ± 0,19 ^{a,A}	88,16 ± 2,43 ^{a,A}
	30	18,17 ± 0,48 ^{a,A}	84,72 ± 7,44 ^{a,A}
	60	16,49 ± 0,08 ^{b,A}	74,03 ± 0,03 ^{b,A}

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre médias em função ao tempo de reticulação ($P < 0,05$). Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os géis reticulados a pH 4 e pH 5 ($P < 0,05$).

Observa-se que as blendas 80/20 gelatina/PVA reticuladas com glutaraldeído em pH 4 e 5 e diferentes tempos de reticulação apresentaram maior força de ruptura e módulo de Young quando comparados com a blenda não reticulada. Isto significa que o glutaraldeído usado como reticulante permitiu a formação de ligações covalentes entre os grupos amins da gelatina, formando uma matriz mais resistente. Também se observa que o pH teve efeito nas propriedades mecânicas das blendas reticuladas, pois as blendas reticuladas a pH 5 formaram géis mais resistentes e mais elásticos, tendo maior característica de um sólido elástico.

A protonação dos grupos amina da lisina ($-\text{NH}_3^+$) é favorecida quanto mais ácido for o pH da solução. Essa protonação reduz a eficiência da reticulação com o glutaraldeído (WONG, 1991; MIGNEAUT, 2004, FARRIS, 2010), levando a uma redução da força de ruptura e módulo de Young das blendas reticuladas em pH 4 quando comparado às blendas reticuladas em pH 5.

Por outro lado, o tempo de reticulação também afetou as propriedades mecânicas das blendas gelatina/PVA, como pode ser observado na Tabela 6 segundo o teste de Tukey

($P < 0,05$). Tempos de reticulação menores do que 30 min foram suficientes para obter géis mais resistentes e com maior módulo de Young. Entretanto, tempos maiores do que 30 min formaram géis com menor força na ruptura em teste de compressão.

Os valores de força de ruptura e módulo de Young não tiveram um comportamento linear em função do tempo de reticulação (Figura 16 e 17). Se compararmos os valores das propriedades mecânicas da blenda reticulada em 5 min e 60 min, observa-se que em 5 min de reticulação foram suficientes para a formação de uma rede polimérica homogênea e resistente mecanicamente, pois a 60 min, o gel formado foi mais fraco. Okuda (1990) demonstrou que a reação entre os grupos amina da lisina e glutaraldeído é rápida até 30 min de reação, após esse período a reação prossegue lentamente até que todos os grupos amina tenham reagido com o glutaraldeído. Esse resultado é compatível com os resultados apresentados neste trabalho, já que nota-se uma redução nas propriedades dos géis reticulados após 30 min, pois outros subprodutos da reação de reticulação podem ser formados prejudicando a formação de uma matriz polimérica homogênea e mais resistente. Este comportamento foi independente do pH, pois observou-se a mesma tendência para as blendas gelatina/PVA reticuladas a pH 4 e 5.

Figura 16. Força de ruptura para blenda reticulada de 80/20% de gelatina/PVA em função do tempo de reticulação em pH 4 e 5. A blenda sem reticulação está representada em 0 min.

Figura 17. Módulo de Young para blenda reticulada de 80/20% de gelatina/PVA em função do tempo de reticulação em pH 4 e 5. A blenda sem reticulação está representada em 0 min.

5.3.2. Ângulo de contato e perda de umidade

O ângulo de contato da blenda gelatina/PVA 80/20, reticulada com glutaraldeído em pH 4 e 5 em tempos de reticulação de 5, 15, 30 e 60 min, estão apresentados na Figura 18. A blenda sem reticulação está representada pelo tempo de 0 min.

Figura 18. Ângulo de contato para blenda reticulada de 80/20 de gelatina/PVA em função do tempo de reticulação em pH 4 e 5. A blenda sem reticulação está representada em 0 min.

De acordo com a Figura 18, observa-se que o processo de reticulação com glutaraldeído aumentou o ângulo de contato da blenda gelatina/PVA 80/20. Esse aumento indica que a reticulação aumentou a hidrofobicidade na superfície do material. O maior valor de ângulo de contato foi obtido para a blenda reticulada a pH 5 e 5 min (73,7°). Em ambos os pHs foi observado um ligeiro decréscimo do valor de ângulo de contato (68,1° em pH 4 após 60 min de reticulação e 66,26° em pH 5 após 60 min de reticulação) quando o tempo de reticulação foi maior que 5 min. Por outro lado, não foi observada diferença significativa entre os diferentes pHs dos géis após 5 min de reticulação.

Apesar da reticulação da blenda gelatina/PVA 80/20 ser mais eficiente em pH 5, como mostram os resultados mecânicos, em ambos os pHs grande parte dos grupos polares da gelatina estão envolvidos na reação de reticulação e na interação entre a gelatina e o PVA, portanto menos grupos polares estarão disponíveis na superfície do material para interagir com as moléculas de água da gota, deixando assim o material mais hidrofóbico.

A reticulação da blenda gelatina/PVA promoveu a diminuição da dessorção de umidade do material em ambos os pHs, como mostra a Figura 19.

Figura 19. Dessorção de umidade em função do tempo de exposição à UR de 95% para blenda reticulada de 80/20% de gelatina/PVA nos tempos de reticulação de 5, 15, 30 e 60 min em pH 4 e 5. A blenda sem reticulação está representada em 0 min.

Este comportamento é concordante com os valores obtidos de ângulo de contato das blendas (Figura 18), pois a reticulação permitiu diminuir a hidrofiliicidade dos géis. Mesmo assim, observa-se que as blendas reticuladas não são estáveis em condições de alta umidade relativa (95% UR), pois a dessorção de umidade das blendas reticuladas segue um

comportamento linear em função do tempo. Sendo que as blendas reticuladas em pH 4, apresentaram maior dessorção de umidade após 120 horas (17,36% nas blendas reticuladas em 5 min), do que as blendas reticuladas em pH 5 (16,50% nas blendas reticuladas em 5 min). As blendas de 80/20 gelatina/PVA após 30 min de reticulação foram as que apresentaram menor dessorção de umidade em ambos pHs (16,05% em pH 4 e 14,80% em pH 5.)

Como a reticulação das blendas de gelatina/PVA reduziu a dessorção de umidade dos géis em ambos os pHs, pode-se dizer que as interações entre as moléculas de água com a matriz dos géis foram maiores do que nas blendas sem reticulação, além disso, as ligações cruzadas promovidas pela reticulação reduzem a mobilidade das moléculas do gel, deixando as moléculas de água mais retidas dentro da estrutura das blendas.

5.4. Efeito da concentração do reticulante nas propriedades da blenda 80/20 de gelatina/PVA.

Para avaliar a influência da concentração do glutaraldeído usado como reticulante foram produzidos géis das blendas de 80/20 em pHs 4 e 5 reticuladas com 0,5 e 1% de glutaraldeído durante 5 min de reticulação. Os resultados foram comparados com o controle (blendas sem reticular). As amostras foram nomeadas de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7. Nomenclatura utilizada para as amostras.

Nome	Descrição da amostra
Gelatina	Gel de 100% de gelatina
PVA	Gel de 100% PVA
Blenda 80/20	80/20 gelatina/PVA
Gelatina 0,5% Glu.pH4	Gelatina reticulada com 0,5% de glutaraldeído em pH 4,0
Blenda 0,5% Glu.pH4	Blenda 80/20 gelatina/PVA reticulada com 0,5% de glutaraldeído em pH 4,0
Gelatina 0,5% Glu.pH5	Gel de gelatina reticulada com 0,5% de glutaraldeído em pH 5,0
Blenda 0,5% Glu.pH5	Blenda 80/20 gelatina/PVA reticulada com 0,5% de glutaraldeído em pH 5,0
Blenda 1% Glu.pH5	Blenda 80/20 gelatina/PVA reticulada com 1,0% de glutaraldeído em pH 5,0

5.4.1. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos géis de gelatina pura, PVA puro, blendas 80/20 gelatina/ PVA com e sem reticulação em pH 4 e 5 utilizando 0,5 e 1,0 % de glutaraldeído estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Força de ruptura (N) e módulo de Young (kPa) dos géis de gelatina pura, PVA puro, gel de gelatina reticulada e blenda com e sem reticulação.

Amostras	pH	Tipo de amostra	Força de Ruptura (N)	Módulo de Young (kPa)
Sem reticular	7	Gelatina	15,45 ± 2,51	54,50 ± 1,59
	7	PVA	0,17 ± 0,01	0,31 ± 0,04
	7	Blenda 80/20	6,40 ± 0,42	40,21 ± 3,05
Reticuladas	4	Gelatina_0,5%Glu	34,29 ± 6,64	116,75 ± 9,50
	4	Blenda_0,5%Glu	14,07 ± 0,22	56,43 ± 0,28
	5	Gelatina_0,5%Glu	36,53 ± 0,51	126,02 ± 3,60
	5	Blenda_0,5%Glu	18,44 ± 0,61	86,21 ± 3,76
	5	Blenda_1%gGlu	20,20 ± 0,53	90,17 ± 2,11

Os resultados apresentados na Tabela 8 demonstram que o processo de reticulação aumentou a força de ruptura e o módulo de Young tanto dos géis de gelatina quanto das blendas em ambos os pHs. Além disso, um aumento da concentração do glutaraldeído (de 0,5% para 1,0%) aumentou a força de ruptura de 18,44 N para 20,20 N e módulo de Young de 86,21 kPa para 90,0 kPa em pH 5, formando géis mais resistentes e com característica elástica. Isso mostra que o reticulante permitiu a formação de ligações covalentes entre os grupos reativos da gelatina formando uma matriz mais resistente. Também se observa que a variação do pH mostra grande efeito nas propriedades mecânicas das blendas reticuladas, sendo que a reticulação em pH 5 formou géis mais resistentes, tendo maior característica de um sólido elástico.

Com a alteração do pH da solução para 4 ocorreu o favorecimento do aumento da protonação dos grupos amina da lisina ($-\text{NH}_3^+$). Essa protonação reduz a eficiência da reticulação com o glutaraldeído (WONG, 1991; MIGNEAUT, 2004, FARRIS, 2010), levando a uma redução da força de ruptura e módulo de Young das blendas reticuladas em pH 4 quando comparado às blendas reticuladas em pH 5.

Comparando-se os dados apresentados na Tabela 2 e na Tabela 8 conclui-se que a formação de blendas, assim como a reticulação do gel de gelatina pura e da blenda 80/20 gelatina/PVA em ambos os pHs, são promissores para a simulação do tecido biológico e de suas patologias. Um exemplo seria a simulação de um tecido glandular mamário (33kPa) com a Blenda 80/20 (40,21 kPa) ou de um tecido fibroso (107 KPa) com a Gelatina 0,5 Glu.pH4 (116,75 kPa) e ou de um carcinoma (93kPa) com a Blenda 1,0% Glu.pH5 (90,17kPa).

5.4.2. Umidade e Ângulo de contato

Observa-se pelos valores de umidade apresentados na Tabela 9 que os géis de gelatina e PVA puros com ou sem reticulação, assim como a blenda 80/20 de gelatina/PVA reticulada ou não, apresentaram alto teor de umidade, não apresentando diferença significativa entre as umidades das amostras analisadas. A característica hidrofílica da gelatina e PVA permite a formação de interações ou pontes de hidrogênio com a água, sendo justificada a presença de alto teor de umidade nestes géis.

Tabela 9. Umidade dos géis de gelatina pura, PVA puro, gel de gelatina reticulada e blendas com e sem reticulação.

Amostra	Umidade (%)
Gelatina	$85,64 \pm 0,07$
PVA	$85,10 \pm 0,18$
Blenda 80/20	$85,47 \pm 0,05$
Gelatina 0,5% Glu.pH4	$85,81 \pm 0,05$
Blenda 0,5% Glu.pH4	$85,66 \pm 0,21$
Gelatina 0,5% Glu.pH5	$85,07 \pm 0,07$
Blenda 0,5% Glu.pH5	$85,68 \pm 0,02$
Blenda 1% Glu.pH5	$85,77 \pm 0,11$

Entretanto, observou-se diferença nos valores de ângulo de contato das amostras analisadas como pode ser observado na Figura 20. A formação de blendas gelatina/PVA e o processo de reticulação com glutaraldeído em ambos os pHs, aumentaram o ângulo de contato dos materiais puros (gelatina e PVA), sendo que o valor mais alto foi para a Blenda 80/20 0,5%Glu.pH5 (73,75°), indicando que em pH 5 a reticulação da blenda é mais eficiente e assim menos grupos hidrofílicos ficam disponíveis na superfície do material para interagir com as moléculas de água da gota.

Figura 20. Ângulo de contato de A) gelatina pura, B) PVA puro, C) Blenda 80/20, D) Gelatina 0,5%Glu.pH4, E) Blenda 0,5 Glu.pH4, F) Gelatina 0,5% Glu.pH5 e G) Blenda 0,5% Glu.pH5.

5.4.3. FTIR-ATR

As Tabelas 10 e 11 apresentam as bandas encontradas no FTIR-ATR e os modos vibracionais relacionados com estas banda para os géis de gelatina pura e PVA puro com ou sem reticulação, da blenda 80/20 com e sem reticulação em pH 4 e 5.

Tabela 10. Número de onda dos géis de gelatina, PVA e blenda 80/20 sem reticulação, relacionados com os modos vibracionais a que se referem.

Gelatina	PVA	Blenda 80/20	Núm. de onda (cm ⁻¹) Literatura	Modo vibracional
3301	3289	3299	3300 - 3070	Amida A: Vibração de estiramento da ligação N-H em ressonância com a vibração de estiramento da amida II
			3500 - 3200	Vibração de estiramento da ligação O-H das ligações de hidrogênio inter e intramoleculares
			3000 - 2840	Vibração de estiramento da ligação C-H dos grupos alquil
1639	1638	1635	~ 1650	Amida I: vibração de estiramento da ligação C-O
1559			~ 1550	Amida II: vibração de estiramento da ligação C-N e vibração de deformação angular no plano da ligação N-H
1455	1420	1418	1460 -1417	Vibração de deformação angular do CH ₂
1399 1242	1329	1338	1400 - 1200	Amida III: vibração de estiramento da ligação C-N, vibração de deformação angular da ligação N-H e vibração de deformação angular da ligação C-O.
-	1095	1097	1150 - 1085	Vibração de estiramento da ligação C-O-C

Tabela 11. Número de onda dos géis de gelatina reticulada e das blendas 80/20 reticuladas em pH 4 e 5, relacionados com os modos vibracionais a que se referem.

Gelatina 0,5Glu pH4	Blenda 0,5Glu pH4	Gelatina 0,5Glu pH5	Blenda 0,5Glu pH5	Núm. de onda (cm ⁻¹) Literatura	Modo vibracional
				3300 - 3070	Amida A: Vibração de estiramento da ligação N-H em ressonância com a vibração de estiramento da amida II
3295	3305	3324	3314	3500 - 3200	Vibração de estiramento da ligação O-H das ligações de hidrogênio inter e intramoleculares
-	2943	2960	2951	3000 - 2840	Vibração de estiramento da ligação C-H dos grupos alquil
-	-	2924	2920		
-	-	2851	2850		
1635	1640	1635	1634	~ 1650	Amida I: vibração de estiramento da ligação C-O
1560	1555	1560	1559	~ 1550	Amida II: vibração de estiramento da ligação C-N e vibração de deformação angular no plano da ligação N-H
1458	1417	1458	1460	1460 -1417	Vibração de deformação angular do CH ₂
1338	1329	1379	1375	1400 - 1200	Amida III: vibração de estiramento da ligação C-N, vibração de deformação angular da ligação N-H e vibração de deformação angular da ligação C-O.
1244	-	1244	1249		
-	1089	-	-	1150 - 1085	Vibração de estiramento da ligação C-O-C

Na Figura 21 são apresentados os espectros de infravermelho do gel de gelatina pura (100/0), PVA puro (0/100), Blenda 80/20, dos géis de gelatina reticulada em pH 4 e 5 e das blendas reticuladas em pH 4 e 5 com 0,5% de glutaraldeído.

Figura 21. Espectros de infravermelho dos géis de gelatina pura, PVA puro, blenda 80/20, gelatina reticulada em pH 4 e 5 e blendas 80/20 reticuladas com 0,5% de glutaraldeído em pH 4 e 5.

No espectro do PVA puro observa-se as bandas intensas na região de 3289cm^{-1} , características da vibração de estiramento das ligações de hidrogênio inter e intramolecular no PVA. Também se observa um pico de pouca intensidade na região de 2953 cm^{-1} , característico da vibração de estiramento da ligação C-H dos grupos alquil. Não se observa o pico na região de $1750 - 1735\text{ cm}^{-1}$ referente à vibração de estiramento do C=O dos grupos acetato o que pode ser explicado pelo alto grau de hidrólise do PVA (MANSUR, 2008; SU, 2009). O espectro do gel de gelatina pura possui os modos vibracionais característicos de proteínas, sendo estes as bandas em 3295 cm^{-1} referente à amida A (vibração de estiramento da ligação N-H em ressonância com a vibração de estiramento da amida II), 1635 cm^{-1} amida I (vibração de estiramento da ligação C-O), amida II em 1560 cm^{-1} (vibração de estiramento da ligação C-N e vibração de deformação angular no plano da ligação N-H) e amida III em 1242 cm^{-1} (vibração de estiramento da ligação C-N, vibração de deformação angular da ligação N-H e vibração de deformação angular da ligação C-O) (BARTH, 2007; CARVALHO, 2017).

Para a Blenda 80/20 o pico intenso na região de $3500 - 3200\text{ cm}^{-1}$ refere-se à vibração de estiramento das ligações de hidrogênio inter e intramolecular, o qual indica a presença de interações através de pontes de hidrogênio entre a gelatina e o PVA.

Observa-se na Figura 21 que o espectro do gel de gelatina e da blenda 80/20 reticuladas com 0,5% de glutaraldeído em pH 5, apresentaram picos similares, o qual pode ser justificado pela alta proporção de gelatina na blenda. As variações nas absorções na região das amidas I, II e III (1650 cm^{-1} a 1200 cm^{-1}) do gel de gelatina e da blenda 80/20 reticuladas com 0,5% de glutaraldeído em pH5, quando comparado com o gel de 100% de gelatina e com a blenda sem reticulação, indicam a formação de ligações químicas, já que o processo de reticulação do glutaraldeído com a gelatina acontece entre os grupos amina dos resíduos de aminoácidos da gelatina com o grupo carboxil do glutaraldeído (BARTH, 2007; CARVALHO, 2017). Além disso, o aparecimento dos picos na região compreendida entre 2960 cm^{-1} a 2850 cm^{-1} pode estar relacionada à vibração de estiramento $-CH$ do aldeído. A presença deste pico somente nas amostras reticuladas em pH 5, indicam um melhor processo de reticulação nesse pH. Em pH 5 (acima do pI da gelatina) a maioria dos grupos amina dos resíduos de aminoácidos da gelatina encontram-se desprotonados o que favorece o processo de reticulação com o glutaraldeído.

5.4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura

As microscopias do gel de gelatina pura (100/0), blenda 80/20 gelatina/PVA com e sem reticulação com 0,5 e 1,0 % de glutaraldeído, em pH 4 e 5 são mostradas na Figura 22. O gel de gelatina mostrou uma estrutura compacta e com presença de relevos (Figura 22 - A). A Blenda 80/20 (Figura 22 – B) apresentou a estrutura compacta e com presença de relevos, como observado para a gelatina pura, mas com a presença de gotículas de diferentes tamanhos que podem estar relacionadas ao PVA e água na blenda. As Blendas 0,5% Glu.pH 4 (Figura 22 - C) e Blenda 0,5% Glu.pH 5 (Figura 22 – D) também apresentaram a estrutura compacta e presença de gotículas, porém não apresentaram relevos. Na Blenda 1,0% Glu.pH5 (Figura 22 – E) mostra a estrutura mais compacta, sem relevos e sem a evidente presença de gotículas, como foi observado nas outras blendas o que indica uma maior interação entre os polímeros, o qual justifica as melhores propriedades mecânicas apresentadas por esta blenda.

Figura 22. Microscopias dos géis de A) gelatina pura, B) Blenda 80/20, C) Blenda 0,5% Glu.pH 4 e D) Blenda 0,5% Glu.pH 5 e E) Blenda 1,0% Glu.pH 5.

5.4.5. Propriedades acústicas

Na Tabela 12 são apresentados os valores de velocidade do som e coeficientes de atenuação para os géis de gelatina pura (100/0), PVA puro (0/100), gelatina reticulada e blenda gelatina/PVA (80/20) com e sem reticulação usando 0,5 e 1,0 % de glutaraldeído, em pH 4 e 5.

Observa-se na Tabela 12 que ocorreu uma redução na velocidade do som após a reticulação em ambos os pHs, tanto para os géis de gelatina quanto para as blenda 80/20 gelatina/PVA quando comparados aos géis de 100% de gelatina, 100% de PVA e blenda 80/20. Essas reduções nas velocidades do som nesses materiais podem ter sido provocadas por um aumento na densidade dos géis e blendas após a reticulação. Porém, esses valores de velocidade são promissores para a produção de *phantoms* pois estão próximos aos valores de velocidade do som de alguns tecidos, como a mama (1510,0 m/s) por exemplo.

Também se observa na Tabela 12 que a diferença de pH no gel de gelatina e blendas reticuladas não teve influência na velocidade do som das blendas. O coeficiente de atenuação foi abaixo da média para os tecidos biológicos, porém Madsen (1978) e Hall (1997) demonstraram que o coeficiente de atenuação em *phantoms* com gelatina pode ser ajustado adicionando micropartículas de grafite ao material.

O aumento da concentração de glutaraldeído para 1% na blenda 80/20 reticulada em pH 5 aumentou a velocidade do som na amostra para um valor próximo ao valor médio para tecidos biológicos que é de 1540,00 m/s. Esse material pode ser utilizado para a produção de *phantoms* para controle de qualidade de ultrassom, tendo o seu coeficiente de atenuação ajustado para 0,5 dB/cm com a adição de micropartículas de vidro ou grafite ao material.

Tabela 12. Velocidade do som (m/s) e coeficiente de atenuação (dB/cm) para os géis de gelatina pura, PVA puro, gelatina reticulada e blenda de 80/20% gelatina/PVA com e sem reticulação.

Amostra	Velocidade do som (m/s)	Coeficiente de atenuação (dB/cm)
Gelatina	1542,75 ± 2,50	0,24 ± 0,03
PVA	1552,50 ± 1,19	0,13 ± 0,09
Blenda 80/20	1541,34 ± 1,13	0,23 ± 0,01
Gelatina 0,5% Glu.pH4	1528,60 ± 1,09	0,23 ± 0,02
Blenda 0,5% Glu.pH4	1529,64 ± 1,93	0,18 ± 0,01
Gelatina 0,5% Glu.pH5	1529,51 ± 1,14	0,28 ± 0,05
Blenda 0,5% Glu.pH5	1531,23 ± 1,32	0,20 ± 0,01
Blenda 1% Glu.pH5	1539,76 ± 1,20	0,21 ± 0,07

Na Figura 23 estão apresentadas as imagens de ultrassom em modo B das Blenda 0,5% Glu.pH 4 e Blenda 0,5% Glu.pH5. A formação de gotículas de diferentes tamanhos na

escala de micrômetros que podem estar relacionadas com a presença do PVA na blenda pode atuar como agente espalhador da onda ultrassônica. Portanto as blends de gelatina/PVA 80/20 reticuladas tanto em pH 4 quanto em pH 5 apresentaram grande potencial para uso como material mimetizador do tecido biológico.

Figura 23. Imagem modo B das blends de 80/20 gelatina/PVA reticulada com 0,5% de glutaraldeído em pH 4 (a) e pH 5 (b).

(a)

(b)

6. CONCLUSÃO

A reticulação das blendas de gelatina/PVA utilizando glutaraldeído melhorou as propriedades mecânicas, diminuiu a hidrofiliabilidade e reduziu a perda de água destas blendas. Este efeito foi mais eficaz quando foi utilizada maior proporção de gelatina (80%) e menor proporção de PVA (20%) na blenda. O pH da blenda também influenciou nas propriedades mecânicas, acústicas e de dessecção de umidade das blendas gelatina/PVA reticuladas com glutaraldeído, sendo o pH 5, o que permitiu obter materiais mais resistentes, menos hidrofílicos e com menor perda de água. Entretanto a variação no tempo de reticulação não provocou grandes alterações nas propriedades das blendas reticuladas, sendo que 5 min foram suficientes para obter blendas reticuladas com boas propriedades.

A blenda gelatina/PVA (80/20) reticulada com 0,5 % de glutaraldeído tanto em pH 4 quanto em pH 5, utilizando um tempo de 5 min, possui grande potencial para ser utilizada como material mimetizador do tecido biológico.

7. TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a influência da adição de nanopartículas de prata como agente antimicrobiano
- Avaliar os vários módulos de Young obtidos com as variações de pH para mimetizar o tecido biológico normal e suas patologias em phantoms para elastografia.
- Avaliar o efeito de um terceiro polímero para a estabilidade das blendas de gelatina/PVA nas proporções que separaram fase.
- Adicionar micropartículas de pó de vidro ou pó de PVC para corrigir a atenuação do material e analisar a relação da atenuação em função da frequência.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIUM Technical Standards Committee. Standard methods for measuring performance of pulse-echo ultrasound imaging equipment: American Institute of Ultrasound in Medicine Standard. Laurel, MD: AIUM, 1990.

BHATTACHARYA, A., RAY, P. Basic features and techniques in polymer grafting and crosslinking. In **Polymer Grafting and Crosslinking** (New York: John Wiley & Sons, 2009), 7-34.

BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta** 1767. p.1073-1101. 2007.

Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., Gurny, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.57, p. 19, 2004.

CABRAL, D.S. **Estudo da miscibilidade de blendas de poli(hidroxibutirato)/poli(álcool vinílico) obtidos por mistura mecânica**. 2017. 86p. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

CABRELLI, L.C. **Desenvolvimento de materiais mimetizadores de tecidos aplicados a técnicas ópticas e ultrassônicas de imagem**. 2015. 69f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

CANNON, L. M. Novel tissue mimicking materials for high frequency breast ultrasound phantoms. **Ultrasound in Med. & Biology**, v.37, n., p. 122-135, 2010.

CARVALHO, I.C; MANSUR, H.S. Engineered 3D-scaffolds of photocrosslinked chitosan-gelatin hydrogel hybrids for chronic wound dressing and regeneration. **Materials science & Engineering**. V. 78. p.690-705. 2017.

CAVALCANTI, E.S. **Desenvolvimento de um Sistema para Medida Elastográfica Dinâmica por Ultrassom**. 2012. 191f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

CONSTANTINO, M. G. **Química Orgânica**. 1ed. São Paulo. Ed. LTC –Livros Técnicos Científicos. 2008. 512 p.

COSTA Jr., E. S., MANSUR, H. S. Preparação e Caracterização de Blendas de Quitosana/ Poli (Álcool Vinílico) Reticuladas Quimicamente com Glutaraldeído para Aplicação em Engenharia de Tecido. **Química Nova**, v. 21, p.1460-1466, 2008.

COURNANE, S. *et.al.* Assessment of the accuracy of an ultrasound elastography liver scanning system using a PVA-cryogel phantom with optimal acoustic and mechanical properties. **Physics in Medicine & Biology**, v.55, p.5965-5983, 2010.

- CRISTIANO C. M. Z. **Blendas formadas por caseína e gelatina: efeito da adição de plastificante e de agente reticulante e interações com copolímeros**. Tese (Doutorado em Química), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- CULJAT, M.O. *et.al.* A review of tissue substitutes for ultrasound imaging. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v.36, n. 6, p. 861-873, 2010.
- DUCONSEILLE, A.; *et.al.* Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. *Food Hydrocolloids*, v. 43, p. 360-376, 2015.
- DUMITRIU, S., VIDAL, P. F., CHORNET, E. “Hydrogels based on polysaccharides.”In *Polysaccharides in medicinal applications*(New York: Marcel Dekker, 1996), 125-223.
- DONG, F. *et. al.* Nonlinearity parameter for tissue-mimicking materials. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 25, n.5, p. 831-838, 1999.
- FARRIS S., SONG, J., HUANG, Q. Alternative reaction mechanism for the cross-linking of gelatin with glutaraldehyde. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 998-1003. 2010.
- GONSALVES, A. A., ARAÚJO, C. R. M. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p.1215-1223, 2011
- GRILLO, F.W. **Phantom antropomórfico para treinamento de biópsia de tireoide guiada por ultrassom**. 2015. 51f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.
- HABBEH, A. F. S. A., HIRAMOTO, R. Reaction of protein with glutaraldehyde. **Biochemistry and biophysics**. v. 128, p. 16-26.1968.
- HALL, T.J. *et. al.* Phantom materials for elastography. **IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control**, v. 44, n.6, 1997.
- GMIA members. *Gelatin Handbook: Gelatin Manufacturers Institute of America*. **GMIA**, 2012.
- KHARINE, A. *et al.* Poly(vinyl alcohol) gels for use as tissue phantoms in photoacoustic mammography. **Physics in Medicine & Biology**, v.48, p.357-370, 2003.
- KEMPKA, A. P. **Desenvolvimento de matriz de imobilização de lipase utilizando gelatina de diferentes BLOOMS adicionada de plastificantes hidrofílicos**. 2012. 209f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Univers. Fed. de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.
- KIRK – OTHMER. Poly(vinyl alcohol) – *Encyclopedia of Chemical Technology* – Ed. John Wiley & Sons, New York, 1982.
- KROUSKOP, T. A. Elastic moduli of breast and prostate tissues under compression. **Ultrasonic Imaging**. v.20, p. 260-274, 1998.

LEHNINGER, A. L, NELSON, D. L., COX, M. M., SIMÕES, A. A., LODI, W. R. N. **Princípios de Bioquímica**. 6 ed. São Paulo. Ed. Sarvier, 2007. 1202p.

Lin, W., Yu, D., Yang, M. Blood compatibility of novel poly(γ -glutamic acid)/polyvinyl alcohol hydrogels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 47, n. 43, 2006.

MADSEN, E. L. *et.al.* Tissue mimicking materials for ultrasound phantoms. **Medical Physics**, v.5, n.5, 1978.

MADSEN, E. L. *et.al.* Anthropomorphic breast phantoms for testing elastography systems. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v.32, n. 6, p. 857-874, 2006.

MANO, E. L., DIAS, M. L., FIREMAND, C.M. **Química Experimental de Polímeros**. 1.ed. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 2004. 302p.

MANSUR, H. S., SADAHIRA, C. M., SOUZA, N. S. & MANSUR, A. A. P. FTIR spectroscopy characterization of poly(vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. **Materials Science and Engineering C**, 28(4), 539 -548. 2008.

MATSUDA, S., IWATA, H., SE N. & IKADA, Y. Bioadhesion of gelatina films crosslinked with glutaraldehyde. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**. v. 45, n. 1, 20-27, 1999.

MIGNEAUT, I., DARTIGUENAVE, C., BERTRAND, M. J., WALDRON, K. C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with protein, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, n. 5, p. 790-802, 2004.

OKUDA, K. *et. al.* Reaction of Glutaraldehyde with amino and thiol compounds. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.71, n. 2, p.100-105, 1991.

PEPPAS, N.A. **Hydrogels in Medicine e Pharmacy**. Polymers. Ed. Nicolas A. Peppas, 1984. 192p.

Rokhade, A. P.; Patil, S. A.; Aminabhavi, T. M. Synthesis and characterization of semi-interpenetrating polymer network microspheres of acrylamide grafted dextran and chitosan for controlled release of acyclovir. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 605-613, 2007.

SIQUEIRA, D. F., BRUNS, R. E., NUNES, S. P. Compatibilização e Otimização de Blendas Poliméricas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, Abr/Jun, 1993.

SU, R., JUANXIA, S. *et al.* Phase behavior and properties of polyvinyl alcohol/gelatin blends with novel pH-dependence. **Journal of Polymer Science: Part B: Polymers Physics**. v. 47, p. 239-247, 2008.

SPERLING, L. H. **Introduction to physical polymer science**. 4 ed. USA.Ed. Wiley Interscience, 2005. 866p.

SURRY, K. J., AUSTIN, H. J., FENSTER, A., PETERS, T.M. Poly(vinyl alcohol) cryogel phantoms for use in ultrasound and MR imaging. **Physics in Medicine & Biology**, 49, p. 5529-5546, 2004.

VIEIRA, S.L. **Desenvolvimento de um “phantom” para treinamento de biópsia de mama guiada por Ultra-som**. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada a Medicina e Biologia). Departamento de Física e Matemática, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

VIEIRA, S. L. *et al.* Paraffin-gel tissue-mimicking material for ultrasound-guided needle biopsy phantoms. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v.39, n.12, p. 2477-2484, 2013.

WALT, D. R., AGAYAN, V. I. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. **Trend in analytical chemistry**, v.13, n.10, 1994.

WIHODO, M., MORARU, C. I. Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical and properties of protein films: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 114, p. 292-302, 2013.

WONG, S. S. Chemistry of protein conjugation and cross-linking. Texas. Ed. CRC Press, 1991. 340p.

ZAGZEBSKI, J.A. **Essentials of ultrasound physics**. 1.ed. Elsevier Health Sciences, 1996. 240p.

ZELL, K. *et al.* Acoustical properties of selected tissue phantom materials for ultrasound imaging. **Physics in Medicine & Biology**, v. 52, p. 475-489, 2007.