



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Estudo da interação da radiação ionizante como método de esterilização de filmes de poliuretano termoplástico aplicados como biomaterial

MARIANA GURGEL RODRIGUES MASSEI

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

**Orientadora:
Profª Dra Monica Beatriz Mathor**

**São Paulo
2021**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Estudo da interação da radiação ionizante como método de
esterilização de filmes de poliuretano termoplástico aplicados
como biomaterial**

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

MARIANA GURGEL RODRIGUES MASSEI

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientadora:

Profa. Dra. Monica Beatriz Mathor

São Paulo

2021

Fonte de Financiamento: CAPES

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

Como citar:

GURGEL RODRIGUES MASSEI, M. ***Estudo da interação da radiação ionizante como método de esterilização de filmes de poliuretano termoplástico aplicados como biomaterial***. 2021. 115 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Gurgel Rodrigues Massei, MARIANA
Estudo da interação da radiação ionizante como método de
esterilização de filmes de poliuretano termoplástico aplicados
como biomaterial / MARIANA Gurgel Rodrigues Massei;
orientadora Monica Beatriz Mathor. -- São Paulo, 2021.
115 f.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia
Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e
Nucleares, São Paulo, 2021.

1. Biomateriais. 2. Poliuretano. 3. Radiação Ionizante. 4.
Caracterização. I. Mathor, Monica Beatriz, orient. II.
Título.

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho aos meus filhos Lorena e Benjamim e a todos que acreditaram em mim, que me auxiliaram nesta caminhada, e que sempre me fizeram acreditar que tudo é possível quando realmente queremos.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela promessa cumprida em minha vida, e pela inspiração guiada para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), e a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) pela oportunidade concedida.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível superior (CAPES) pela bolsa concedida, e incentivo a pesquisa.

À Dra Monica Beatriz Mathor, pela orientação, confiança, compreensão, paciência e amizade depositadas em mim ao longo do desenvolvimento deste trabalho, com ela aprendi que a ética e a verdade devem estar sempre alinhadas e em concordância com o trabalho e vida pessoal.

À Maria Fátima Guarizo Klingbeil pelo acompanhamento e direcionamento nos experimentos e amizade durante o processo.

A toda a equipe da pós-graduação pelo apoio, paciência e zelo.

A todos os colegas que trilharam esse caminho junto comigo, sabemos que não é fácil.

A toda equipe do Centro de Tecnologia das Radiações (CETER) pelo apoio e disponibilidade para que esse trabalho se concretizasse.

À equipe Banco de Tecidos Musculoesqueléticos da Santa Casa de Misericórdia da cidade de São Paulo, pelo auxílio com as amostras.

À equipe do Banco de Tecidos do Instituto de Ortopedia e Traumatologia (IOT) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo no Hospital das Clínicas pela esterilização e auxílio com as amostras.

Ao Dr. Macio Henrique Zaim pela amizade e auxílio na caracterização das amostras.

Ao Dr. Jivaldo do Rosário Matos pela disponibilização do laboratório e equipamentos para caracterização térmica das amostras.

Aos meus pais por acreditarem no meu potencial, e apoio na carreira científica. Em especial a minha mãe Rosângela que nunca duvidou do futuro brilhante que me aguardava, e por me levantar todas as vezes que caí.

À minha família por sempre me apoiar com palavras de incentivo e alegria nos momentos que precisei.

Ao meu companheiro Pedro Romero por sempre me apoiar e incentivar a buscar o meu melhor, por muitas vezes acreditar no meu potencial quando duvidei.

Aos meus filhos por me mostrar que sou capaz de absolutamente tudo.

E principalmente por todas as mulheres na ciência que lutaram por nossa colocação, por produzir conteúdo de qualidade e por fazer ciência, permitindo que eu chegasse até aqui,
LUGAR DE MULHER É ONDE ELA QUISER.

Estudo da interação da radiação ionizante como método de esterilização de filmes de poliuretano termoplástico aplicados como biomaterial

MARIANA GURGEL RODRIGUES MASSEI

RESUMO

Novos materiais estão sendo amplamente estudados e aplicados na área da saúde, estes são denominados biomateriais. Diferentes métodos são utilizados para esterilização de materiais, dentre eles a radiação ionizante vem sendo utilizada pela sua eficácia em eliminar contaminantes biológicos diversos. Para a utilização deste tipo de radiação deve-se avaliar não apenas a eficácia de seu poder esterilizante, mas a influência que esta pode exercer sobre as cadeias poliméricas, a fim de avaliar possíveis perdas ou modificações que alterem o material a ser utilizado. Desta forma, no presente trabalho, o filme de poliuretano do tipo termoplástico com base policarbonato foi submetido a tratamento com solvente orgânico, em ambiente com temperatura e umidade controladas, sendo avaliada por meio da caracterização química, físico-química e mecânica, a extensão das alterações causadas no material pela radiação ionizante. Também foi avaliado se o material apresenta as características necessárias para ser utilizado em testes clínicos, por meio de ensaios de biocompatibilidade descritos pela ISO 10993. Para estudo da esterilização, o filme foi submetido a doses crescentes de radiação gama (15, 25 e 50 kGy), Óxido de Etileno e plasma, caracterizados com técnicas comparativas, reavaliando possíveis alterações. Os filmes após os processos de esterilização mantiveram as características muito próximas ao material manufaturado, demonstrando que a radiação ionizante na dose de 25 kGy é a ideal para a esterilização deste tipo de material. A metodologia empregada na fabricação dos filmes pode levar a confecção de *stents* esofágicos, recobrimento de marca-passos, substituição de tecidos biológicos lesados, dentre outros. O estudo permitiu a criação da metodologia de processo que gerou a patente de invenção com numeração BR 1020170202658.

Palavras-chave: Biomateriais, Poliuretano, Radiação Ionizante, Caracterização.

Study of the interaction of ionizing radiation as a method of sterilization of thermoplastic polyurethane films applied as a biomaterial

MARIANA GURGEL RODRIGUES MASSEI

ABSTRACT

New materials are being widely studied and applied in the health area, these are called biomaterials. Different methods are used to sterilize materials, among them ionizing radiation has been used for its effectiveness in eliminating several biological contaminants. For the use of this type of radiation, not only the effectiveness of its sterilizing power should be evaluated, but also the influence it can exert on the polymeric chains, in order to evaluate possible losses or modifications that alter the material to be used. Thus, in the present work, the thermoplastic-type polyurethane film with polycarbonate base was subjected to treatment with an organic solvent, in an environment with controlled temperature and humidity, and the extent of the changes caused in the material by ionizing radiation. It was also evaluated whether the material has the necessary characteristics to be used in clinical tests, through biocompatibility tests described by ISO 10993. To study sterilization, the film was subjected to increasing doses of gamma radiation (15, 25 and 50 kGy), Ethylene Oxide and plasma, characterized with comparative techniques, reassessing possible changes. The films after the sterilization processes kept their characteristics very close to the manufactured material, demonstrating that ionizing radiation at a dose of 25 kGy is ideal for the sterilization of this type of material. The methodology used in the manufacture of films can lead to the construction of esophageal stents, pacemaker coverage, replacement of damaged biological tissues, among others. The study allowed the creation of the process methodology that generated the invention patent with number BR 1020170202658.

Keywords: Biomaterials, polyurethane, ionizing radiation, characterization.

SUMÁRIO

2 JUSTIFICATIVA	17
3 OBJETIVOS	19
3.1 Geral	19
3.2 Específicos	19
4 CONSIDERAÇÕES GERAIS	20
4.1 Biomateriais	20
4.1.1 Histórico	20
4.1.2 Definição	20
4.1.3 Classificação.....	21
4.2 Polímeros	23
4.2.1 Histórico	23
4.2.2 Definição	24
4.3 Poliuretano	25
4.3.1 Sínteses do poliuretano	27
4.3.2 A química do poliuretano	29
4.3.3 Produção do poliuretano	30
4.3.4 Poliuretanos termoplásticos e termofixos	31
4.3.5 Solubilidade dos materiais poliméricos.....	35
4.3.6 Poliuretano como biomaterial	36
4.4 Esterilização	37
4.4 Radiação ionizante com fontes de Cobalto-60	39
4.5.1 Efeito da radiação ionizante em microorganismos	40
4.5.2 Efeitos da radiação ionizante em polímeros.....	42
4.5.3 Validação do processo de esterilização	42
4.6 Técnicas de caracterização	43
4.6.1. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	44
4.6.2. Análise Térmica	45
4.6.3. Difractometria de raios X (DRX).....	48
4.6.5 Tomografia por coerência óptica (OCT).....	50
4.6.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	52
4.6.7 Ensaio de tração	54
4.6.8 Avaliação da biocompatibilidade	58
5 MATERIAL	63

6 MÉTODOS	63
6.1 Manufatura do filme	63
6.2 Esterilização	65
6.2.1 Irradiação das amostras em fonte Cobalto-60	65
6.2.2 Óxido de Etileno.....	65
6.2.3 Plasma	65
6.3 Caracterização	65
6.3.1 Espectroscopia de Absorção da região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	65
6.3.2 Termogravimetria/termogravimetria derivada (TG / DTG).....	66
6.3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	66
6.3.4 DRX (Difratometria por Raio X)	67
6.3.5 Tomografia por coerência óptica (OCT).....	67
6.3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	67
6.3.7 Ensaio de tração	67
6.3.8 Citotoxicidade – ISO 10993-5	69
6.3.9 Adesão e ploriferação.....	70
7 RESULTADOS	71
7.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	71
7.2 Análise térmica	76
7.2.1 Termogravimetria (TG).....	76
7.2.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	78
7.3 Difração de raios X (DRX)	81
7.4 Tomografia por coerência óptica (OCT)	82
7.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	85
7.6 Ensaio de tração	88
7.7 Citotoxicidade	91
7.8 Adesão	91
7.9 Proliferação	92
8.0 DISCUSSÃO	94
9.0 CONCLUSÃO	106
10.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	107

LISTA DE FIGURAS

Figura-1. Etapas do ciclo de vida de um biomaterial, desde sua concepção, baseada em uma necessidade específica até seu uso clínico e avaliação posterior.....	15
Figura-2. Fluxograma de desenvolvimento do filme para aplicação como biomaterial no mercado.	18
Figura 3- Lista de características importantes que um biomaterial deve oferecer.	21
Figura 4- a) ácido carbâmico, b) uretana, c) ligação uretânica.....	26
Figura 5- Estrutura do isocianato, principal monômero do poliuretano.....	26
Figura-6. Reação genérica de polimerização do Poliuretano.	27
Figura 7- Esquema de reação para formação do poliuretano	28
Figura 8- Reações mais encontradas para a obtenção de Poliuretano	30
Figura 9- Representação simplificada de comparação entre termoplásticos e termorrígidos.	32
Figura 10- Esquema de aquecimento e resfriamento de material termoplástico	33
Figura 11- Esquema de processo de solubilidade de polímeros	36
Figura 12- Mecanismos de ação radiação ionizante na cadeia de DNA.	40
Figura 13- Equações do processo de dissociação da água.....	41
Figura 14- Possíveis recombinações dos radicais em solução.	41
Figura 15- Espectro eletromagnético.....	44
Figura 16- Esquema óptico do caminho percorrido do feixe eletromagnético em um acessório ATR típico horizontal.	45
Figura 17- Representação de rompimento de forças moleculares causados pelo calor..	48
Figura 18- Representação do caminho ótico percorrido pelo feixe de raio X emitido...	49
Figura 19- Representação dos agregados e organização em cadeia poliméricas.	50
Figura 20- Fluxo de análise por OCT.....	51
Figura 21- Representação esquemática dos componentes de um microscópio eletrônico de varredura.	52
Figura 22- Curva representativa de tensão versus deformação.	55
Figura 23- Curva de tensão- deformação sob tração de Nailon 6,6 ®.	56
Figura 24- Corpos de prova antes e após ensaio de tração.....	57
Figura 25- Comportamento físico- mecânico de um polímero em função da massa molar.....	58
Figura 26- Tabela usada como critério de seleção de testes para avaliação da biocompatibilidade	59
Figura 27- Frasco para solubilização com pellet em contato com solvente	64
Figura 28- Técnica deeping sendo aplicada com molde e gel formado pelo poliuretano termoplástico.	64
Figura 29- Filme formado pela técnica casting com controle de espessura.	64
Figura 30- Irradiador multipropósito localizado no Instituto de tecnologia nuclear.	65
Figura 31- Molde utilizado para corpos de prova dos filmes para ensaio de tração.	68
Figura 32- Corpos de prova do filme termoplástico.....	68
Figura 33- Ensaio de tração em andamento realizado no equipamento de ensaio universal Instron.	68
Figura 34- Inserção do meio de cultura as amostras adicionadas a placa.	70
Figura 35- Espectro de absorção na região do infravermelho para a amostra não esterilizada.	72

Figura 36- Espectro de absorção na região do infravermelho para a amostra esterilizada por plasma.	72
Figura 37-Figura 3. Espectro de absorção na região do infravermelho para a amostra esterilizada por Óxido de etileno	73
Figura 38- Espectro de absorção na região do infravermelho para a amostra esterilizada por radiação gama dose de 15 kGy.....	73
Figura 39- Espectro de absorção na região do infravermelho para a amostra esterilizada por radiação gama dose de 25 kGy.....	74
Figura 40- Espectro de absorção na região do Infravermelho para a amostra esterilizada por radiação gama dose de 50 kGy.....	74
Figura 41- Espectros na região do infravermelho para os filmes com diferentes técnicas de esterilização. a: Não esterilizado; b: Plasma; c: Óxido de etileno; d: 15 kGy; e: 25 kGy; f: 50 kGy.....	76
Figura 42- Curva TG para amostra de <i>pellet</i> de poliuretano termoplástico com base policarbonato	77
Figura 43- Curvas TG dos filmes de poliuretano com diferentes técnicas de esterilização.	77
Figura 44- Curva DSC para <i>pellet</i> de poliuretano termoplástico com base policarbonato	79
Figura 45- Curvas DSC para os filmes de poliuretano com diferentes técnicas de esterilização.	80
Figura 46- Difratoograma de raio X para amostra de filme sem esterilização.....	81
Figura 47- Difratoogramas de raio X para os filmes de Poliuretano esterilizados com diferentes técnicas.....	82
Figura 48- Figuras obtidas por tomografia por coerência óptica para os filmes de poliuretano. a: Não esterilizado; b: Plasma; c: Óxido de Etileno; d: 15 kGy; e: 25 kGy; f: 50 kGy. (setas) indicam irregularidades perpendiculares a borda do material	83
Figura 49- Espessura média dos filmes. a) Filme sem esterilização; b) esterilizado por Óxido de Etileno; c) esterilizado por Plasma; d) esterilizado por radiação ionizante dose de 15 kGy; e) dose de 25 kGy; f) dose de 50 kGy	84
Figura 50- Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para filmes de poliuretano não estéril. Superfície homogênea posicionada ao lado esquerdo, e sessão de corte ao lado direito com marcas paralelas ocasionadas pela lamina de corte.	85
Figura 51- Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para filmes de poliuretano esterilizado por plasma. Superfície homogênea posicionada na parte superior da figura, Linhas paralelas na lateral ocasionadas pela lamina de corte.	86
Figura 52- Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para filmes de poliuretano esterilizada por Óxido de etileno. Superfície homogênea na parte inferior da figura.....	86
Figura 53- Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para filmes de poliuretano esterilizada por radiação ionizante com dose de 15 kGy.	87
Figura 54- Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para filmes de poliuretano esterilizada por radiação ionizante com dose de 25 kGy. As setas indicam fibras evidenciadas do material	87
Figura 55- Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para filmes de poliuretano esterilizada por radiação ionizante com dose de 50 kGy. (setas) indicam fibras evidenciadas do material. Objeto bem definido como linha ao centro da imagem é	

referente ao <i>stent</i> metálico que compõe a metodologia de manufatura recoberto pelo filme.	88
Figura 56- Curvas obtidas a partir do ensaio de tração para os filmes de poliuretano termoplástico e pericárdio bovino.	89
Figura 57- Ampliação Curvas obtidas a partir do ensaio de tração para os filmes de poliuretano termoplástico	90
Figura 58- Histograma comparativo para a avaliação de citotoxicidade.....	91
Figura 59- Gráfico de adesão celular efetuada com os fibroblastos murinos sobre as amostras de membranas a base de poliuretano. CC = Controle de células.	92
Figura 60- Gráfico de proliferação celular efetuada com os fibroblastos murinos sobre as amostras de membranas a base de poliuretano. CC = Controle de células.	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Vantagens e desvantagens dos métodos convencionais utilizados para esterilização de biomateriais	38
Tabela 2. Propriedades do polímero Carbothane.	63
Tabela 3- Espectro de absorção na região do Infravermelho para as amostras	75
Tabela 4- Variação de massa e temperatura para os filmes de poliuretano.....	78
Tabela 5- Temperatura de transição vítrea para os filmes de poliuretano esterilizados por diferentes técnicas	80
Tabela 6- Valores para espessura e desvio padrão dos filmes.....	85
Tabela 7- Resultados para ensaio de tração, com valores de tensão aplicada versus deformação dos filmes e pericárdio bovino.	90

LISTA DE FORMULAS

Equação 1. Equação para cálculo da energia de vaporização	35
Equação 2. Parâmetro de solubilidade de Hildebrand.....	35
Equação 3. Cálculo do valor de D_{10}	41
Equação 4. Derivada primeira da variação de massa em relação ao tempo	47
Equação 5. Derivada primeira da variação da massa em relação à temperatura	47
Equação 6. Lei de Bragg aplicada à refração de Raios -X	49
Equação 7. Calculo da tensão.....	54
Equação 8. Calculo da deformação.	54

INTRODUÇÃO

Existe uma grande dificuldade em encontrar materiais que apresentem propriedade de biocompatibilidade, pois o organismo é um grande desafio por ser extremamente complexo. A ciência dos biomateriais é uma parte importante dos cerca de 300.000 produtos para uso na área da saúde. No ano 2000, o mercado mundial de biomateriais foi estimado em 23 bilhões de dólares, com uma taxa de crescimento maior que 12% ao ano, chegando a movimentar em 2005 mais de 40 bilhões de dólares (SOARES, 2006). Nota-se expressiva expansão ao longo dos últimos anos no mercado global de biomateriais, em 2008 este mercado movimentou US\$ 25,6 bilhões mundialmente, tendo a seguinte distribuição: 43% nos Estados Unidos, 33% na Europa, 3% na Ásia (Pacífico), 2% no Brasil e 19% no restante do mundo (ALCIMED, 2017). Em 2012, este mercado atingiu a cifra de US\$ 44 bilhões, chegando em 2017 a um total de 88,4 bilhões de dólares com uma taxa de crescimento de 22,1% ao ano. O tamanho do mercado global de biomateriais deve chegar a US \$ 348,4 bilhões em 2027, registrando uma taxa de crescimento anual composta de 15,9% sobre o período da previsão, de acordo com um novo relatório da Grand View Research (GRAND VIEW RESEARCH, 2021). A aplicação de biomateriais representa um campo de rápido crescimento na área biomédica, com avanços recentes na melhoria da bioatividade, compatibilidade e propriedades mecânicas que introduziram novas oportunidades para sua aplicação em engenharia de tecidos, engenharia imunológica e sistemas de distribuição de drogas. A biocompatibilidade, a baixa toxicidade e a natureza renovável dos biomateriais poliméricos os tornam potentes agentes de distribuição, na liberação controlada e direcionada de drogas, proporcionando oportunidades lucrativas para o crescimento do mercado.

No Brasil, o mercado de biomateriais foi de 690 milhões de dólares em 2010, tendo crescimento de 20% no ano de 2015. Neste país, o ramo de maior movimento econômico é o de produtos ortopédicos com 37,5% do mercado total em 2009, seguido de biomateriais de uso cardiovascular com 36% do total. Já em 2011 as cirurgias ortopédicas chegavam, no Brasil, a quase 300 mil por ano, de acordo com dados do Sistema Único de Saúde reportados no Portal Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). O Mercado brasileiro deve chegar acima de US \$ 5,18 bilhões em 2022, segundo o relatório que oferece *insights* detalhados sobre as forças dinâmicas do mercado para possibilitar uma tomada de decisão de negócios e formulação de estratégias de desenvolvimento apoiado sobre as oportunidades presentes no mercado (O PETRÓLEO, 2021).

O crescimento acelerado observado no mercado de biomateriais pode ser atribuído a três motivos principais: (i) O envelhecimento da população mundial, com a elevação da expectativa de vida; (ii) O aumento do poder aquisitivo e do padrão de vida nos países em desenvolvimento, que facilitam o acesso ao tratamento de diversos tipos de enfermidades; (iii) As melhorias tecnológicas na abordagem de doenças anteriormente vistas como não tratáveis (UNITED NATIONS, 2013).

Estes materiais têm como definição: “Biomaterial é qualquer substância ou combinação destas, sintética ou natural, que pode ser utilizado por certo tempo, em conjunto ou como parte do sistema que trata, ou restitui um tecido, órgão ou função no organismo” (COHENI, 2010). Biomateriais devem produzir respostas biológicas ou sistêmicas devendo não apresentar toxicidade, substâncias carcinogênicas, antigênicas e agentes mutagênicos. Diante de aplicações diferenciadas, os dispositivos podem ter aplicações a longo prazo, como próteses permanentes, válvulas cardíacas e revestimento (DA SILVA, 2000).

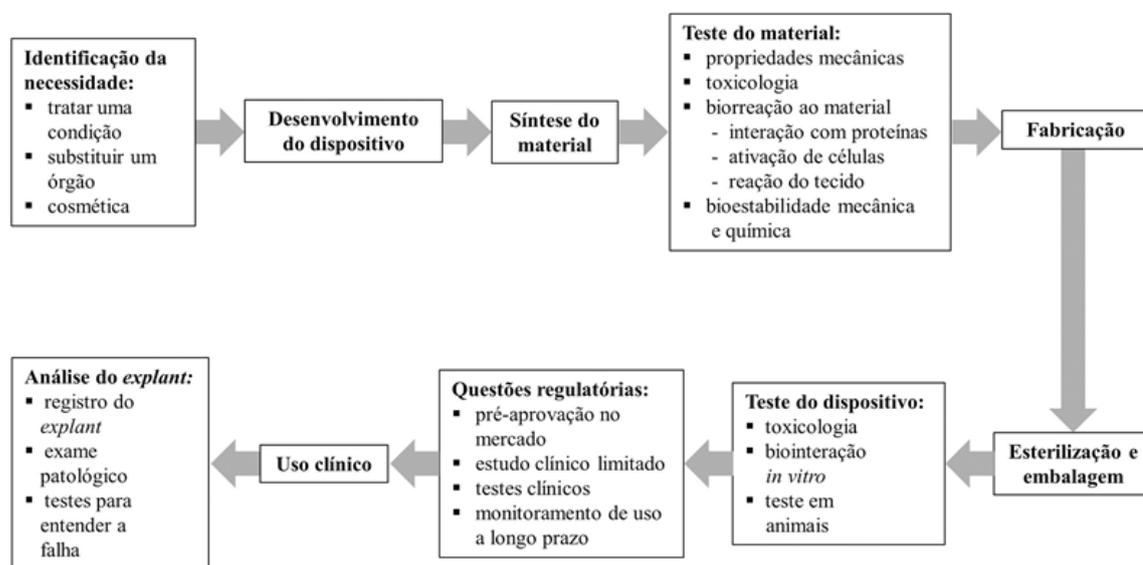
Em 1959, foi publicado o primeiro relato do uso do poliuretano em aplicações biomédicas, sendo este explorado como válvulas cardíacas em um coração artificial. Nesse trabalho a equipe introduziu as válvulas em 51 cachorros, avaliando a biocompatibilidade do material, seguido de suas complicações (KOLFF, 1959). Com o desenvolvimento de novos materiais poliméricos, especialmente na área médica, o poliuretano dentre eles, ganhou destaque significativo, tendo como principais vantagens, a adaptação das propriedades mecânicas e da cinética de degradação para atender as diversas aplicações, podendo ser fabricados com várias técnicas e características morfológicas (LOH, 2008).

Alguns grupos estudam a aplicabilidade deste tipo de material na área cardiovascular como a equipe do Doutor Jacques Scherman, que desenvolveu um sistema de implantação de válvula aórtica transcater, econômico e não oclusivo (IVAT) para doença de válvula aórtica. A metodologia de implantação envolve dois tipos de *stent*, o de pericárdio bovino e o constituído de polímero, ambos após testes demonstraram uma grande durabilidade e excelentes resultados no duplicador de pulso, que simula, por meio de bilhões de ciclos, o sistema cardiovascular. Este *stent* foi desenvolvido para atuar de forma fixa e em conjunto com um balão transcater, utilizado para desobstruir as vias (SCHERMAN, 2017).

O desenvolvimento de novos produtos requer etapas que validem a segurança e aplicabilidade do material, para que isso ocorra, não só a caracterização química e física deve ser realizada, mas o estudo da compatibilidade e viabilidade em um organismo.

A biocompatibilidade envolve testes como o estudo da citotoxicidade, adesão celular entre célula e polímero, entre outros (ISO 10993 parte 1). A partir do momento que o polímero é testado e se obtém resultados satisfatórios tornam-se grandes candidatos a testes clínicos. São várias as etapas envolvidas desde a identificação da necessidade de um biomaterial até a utilização e análise final do produto como visualizado na Figura 1.

Figura-1. Etapas do ciclo de vida de um biomaterial, desde sua concepção, baseada em uma necessidade específica até seu uso clínico e avaliação posterior.



Fonte: PIRES, 2015.

Uma das etapas ao desenvolver um novo produto, é a definição de uma metodologia para a esterilização do material. Atualmente a metodologia mais aplicada para esterilização de produtos médicos é com Óxido de Etileno (OEt) que pode deixar resíduos tóxicos causando possíveis complicações no paciente. Esterilizadores que operam em baixa temperatura utilizando Peróxido de Hidrogênio como substrato para formação de plasma, também são amplamente utilizados para materiais sensíveis ao calor, porém é limitado para grandes quantidades.

Dentre os métodos desenvolvidos para a esterilização, a radiação ionizante pode ser utilizada na área da saúde, esta permite a esterilização destes materiais em baixas temperaturas, tendo como principal vantagem a mínima manipulação do material,

podendo ser irradiado após a sua embalagem final, por sua ótima penetrabilidade, permitindo um acesso total ao material.

Mesmo apresentando inúmeras vantagens a radiação ionizante pode gerar alterações no material, como a decomposição deste, apresentando liberação de agentes tóxicos, e perda de propriedades mecânicas, por esse motivo se faz necessária a caracterização química, físico-química e mecânica deste, antes e pós a esterilização, para o acompanhamento das propriedades do biomaterial.

2 JUSTIFICATIVA

O mercado de biomateriais se desenvolveu nos últimos anos com a necessidade de melhora da qualidade de vida dos seres humanos, para atender as demandas na área da saúde, e com o aprimoramento de novas tecnologias. Hoje é esperado que o material que substituirá um órgão ou parte deste, tenha uma alta durabilidade e exerça seu papel de forma minimamente invasiva, isto é, interagindo com o organismo de forma satisfatória. Além de aplicar materiais conhecidos no organismo, existe também a necessidade de mudança das técnicas de esterilização destes dispositivos médicos, a fim de obter o menor grau de contaminantes e resíduos químicos possíveis, o que aumenta a chance de aceitação e sucesso do novo produto.

Diante desse desafio, foi desenvolvida uma metodologia de manufatura e esterilização de filmes poliméricos para aplicação como biomaterial, podendo este ser utilizado como revestimento de equipamento eletrônico (marca-passo), constituição de *stents* esofágicos e cardíacos, possibilitando uma maior durabilidade, e como estudo futuro a utilização deste material em impressora 3D, servindo de modelagem para *scaffolds* e redes tridimensionais.

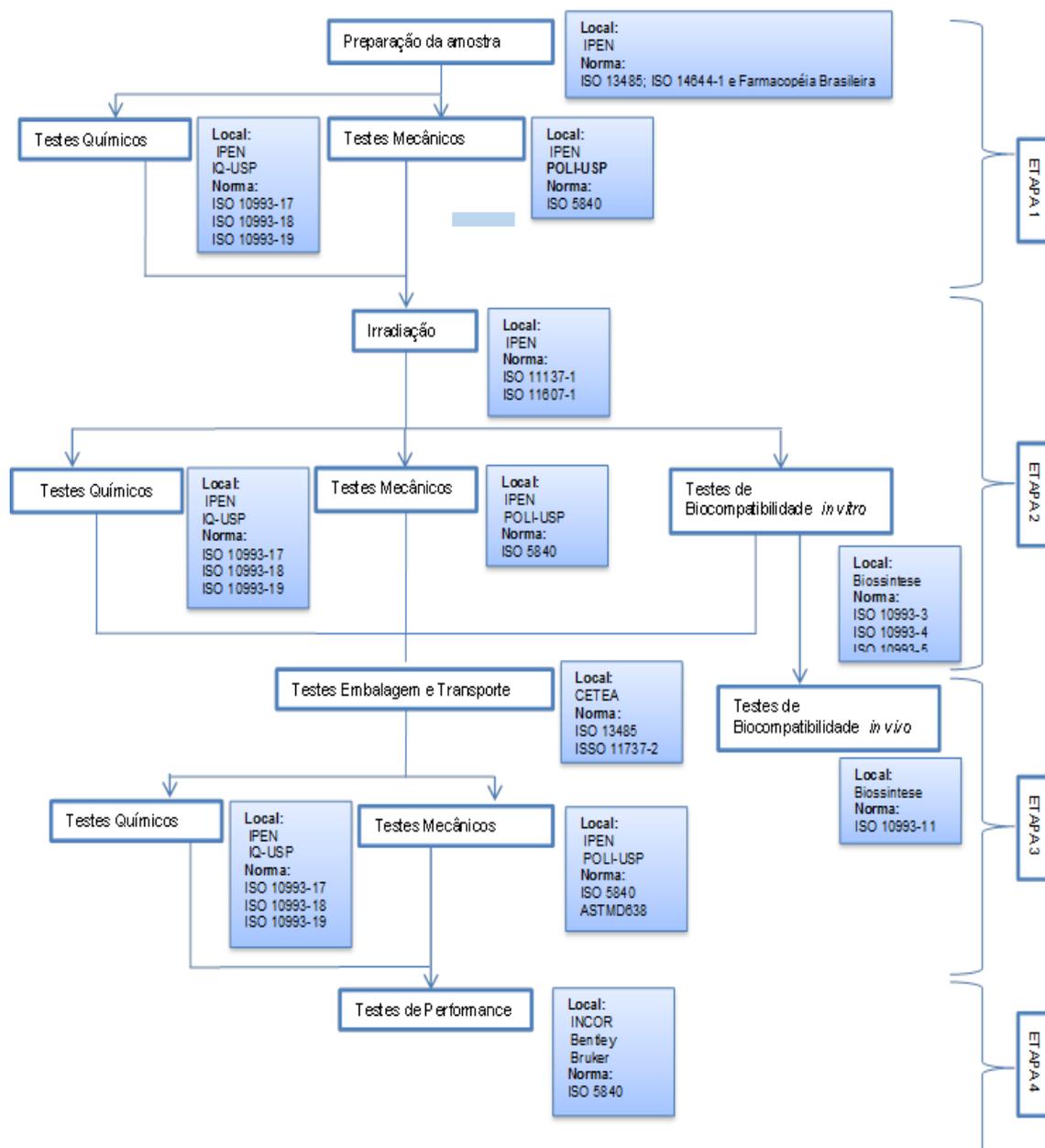
Um dos estudos desenvolvidos foi realizado em parceria com a empresa *NanoBioheart*, onde o filme produzido compõe uma válvula cardíaca em conjunto com um *stent* de cromo e cobalto sob patente BR 102016021508-0, abordando aspectos associados a: estabilidade, morfologia, propriedades mecânicas e biocompatibilidade do material antes e após a esterilização, para a execução de testes clínicos como exemplificado na Figura 2. As duas primeiras etapas do fluxograma são de desenvolvimento e caracterização, sendo essenciais para que o novo material siga com características seguras para o mercado, desta maneira, foram as etapas concluídas neste trabalho.

O Polímero escolhido para este estudo é da classe dos termoplásticos, designado Poliuretano (TPU) com base policarbonato, devido a sua maleabilidade, durabilidade e com solubilidade satisfatória em solventes orgânicos convencionais, este material é comercializado pela empresa Lubrizol. Com base no material, a técnica de esterilização também é de suma importância de ser definida, já que esta permitirá a diminuição de possíveis complicações de biocompatibilidade e durabilidade, além de minimizar custos e garantir a não contaminação por produtos químicos. A metodologia proposta é a esterilização por radiação ionizante, que hoje já é utilizada em produtos hospitalares e

vem ganhando espaço no mercado. Os resultados da caracterização foram comparados entre as metodologias de esterilização.

A metodologia de processo desenvolvida neste trabalho gerou a patente de invenção com numeração BR 1020170202658.

Figura-2. Fluxograma de desenvolvimento do filme para aplicação como biomaterial no mercado.



Fonte: Autor, 2021.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver e validar a metodologia de manufatura e esterilização de filme polimérico constituído de Poliuretano Termoplástico (TPU) com base Policarbonato, com a utilização da radiação ionizante nas doses de 15, 25 e 50 kGy para esterilização do material em comparativo às técnicas comumente utilizadas como a de plasma e Óxido de Etileno. Este material apresenta potencial de mercado para revestimentos de *stents* implantáveis esofágicos, constituintes de *stents* na área cardiovascular substituindo material biológico hoje utilizado (pericárdio bovino) e revestimentos de aparelhos marca-passo devido a sua característica de material isolante, dentre outros.

3.2 Específicos

- Desenvolver e otimizar a metodologia de manufatura dos filmes de TPU, escolhendo as condições ideais a fim de produzir uma nova metodologia de aplicação;
- Submeter o material a diferentes técnicas de esterilização, utilizando diferentes doses de radiação ionizante: 15, 25 e 50 kGy, como comparativo às técnicas de Óxido de Etileno e plasma.
- Avaliar as características químicas e físicas dos filmes poliméricos pré e pós esterilização, para determinação da técnica ideal para esterilização.
- Avaliar a biocompatibilidade do filme após a esterilização;

4 CONSIDERAÇÕES GERAIS

4.1 Biomateriais

4.1.1 Histórico

Os primeiros registros da utilização de biomateriais datam de 4.000 A.C, entretanto, os usos desses materiais não apresentavam garantia de funcionalidade, uma vez que eram desconhecidos os conceitos relativos aos materiais, a infecção e as reações biológicas. Os biomateriais devem apresentar propriedades químicas, físicas e biológicas compatíveis com os tecidos biológicos do hospedeiro, de modo a estimular uma resposta adequada dos mesmos (SILVER & DOILLON, 1989).

Os principais marcos no desenvolvimento dos biomateriais foram nas duas grandes guerras mundiais, onde, na tentativa de evitar a amputação ou promover a recuperação dos membros que tiveram suas funções comprometidas, ocorreu uma busca incessante por materiais que não fossem nocivos e não induzissem rejeição. Até meados da I Guerra Mundial, apesar de avanços consideráveis na ciência dos biomateriais, nenhum dos materiais aplicados apresentava o estudo e comprovação da sua biocompatibilidade. Os maiores avanços nesse campo ocorreram após a II Guerra Mundial, com importante papel da odontologia, principalmente após o advento da ósseointegração, conceito introduzido por pesquisadores liderados pelo médico ortopedista sueco Per-Ingvar Brånemark. Com isso, as pesquisas passaram a se concentrar em materiais que visam acelerar a ósseointegração, ou seja, diminuir o tempo necessário para a aposição óssea, devido aos ferimentos de guerra (BRANEMARK, 2003).

4.1.2 Definição

Biomaterial tem como definição: é qualquer substância ou combinação destas, sintética ou natural, que pode ser utilizado por certo tempo, em conjunto ou como parte do sistema que trata, ou restitui um tecido, órgão ou função no organismo” (COHENI, 2010.).

O critério para a escolha de um biomaterial para uma determinada aplicação deve ser feito considerando a similaridade química ou física que o material apresenta quando comparado aos tecidos ou órgão a ser substituído, para isso existe a necessidade do domínio das condições, não apenas da preparação e caracterização do biomaterial, mas também das respostas biológicas que este pode vir a ocasionar, como por exemplo em preenchimento de espaços vazios em ossos, ocasionados pela perda de tecido. O

biomaterial deve promover uma resposta celular satisfatória para que este possa cumprir seu papel (WILLIAMS, 1987).

O caminho para entender a biocompatibilidade é a determinação dos mecanismos químicos, bioquímicos, físicos e fisiológicos que envolvem a interação do material em estudo com os tecidos do corpo humano.

Existe um conjunto de características dos biomateriais que podem influenciar na resposta do organismo à sua presença, e que devem ser consideradas para a sua seleção (WILLIAMS D., 2008), estas estão exemplificadas na Figura 3.

Figura 3- Lista de características importantes que um biomaterial deve oferecer.



Fonte: PIRES, 2010.

4.1.3 Classificação

Os Biomateriais são classificados em função da sua origem, da reação tecidual que geram no organismo, ou de sua natureza química (SINHORETI, VITTI, & SOBRINHO, 2013)

Com relação à sua origem, os biomateriais podem ser autógenos, alógenos, xenógenos e aloplásticos. Os materiais ditos autógenos são aqueles pertencentes ao próprio corpo, são utilizados principalmente como enxertos, já que apresentam uma maior viabilidade celular, porém na necessidade da utilização de grandes quantidades se tornam muitas vezes inviáveis (ALMEIDA, 2007). Os alógenos, também são provenientes de organismos, só que neste caso de outro, sendo da mesma espécie, podem ser processados, armazenados em bancos e obtidos a partir de organismos não mais vivos, exemplos desse tipo de material são ossos e pele, o lado negativo são possíveis infecções transmitidas

pelo mau armazenamento ou doença pré-existente (KAYAIGA, 1991). Materiais xenógenos são obtidos mais facilmente e provêm de espécies diferentes, como por exemplo, osso e pericárdio bovino, a principal desvantagem é a possibilidade de rejeição pelo novo organismo ao qual este fará parte, gerando infecções, deterioração e perda do material (BENKE D., 2007). Os materiais aloplásticos compreendem os materiais sintéticos e biocompatíveis encontrados comercialmente como os metálicos, polímeros e cerâmicas (ALMEIDA, 2007))

Quanto a classificação de reação tecidual, os biomateriais podem ser considerados como: bioinerte, bioativo e bioabsorvível. Bioinertes são aqueles tolerados pelo organismo e não liberam nenhum tipo de componente, também não provocam reações com tecidos vizinhos, porém o termo precisaria ser reavaliado, já que todo tecido possui resposta frente a qualquer material, mesmo que mínima (STEVENS, 2008). Bioativos favorecem a interação no local do implante, no caso por exemplo de enxerto ósseo, favorecem a osteointegração por ter similaridade química, permitindo assim a ligação entre os tecidos. Quando o material bioativo é implantado, uma série de reações bioquímicas são desencadeadas por conta da interface entre o implante e o tecido, estas determinam a resposta celular e a aceitação que será desenvolvida (CAO, 1996). Já materiais reabsorvíveis são aqueles que podem ser consumidos, ou degradados por um processo de remoção por atividade celular diretamente ou indiretamente por mecanismos de fagocitose, enzimático, dissolução, etc. (RAVAGLILO, 1992).

Além da classificação no comportamento, um biomaterial pode ser classificado quanto à sua natureza, que pode ser natural ou sintética. Entre os naturais, como o próprio nome diz, estão os materiais de origem natural, como o colágeno, fragmentos de ossos e pele, dentre outros. Já os sintéticos podem ser metálicos, cerâmicos ou poliméricos (SOARES, 2017). Exemplos de materiais compostos de ligas metálicas são as próteses dentárias, constituídas de Mercúrio, Estanho e Prata no geral, estes possuem elevada condutividade térmica, além de alta tenacidade, dureza, ductibilidade, resistência, etc., o que permite uma grande aplicabilidade. Materiais cerâmicos apresentam ótima biocompatibilidade e grande resistência mecânica, muitos estudos na área ortodôntica e ortopédica são realizados devido às características que esses materiais possuem, dentre eles resistência a compressão, e durabilidade. Um exemplo de material atualmente utilizado é a Hidroxiapatita (HA), esta é muito empregada em reparos ósseos, juntas e dentes, porém apresenta uma desvantagem que é o baixo limite de resistência mecânica,

baixo módulo de elasticidade e alta densidade quando comparada aos polímeros (PONOMAREVA, 2010).

Por fim, os polímeros apresentam diversas aplicações, sendo muito versáteis e com características distintas como a utilização biomédica em confecção de próteses maxilofaciais, órgãos artificiais, próteses cardíacas, membranas dialisadoras, oxigenadores, lentes de contato, cateteres, dentre muitos outros. Entre os polímeros, destacam-se o poliéster, polipropileno, poliuretanos, siliconas, poliamidas e muitas outras (PIRES, 2015).

4.2 Polímeros

4.2.1 Histórico

Diante da constante busca pela evolução do conhecimento da sociedade, esta avança em termos de ciência e tecnologia, assim, o avanço está ligado à capacidade em criar alternativas para garantir nossa sobrevivência e melhora da qualidade de vida. Surgiu então a necessidade de copiar a natureza a fim de gerar novos materiais que imitem ou se aproximem das características desejadas para serem aplicados, conforme a necessidade.

Muitas mudanças tecnológicas realizadas se devem ao surgimento dos polímeros como material alternativo, como por exemplo, borrachas sintéticas, plásticos e fibras sintéticas, revolucionando setores como, automotivo, têxtil, de embalagens, de biomateriais, etc. . Os polímeros vêm revolucionando a tecnologia moderna, abrindo inúmeras possibilidades para o crescimento e aprimoramento da área de materiais. O termo polímero foi criado pelo J. Berzelius em 1832. Na realidade Berzelius tentou criar um termo para diferenciar moléculas orgânicas que possuíam os mesmos elementos químicos, mas não necessariamente as mesmas propriedades químicas, como por exemplo os gases Etileno e Buteno. Inicialmente, estas moléculas foram chamadas de isoméricas e posteriormente Berzelius esclareceu que as moléculas de Buteno, possuindo quatro átomos de carbono e oito átomos de hidrogênio, seriam o estado polimérico das moléculas de Etileno, que em sua opinião, possuíam um átomo de carbono e dois átomos de hidrogênio. Assim, o termo polímero foi utilizado para representar as moléculas de Buteno constituídas de muitas (poli) unidades(meros) de Etileno. Vale a pena ressaltar que, nesta época não se conhecia o conceito de macromoléculas, que só veio a ser estabelecido em meados do século XX por Hermann Staudinger. Em 1866 Berthelot utilizou o termo polímero dentro do mesmo contexto de Berzelius, ou seja, Acetileno

poderia ser convertido em polímeros chamados Benzeno e Estireno por aquecimento. O termo polímeros só veio a ser usado como é conhecido hoje após 1922 (HAGE, 1998).

Os materiais poliméricos não são novos, pois têm sido utilizados desde a antiguidade, onde na época os de origem natural eram os únicos existentes. A síntese artificial de materiais poliméricos é um processo que requer tecnologia sofisticada, envolvendo reações de química orgânica, ciência que só começou a ser dominada a partir da segunda metade do século XIX (GORNI, 2013). Nessa época começaram a surgir polímeros modificados a partir de materiais naturais. Somente no início do século XX os processos de polimerização começaram a ser viabilizados, permitindo a síntese de polímeros a partir de seus meros.

4.2.2 Definição

Quando as moléculas se tornam grandes, e contém um número de átomos encadeados superiores a uma centena, estas são chamadas de macromoléculas. A cadeia adquire características resultantes da interação envolvendo segmentos intramoleculares ou intermoleculares (MANO,1999). As forças intramoleculares, covalentes e fortes, determinam juntamente com o arranjo das unidades de repetição, a estrutura e o tipo da cadeia polimérica, estas também influenciam na rigidez, logo flexibilidade da cadeia, assim como, em sua estabilidade térmica, química, etc.. Forças intermoleculares fracas determinam em sua maioria propriedades físicas das cadeias poliméricas, como a temperatura de fusão, solubilidade, cristalinidade, difusão, deformação envolvendo a quebra e formação de ligações intramoleculares. Pode-se considerar que, quanto mais forte for a ligação, maior será a atração entre as cadeias, tornando difíceis eventos que envolvem separação ou fluxo em cadeia (CANEVAROLO, 2006). Estas interações conferem características dominantes em relação aos átomos e grupamentos funcionais presentes. Os tipos de interação podem ser: ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, interações de Van der Waals que atuam na molécula no estado sólido, em solução estas macromoléculas acarretam um aumento da viscosidade (MANO, 1999).

A solubilidade destes materiais depende da estrutura química do solvente: se as cadeias são lineares, ramificadas, etc., acarretando assim, um aumento da dificuldade do escoamento das camadas. A evaporação desses solventes acarretam a formação de filmes, enquanto que soluções de substâncias sólidas de baixo peso molecular resultam em cristais ou pós (MOTHÉ, 2009).

Macromoléculas são encontradas tanto como produtos de origem natural quanto de origem sintética. Polissacarídeos, polihidrocarbonetos, proteínas e ácidos nucleicos, amido, algodão, madeira, cabelo, são exemplos de macromoléculas de origem natural. Poliestireno e Náilon® são exemplos de macromoléculas sintéticas orgânicas. Há muitas semelhanças entre conceitos de macromoléculas e polímeros. Polímeros (*Polymers*) são macromoléculas caracterizadas por seu tamanho, estrutura química e interações intra e intermoleculares, possuem unidades químicas (meros) ligadas por covalência, repetidas regularmente ao longo da cadeia. O grau de polimerização (n ou DP) será definido a partir do número de meros na cadeia (MANO, 1999).

Todos os polímeros são macromoléculas, porém nem toda macromolécula é um polímero (MANO, 2000). Os polímeros industrializados apresentam massa molecular entre 10^4 e 10^6 , enquanto que alguns de origem natural apresentam o peso de 10^8 . Todos os polímeros contêm longos segmentos moleculares com dimensão entre 100 e 100.000 Å, os quais propiciam enlaçamentos e emaranhamentos (*entanglements*), alterando o espaço vazio entre as cadeias que é denominado volume livre (*free volume*).

Com a elevação da temperatura, aumentam os movimentos desses segmentos, tornando o material macio, polímeros com baixa massa molecular são chamados de oligômeros, geralmente são produtos viscosos na ordem de 10^3 (SOLOMONS, 2009)

Monômeros são micromoléculas susceptíveis a reagir e formar polímeros. A reação química que conduz a formação dos polímeros é chamada polimerização, que é funcional e pode continuar indefinidamente, desde que sejam mantidas as condições, preservando o centro ativo terminal, evitando sua extinção (MANO, 2014).

Quando o polímero tem apenas um tipo de mero usamos a expressão homopolímero, quando há mais de um tipo designamos copolímero. As reações de polimerização podem ocorrer em cadeia, necessitando de um agente iniciador e um terminador. Na química orgânica, a polimerização geralmente ocorre com o encadeamento das unidades monoméricas e pode ser realizada de forma regular cabeça-cauda (*head-to-tail*), na forma cabeça-cabeça (*head-to-head*), cauda-cauda (*tail-to-tail*), ou mista (NELSON, 2011).

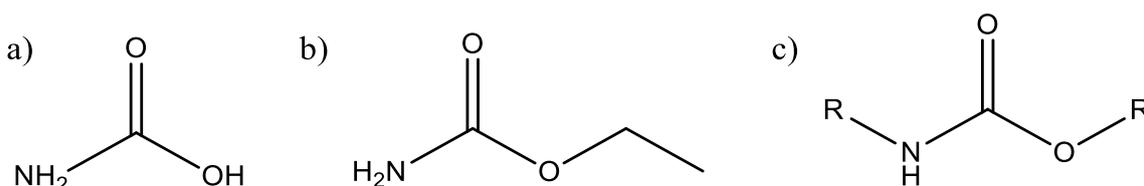
4.3 Poliuretano

No ano de 1937, o alemão Otto Bayer, desenvolveu os poliuretanos (PU). O uso comercial do PU começou na Alemanha, no final da década de 1930, utilizado

inicialmente na fabricação de espumas rígidas, adesivos e tintas. Foi após a segunda guerra mundial, na década de 1950, que ocorreu o desenvolvimento comercial do PU em espumas flexíveis. Em 1959, na Alemanha, uma indústria começou a produção de espuma flexível usando a técnica “*One Shot*” que dispensa o uso de pré-polímeros formados pela reação prévia do isocianato e polioli viabilizando a produção em grande escala desta espuma (VERHOEVEN, 2006).

Poliuretano é o nome dado a uma classe de polímeros inicialmente conhecida como policarbamato (FRISH & KLEMPER, 1998) O nome tem origem no carbamato de etila um éster do ácido carbâmico, também chamado de uretana (Figura 4). Os polímeros derivados de uretanas são denominados poliuretanos, adotaremos a sigla PU segundo as normas da IUPAC (ALLEGRA & BAREIS, 1987).

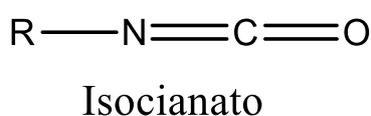
Figura 4- a) ácido carbâmico, b)uretana, c) ligação uretânica



Fonte: Adaptado de MELO & MORENO, 2010.

Polímeros são formados a partir da junção de monômeros como citado anteriormente, o elemento estrutural característico de praticamente toda a classe de PU é o grupo uretana. As ligações uretana resultam principalmente da reação de um isocianato (-N=C=O) com um álcool (-OH), o átomo de hidrogênio do grupo hidroxila é transferido ao nitrogênio do isocianato (Figura 5). Para a formação de PU é necessário isocianatos com dois ou mais grupos NCO por molécula, como os diisocianatos e poliisocianatos aromáticos, bem como alifáticos e cicloalifáticos (VILAR, 1999).

Figura 5- Estrutura do isocianato, principal monômero do poliuretano

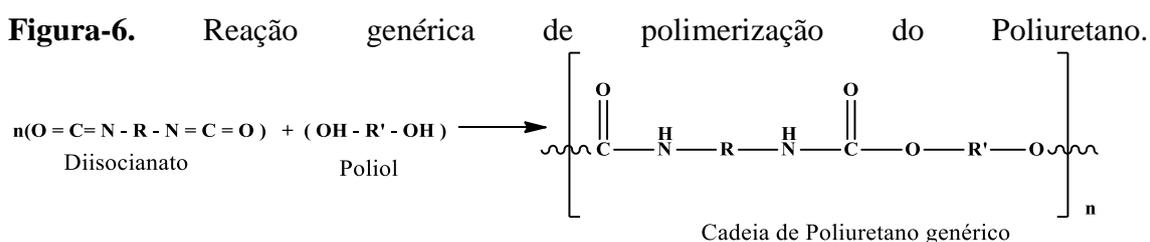


Fonte: Adaptado de LAGE ,2003.

A fabricação do poliuretano em 1937 visava à produção de fibras que na época substituiriam a poliamida (Naylon[®]). Diante de tal desenvolvimento foi percebido que esse polímero poderia ter inúmeras aplicações como elastômeros, espumas, ionômeros, enfim, uma ampla variedade comercial (SADOWSKA, CZUPRYNSKI, & LISZKOWSKA, 2011). Os elastômeros pertencem a uma classe de materiais poliméricos que apresentam como característica uma deformação elástica de no mínimo duas vezes seu comprimento original, temperatura de transição vítrea abaixo da temperatura ambiente e dificuldade de cristalização sob estiramento. Os elastômeros podem ser termoplásticos ou termofixos. No caso dos elastômeros termofixos deve existir pequena concentração de ligações cruzadas para prevenir a deformação plástica devido ao deslizamento molecular, garantindo, assim, alta deformação elástica, aumento do módulo de elasticidade e da resistência à tração (RODA, 2014).

4.3.1 Sínteses do poliuretano

Poliuretanos são formados a partir da reação de diisocianatos e polióis como visualizado na Figura 6, tendo estas inúmeras combinações, gerando um grande número de diferentes poliuretanos. A cadeia poliuretânica consiste de uma sequência alternada de segmentos flexíveis e segmentos rígidos. O poliol irá conferir as características elastoméricas ao polímero, sendo caracterizadas pelos segmentos flexíveis do material, enquanto que o diisocianato irá conferir as características do segmento rígido do material, como dureza, tenacidade e resistência (Figura 7) (MELCHIORS, 2000).

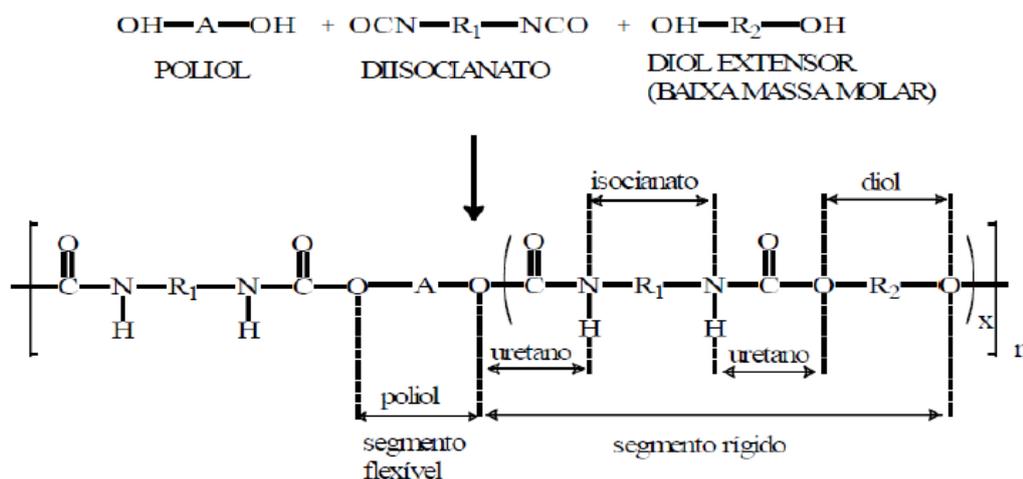


Fonte: Autor, 2021.

As propriedades mecânicas são influenciadas pela estrutura terciária da molécula. A escolha do diisocianato também afeta a estabilidade do poliuretano à exposição luz. Os poliuretanos sintetizados com diisocianatos aromáticos tornam-se amarelados quando expostos à luz ultravioleta, enquanto que os sintetizados com diisocianatos alifáticos são estáveis (LAGE, 2003)

Diferentes tipos de poliuretano são produzidos dependendo do material utilizado e da estrutura dos segmentos das cadeias que irão compor o polímero, por isso é importante compreender e descrever os tipos utilizados na reação (CRUZ, 2006).

Figura 7- Esquema de reação para formação do poliuretano



Fonte: SOUZA, 2014.

Para a produção de PU é necessário promover uma reação de polimerização, uma poliadção de isocianatos e um composto orgânico hidroxilado (com Hidrogênio ativo), esses devem apresentar uma funcionalidade mínima de dois, isto é, dois grupos reativos por molécula. Além dos polióis e isocianatos, são usados outros reagentes para a síntese de poliuretanos, tais como: extensores de cadeia (polióis geralmente de cadeias menores) e catalisadores para aumentar a velocidade de reação e estabelecer o balanço apropriado entre a extensão da cadeia e a reação de formação de polímero. Surfactantes e agentes de expansão também são importantes na produção dos poliuretanos.

Os agentes de expansão controlam o processo de formação e a densidade dos materiais poliméricos. Do ponto de vista químico existem dois métodos principais de preparação dos poliuretanos. No primeiro, todos os reagentes são misturados em uma única etapa (*one shot process*). O segundo inclui a preparação de um pré-polímero de baixa massa molar, seguida de extensão da cadeia deste até alta massa molar. A formação deste precursor se dá por meio da reação entre macropoliol e um diisocianato em excesso, originando então, pré-polímeros com cadeias contendo grupamento isocianato livre em suas extremidades (ZECK, 2004).

A extensão das cadeias do pré-polímero se passa com a adição de compostos contendo grupamento hidroxilas (menores cadeias) que reagem com os grupamentos isocianato das pontas das cadeias do pré-polímero. Esta última reação dá origem aos segmentos rígidos, responsáveis pela coesão das cadeias destes polímeros. Os segmentos flexíveis, por sua vez, são constituídos pelas cadeias do macropoliol (ALVES, 2010).

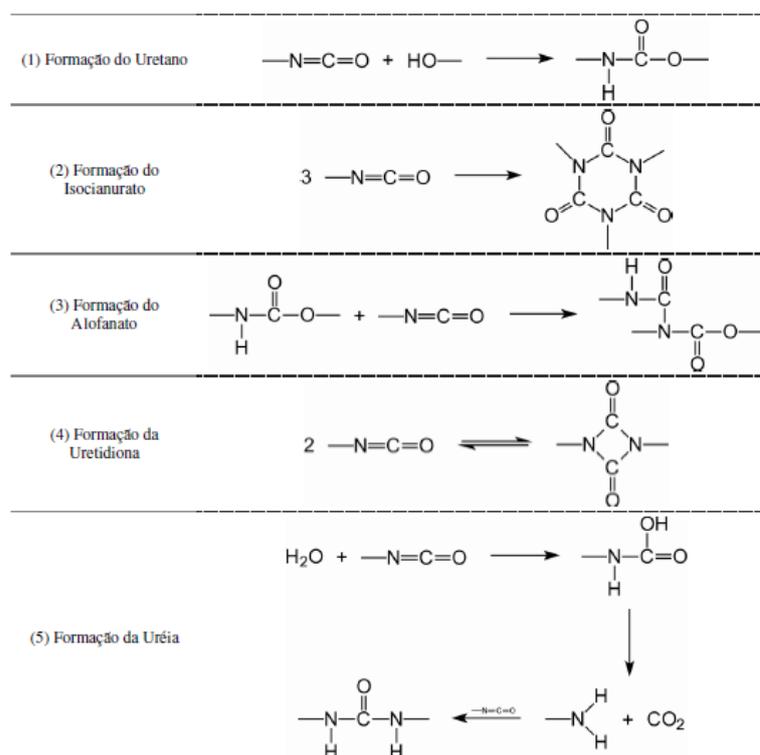
Os compostos hidroxilados são divididos em duas categorias de cadeia: longa e curta. Os compostos de cadeia curta são chamados de extensores de cadeia, e possuem funcionalidade dois (grupos ativos), quando possuir funcionalidade três, promove ligações cruzadas. Esses extensores permitem a formação da cadeia de poliuretano separando-as em microdomínios, dando certa flexibilidade ao material e conferindo propriedades físicas e químicas únicas. Tem-se como exemplo os compostos: 1,4-butanodiol (BD), dietanolamina (DEA) e a glicerina. Qualquer diol de cadeia curta pode ser utilizado como um extensor de cadeia, mas é 1,4-butanodiol o mais utilizado na produção de poliuretano devido ao tamanho ótimo de segmentos rígidos que produz (CARDOSO, 2012)

A categoria de cadeias longas denominadas poliois é dividida em poliéteres e poliésteres (oligômeros/polímeros) se destacando: polietilenoglicol (PEO), politetrametilenoglicol (PMTO), polipropilenoglicol (PPO), também se tem os óleos naturais provindos da mamona e soja como polibutadieno líquido hidroxilado (PBLH) (KLOSS, 2007).

4.3.2 A química do poliuretano

Os poliuretanos (PU) representam uma classe de polímeros que apresentam diversas aplicações, como na área médica, no setor automobilístico e industrial. O PU é dividido entre termoplásticos e termofixos (ou termorrígidos), devido a suas propriedades mecânicas, térmicas e químicas que podem ser definidas pela ampla variedade de matéria prima (KUMAR, 2002).

As reações mais encontradas no processo de obtenção de PU estão descritas na Figura 8. Na fabricação de espumas de PU termorrígido a reação número 5 é indispensável, já para a produção de PU termoplásticos (TPU), a água deve ser removida, sendo somente as reações de número 1 a 4.

Figura 8- Reações mais encontradas para a obtenção de Poliuretano

Fonte: Adaptado KUMAR, 2012.

As reações que podem ocorrer durante a síntese de PU dependem da temperatura, tipo de solvente e catalizador utilizado, podendo aumentar a taxa de reação. A temperatura pode influenciar e afetar a taxa de reação de formação do grupo uretano, assim reações secundárias podem ocorrer e interferir nas propriedades finais do material (VERHOEVEN, 2006).

4.3.3 Produção do poliuretano

A principal reação de produção de poliuretanos tem como reagentes um diisocianato, podendo ser alifáticos ou aromáticos, e um diol (etileno glicol, 1,4 butanodiol, dietilenoglicol, glicerol) ou um poliálcool poliéster, na presença de catalisador e de materiais para o controle da estrutura das células (surfactantes), no caso de espumas e tintas. Quando, na reação de polimerização, o diol é substituído por uma diamina, obtêm-se uma poliureia, porque a unidade básica torna-se uma uréia e não um carbamato (IGNÁCIO, 2002).

O poliuretano tem uma ampla variedade de densidades e de durezas, que mudam de acordo com o tipo de monômero utilizado e de acordo com a adição ou não de substâncias modificadoras de propriedades (LAGE, 2003).

Embora as propriedades do poliuretano possam ser determinadas principalmente pela escolha do poliól, o diisocianato também exerce alguma influência nas propriedades do polímero. A taxa de cura é influenciada pela reatividade do grupo funcional, e a funcionalidade pelo número de grupos isocianato. As propriedades mecânicas são influenciadas pela funcionalidade e pela forma da molécula. A escolha do diisocianato também afeta a estabilidade do poliuretano a exposição à luz. Os poliuretanos sintetizados com diisocianatos aromáticos ficam amarelados quando expostos à luz ultravioleta, enquanto que os sintetizados com diisocianatos alifáticos são estáveis (LAGE, 2003).

Surgem poliuretanos mais macios, elásticos e flexíveis quando segmentos de polietilenoglicol difuncionais lineares, normalmente chamados de polióis poliéter, são usados nas ligações uretânicas. A espuma de poliuretano (inclusive a espuma de borracha) é geralmente preparada com a adição de pequenas quantidades de materiais voláteis, chamados de agentes de sopro, à mistura reacional. Tais materiais podem ser substâncias químicas voláteis e simples, como a Acetona ou o Cloreto de metileno, ou fluorcarbonetos mais sofisticados, que conferem características importantes de desempenho, primariamente a isolação térmica (CANGEMI, 2009).

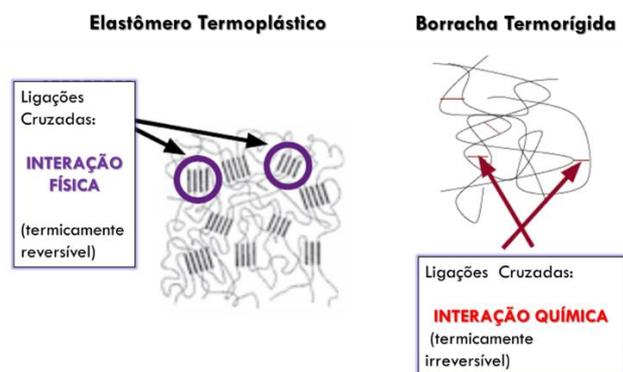
4.3.4 Poliuretanos termoplásticos e termofixos

Elastômeros de PU com características termoplásticas foram descritos na década de 1950, e inicialmente comercializados a partir de 1960 (OERTEL, 1994). Assim, atualmente o poliuretano termoplástico (TPU) é um dos produtos com maior aplicabilidade no âmbito de engenharia com propriedades elastoméricas. Os TPU são amplamente utilizados como elastômeros de alto desempenho com uma grande aplicabilidade e que requerem alta resistência ao impacto, a abrasão, resistência a solventes e a óleos, dentre outras propriedades (MOTHÉ, 2009).

Poliuretanos termoplásticos (TPU) são do tipo copolímeros em bloco, apresentando segmentos flexíveis e rígidos alternados gerando uma cadeia polimérica. Os blocos flexíveis permitem que o material apresente elasticidade, enquanto o bloco rígido atua como pontos de reticulações físicas, devido às ligações de hidrogênio realizadas pelos grupos uretano. Os segmentos flexíveis são responsáveis por controlar as propriedades de flexibilidade mesmo em temperaturas baixas e a resistência química (Figura 9), cujos principais utilizados são formados por polióis do tipo poliésteres ou poliéteres (RODA, 2014).

Os TPU's podem ser processados por meio de técnicas comuns entre os termoplásticos, como: moldagem por injeção, extrusão, sopro, etc., sendo recomendada a sua secagem antes do uso até que obtenha menos de 0,05% de umidade, o que pode levar de 3 a 6 horas entre 90 e 110°C dependendo da dureza do material. Um método usual de obtenção do TPU é a sua polimerização em processo contínuo, via extrusão reativa. Neste método, os monômeros são alimentados em uma extrusora, utilizando-se um sistema de dosagem preciso, e a polimerização ocorre ao longo do cilindro da máquina. Uma etapa posterior, denominada “pós-cura”, geralmente é utilizada para garantir a obtenção de polímeros de elevada massa molar. A extrusão reativa apresenta como vantagens, comparada aos processos de polimerização clássicos (reatores fechados, em batelada), maior rendimento, capacidade de transporte e mistura de materiais altamente viscosos. A extrusora também apresenta controle adequado de tempo e temperatura para diversas reações químicas que são realizadas em seu interior (CARDOSO, 2012).

Figura 9- Representação simplificada de comparação entre termoplásticos e termorrígidos.



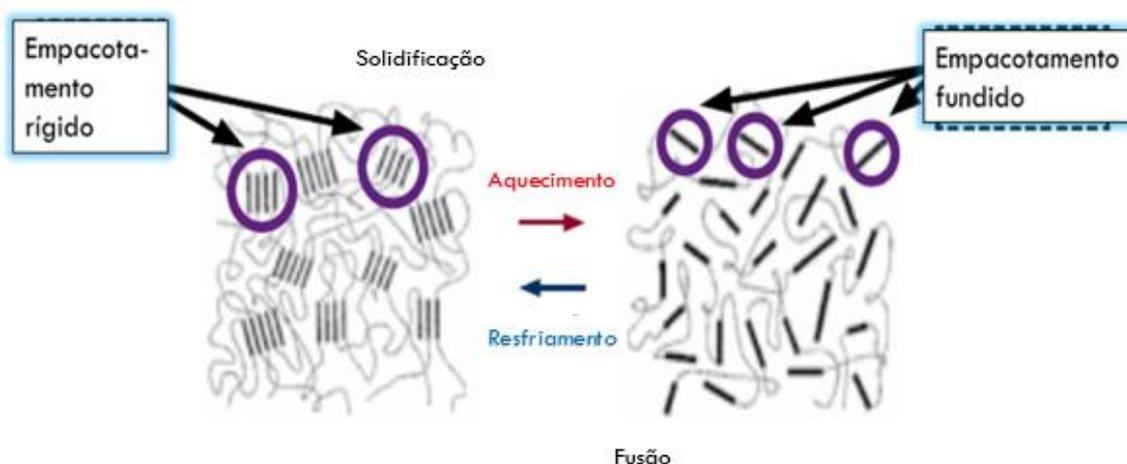
Fonte: Adaptado Guide of TPU, LUBRIZOL, 2015.

Os segmentos flexíveis são responsáveis por controlar as propriedades de flexibilidade mesmo em temperaturas baixas e a resistência química, cujos principais segmentos utilizados são formados por polióis do tipo poliésteres ou poliéteres. Poliéster TPU são compatíveis com PVC e outros materiais plásticos polares, oferecem ao material transparência e resistência a óleos, assim como uma maior resistência térmica. O Poliéter TPU também apresenta grande resistência térmica, e transparência, este é muito utilizado em materiais biológicos por possuir resistência a ataque microbológico e a hidrólise (ALVES, 2010.). TPU's aromáticos têm como base isocianatos MDI (Metileno Difenil

Isocianato), pois são produtos utilizados que requisitam uma maior flexibilidade, resistência e durabilidade. Os TPU's alifáticos têm como base os isocianatos H12-MDI, HDI (Hexametileno Diisocianato) e IPDI (Diisocianato de Isoforona) dando estabilidade a luz, normalmente são utilizados na indústria automotiva, e também em projetos que requisitam excelentes propriedades ópticas, de adesão e de proteção de superfície (RODA, 2014.).

Os polímeros termofixos possuem ligações covalentes entre as cadeias, a energia necessária para o rompimento destas ligações é muito alta e os polímeros são degradados antes de se transformarem em materiais moldáveis, portanto não podem ser reciclados. O aquecimento é usado para dar formato a uma peça, apenas uma vez, visto que, o mesmo não pode mais amolecer. Ao serem aquecidos, os termofixos formam as ligações cruzadas entre as cadeias lineares, criando uma estrutura de cadeia tridimensional estável que impede um novo deslocamento das moléculas do polímero, de forma simplificada, esta mudança é mostrada na Figura 10. Outros termorrígidos, no entanto, não necessitam de aquecimento externo ou algum tipo de pressão para serem produzidos, como o poliéster, poliuretano (pintura) e epóxi (adesivos e pisos). Com o aquecimento e pressão, somente haverá o rompimento da cadeia, resultando em degradação das propriedades (CALLISTER, 2002).

Figura 10- Esquema de aquecimento e resfriamento de material termoplástico



Fonte: Adaptado Guide of TPU, LUBRIZOL, 2015.

Polímeros termoplásticos podem ser amolecidos, o que permite a deformação desses a partir da aplicação de pressão. Quando resfriados, tais polímeros retomam a sua rigidez inicial. O comportamento desse tipo de polímero viabiliza a produção em larga

escala de artefatos através de meios como a extrusão e a moldagem por injeção. Outro importante aspecto desses polímeros é que eles podem ser reciclados a partir de rejeitos e refugos, já que são facilmente remodelados através da aplicação combinada de pressão e temperatura. Exemplos desse tipo de polímero são o polietileno, poliuretano termoplástico (TPU), polipropileno, PMMA [poli (metacrilato de metila)], politetrafluoretileno (Teflon®), Nylon®, etc. (ALVES, 2010).

São caracterizados por possuir ligações químicas fracas (Van der Waals) entre as cadeias que assim podem ser facilmente rompidas com a introdução de energia. Dessa forma, quando tais materiais são aquecidos, as ligações de Van der Waals são quebradas, permitindo que haja uma maior facilidade para a movimentação de cadeias poliméricas umas em relação às outras. A capacidade das cadeias de fluir com a aplicação de temperatura, garante a esses materiais suas características fundamentais de fácil re-processabilidade (ALVES, 2010).

O comportamento dos polímeros frente à ação de solventes também pode ser explicado pelo tipo de interação entre cadeias existentes. Assim, para polímeros termoplásticos, a solubilização do polímero por um determinado solvente é possível quando as interações entre as moléculas do solvente e das cadeias poliméricas apresentam uma magnitude superior à magnitude de interações entre as cadeias poliméricas. Nesse caso, as moléculas de solvente são capazes de romper as ligações fracas que unem as cadeias poliméricas e substituí-las por ligações um pouco mais fortes, mas ainda do tipo Van der Waals, entre o solvente e polímero (CALLISTER, 2002). Com a redução do grau de interação entre cadeias do polímero submetido à ação de um solvente efetivo, essas ganham maior liberdade de se moverem umas em relação às outras levando à desintegração e solubilização do material (MOTHÉ, 2009).

O solubilidade dos polímeros termofixos é influenciada justamente pelas interações entre cadeias, já que as ligações e enovelamento devem ser desfeitas, desta maneira, são normalmente mais insolúveis em solventes orgânicos usuais, enquanto os termoplásticos são mais adaptáveis. A introdução de fluídos quimicamente compatíveis com polímeros termorrígidos levam ao chamado “inchamento” desses, já que o fluido se insere entre as cadeias poliméricas sem, no entanto, romper qualquer ligação cruzada. (MANO 1999).

4.3.5 Solubilidade dos materiais poliméricos

Um solvente é uma substância líquida com capacidade de dissolver outra substância, formando então uma mistura uniforme (SOLOMONS, 2012). Uma dada substância tem poder solvente, quando esta apresenta a capacidade de vencer as forças de coesão que unem as moléculas no soluto, no caso as forças de Van der Waals. Desta forma o poder solvente é traduzido na prática por um parâmetro de solubilidade de Hildebrand (δ), que de certa forma mede as forças de Van der Waals, derivada da densidade de energia coesiva, esta por sua vez é derivada do calor de vaporização (CAETANO, 2010).

Equação 1. Equação para cálculo da energia de vaporização

$$C = \frac{\Delta H - RT}{V_m}$$

Sendo: ΔH = calor de vaporização

R= constante dos gases perfeitos

T= temperatura (K)

V_m = volume de um mol da substancia

O parâmetro de solubilidade de Hildebrand (Equação 2), desenvolvido em 1936, é a raiz quadrada do valor de densidade de energia coesiva:

Equação 2. Parâmetro de solubilidade de Hildebrand

$$\delta = \sqrt{C} = \left(\frac{\Delta H - RT}{V_m} \right)^{1/2}$$

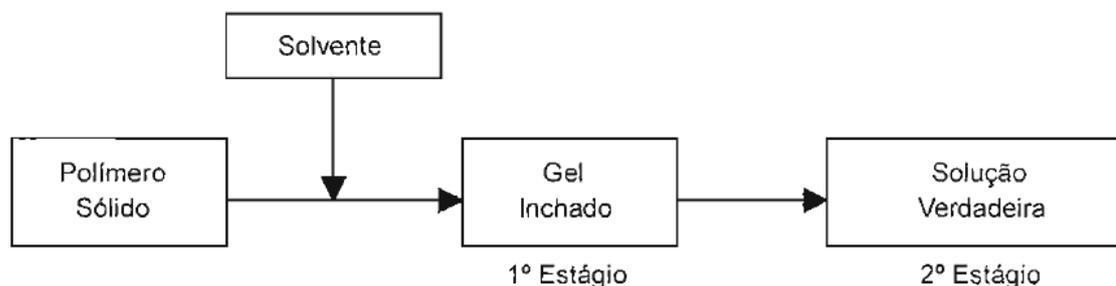
As unidades utilizadas são $(\text{caloria}/\text{cm}^3)^{1/2}$ e $\text{MPa}^{1/2}$, com a seguinte equivalência:

$$1(\text{caloria}/\text{cm}^3)^{1/2} = 2,046 \text{ Mpa}^{1/2}$$

Em 1967 foi desenvolvido por Charles Hansen o parâmetro de solubilidade de Hansen, abreviadamente *HSP*, que se apoia numa teoria com alguns aspectos favoráveis e outros menos favoráveis. Utilizaremos nestas notas o que poderemos chamar de “Clássico parâmetro de solubilidade de Hildebrand”. Uma regra muito conhecida, e que se aplica, quer ao parâmetro de solubilidade de Hildebrand, quer ao parâmetro de solubilidade de Hansen, é que semelhante dissolve o semelhante (CAETANO, 2010).

A solubilização de um polímero é um processo físico reversível que ocorre em etapas, este processo não deve alterar a composição química da cadeia polimérica. O primeiro contato do polímero com o solvente faz com que este tenha tendência a inchar através da difusão das moléculas do solvente, formando um gel inchado, para isto as interações polímero-polímero devem ser menores que a interação polímero-solvente como visualizado na Figura 11 (CANEVAROLO, 2006).

Figura 11- Esquema de processo de solubilidade de polímeros



Fonte: Adaptado CANEVAROLO, 2006.

O segundo estágio será o de desintegração do gel, formando então uma solução verdadeira, este estágio será prejudicado se na massa polimérica existir cristalinidade, pontes de hidrogênio, ligações cruzadas, e se a interação polímero-polímero for muito intensa a ponto de superar a do polímero com o solvente (CAETANO, 2010).

4.3.6 Poliuretano como biomaterial

A aplicação de materiais poliméricos biocompatíveis para finalidades médicas vem crescendo rapidamente, aplicando-se em diversas áreas biomédicas como, por exemplo, engenharia tecidual (ET), implantes de dispositivos médicos, órgãos artificiais, próteses oftalmológicas e ortopédicas, reparo ósseo e em outros campos diversos de atuação.

O grupo polímeros da Universidade de São Paulo em São Carlos, desde 1984, vem desenvolvendo pesquisas com polímeros poliuretanos derivadas do óleo de mamona que apresentam grande destaque na área médica. Este derivado apresentou-se completamente compatível com o organismo humano e vem sendo utilizado como cimento ósseo para reparação como implante de próteses. O osso é regenerado em um processo bioquímico

substituindo o polímero por células ósseas, este invento recebeu em 2003 a aprovação na *Food and Drug Administration* (FDA) e este certificado permite que este novo material possa ser inserido na área da saúde.

Na Universidade de São Paulo um grupo de pesquisadores pertencentes a equipe de engenharia metalúrgica do professor Wang Hui, desenvolveu uma metodologia de deposição de Prata e Óxido de Zinco em membranas compósitas de TPU a partir da evaporação de solventes, durante o processo de eletrofição. Desta maneira após caracterização, foi constatado a biocompatibilidade do material e sua utilização com propriedades biocidas, alta porosidade e permeabilidade ao ar, possibilitando sua aplicação na área biomédica. (HARADA, 2014.)

Na tentativa de suprir a falta dos ventrículos direito e esquerdo do coração durante o bombeamento em casos de transplante, a equipe do laboratório de engenharia biomédica da Universidade de São Carlos, realizou a caracterização de poliuretano derivado de óleo vegetal para compor a confecção de dispositivos de assistência ventricular (DAVs). Em testes biológicos, os dispositivos demonstraram que o PU possui potencial para ser utilizado em dispositivos que estão em contato com o sangue, sendo esse hemocompatível (CARVALHO, 2014).

Levando em consideração estas aplicações, alguns tópicos são importantes de serem abordados, como por exemplo, as características do polímero a ser utilizado, seu processo de obtenção e sua biocompatibilidade, tipo de esterilização do material, etc..

Os biomateriais ainda apresentam alto custo quando comparados a materiais já existentes muitas vezes derivados do petróleo, porém existe uma grande expectativa para que em breve o processo e o custo sejam bem menores, conforme o desenvolvimento é acelerado.

4.4 Esterilização

A esterilização de materiais é um processo extremamente importante para a segurança de um novo produto, esta é definida como um processo ou ato de inativar todas as formas de vida, em especial microrganismos indesejáveis. A cinética de inativação microbiana é de natureza exponencial, o que significa que sempre irá existir a possibilidade de sobrevivência de alguns microrganismos, independente do tratamento empregado (RUTALA & WEBER, 2004). Existem várias formas de realizar esses processos, nem todas porém, são recomendadas para a esterilização de alguns materiais.

A decisão de qual processo utilizar deve ser baseada no tipo de material e no risco de contaminação.

Os métodos de esterilização mais empregados hoje são divididos por meio físico e químico. Métodos químicos de esterilização são indicados para artigos críticos e termossensíveis, ou seja, aqueles que não resistem às altas temperaturas dos processos físicos. Dentre os métodos químicos, alguns deles podem ser utilizados tanto para desinfetar como para esterilizar, depende apenas do tempo de exposição e concentração do agente. A esterilização por processos físicos pode ser através de calor úmido, calor seco ou radiação. Quando por radiação tem sido utilizada em nível industrial, para artigos médico-hospitalares. Ela permite uma esterilização a baixa temperatura, mas é um método de alto custo. Para materiais que resistem a altas temperaturas a esterilização por calor é o método de escolha, pois não forma produtos tóxicos, é seguro e de baixo custo (MARTINHO JR, 2008). Os métodos mais utilizados para esterilização de produtos laboratoriais são listados na Tabela 1.

Tabela 1-Vantagens e desvantagens dos métodos convencionais utilizados para esterilização de biomateriais

Tipo	Vantagens	Desvantagens
Esterilização Química		
Óxido de Etileno	Alto poder de penetração, empregado em baixas temperaturas.	A penetração pode não ser 100% eficiente, para polímeros pode interferir em sua temperatura de transição vítrea, e pode deixar resíduos tóxicos.
Vapor de Formaldeído	Utilizado na forma gasosa ou líquida. Em baixas temperaturas.	Necessita de um longo tempo de exposição e apresenta alta absorção pelos materiais deixando resíduos.
Plasma de Peróxido de Hidrogênio	Muito indicado para materiais que necessitam de baixas temperaturas.	Alto Custo e não proporciona desinfecção em grandes quantidades.

Não Oxidante e com alto poder penetrante.		
Tipo	Vantagens	Desvantagens
Esterilização Física		
Calor	Rápido, eficaz e com baixo custo.	Não pode ser utilizado em materiais termossensíveis e nem em materiais que oxidam com a água.
Filtração	Eficiente para reter fungos, bactérias e leveduras.	Não elimina todo tipo de microorganismo e é utilizada somente em gases e líquidos.
Radiação não ionizante- Ultravioleta (UV)	Muito eficiente contra bactérias e cistos, de efeito rápido e baixo custo.	Baixo poder de penetração e efeitos deletérios sobre a pele e olhos, causando queimaduras graves. Além de possíveis alterações no material.
Radiação ionizante- Gama e Acelerador de elétrons (E-beam)	Sem alteração de temperatura, pressão e com alta eficiência em inativar microorganismos devido a seu alto poder de penetração. Permite assim a esterilização dos produtos já em sua embalagem final.	Necessidade de equipamentos especiais e equipe técnica altamente qualificada. Em alguns casos de microorganismos, são necessárias doses muito elevadas para a inativação.

Fonte: MARTINHO Jr, 2008.

4.4 Radiação ionizante com fontes de Cobalto-60

A radiação ionizante é definida como uma forma de radiação que tem energia suficiente para arrancar elétrons de átomos neutros, ou moléculas convertendo-os em íons e assim modificando seu comportamento químico. (YOSHITO,2011)

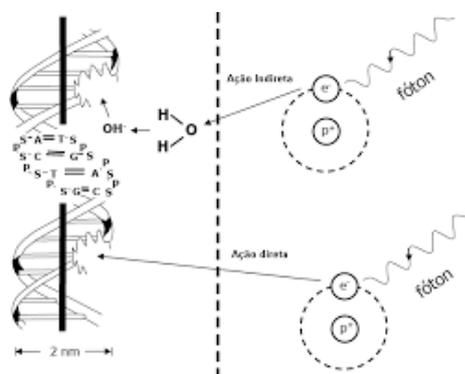
A radiação gama, classificada como radiação eletromagnética, com propriedades básicas de absorção representadas pela diminuição exponencial das intensidades das radiações, que ao passarem pela matéria, apresentam alto poder de penetração. Em todos os tipos de radiação ionizante a penetração é inversamente proporcional a densidade dos materiais processados. Sendo assim é de suma importância avaliar a embalagem, sendo as dimensões e densidades os critérios determinantes para o sucesso da aplicação. Os raios gama provenientes da fonte ^{60}Co possuem energia média de 1,25 MeV e poder de penetração superior a 50 cm, porém possuem uma taxa de dose baixa, ideal para o processamento de diversos produtos, espessuras e com densidade alta (CALVO 2005).

Dentre os métodos desenvolvidos para a esterilização, a radiação ionizante pode ser utilizada na área da saúde pela sua eficácia em eliminar contaminantes de diversas origens (SILVERMAN, 1991). O uso da radiação ionizante permite a esterilização destes materiais a baixas temperaturas, tendo como principal vantagem a mínima manipulação do produto, podendo ser irradiado após a sua embalagem final, por sua ótima penetrabilidade, permitindo um acesso total ao material.

4.5.1 Efeito da radiação ionizante em microorganismos

A radiação ionizante tem dois mecanismos de ação, um sendo de efeito direto sobre as moléculas dos microorganismos (Figura 12), quebrando, lesando e fundindo as estruturas, e outro efeito é o indireto que é causado pela formação de radicais livres com a radiólise da água, eles interagem com as moléculas em uma reação em cadeia culminando na morte de microorganismos (YUSOF, 2001).

Figura 12- Mecanismos de ação radiação ionizante na cadeia de DNA.

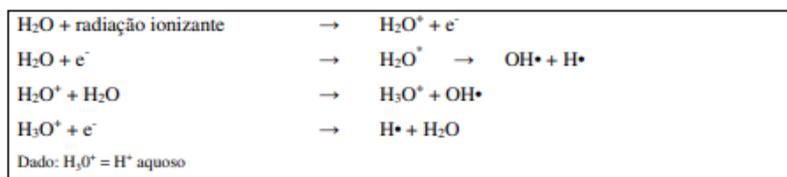


Fonte: FONSECA, 2009.

A radiação interage com a molécula de água, onde surgem dissociações e formação de produtos moleculares diferenciados. A radiólise da água é uma dissociação

que forma radicais livres, estas são moléculas que possuem apenas um elétron em sua órbita externa. Para que ocorra a radiólise, a energia da radiação deve ser superior ao valor da energia de ligação entre os elétrons que compõem a ligação como mostrado na Figura 13.

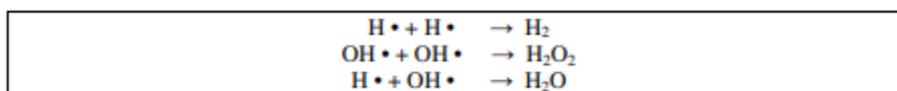
Figura 13- Equações do processo de dissociação da água



Fonte: FONSECA, 2009.

Ao interagir com as moléculas em solução, os radicais podem sofrer recombinação originando novas espécies químicas como mostrado na Figura 14.

Figura 14- Possíveis recombinações dos radicais em solução.



Fonte: FONSECA, 2009.

O processo para a determinação da dose utilizada na esterilização é estabelecida pela relação entre a carga microbiológica, valor D_{10} e o SAL. (Sterility Assurance Level) desejado, que é derivado matematicamente e define a probabilidade de um microorganismo viável estar presente em uma unidade de produto individual. O valor de D_{10} , que é usualmente expresso em kGy, é a dose de irradiação necessária para reduzir a população microbiana inicial em um logaritmo (1 \log_{10}), sendo então, 90% da carga inicial (HAMMAD, 2008). O valor pode ser calculado a partir da equação 3.

Equação 3. Cálculo do valor de D_{10} .

$$\text{Valor } D_{10} = \frac{\text{Dose de radiação}}{\log N_0 - \log N}$$

$$\log N_0 - \log N$$

Onde N e N_0 representam a diferença dos logaritmos da população inicial e final dos microorganismos. O valor D_{10} é específico para cada microorganismo conhecido.

O SAL deriva de estudos cinéticos de inativação de microrganismos, e expressa a probabilidade de se encontrar estes em uma unidade de produto, após a aplicação da

esterilização. Como por exemplo, um SAL de 10^{-6} significa a probabilidade de uma em um milhão de permanecer viável a vida do microorganismo em uma unidade de produto (GLYN, 2001)

O uso da radiação ionizante com propósitos de esterilização tem sido apoiado pela Agência Internacional de Energia Atômica (International Atomic Energy Agency-IAEA). Existe a norma da Organização Internacional de Normalização (ISO 11137- Sterilization of health care products- Radiation) para o uso de raios gama, raios X e feixes de elétrons em diferentes doses.

4.5.2 Efeitos da radiação ionizante em polímeros

Estudos mostram que quando um material polimérico é submetido a radiação ionizante, este poder vir a sofrer modificações em sua estrutura física e química. Estas são induzidas pela interação da radiação com a cadeia polimérica e pela produção de cátions, ânions, radicais livres e espécies excitadas (GOULAS et al., 2003). As modificações são causadas em condições específicas, isto é, dependerá da dose absorvida, da taxa de dose, da atmosfera da irradiação, e da presença de oxigênio. As modificações dependerão da constituição da cadeia, dos aditivos, solventes, grau de cristalinidade e homogeneidade do material que absorverá a energia (CLEGG E COLLYER, 1964).

As principais alterações que ocorrem em polímeros devido à radiação ionizante são a cisão das ligações da cadeia principal, isto é, degradação, e entre cadeias, com a formação de ligações chamadas de reticulação. Além disso, também pode ocorrer a formação de gases e compostos de baixa massa molecular ocasionados pela radiólise. Segundo Schnabel (1981), a produção de radicais livres e íons pela radiação, poder gerar uma polimerização ou a copolimerização em monômeros ou cadeias poliméricas. Uma vez modificado o polímero por radiação, faz-se necessário caracterizar esse material, constatando as possíveis modificações produzidas pela reticulação ou degradação.

4.5.3 Validação do processo de esterilização

A validação da esterilização visa construir e aplicar um modelo padronizado de análise, para eliminar todas as formas de vida microbiana utilizando um processo químico ou físico. No caso da radiação ionizante, a qualificação de performance segue a ISO 11137-1. Para que ocorra a validação da metodologia de esterilização, esta é dividida em três etapas:

- (i) A primeira é a de mapeamento da dose. Por meio deste mapeamento será possível averiguar a dose recebida em cada ponto do material;
- (ii) (ii) A segunda etapa para a validação é a determinação da dose mínima necessária para a esterilização do material;
- (iii) (iii) A terceira etapa é a verificação da dose máxima, onde o produtor não perderá suas características e não será degradado pela irradiação.

A dose recebida pelo polímero para sua esterilização, irá depender de suas características, pois esse como dito anteriormente pode sofrer modificações. Diante desse resultado o produto deve ser caracterizado.

4.6 Técnicas de caracterização

Para melhor entendimento do objeto de estudo, além de realizar o levantamento bibliográfico, deve-se usar técnicas de caracterização, estas podem ser divididas em: químicas, físicas e físico-químicas. Também foi realizado o estudo de biocompatibilidade por meio de técnicas biológicas *in vitro*.

As técnicas para caracterização química vão nos fornecer a composição de átomos e moléculas da amostra. A caracterização física indica literalmente as propriedades físicas do objeto de interesse, como por exemplo, a estrutura, arranjo molecular, cristalinidade, etc.. A caracterização físico-química é responsável por evidenciar os fenômenos físicos que ocorrem com a amostra devido a estrutura química, como por exemplo, ponto de fusão, cristalização e amolecimento.

Para este trabalho foram utilizadas para caracterizar as amostras de filmes constituídos de poliuretano termoplástico (TPU) as técnicas: Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) que identificará as bandas características de grupamentos orgânicos das amostras; Termogravimetria/ Termogravimetria Derivada (TG/DTG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), estas nos darão acesso ao perfil térmico da amostra e os eventos envolvidos a cada intervalo de aquecimento; Difractometria de Raios X (DRX), para a avaliação da cristalinidade da amostra; Tomografia por Coerência Óptica (OCT) para avaliação da espessura e possíveis falhas entre as camadas do polímero; Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), que permite o estudo da superfície do material, garantindo que este esta homogêneo, sem bolhas ou falhas; Ensaio de tração para estudo da deformação do material frente a força aplicada.

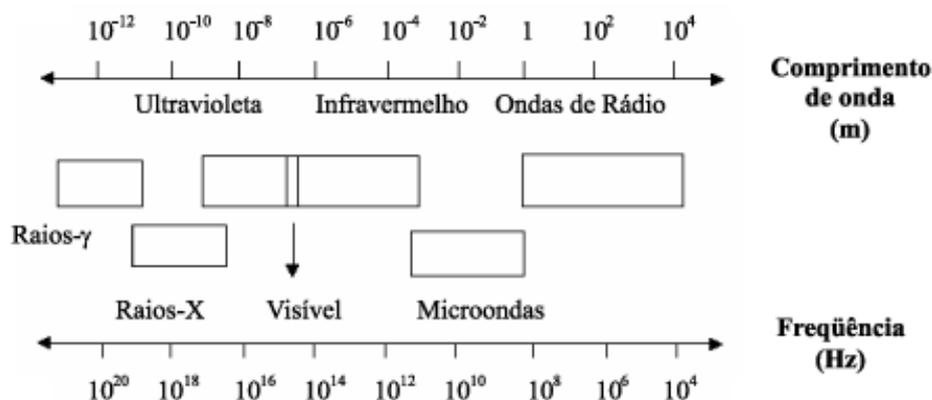
Também foram realizados ensaios de biocompatibilidade, sendo eles:

- (i) Citotoxicidade, garantindo que o material não é tóxico, isto é, o processo de manufatura e esterilização não deixou produtos que inviabilizam a aceitação do organismo,
- (ii) Adesão e Proliferação, garantindo a aceitação do organismo e demonstrando como este irá se comportar em relação a resposta celular.

4.6.1. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As técnicas espectroscópicas permitem a obtenção de informações estruturais sobre átomos e moléculas. A espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é utilizada para determinação de funções orgânicas e inorgânicas a partir da interação da radiação eletromagnética com a matéria (SHRIVER, 2008; BATSCHAUER, 2002).

Figura 15- Espectro eletromagnético



Fonte: SENSEVERINO, 2010.

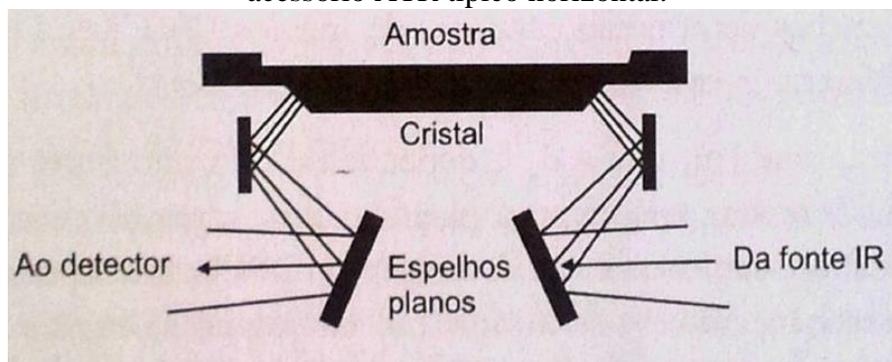
Um espectro de absorção no infravermelho (IR) (Figura 15) de um material é obtido quando a radiação de frequência no IR passa através da amostra e determina-se a fração na qual é absorvida a frequência dentro de um intervalo espectral particular. É necessário que haja uma variação no momento de dipolo elétrico da molécula como consequência com seu movimento vibracional e rotacional. Existem duas vibrações fundamentais: (i) Estiramento, na qual os átomos pertencem ao mesmo eixo de ligação, e a distância entre estes aumentam e diminuem; (ii) Deformação angular onde a posição

dos átomos muda em relação ao eixo. Obtemos então um espectro da transmitância versus o número de onda, onde o cálculo matemático chamado Transformada de Fourier irá extrair as frequências individuais que foram absorvidas, construindo o espectro (PAVIA, 2012).

4.6.1.1 Refletância total atenuada (ATR)

O acessório é utilizado para a obtenção de uma melhor qualidade dos espectros de polímeros, este é montado no compartimento de porta amostra do equipamento, tendo como principal elemento um cristal, também deve ser transparente à radiação infravermelha e apresentar alto índice de refração. O acessório também possui dois espelhos planos, que irão orientar o feixe, esquema pode ser visualizado na Figura 16 (CANEVAROLO, 2007). O feixe IR incidente no cristal a um ângulo de incidência específico e atinge a superfície, ocorrendo o fenômeno de reflexão total, onde se propaga ao longo da superfície do cristal até sair na extremidade oposta. O feixe de IR que penetra numa pequena profundidade na amostra, se absorvido será detectado. Desta forma este sofrerá atenuação, que é denominada de onda evanescente.

Figura 16- Esquema óptico do caminho percorrido do feixe eletromagnético em um acessório ATR típico horizontal.



Fonte: CANEVALORO, 2012.

4.6.2. Análise Térmica

Análise térmica é definida como um grupo de técnicas por meio das quais uma propriedade física de uma substância e seus produtos de reação são medidas em relação à temperatura, enquanto a substância é submetida a um programa controlado de temperatura a uma atmosfera específica (IONASHIRO,1980; WENDLANDT, 1986; HAINES,1995).

Uma técnica será considerada termo analítica se seguir as seguintes condições:

(1º) Uma propriedade física deve ser mensurada;

(2º) O resultado deve ser expresso direta ou indiretamente em função da temperatura;

(3º) A análise dever ser submetida a um programa controlado de temperatura (SALVIO NETO, 2010; ARAUJO, 2009; GIL, 2010; MOTHE, 2009; WENDLANDT, 1985; BROWN, 2004).

Um analisador térmico genérico é constituído por um forno, um transdutor de sinal, uma unidade controladora e por fim um microcomputador, o forno será a célula de medida, onde a amostra será aquecida ou resfriada (CANEVAROLO; MATOS, J.R.; MACHADO, L.D.B., 2007).

A análise térmica é aplicada a uma grande variedade de materiais possibilitando uma ampla variedade de estudos, muitas vezes uma única técnica de análise térmica não é conclusiva, por isso se pode acrescentar os resultados obtidos entre duas ou mais técnicas como DSC complementando o TG/DTG ou DTA (GOMES, 2007).

4.6.2.1. Termogravimetria (TG)

A termogravimetria (TG) é uma técnica da análise térmica na qual a variação da massa da amostra é determinada em função do tempo e/ou temperatura, enquanto a amostra é submetida a um programa controlado de temperatura, a uma atmosfera específica. A partir desta técnica podemos conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa do objeto de interesse, assim estabelecendo uma faixa de temperatura em que ele adquire composição química fixa, definida e constante, a temperatura que começam a se decompor, e acompanhar o andamento de reações. Obtemos a partir desta técnica curvas da massa de amostra em função da temperatura ou do tempo, estas curvas são denominadas curvas TG (WENDLANDT, 1986).

O efeito do aquecimento até a decomposição em materiais poliméricos varia muito com a natureza química dos polímeros. Ao atingir a excitação térmica, as ligações covalentes das cadeias poliméricas movimentam-se vibracionalmente, se rompendo e formando uma diversidade de fragmentos ou pequenas moléculas. Devemos ter informações cinéticas dos materiais e dos mecanismos de decomposição (CANEVAROLO; MATOS, J.R.; MACHADO, L.D.B., 2007).

Neste enfoque, a TG é uma ferramenta importante para este estudo, podendo obter parâmetros cinéticos, ordem de reação e informações sobre o mecanismo de decomposição. Os resultados obtidos a partir da curva forneceram informações sobre a

estabilidade térmica, composição da amostra e a estabilidade dos compostos intermediários e o produto final (MATOS, 2004).

4.6.2.2. Termogravimetria Derivada (DTG)

Na termogravimetria derivada (DTG), as curvas são obtidas a partir das curvas TG, e correspondem à derivada primeira da variação de massa em relação ao tempo (dm/dt), esta é registrada em função da temperatura ou do tempo, conforme a Equação 4:

Equação 4. Derivada primeira da variação de massa em relação ao tempo

$$\frac{dm}{dt} = f(T \text{ ou } t)$$

Ou ainda, à derivada primeira da variação da massa em relação à temperatura (dm/dT) que é registrada em função da temperatura ou tempo, conforme a Equação 5:

Equação 5. Derivada primeira da variação da massa em relação à temperatura

$$\frac{dm}{dT} = f(T \text{ ou } t)$$

Deve se ressaltar que a curva DTG, obtida matematicamente, não contém mais informações do que a curva TG integral, obtida sob as mesmas condições experimentais, assim ela representa apenas os dados de uma forma diferente, porém facilitando a visualização dos eventos, e permitindo a pronta determinação da temperatura em que a taxa de variação de massa é máxima, T_{pico} , e fornece informações adicionais como T_{onset} e T_{endset} . A área do pico sob a curva DTG é diretamente proporcional à variação da massa, e a altura do pico a qualquer temperatura fornece a razão de variação da massa naquela temperatura.

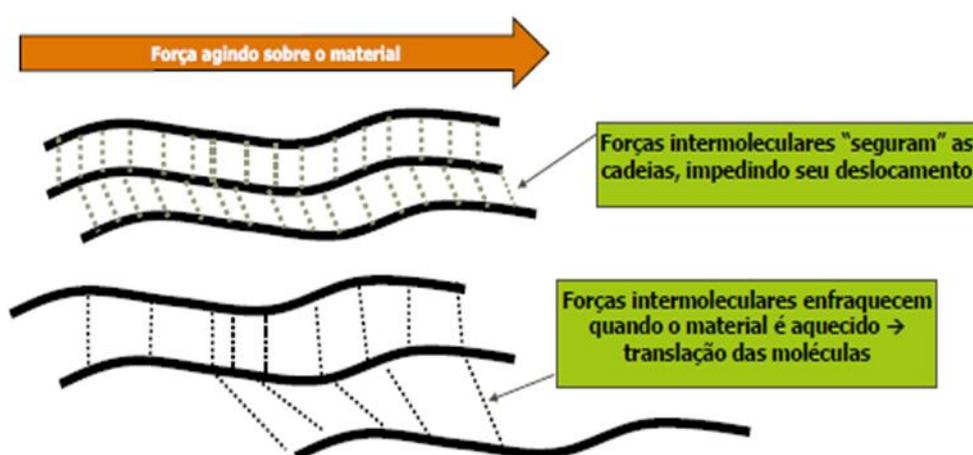
4.6.2.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) avalia as variações entálpicas que ocorrem em uma determinada amostra durante um processo de variação da temperatura. Assim nessa técnica mede-se a diferença de energia fornecida à amostra e a um material de referência em função da temperatura enquanto são submetidas a um programa controlado de temperatura (LAGE, 2003).

A DSC é uma técnica útil para determinar transições térmicas em polímeros, bem como as temperaturas e entalpia envolvidas nestas transições. Em polímeros temos como transições térmicas mais comuns a transição vítrea, fusão e cristalização.

A temperatura de transição vítrea (T_g) é a temperatura associada à mudança na capacidade calorífica entre um “sólido” vítreo e um “sólido” amorfo. Quando se tem um sólido quebradiço, vítreo; e esse sólido é aquecido acima da temperatura de transição vítrea, ocorre um aumento do volume possibilitando um maior aumento molecular sem alterar a estrutura, assim não envolvendo o calor latente (Figura 17). O processo é endotérmico, pois é necessário o fornecimento de energia para romper a barreira de energia intramolecular, e nas curvas DSC esta transição é apresentada como uma mudança na linha de base (DE PAIVA, 2006).

Figura 17- Representação de rompimento de forças moleculares causados pelo calor.



Autor: Adaptado de PAIVA, 2006.

A temperatura de fusão (T_m) é aquela onde a cristalinidade desaparecerá ou a temperatura máxima onde a rede cristalina é estável. É uma transição endotérmica, não pode ser medida quando o polímero não possui cristalinidade ou uma alta densidade de ligações cruzadas, este quando aquecido se decompõe. Já a temperatura de cristalização é aquela onde as cadeias, depois de fundidas, se movem livremente. Ao serem resfriados estes se rearranjam em estrutura regulares produzindo um pico exotérmico (CANEVAROLO, 2007).

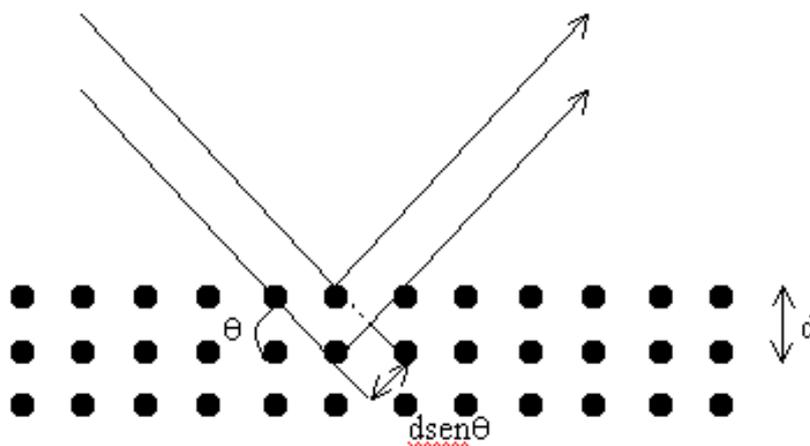
4.6.3. Difratomia de raios X (DRX)

Macromoléculas e polímeros podem formar microcristais assim como compostos inorgânicos. Esta técnica corresponde a uma das principais para a caracterização de microestruturas, amplamente utilizadas na indústria. A difratometria de raios X utiliza o espalhamento coerente da radiação X, o fóton de raios X após a colisão muda sua trajetória, mantendo porém, a mesma fase e energia inicial, desta forma a onda

eletromagnética é absorvida pelo elétron e reemitida, cada elétron irá se comportar como centro de emissão de raios X (CULLITY, 1978).

Como condição necessária para que a difração ocorra, o espaçamento entre as camadas de átomos deve ser equivalente à ordem de grandeza da onda que será incidida e deve assim estar distribuída de forma regular. A seguir (Figura 18) é possível visualizar o esquema para o arranjo experimental da técnica.

Figura 18- Representação do caminho óptico percorrido pelo feixe de raio X emitido.



Fonte: SANCHES, 2011.

Um feixe de raios X incide sobre um conjunto de planos cristalinos, cuja distância interplanar é d . O ângulo de incidência é que gerará os feixes refletidos por dois planos subsequentes, e apresentarão o fenômeno da difração. Isto é se a diferença entre seus caminhos óticos for um número inteiro de comprimentos de onda, haverá superposição construtiva (um feixe de raios X será observado); caso contrário, haverá superposição destrutiva. Temos:

Equação 6. Lei de Bragg aplicada à refração de Raios -X

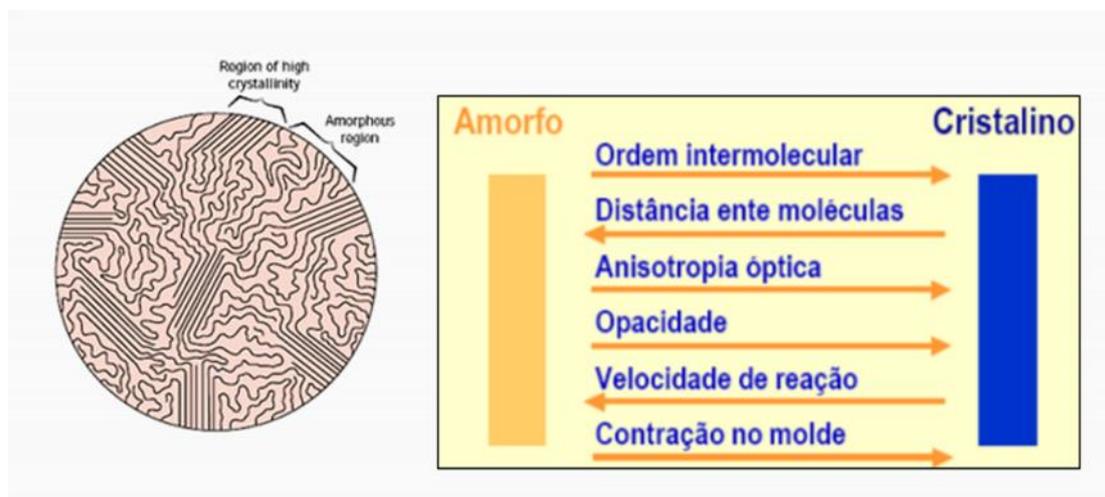
$$2d\text{sen}\Theta = n\lambda$$

Onde λ é o comprimento de onda da radiação utilizada, e n é um número inteiro.

A expressão (Equação 7) é conhecida como lei de Bragg e desempenha papel fundamental no uso da difração de raios X para estudos cristalográficos (SANCHES, 2011).

Para que um polímero cristalize, é necessário que este apresente algumas características moleculares, destacando-se o alto nível de organização e repetitividade das unidades chamadas de meros, assim materiais que apresentam grande nível de ramificação ou inúmeras irregularidades, terão dificuldade em cristalizar. Para a caracterização destes materiais, em 1930, foi proposto por Hermann modelos estruturais como o da “micela franjada” (Figura 19), onde segmentos de diferentes cadeias poliméricas cristalizavam, enquanto outros formavam fases amorfas entre as micelas, uma única cadeia poderia participar de diferentes micelas. Desta forma denominou-se o nome “cristalito” à agregação de cristais, que dependerão das condições de formação do polímero. Pode ocorrer também a formação de cristais poliméricos a partir de material fundido, neste caso dá-se o nome para os cristais formados de “esferulitos”, por terem dimensões mínimas equivalentes a esfera (CANEVAROLO, 2007).

Figura 19- Representação dos agregados e organização em cadeia poliméricas.



Fonte: CARNEVAROLO, 2007.

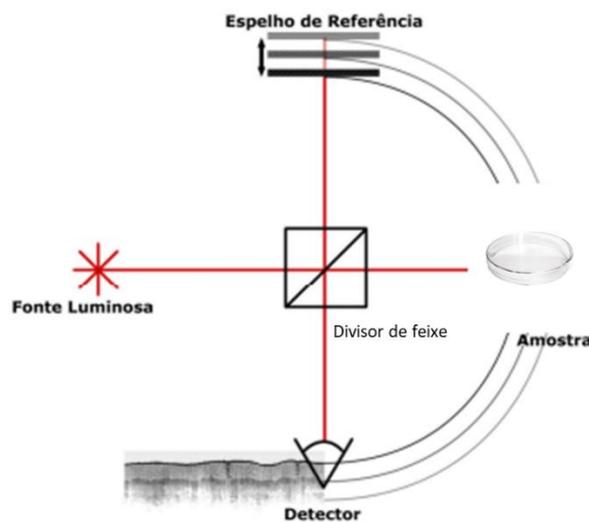
4.6.5 Tomografia por coerência óptica (OCT)

Tomografia de coerência óptica (OCT) é uma técnica interferométrica e não invasiva, a qual tem a capacidade de penetração tecidual em milímetros com resolução axial e lateral de escala micrométrica. Ela foi demonstrada pela primeira vez em 1991 com uma resolução axial de aproximadamente 30 μm , já em 2001, alcançou-se uma resolução submicrométrica. A partir daí, a OCT se tornou uma técnica de imagem muito

importante na área da oftalmologia e, também, foi introduzida em outras áreas médicas (FREITAS, 2007).

Resumidamente, podemos descrever o funcionamento do aparelho baseando-se nos princípios do interferômetro de Michelson, o qual se caracteriza pela presença de um diodo superluminescente que produz um feixe de luz de baixa coerência, cujo comprimento de onda situa-se próximo à faixa do infravermelho (820 nm). Este feixe de luz é dividido em dois segmentos, um que vai ao olho avaliando, posteriormente, as estruturas oculares, e outro que é enviado a um espelho de referência cuja distância da fonte luminosa é previamente conhecida. Ao se combinar a luz refletida das estruturas oculares com a luz refletida proveniente do espelho de referência (Figura 20), ocorre um processo físico denominado interferência, esta captada por um fotodetector que mede as distâncias entre as estruturas oculares.

Figura 20- Fluxo de análise por OCT.



Fonte: Adaptado de FREITAS, 2007.

A capacidade da técnica é de resolução de 10 μm ou menos, o que representa uma resolução cerca de dez vezes maior que o ultrassom convencional. Além disso não requer contato direto com a amostra, porém a capacidade de obtenção de profundidade da amostra é reduzido (FUJIMOTO et al., 1995)

A medição produz uma medida de variação da reflexão óptica ao longo do eixo do feixe. Uma imagem é obtida como resultado da secção transversal similar à de um

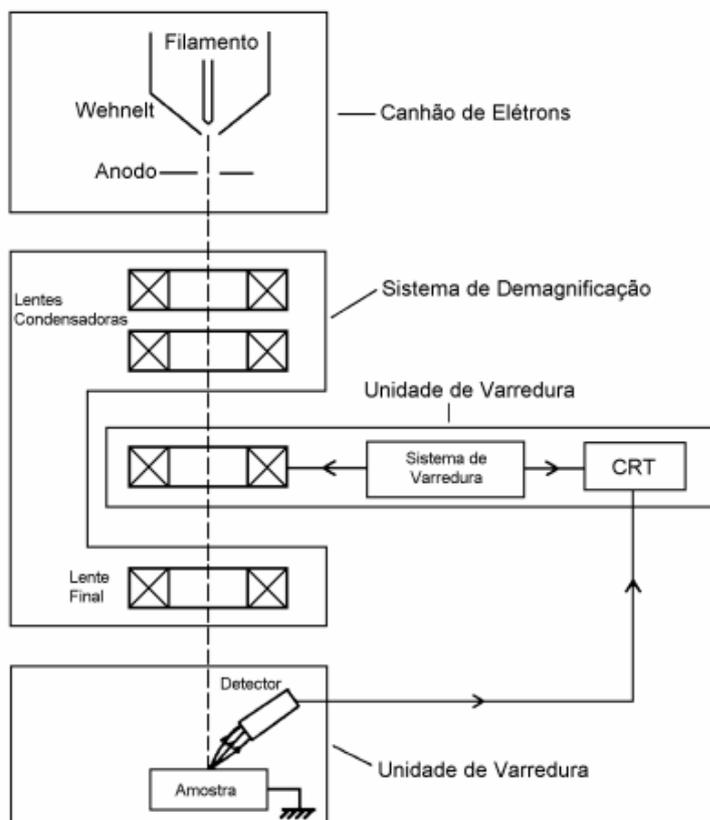
radar. Esta representação pode ser mostrada em uma escala de cor cinza ou por cores falsas (padrão RGB), cujas diferentes cores indicam os graus de espalhamento dos fótons (SOARES, 2013).

4.6.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) se tornou um instrumento imprescindível nas mais diversas áreas: eletrônica, geologia, engenharia dos materiais, ciências da vida, etc.. Em particular, o desenvolvimento de novos materiais têm exigido um número de informações bastante detalhado das características microestruturais, só possível de ser observado no MEV.

O MEV, conforme pode ser visto na Figura 21, consiste basicamente da coluna ótico-eletrônica (canhão de elétrons e sistema de desmagnificação), da unidade de varredura, da câmara de amostra, do sistema de detectores e do sistema de visualização da imagem.

Figura 21- Representação esquemática dos componentes de um microscópio eletrônico de varredura.



Fonte: MALISKA, 2013.

O canhão de elétrons é usado para a produção do feixe de elétrons com energia e quantidade suficiente para ser captado pelos detectores. Esse feixe eletrônico é então desmagnetizado por várias lentes eletromagnéticas, cuja finalidade é produzir um feixe de elétrons focado com um pequeno diâmetro numa determinada região da amostra.

O elétron do feixe eletrônico ao atingir a superfície da amostra irá interagir com os átomos desta. Como consequência da presença do potencial atômico e nuclear da amostra este elétron sofrerá modificação na sua velocidade inicial. Esta variação da velocidade pode ser somente na direção ou pode ocorrer tanto na direção quanto no módulo (magnitude). As interações nas quais ocorre a mudança na trajetória do elétron, sem que ocorra variação na sua energia cinética são ditas interações elásticas. Aquelas em que há transferência de energia do elétron primário (ep) para os átomos da amostra são chamadas de interações inelásticas. A energia entregue à amostra pelo feixe de elétrons também pode ser liberada da amostra na forma de luz (fótons). O fóton de luz é originado em transições eletrônicas de baixa energia, isto é, transições da banda de condução para a banda de valência ou pela desexcitação de átomos ou moléculas. Neste processo de emissão de luz, que é chamado de catodoluminescência, os elétrons da camada externa são envolvidos. A capacidade de um material emitir ou não luz como resultado de um bombardeamento eletrônico, irá depender da sua estrutura e da sua transparência em relação ao comprimento de onda envolvido. Minerais e materiais semicondutores são materiais que apresentam boa luminescência e neste caso a intensidade luminescente depende fortemente do tipo e da concentração dos dopantes (MALISKA, 2013).

4.6.6.1 Microscopia eletrônica de varredura de baixo vácuo (LVSEM)

Este tipo de microscopia funciona basicamente como um MEV convencional, mas possui um modo diferencial de baixo vácuo (LV), no qual a pressão pode ser ajustada na câmara da amostra até que o artefato do "carregamento de elétrons" seja removido a partir da imagens. Também pode ser utilizado para obter imagens da superfície de amostras não condutoras, já que as amostras não podem ser metalizadas. O artefato do carregamento de elétrons antes mencionado é o resultado do feixe de elétrons agindo na superfície da amostra, elétrons extras saltam a partir da amostra de forma imprevisível, fazendo com que surjam linhas e manchas na imagem. Além disso, a descarga desses elétrons imprevisíveis repele o feixe, causando saltos na imagem ou o aparecimento de manchas pretas. (BOGNER, 2007)

O uso de microscopia eletrônica de varredura de baixo vácuo é útil para a visualização de polímeros, amostras biológicas, e amostras que não podem sofrer alteração. Pode ser utilizado, também, para liofilizar a amostra, procedimento o qual funciona melhor em amostras hidratadas de integridade estrutural. Nessa configuração é possível evitar o carregamento da superfície da amostra e obter micrografias com contraste composicional e de topografia (GROSS, 2018).

4.6.7 Ensaio de tração

O ensaio consiste em aplicar uma força uniaxial no material, tendendo-o a alongá-lo até o momento de sua fratura. O corpo de prova (sempre padronizado por normas técnicas) é fixado pelas suas extremidades nas garras de fixação da máquina de tração. O corpo de prova é então submetido a um esforço, aplicando uma carga gradativa e registrando cada valor de força correspondente a um diferente tipo de alongamento do material (alongamento este medido por um extensômetro). O ensaio termina quando o material se rompe ou perde sua característica. (Callister, 2007)

Para efeitos de reduzir as diferenças entre as dimensões de diferentes corpos de prova, utiliza-se o conceito de tensão convencional ou tensão de engenharia definido por:

Equação 7. Calculo da tensão.

$$\sigma = F / A_0$$

Onde, temos que:

- F = Força aplicada
- A₀ = Área da seção transversal do corpo (antes da aplicação da carga)

O módulo de Young está diretamente relacionado com a rigidez do polímero, ou seja, quanto maior for o valor do módulo maior será a rigidez do polímero. Este é obtido pela inclinação da curva a baixas deformações, ou seja, E= s/e até 0,2% de deformação. Existem quatro tipos diferentes de módulos de elasticidade: (i) o módulo de Young; (ii) E, o módulo de cisalhamento; (iii) G; o módulo em compressão; (iv) K, e o módulo sob flexão. As deformações no escoamento e na ruptura definem o poder de escoamento das moléculas poliméricas durante o estiramento (CANERVAROLO, 2007). A deformação é calculada a partir da relação:

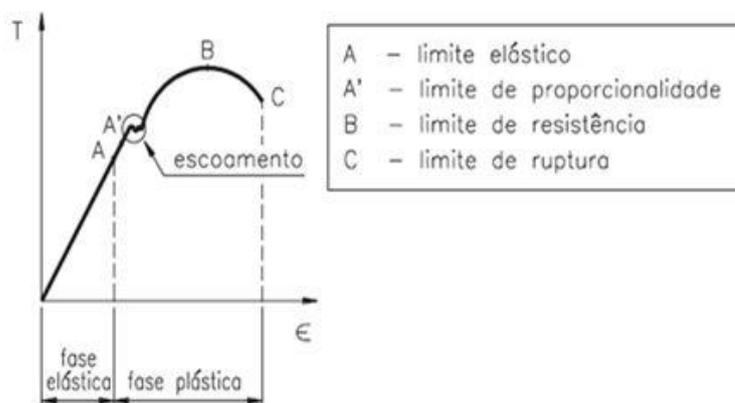
Equação 8. Calculo da deformação.

$$\varepsilon = (L_f - L_0) / L_0$$

- L_f = Comprimento final
- L_0 = Comprimento inicial
- ε = Deformação

Os resultados obtidos através do ensaio de tração são “plotados” (fornecidos pela própria máquina de ensaio) em um gráfico chamado de tensão versus deformação ($\sigma \times \varepsilon$).

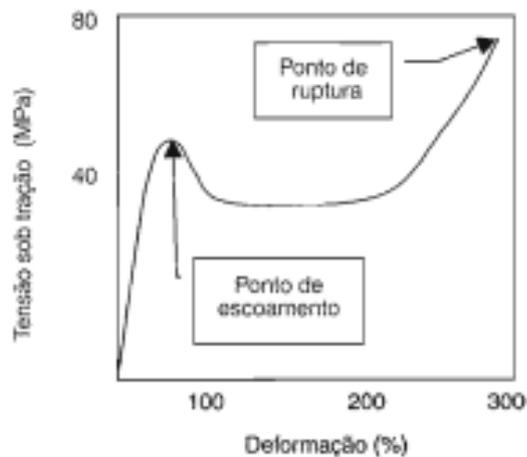
Figura 22- Curva representativa de tensão versus deformação.



Fonte: CANERVAROLO, 2007.

Os principais parâmetros que quantificam a resistência mecânica dos polímeros em ensaios tensão-deformação são: módulo de Young ou de elasticidade; tensão e deformação no escoamento; tensão máxima; tensão e deformação na ruptura, e tenacidade. A Figura 23 ilustra alguns destes parâmetros

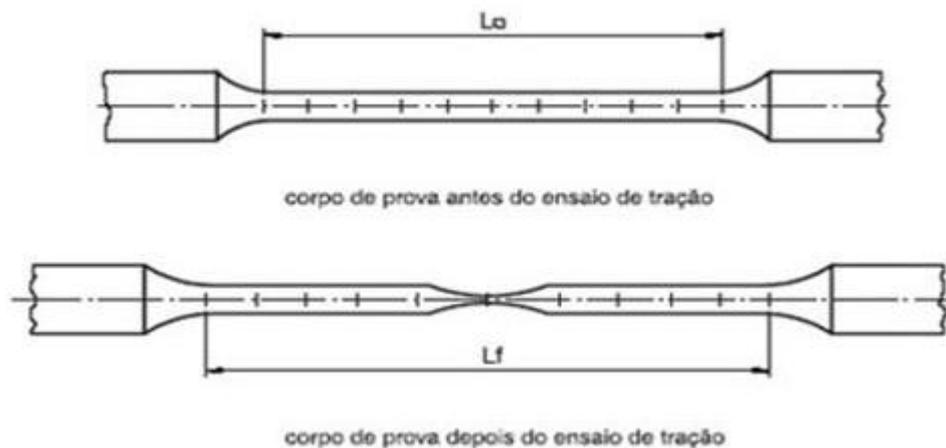
Figura 23- Curva de tensão- deformação sob tração de Nylon 6,6 ®.



Fonte: CANERVAROLO, 2007.

As propriedades mecânicas dos polímeros são determinadas conforme o material responde as metodologias mecânicas aplicadas. A natureza irá depender da estrutura química, temperatura, tempo e das condições do processamento deste. A estrutura molecular dos polímeros proporciona um comportamento viscoso, como em líquidos, sobreposto com um comportamento elástico, como em sólidos Hookeanos (CANEVAROLLO, 2007). Este fenômeno é denominado viscoelasticidade, e ocorre para materiais considerados plásticos, envolvendo grandes deformações. A caracterização do comportamento mecânico pode ser feita atingindo-se ou não a ruptura do material. Por exemplo: módulos elásticos, tensão e deformação no escoamento, tensão máxima, etc., são parâmetros caracterizados sem atingir a ruptura do polímero (Figura 24). Por outro lado, tensão e deformação a ruptura, resistência ao impacto, número de ciclos de vida sob fadiga, etc., são propriedades mecânicas determinadas no limite da resistência destrutiva do polímero (ORÉFICE, 2012).

Figura 24- Corpos de prova antes e após ensaio de tração.



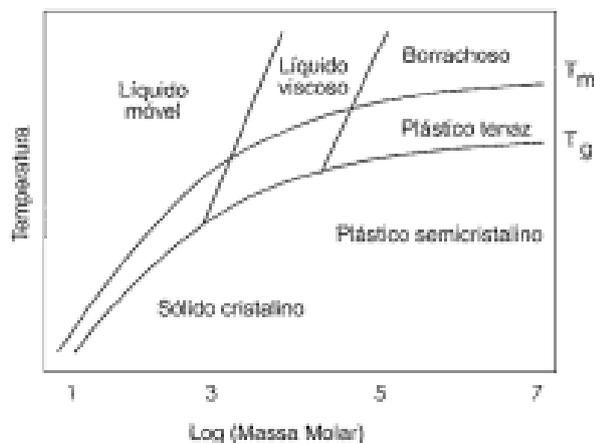
Fonte: site: <https://www.infoescola.com/fisica/ensaio-de-tracao>.

4.6.7.1 Viscoelasticidade

A viscoelasticidade é definida como o fenômeno pelo qual o material apresenta características de fluido e sólido elástico ao mesmo tempo. A fração elástica de deformação decorre da variação de ângulo e distância das ligações entre os átomos, já a fração plástica ocorre por conta do atrito entre as cadeias poliméricas, isso faz com que o material demore um certo tempo para responder.

Quando o comportamento mecânico de um material é analisado, alguns fatores devem ser levados em conta, como a massa molar, as temperaturas de transição vítrea (T_g), transição cristalina, seguido da fusão (T_m) e a temperatura na qual a medida está sendo feita. Com este conjunto de dados, é possível construir-se um gráfico como o apresentado na Figura25.

Figura 25- Comportamento físico- mecânico de um polímero em função da massa molar.



Fonte: CANEVAROLO, 2007.

De uma maneira simplificada, classificamos os materiais em três estados com relação à temperatura: Vítreo, Borrachoso e Viscoso. O vítreo acontece em temperaturas abaixo de T_g , pois as cadeias poliméricas não têm energia suficiente para apresentar mobilidade, respondendo de forma elástica às solicitações, sendo o polímero rígido e frágil. O borrachoso, acontece em temperaturas entre T_g e T_m . Nesta faixa de temperatura, o nível energético é suficiente para dar mobilidade somente à fase amorfa, mantendo a fase cristalina rígida, este tipo de polímero apresenta um comportamento semelhante ao da borracha vulcanizada. O viscoso, acontece em temperaturas acima de T_m , onde o termo "fundido" é restrito apenas aos polímeros semicristalinos e, portanto, não é usado por não ser geral. Este alto nível energético é caracterizado por apresentar todas as cadeias altamente móveis (CANEVAROLO, 2007).

4.6.8 Avaliação da biocompatibilidade

Segundo a avaliação da normativa 10993 seguida pelos órgãos regulatórios todos os materiais devem passar pelo processo de enquadramento, seguindo assim, as caracterizações correspondentes para uso adequado e seguro nos organismos (Figura 26).

A ISO (Organização Internacional de Padronização) é uma federação mundial de organismos de normalização nacionais. O trabalho de preparação de normas internacionais é normalmente realizado por meio destes comitês técnicos pertencentes a ISO. Cada órgão membro interessado em um assunto para o qual um comitê técnico foi estabelecido, tem o direito de ser representado nessa comissão. Organizações

internacionais, governamentais e não governamentais, em articulação com a ISO, também participam do trabalho.

Figura 26- Critério de seleção de testes para avaliação da biocompatibilidade



ISO 10993-1:2018 Biological Risk Assessment
Partner Research Organization

ISO 10993-1:2018 Biological Risk Assessment

In the table below, X means prerequisite information needed for a risk assessment; E means endpoints to be evaluated in the risk assessment (either through the use of existing data, additional endpoint-specific testing, or a rationale for why assessment of the endpoint does not require an additional data set assessment).^[A]

Medical Device Categorization			Endpoints of Biological Evaluation													
Category	Contact	Contact Duration A—Limited (≤ 24 hrs) B—Prolonged (> 24 hrs to 30 days) C—Long Term (> 30 days)	Physical and/or Chemical Information	Cytotoxicity	Sensitization	Irritation / Intracutaneous Reactivity	Material Mediated Pyrogenicity ^[B]	Acute Systemic Toxicity ^[C]	Subacute Toxicity ^[C]	Subchronic Toxicity ^[C]	Chronic Toxicity ^[C]	Implantation ^[C,D]	Hemocompatibility	Genotoxicity ^[E]	Carcinogenicity ^[E]	
Surface Medical Device	Intact Skin	A, B or C	X	E	E	E										
		A	X	E	E	E										
		B	X	E	E	E		E	E				E			
	Breached or Compromised Surface	A	X	E	E	E	E	E								
		B	X	E	E	E	E	E	E				E			
		C	X	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
Externally Communicating Device	Blood Path, Indirect	A	X	E	E	E	E	E						E		
		B	X	E	E	E	E	E	E					E		
		C	X	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
	Tissue / Bone / Dentin ^[F]	A	X	E	E	E	E	E								
		B	X	E	E	E	E	E	E				E		E	
		C	X	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
	Circulating Blood	A	X	E	E	E	E	E						E	E ^G	
		B	X	E	E	E	E	E	E				E	E	E	
		C	X	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
Implant Medical Device	Tissue / Bone	A	X	E	E	E	E									
		B	X	E	E	E	E	E				E		E		
		C	X	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
	Blood	A	X	E	E	E	E	E					E	E	E	
		B	X	E	E	E	E	E	E				E	E	E	
		C	X	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E

[A] If a medical device is manufactured from novel materials, not previously used in medical device applications, and no toxicology data exists in the literature, additional endpoints beyond those marked "E" in this table should be considered. For particular medical devices, there is a possibility that it will be appropriate to include additional or fewer endpoints than indicated.

[B] Refer to ISO 10993-11:2017, Annex F.

[C] Information obtained from comprehensive implantation assessments that include acute systemic toxicity, subacute toxicity, subchronic toxicity and/or chronic toxicity may be appropriate if sufficient animals and timepoints are included and assessed. It is not always necessary to perform separate studies for acute, subacute, subchronic, and chronic toxicity.

[D] Relevant implantation sites should be considered. For instance medical devices in contact with intact mucosal membranes should ideally be studied/ considered in contact with intact mucosal membranes.

[E] If the medical device can contain substances known to be carcinogenic, mutagenic and/or toxic to reproduction, this should be considered in the risk assessment.

[F] Tissue includes tissue fluids and subcutaneous spaces. For gas pathway devices or components with only indirect tissue contact, see device specific standards for biocompatibility information relevant to these medical devices.

[G] For all medical devices used in extracorporeal circuits.

NB: Reproductive and developmental toxicity should be addressed for novel materials, materials with a known reproductive or developmental toxicity, medical devices with relevant target populations (e.g. pregnant women), and/or medical devices where there is the potential for local presence of device materials in the reproductive organs.

NB: Degradation information should be provided for any medical devices, medical device components or materials remaining within the patient, that have the potential for degradation.

www.iuvoBioScience.com

Fonte: ISO 10993-1, 2018.

Neste trabalho realizamos os testes iniciais de biocompatibilidade: Citotoxicidade *in vitro*, Adesão e Proliferação Celular.

4.6.8.1 Citotoxicidade

A toxicidade de um material é definida pela sua capacidade de liberar substâncias que possam causar danos ou morte celular, direta ou indiretamente, pela inibição de vias metabólicas (ORÉFICE, PEREIRA, & MANSUR, 2013). Assim, as substâncias citotóxicas podem diminuir a capacidade de autorrenovação de um tecido, ou causar a sua degeneração por morte das células. Por sua vez, essa morte pode ocorrer por diversas vias, que são agrupados em classes morfológicas: (i) Necrose e (ii) Apoptose. As substâncias que causam toxicidade às células podem ser de origem endógena, por exemplo, aquelas liberadas pelo sistema imunológico, ou de origem exógena, como toxinas, venenos, poluentes, etc..

Citotoxicidade endógena é a principal forma encontrada, e é promovida pelo sistema imunológico, por meio dos linfócitos. Os linfócitos citotóxicos compreendem as células T citotóxicas, as natural *killers* (NK) e as células T assassinas naturais. Elas são capazes de reconhecer e matar células infectadas por vírus, bactérias dentre outros microrganismos e células cancerígenas. Esses linfócitos liberam citotoxinas, como o interferon- γ (IFN- γ), que vão produzir a morte celular dos componentes identificados, estimulando o funcionamento de outros mecanismos imunológicos (CRUZ, 2015).

Citotoxicidade exógena ocorre onde diversas substâncias podem levar a morte celular ou reduzir a proliferação em tecidos. Por isso, medicamentos, cosméticos e materiais utilizados em enxertos, implantes e exames, devem ser testados previamente ao consumo humano e animal (CRUZ, 2015).

Esses testes devem ser realizados primeiramente *in vitro*, pois eles mostram, de uma forma segura, os mecanismos e os efeitos tóxicos que as substâncias podem produzir. A forma eleita para se testar, é o cultivo de células e a subsequente análise dos efeitos intracelulares dos compostos. Existem muitos testes para verificar os efeitos citotóxicos em células cultivadas, alguns deles são amplamente utilizados, como o de viabilidade celular, que quanto mais células se mantiverem viáveis metabolicamente, menor é a citotoxicidade ao metabolismo promovida pela substância testada (ORÉFICE, PEREIRA, & MANSUR, 2013).

O ensaio clonogênico baseia-se em expor as células a uma substância e verificar o tempo e a quantidade de sobrevivência celular posterior a esse tratamento. Se as células sobrevivem após a exposição, mas morrem depois de um tempo, a substância é potencialmente citotóxica, mas exerce esse efeito em um período maior (HORTON & MATHEW, 2015).

Já no ensaio de dupla marcação são utilizados dois corantes, a Anexina V e o Iodeto de Propídio, os quais marcam os eventos de morte por apoptose e necrose, respectivamente. Assim, após a exposição à substância, realiza-se esse ensaio e verifica-se se foi promovida a morte celular e qual tipo ocorreu, em quantificação desses eventos por citometria de fluxo (HORTON & MATHEW, 2015).

Desta maneira o ensaio é baseado na capacidade das células viáveis em absorver e reter um corante, exemplos destes são o vermelho neutro e sais de Tetrazólio. Os sais de Tetrazólio são convertidos pela Succinato Desidrogenase mitocondrial a Formazan blue. Este produto é quantificado usando um espectrofotômetro e tem sido modificado para ser tão sensível quanto à incorporação dos nucleotídeos radioativos para avaliar a proliferação celular. Os parâmetros de avaliação observados são a porcentagem de morte celular e a IC50 (concentração do produto que inibe 50% do crescimento celular) (ORÉFICE, PEREIRA, & MANSUR, 2013).

4.6.8.2 Adesão e proliferação

As células em cultura possuem, inicialmente, características semelhantes aos seus tecidos de origem. Assim, células provenientes de tecidos epiteliais terão uma maior dependência de interação entre elas. As células cultivadas podem apresentar dois aspectos distintos, podendo ser aderentes ou não aderentes. Células aderentes são dependentes de ancoragem, necessitando da adesão a uma superfície de contato para que possam iniciar a proliferação. O meio apresentando-se propício, as células iniciam a produção das proteínas de adesão (ALVES 2005).

Para que as células aderentes possam se ligar ao material, é necessário que este tenha uma carga negativa. Superfícies como vidro e metal possuem uma carga líquida negativa e são excelentes superfícies para a adesão celular. Plásticos são muito utilizados em cultivo celular, mas para que estes desenvolvam carga negativa, é necessário um

tratamento prévio com agentes químicos como os oxidantes, ou físicos, como a luz ultravioleta e a radiação. A carga negativa é necessária pois a adesão celular ocorre por meio de forças eletrostáticas e da interação dessas cargas com glicoproteínas de adesão e com cátions como Ca^{+2} e Mg^{+2} . Esta interação, desencadeia uma sinalização intracitoplasmática que acarreta na produção e liberação de proteínas da matriz extracelular pela própria célula, onde está irá aderir e “espraiar” iniciando sua proliferação.

As proteínas da matriz, como o colágeno, a laminina e a fibronectina são reunidas em fibrilas na superfície das células que as produzem, por mecanismo dependente da actina da célula adjacente. A matriz, também pode influenciar no citoesqueleto, no espalhamento celular, assim como atuam nos receptores da superfície celular que ativam as vias intracelulares sinalizadoras (MORAES, 2007).

A ligação da célula à matriz extracelular necessita de proteínas de adesão celular transmembrana, que atuam como receptores da matriz e conectam-na com o citoesqueleto celular. As integrinas são os principais receptores usados pelas células animais para ligarem-se à matriz extracelular que, quando ativadas pela matriz, também atuam como transdutores de sinais ativando várias vias de sinalização intracelular. Essa combinação de integrinas e receptores podem promover o crescimento, sobrevivência e a proliferação celular (SPANGBERG, 1978).

Podem-se definir as quatro fases do crescimento celular em cultura em:

- (i) primeira fase, chamada de Lag, onde o número de células varia pouco, pois não há proliferação imediata após a adição de células ao meio de cultura. Há pouca ou ausência de divisão celular estendendo-se de horas a dias. Células provenientes de uma fase Lag, demoram a se adaptar e iniciar seu crescimento. Ocorre a produção de proteínas estruturais e de enzimas, como a DNA polimerase e um aumento na síntese de DNA;
- (ii) a segunda fase Log, é a fase de crescimento logarítmico com máximo crescimento. Há maior viabilidade e atividade metabólica, sendo o período ideal para experimentação e estudo. A duração dessa fase depende da densidade inicial das células, da taxa de crescimento celular e da densidade de saturação da linhagem;
- (iii) a terceira fase é chamada de *Plateau*, caracterizada por grande formação de células acompanhadas pela redução da velocidade de crescimento. O número de células mortas tende a ser equivalente ao número de células novas. Pode-se atribuir ao contato célula-célula, diminuição da capacidade de dispersão, nutrientes e de fatores de crescimento;
- (iv) quarta

fase é de morte celular, onde há grande redução do número de células que suplantam a quantidade de células vivas (JAYABALAN, 1993).

5 MATERIAIS

O material polimérico têm numeração: *Carbothane* PC-85A (Lubrizol®), com características na Tabela 2.

Tabela 2. Propriedades do polímero Carbothane.

Propriedade	Valor
Dureza	80 A
Densidade Relativa	1,35
Módulo de Flexão	2200
Módulo de Contração	0,010

Fonte: Autor, 2021.

O solvente orgânico utilizado é o Clorofórmio (CHCl_3) da marca Synth®, este apresenta massa molecular de 119,38 g/mol, permitido pela Farmacopéia com limite de concentração de 60 ppm, sendo este classificado com solvente de classe 2. O molde utilizado para o *deeping* consiste em um cilindro de aço INOX. Para a técnica de *casting*, foram utilizadas placas de Pétri com 10 cm de diâmetro.

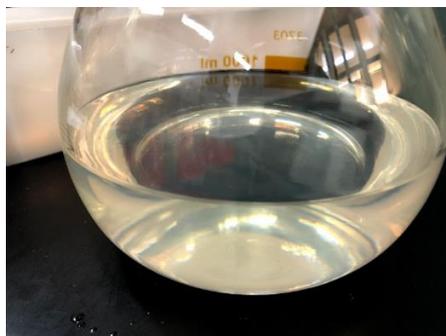
6 MÉTODOS

6.1 Manufatura do filme

Os filmes foram produzidos por meio da solubilização dos *pellets* comercializados pela empresa Lubrizol® com numeração de produto *Carbothane Aliphatic TPU PC-85A*, em solvente orgânico Clorofórmio P.A da marca Synth® e armazenados por 48 horas em frasco fechado e vedado (Figura 27), em ambiente com umidade controlada por volta de 50% e temperatura constante de 20 °C. Para a preparação dos filmes a espessura deve ser controlada, onde será utilizada a técnica de *deeping* (Figura 28), que consiste em submergir o molde no gel polimérico produzido e *casting* (Figura 29), que consiste na evaporação do solvente após inclusão do gel em placas de Pétri. Em ambas as técnicas o filme é formado e devem ter a mesma espessura. A espessura final deve ser de 220 μm com variação de 10 μm . A evaporação do solvente é realizada em temperatura controlada por 4 horas. O desmolde é realizado após banho em água.

A metodologia detalhada é descrita na patente de processo com numeração BR 10 2018 0039490.

Figura 27- Frasco para solubilização com pellet em contato com solvente



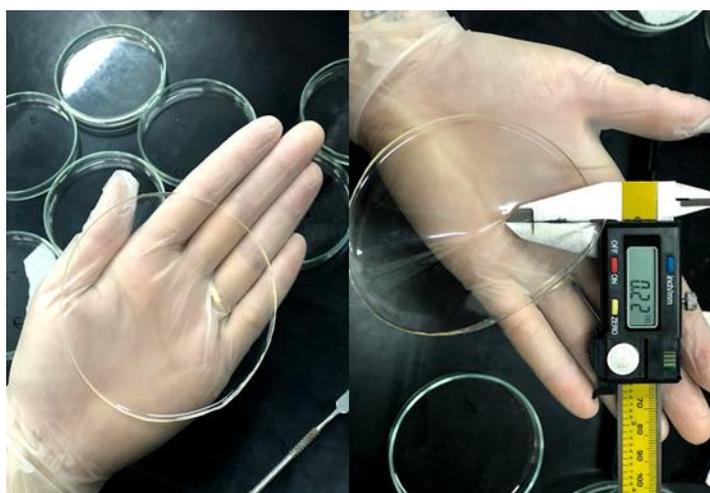
Fonte: Autor, 2021.

Figura 28- Técnica *deeping* sendo aplicada com molde e gel formado pelo poliuretano termoplástico.



Fonte: Autor, 2019.

Figura 29- Filme formado pela técnica *casting* com controle de espessura.



Fonte: Autor, 2019.

6.2 Esterilização

6.2.1 Irradiação das amostras em fonte de Cobalto-60

As amostras foram submetidas à irradiação no irradiador de Cobalto-60 tipo Multipropósito (Figura 30). Como controle de dose foram utilizados dosímetros poliméricos Red Perspex[®] (5-50 kGy).

As doses foram de 15; 25; e 50 kGy. A dose de 25 kGy já é comumente utilizada para produtos hospitalares nas indústrias, o intuito de utilizar a dose de 15 kGy e 50 kGy é avaliar se em doses menores ou maiores o material varia suas características, permitindo sua esterilização.

Figura 30- Irradiador multipropósito localizado no Centro de Tecnologia das Radiações, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.



Fonte: site: www.ipen.br

6.2.2 Óxido de Etileno

As amostras foram condicionadas em embalagens apropriadas e submetidas a esterilização em câmara de Óxido de Etileno, com umidade relativa na faixa de 60 a 70%, à temperatura entre 45 a 50 °C, variando a concentração de gás, isto é, 450 - 470 mg/L durante 5 horas.

6.2.3 Plasma

As amostras foram condicionadas em embalagens apropriadas e submetidas ao plasma de Peróxido de Hidrogênio realizado em Sterrad[®], com pressão de 330 mTorr, potência de 400W, e tempo de exposição entre 20 e 40 minutos, totalizando 189 ciclos.

6.3 Caracterização

6.3.1 Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros foram obtidos por um espectrometro de absorção da marca BOMEM[®], modelo MB102, na faixa de comprimento de onda entre 4000 e 400 cm⁻¹, e

registrados tendo como abcissa representada por número de onda (cm^{-1}) e ordenada em transmitância (%) pertencente a Biolab-CIETEC. A refletância total atenuada (ATR) utiliza um cristal (ZnSe). Com este aparato não se faz necessária a preparação prévia da amostra, estas foram separadas em corpos de prova de 1,0 x 1,0 cm com espessura de 220 μm e acondicionadas sobre o cristal para obtenção do espectro.

6.3.2 Termogravimetria/Termogravimetria derivada (TG/DTG)

Para o estudo dos filmes foi utilizada uma termobalança, modelo TGA-51, da marca SHIMADZU[®], permitindo uma detecção de variação na massa de +/- 1 μg . A termobalança pode operar com uma capacidade máxima de 200 mg, com uma variação de temperatura da ambiente até 1500 °C. Este equipamento pertence ao Laboratório de Análise Térmica Ivo Giolito, localizado no Instituto de química na Universidade de São Paulo. As condições experimentais foram: cadinho de Platina, massa da amostra de 15 mg, sob atmosfera dinâmica (constante) de ar (50 mL min^{-1}), razão de aquecimento (β) = 20 °C min^{-1} e faixa de temperatura entre 25 a 700°C.

Foram realizadas calibrações diárias e verificações das termobalanças antes dos ensaios termogravimétricos, empregando-se uma amostra de Oxalato de Cálcio monohidratado, conforme a Norma ASTM E1582-04. Para uma melhor determinação da variação de massa foi realizado um branco com cadinho vazio nas mesmas condições experimentais.

6.3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas utilizando uma célula calorimétrica, modelo DSC6000 da marca TA *Instruments*[®], pertencente ao laboratório multiusuário do Centro de Tecnologia das Radiações-IPEN, sob atmosfera dinâmica de Nitrogênio, com vazão de 100 mL. min^{-1} e uma razão de aquecimento (β) de 10 °C. min^{-1} . Com primeiro aquecimento a 100 °C, seguido de resfriamento a -30 °C, e um segundo aquecimento a 250 °C, em cápsulas de alumínio, parcialmente fechadas e a massa da amostra de 5 mg. Antes dos ensaios foram obtidas as curvas em branco, nas mesmas condições experimentais que as amostras, para a avaliação da sua linha de base. A célula foi calibrada utilizando o padrão de Índio metálico ($T_{\text{fusão}} = 156,6$ °C, e o $\Delta H = 28,7$ Jg⁻¹) com pureza de 99,9%. com cadinho de Platina (Pt).

Todos os resultados obtidos para TG/DTG e DSC foram tratados utilizando o *software* TA-60 que faz parte da instrumentação.

6.3.4 DRX (Difratometria por Raio X)

Os difratogramas foram obtidos com um difratômetro da marca Bruker[®], modelo D8 Advance, no Centro de Combustíveis Nucleares (CECON)-IPEN, equipado com tubo de radiação de Cobre, goniômetro de 250 mm, monocromador de grafite e detector de cintilação. A potência utilizada no tubo é de 25 kV e 35 mA. As amostras foram cortadas em corpos de prova de 1 x 1cm e posicionadas sobre placa inerte para leitura.

6.3.5 Tomografia por coerência óptica (OCT)

As imagens foram obtidas no equipamento da marca Thorlabs[®], modelo Spectral Radar 930 nm pertencente ao Centro de Lasers e Aplicações - IPEN. As amostras dos filmes foram cortadas na proporção 1 x 1 cm para a leitura. O filme foi estendido sobre uma lâmina de vidro com suporte vazado de aço inox possibilitando uma interface ar/ar para que o filme ficasse aderido a lâmina de vidro. Foi realizada a imagem com escala de tons de cinza. O cálculo do coeficiente de atenuação óptica foi realizado por meio de software Image J[®].

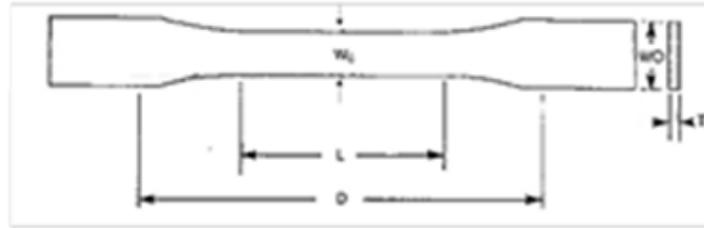
6.3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens foram obtidas em um microscópio da marca HITACHI[®], modelo TM3000 MEV no Centro de Lasers e Aplicações-IPEN, tensão de aceleração: 5 ou 15 kV, fonte de tungstênio, ampliação de 3000x com resolução de 30 nm, com EDS (espectroscopia de energia dispersiva) integrado. Modo de redução de carga sob vácuo, sem necessidade de impregnação por ouro.

6.3.7 Ensaio de tração

O equipamento de ensaio universal (INSTRON) utilizado pertence ao Centro de Tecnologia das Radiações (CETER-IPEN). O ensaio tração dos filmes foi realizado de acordo com a norma ASTM D 882-18 (Propriedades de tração de plásticos finos). O molde para o preparo dos corpos de prova (Figura 31) contém dimensões com espessura do filme (T) = 0,20 mm; comprimento (L) = 20,00 mm; comprimento (D) = 30,00 mm e largura (W₀) = 5,00 mm, desta maneira as amostras foram cortadas em formato de halteres (figura 32). O filme foi colocado no suporte para corpos de prova em formato de garra com prensa para materiais flexíveis (Figura 33), o ensaio ocorreu até deformação do material.

Figura 31- Molde utilizado para corpos de prova dos filmes para ensaio de tração.



Fonte: Adaptado da norma ASTM D 882-18.

Figura 32- Corpos de prova do filme termoplástico.



Fonte: Autor, 2019.

Figura 33- Ensaio de tração em andamento realizado no equipamento de ensaio universal Instron.



Fonte: Autor, 2019.

6.3.8 Citotoxicidade – ISO 10993-5

Nesse ensaio utilizamos as normas da ISO 10993-12:2012 para preparação do extrato, onde, dependendo do tipo de amostra, calcula-se o peso da massa ou a área, para chegarmos a quantidade de meio de cultura necessária para a produzir o extrato. Em todos os ensaios de citotoxicidade são utilizados os respectivos controles: positivo (Látex) e negativo (papel filtro), e o controle de células. Para iniciar este ensaio, utilizamos para o cálculo de meio de cultura a especificação da norma 10993-5:2012 (Tabela 1, p.13), para amostras menores que 0,5 mm com raio de extração de $6 \text{ cm}^2 \cdot \text{ml}^{-1}$, por 72 horas à 37°C . Em nossos ensaios, foi utilizada a linhagem celular NIH 3T3 (fibroblastos murinos), a qual foi semeada nos poços das placas de 96. Em cada poço foram semeadas 5×10^3 células (em torno de $1,67 \times 10^3$ células/ cm^2 , cada poço possui $0,335 \text{ cm}^2$ de área) com o meio de cultura original para esse tipo celular, a saber: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino, 1% de penicilina/streptomicina/amphotericina B e 1% de L-glutamina.

No primeiro dia as células foram semeadas nos poços para aderirem, para então, no próximo dia darmos início ao teste. Assim, todo o meio contido nos poços foi aspirado e o extrato gerado pelas amostras foi adicionado, as células incubadas em incubadora úmida à 37°C com 5% de CO_2 . Após 24 horas foi realizado o teste de viabilidade celular utilizando o reagente MTS Kit Cell Titer96 (Promega[®], Madison, Wisconsin, USA). Então, aspiramos o meio de cultivo (extratos), lavamos os poços com solução fisiológica ou solução tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e em seguida adicionamos 100 μL de novo meio de cultura acrescido de 20 μL de solução de MTS/PMS, tomando o devido cuidado de proteger o máximo possível da luz durante todo o procedimento. O método é baseado na avaliação quantitativa de células vivas, após a exposição ao agente tóxico, pela incubação com o corante supravital do composto Tetrazólio (MTS). As células com a solução foram incubadas por no mínimo 3 horas, a 37°C . Ao término da reação procedeu-se a leitura num leitor de placas (EXL 800BIO-Tek Instruments Inc.) com um filtro de comprimento de onda de 490 nm, para a detecção do grau de absorbância.

Figura 34- Inserção do meio de cultura as amostras adicionadas a placa.



Fonte: Autor, 2020.

6.3.9 Adesão e proliferação

Para os testes de adesão e proliferação, procedemos com poços de placas de 96, cada poço com $0,335 \text{ cm}^2$ de área. Primeiramente as amostras a serem testadas foram recortadas do tamanho da área do poço e as que não foram esterilizadas anteriormente, ficaram expostas à luz UV durante no mínimo 15 minutos de cada lado para promover a esterilização. Algumas amostras necessitam ser previamente intumescidas, enquanto outras não. Após o intumescimento procedemos a semeadura das células sobre as membranas. Como no experimento anterior, utilizamos a mesma linhagem celular NIH 3T3, e o mesmo meio de cultivo citado anteriormente: DMEM, acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino, 1% de penicilina/estreptomicina/anfotericina B e 1% de L-glutamina. Neste experimento os controles negativos utilizados são as amostras sem células e o controle positivo são os poços com as células diretamente semeadas sobre estes.

No primeiro dia as células foram semeadas sobre as membranas: candidatos à *scaffolds* (arcabouços), nos poços das placas de 96. Em cada poço foram semeadas 5×10^3 células. Após 24 horas fizemos a primeira leitura. Esses resultados nos fornecem a porcentagem de adesão celular sobre as amostras. Para isso utilizamos o corante vital Alamar Blue™ Cell Viability Reagent (Invitrogen®). O mesmo fica em contato com as amostras “*over night*”, em torno de 18 horas. Isso permite que esse reagente se adentre à amostra, pois muitas vezes as células não estão somente na superfície, mas internamente nas membranas. Todo o procedimento deve ser protegido da luz, pois este é fotossensível. O conjunto: amostras e corante, foram incubados em incubadora úmida à 37°C e 5% de CO_2 . Este corante é diluído em meio de cultura, numa proporção de 1:10. No momento de procedermos a leitura, o sobrenadante com o corante (100 μL) foi transferido para uma

micro placa de 96 poços preta de fundo claro, e a leitura foi feita por fluorescência entre 560 nm de excitação e 590 nm de emissão mensurada em leitor SpectraMax i3 (Molecular Devices®). A presença de células viáveis foi demonstrada por meio da comparação direta com a fluorescência observada nas amostras controle, ou seja, células totais. Os experimentos foram repetidos em torno de 3 vezes e o número de amostras variou de 3 a 10, dependendo do experimento.

Para os ensaios de proliferação, as leituras se repetiram a cada 24 horas (48, 72, 96 e 120 horas), sendo o reagente incubado *over night*, como no experimento de adesão. Esse protocolo foi seguido, respeitando os horários criteriosamente. Em experimentos de longa duração como este, após 96 horas de incubação, necessitamos acrescentar meio de cultura aos poços contendo as amostras (em torno de 50 µL).

7 RESULTADOS

7.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

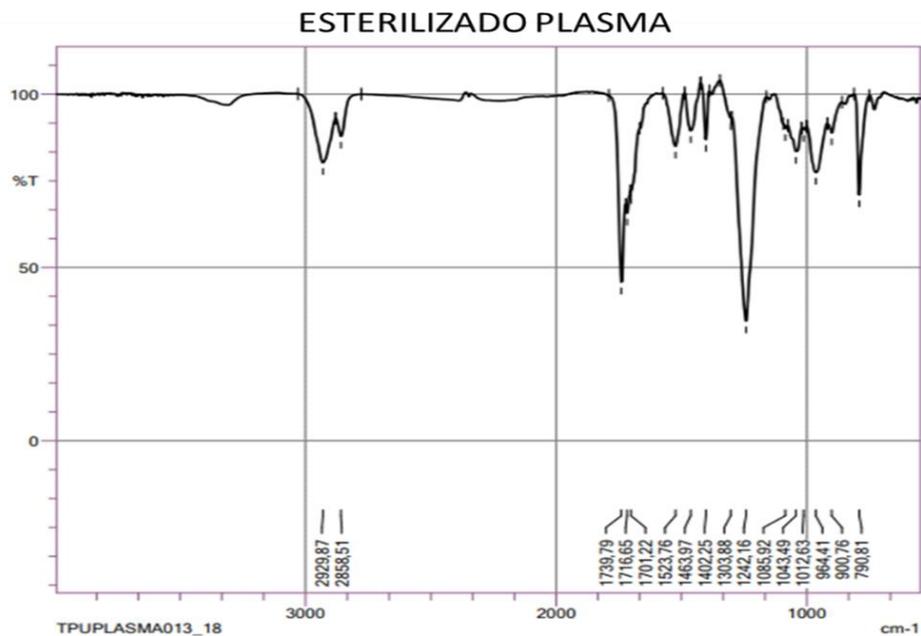
Visando determinar o comportamento das ligações químicas nos filmes termoplásticos, a técnica de espectroscopia vibracional na região do infravermelho forneceu perfis similares nos espectros observados (Figura. 35 à 40), sugerindo que o material não sofreu modificações químicas com a esterilização, isto é, surgimento ou quebra de ligações. A disposição espacial da cadeia polimérica pode interferir na interação com o feixe de infravermelho de uma forma mais intensa, gerando bandas mais expressivas.

Figura 35- Espectro de absorção na região do infravermelho para a amostra não esterilizada.



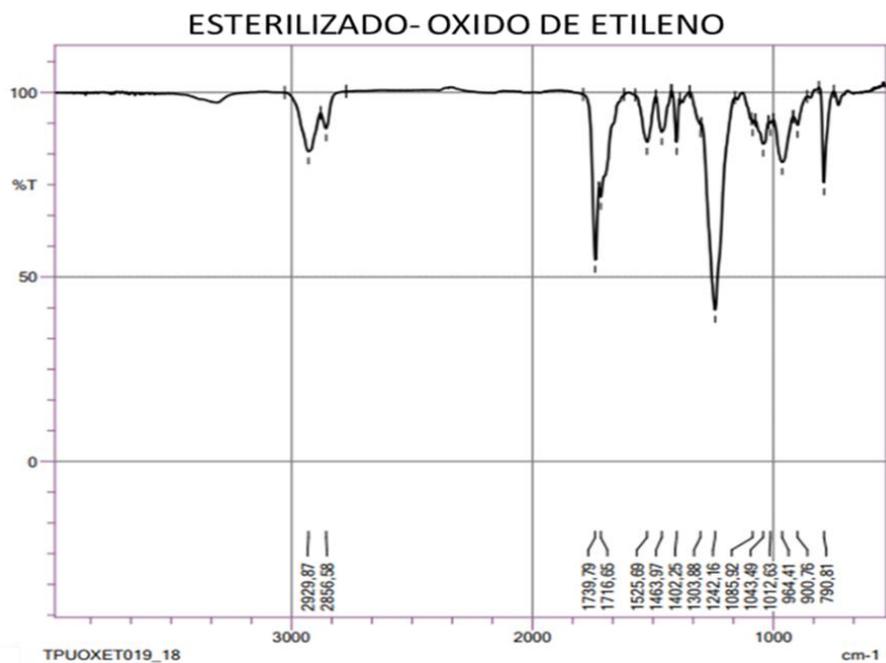
Fonte:Autor, 2021.

Figura 36- Espectro de absorção na região do infravermelho para a amostra esterilizada por plasma.



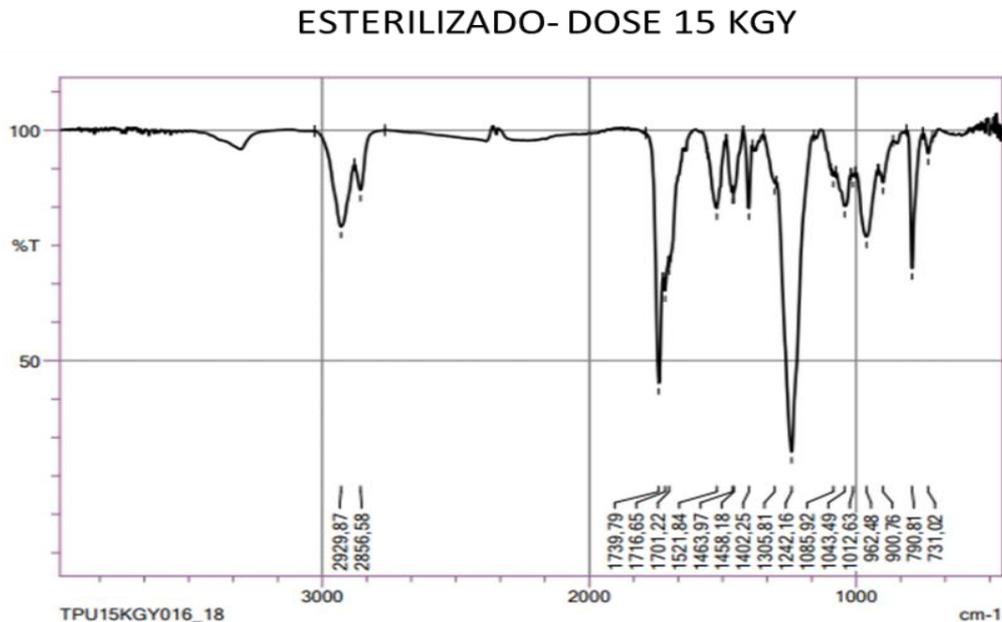
Fonte:Autor, 2021.

Figura 37- Espectro de absorção na região do infravermelho para a amostra esterilizada por Óxido de etileno



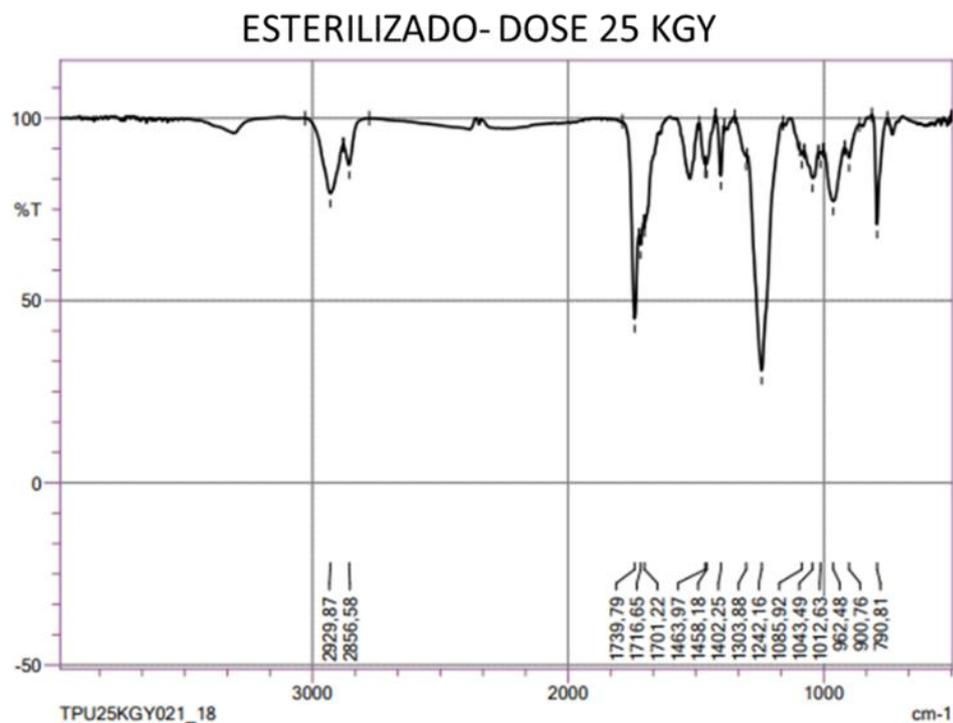
Fonte:Autor, 2021.

Figura 38- Espectro de absorção na região do infravermelho para a amostra esterilizada por radiação gama dose de 15 kGy



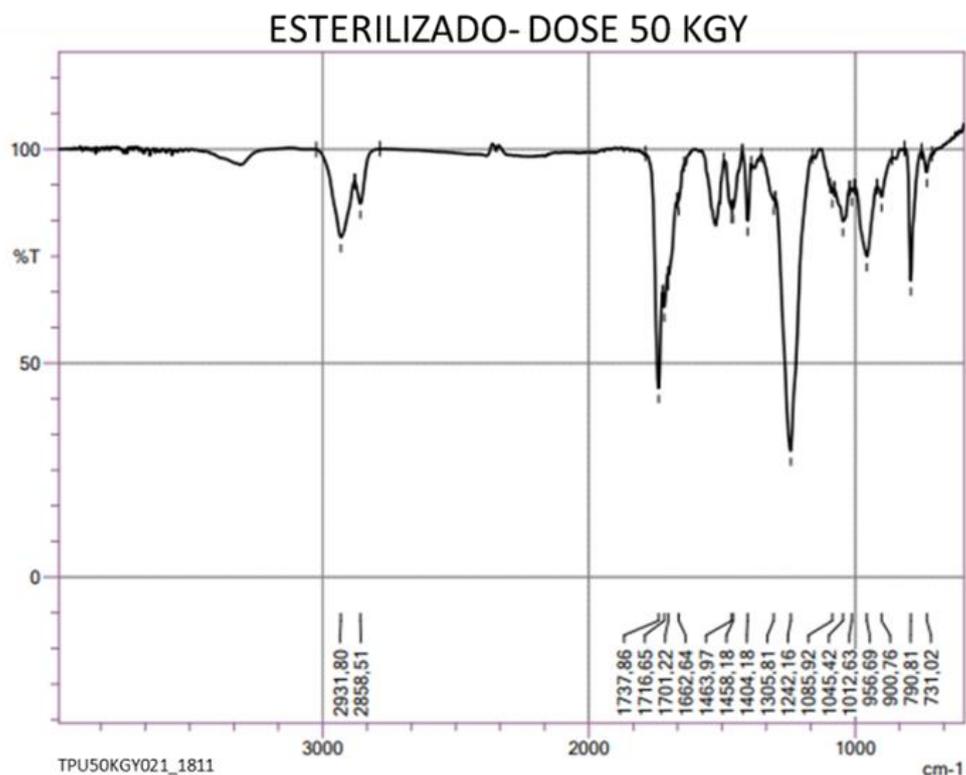
Fonte:Autor, 2021.

Figura 39- Espectro de absorção na região do infravermelho para a amostra esterilizada por radiação gama dose de 25 kGy



Fonte:Autor, 2021.

Figura 40- Espectro de absorção na região do Infravermelho para a amostra esterilizada por radiação gama dose de 50 kGy



Fonte:Autor, 2021.

Na Tabela 3 as bandas características de cada grupo funcional caracterizam o filme como um poliuretano termoplástico com base em policarbonato. As intensidades são ligeiramente modificadas devido a exposição do grupamento funcional na área superficial do filme. A metodologia de esterilização influencia diretamente nessa exposição, podendo levar à compressão ou relaxamento das cadeias. Um exemplo da influência que a metodologia pode exercer nas ligações, é a diminuição de intensidade na maioria das bandas quando comparamos o filme não esterilizado com o irradiado na dose de 50 kGy, demonstrando a diminuição da energia vibracional.

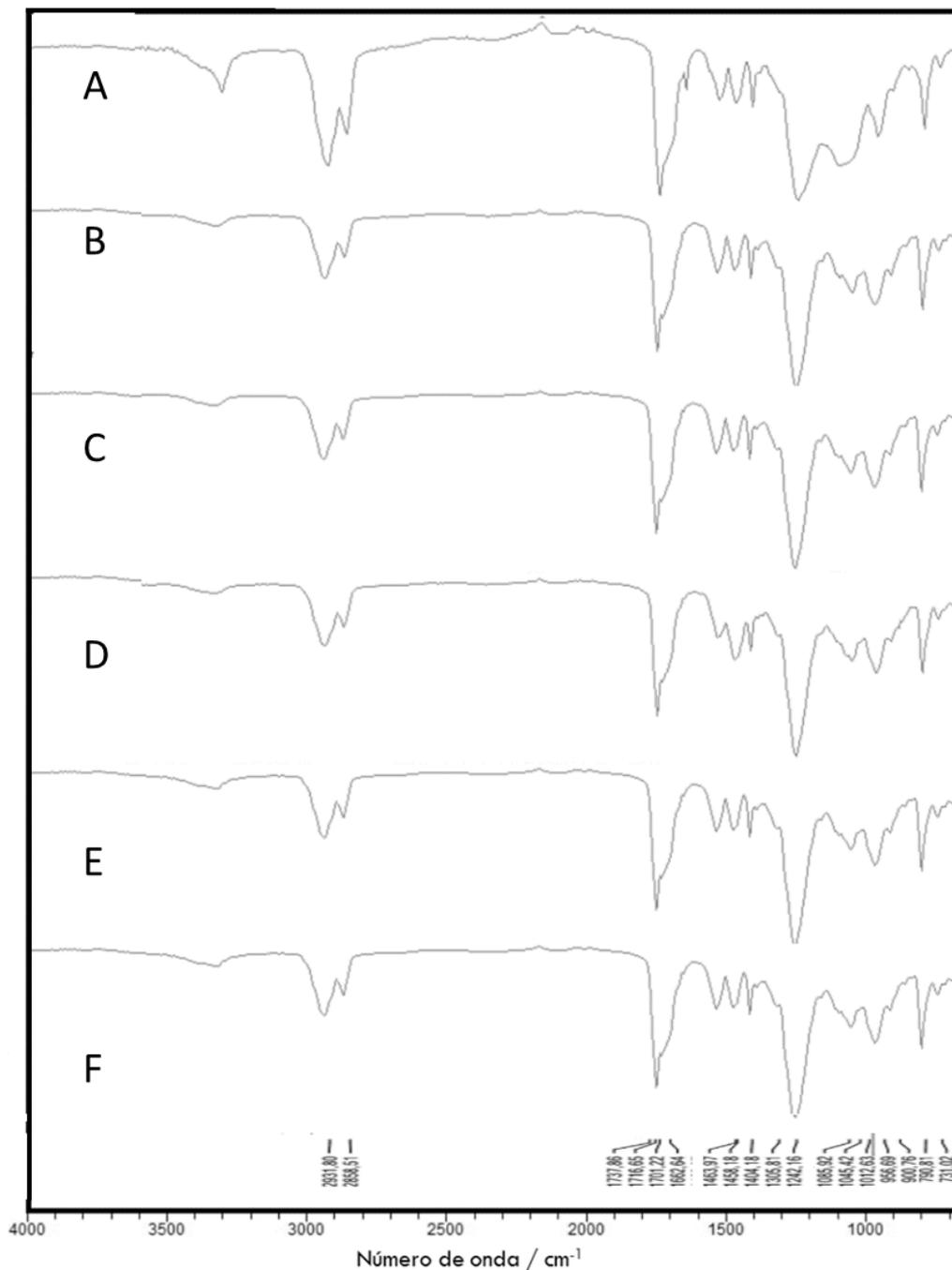
Tabela 3- Espectro de absorção na região do Infravermelho para as amostras

Ligação	Interação	Banda (cm ⁻¹)	Intensidade em transmitância (%)					
			Não Esteril	Plasma	OEt	15 kGy	25 kGy	50 kGy
(O=C-N) Amida I	δ	1460	89,55	89,42	88,36	86,46	87,22	86,16
(N-H) Amida	μ	2930	83,92	80,24	80,09	79,06	79,14	79,43
(N-H) Amida II	δ	1525	86,82	84,99	84,65	83,05	87,23	87,97
(C(=O)O) Éster	μ	790	75,60	70,95	70,92	70,07	70,37	69,32
(C-O-C) Éster	μ	1012	91,87	89,74	91,16	90,00	89,88	90,24
(C=O) Carbonila	μ	1716	71,74	65,64	67,82	65,25	65,31	63,14
(C-H) Carbono sp ³	μ	2857	90,11	87,52	87,75	87,00	87,05	86,16
(C-H) Carbono sp ³	δ	1303	91,99	93,17	89,82	88,50	89,27	88,13

Fonte: Autor, 2021

Com isso é possível realizar a comparação dos espectros e dos filmes e suas diferentes formas de esterilização na Figura 41. Não ocorre modificação química de âmbito vibracional significativo, podendo então ser considerado que o material se manteve preservado.

Figura 41- Espectros na região do infravermelho para os filmes com diferentes técnicas de esterilização. a: Não esterilizado; b: Plasma; c: Óxido de etileno; d: 15 kGy; e: 25 kGy; f: 50 kGy



Fonte:Autor, 2021.

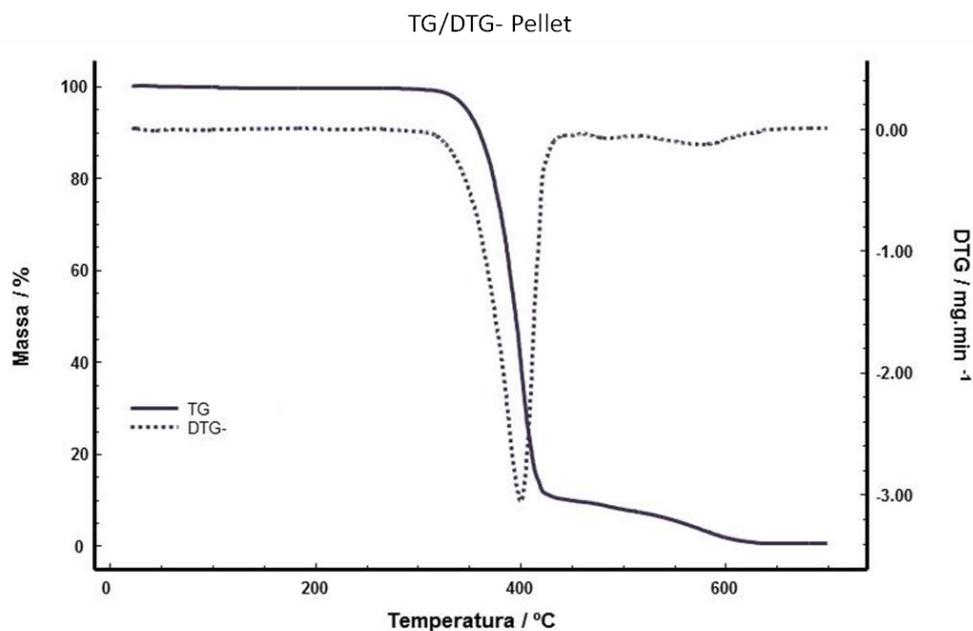
7.2 Análise térmica

7.2.1 Termogravimetria (TG)

A técnica de Termogravimetria (TG) permite avaliar o comportamento térmico das amostras de interesse. Foi avaliado por termogravimetria e termogravimetria derivada o perfil térmico da amostra comercial de *pellet* de poliuretano termoplástico, isto é, antes

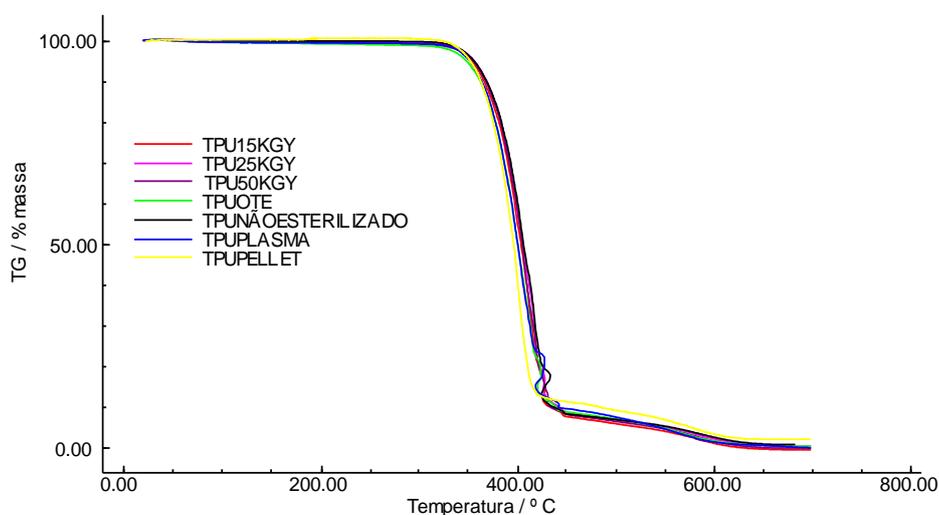
da manufatura do filme, a fim de comparar se o processo poderia alterar quimicamente a cadeia. Na Figura 42 foi possível visualizar dois eventos, nos quais ocorre a variação de massa caracterizada pela decomposição térmica do material, o primeiro de degradação quase que completa do filme dos grupamentos mais maleáveis que conferem a elasticidade ao material, e a segunda degradação menor dos grupamentos mais rígidos, que conferem a durabilidade e resistência.

Figura 42- Curva TG para amostra de *pellet* de poliuretano termoplástico com base policarbonato



Fonte:Autor, 2021.

Figura 43- Curvas TG dos filmes de poliuretano com diferentes técnicas de esterilização.



Fonte: Autor,2021.

Todas as amostras foram submetidas as mesmas condições de variação de temperatura. Na Figura 43, pode-se observar que as amostras apresentaram o primeiro evento de decomposição com maior variação de massa, correspondente quase que a totalidade da amostra, já o segundo evento apresentou uma menor variação de massa. Observou-se um pequeno teor de massa residual referente ao material adicionado na composição do *pellet*, ou seja, Sulfato de bário (BaSO_4).

Comparativamente, as curvas TG evidenciam as características e o perfil térmico das amostras. Ressalta-se uma notoriedade da semelhança entre as curvas, apresentando diferenças discretas em relação à estabilidade térmica do material estudado.

Tabela 4- Variação de massa e temperatura para os filmes de poliuretano

Amostra	Evento I		Evento II		Resíduo
	$\Delta\%$ massa (mg)	ΔT (°C)	$\Delta\%$ massa (mg)	ΔT (°C)	% massa (mg)
<i>Pellet</i>	89,08	369-420	9,07	420-597	1,85
Não esterilizado	92,04	373-427	5,69	427-598	2,27
Plasma	90,60	367-421	8,22	421-591	1,18
OEt	91,47	368-423	7,29	423-591	1,24
15 kGy	92,37	373-425	6,58	425-588	1,05
25 kGy	91,34	373-426	6,88	426-590	1,78
50 kGy	92,26	378-423	6,37	423-595	1,36

Fonte: Autor, 2021.

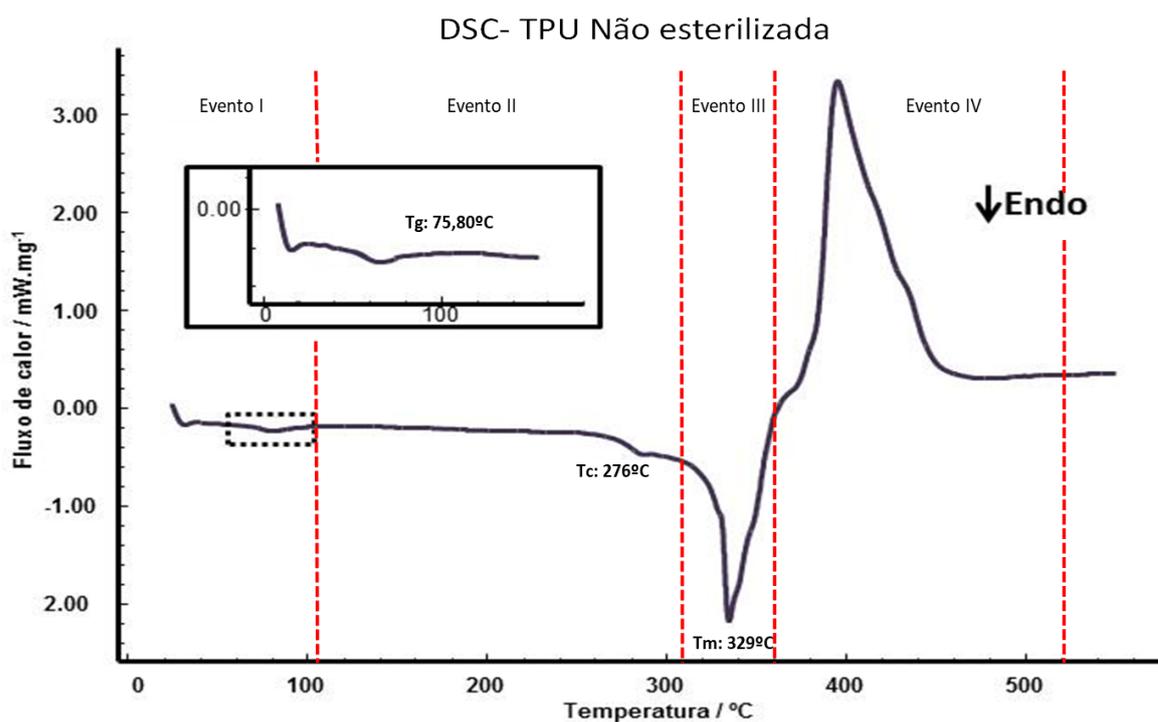
Com base na avaliação destes resultados mostrados na Tabela 4, é possível que, neste caso, as amostras esterilizadas por plasma e por Óxido de etileno apresentem menor estabilidade térmica em relação às outras técnicas de esterilização. As amostras esterilizadas por radiação ionizante apresentaram perfil muito similar à amostra não esterilizada.

7.2.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

O estudo das curvas DSC fornecem os eventos físicos e químicos (eventos entálpicos) que ocorrem na amostra ao ser submetida ao aquecimento. De forma a corroborar e complementar o estudo térmico realizado com as curvas TG, as curvas de

calorimetria exploratória diferencial permitem a observação de mudanças químicas do material, e também mudanças de caráter físico, como observado no filme sem nenhum tipo de esterilização. A primeira análise deve ser de uma varredura completa a fim de estipular o intervalo de estudo do material. O *pellet* (Figura 44) apresenta quatro eventos entálpicos, onde o primeiro evento é a transição vítrea do material (T_g) em $75,80\text{ }^\circ\text{C}$, o segundo evento referente à transição cristalina do material (T_c) em $276\text{ }^\circ\text{C}$. A transição cristalina é uma característica intrínseca do polímero, assim como, pode ser originada pela dissolução incompleta do material, ficando com fragmentos cristalinos não homogêneos no filme. O terceiro evento evidencia a fusão (T_m) do material em torno de $329\text{ }^\circ\text{C}$ e o quarto evento exotérmico, corresponde à decomposição térmica deste material, corroborando a caracterização observada na curva TG, onde uma grande perda de massa ocorre entre 373 e $427\text{ }^\circ\text{C}$.

Figura 44- Curva DSC para *pellet* de poliuretano termoplástico com base policarbonato

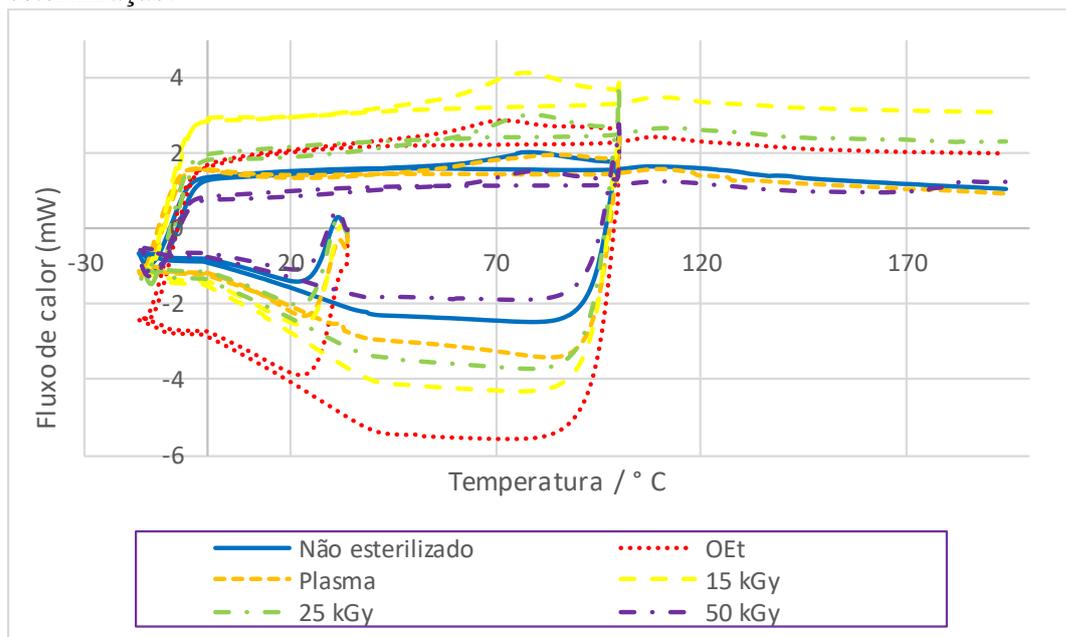


Fonte: Autor, 2021.

Na Figura 45 são mostradas de forma comparativa as curvas DSC para os filmes, realizadas em um intervalo de temperatura menor e com resfriamento, a fim de estudar a transição vítrea do material, já que para fins de aplicação no corpo humano não deveria passar dos $40\text{ }^\circ\text{C}$. A temperatura final deste estudo foi estipulada antes do evento de transição cristalina e fusão em $276\text{ }^\circ\text{C}$, já que após essa faixa o material perde suas

características e não é possível realizar o resfriamento. Desta forma é possível analisar o comportamento térmico similar, com o mesmo número de eventos em intervalos de temperaturas próximos, corroborando o estudo realizado na termogravimetria.

Figura 45- Curvas DSC para os filmes de poliuretano com diferentes técnicas de esterilização.



Fonte: Autor, 2021.

Tabela 5- Temperatura de transição vítrea para os filmes de poliuretano esterilizados por diferentes técnicas

Transição Vítrea	I aquecimento (°C)	II aquecimento(°C)
TPU Não esterilizado	77,71	118,37
TPU Plasma	71,00	101,13
TPU OEt	81,69	111,37
TPU 15 kGy	77,00	110,68
TPU 25 kGy	78,35	115,69
TPU 50 kGy	78,71	112,38

Fonte: Autor, 2021.

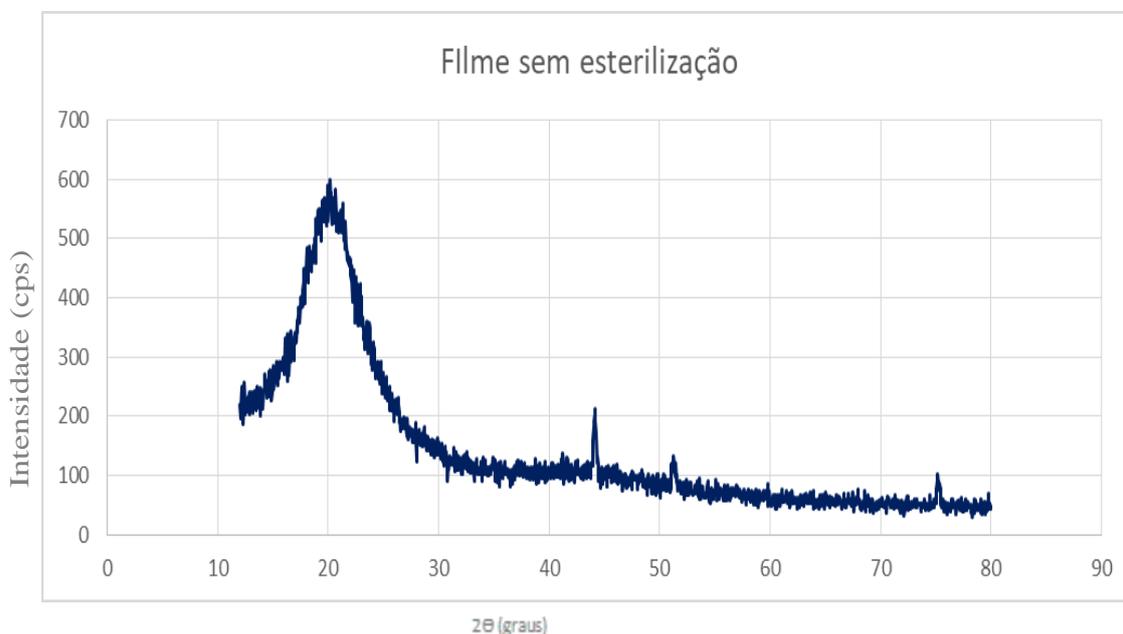
No primeiro aquecimento o intervalo a ser observado é a temperatura de transição vítrea do material descrito na Tabela 5. No segundo aquecimento a transição é deslocada para valores maiores, onde todas as amostras seguem resultados similares, corroborando as faixas de temperatura e características descritas na termogravimetria. Assim como na

termogravimetria, o filme esterilizado por plasma e por Óxido de etileno apresentaram menor estabilidade térmica. O evento de fusão ocorre acompanhado do primeiro evento de decomposição térmica, onde o material sofre mudança física e química.

7.3 Difração de raios X (DRX)

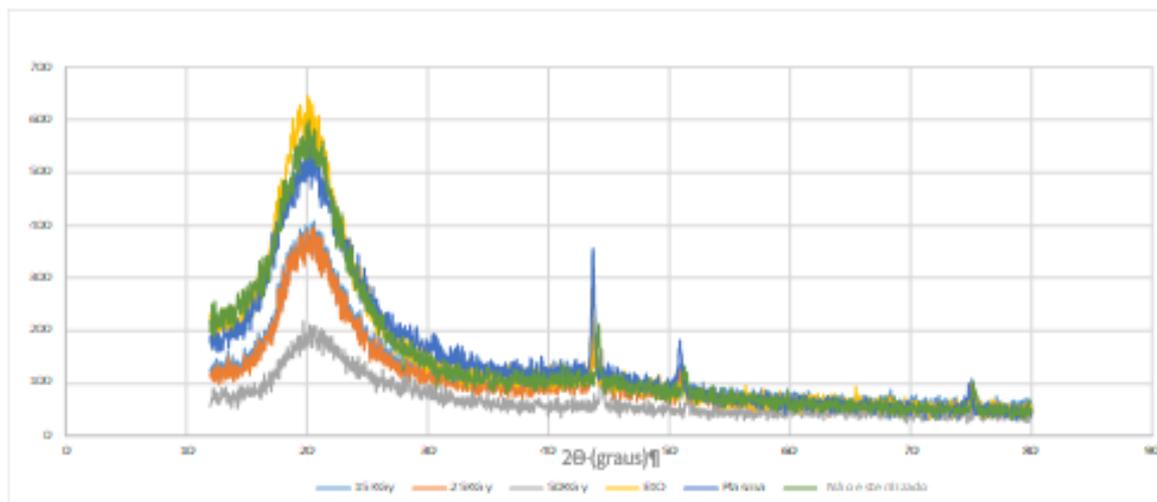
Em sistemas poliméricos existe um agregado de diversos meros (partes do polímero), no caso, diversas células unitárias que unidas podem formar monocristais, cristalizando o polímero, estes são chamados cristalitos. As bandas com maior intensidade sugerem um aumento no grau de cristalinidade do polímero, isto é, após tratamento as cadeias podem se reorganizar, enquanto as bandas menos intensas sugerem uma maior região amorfa de sua organização. No difratograma para o filme sem esterilização (figura 46), é observado uma região de dominância amorfa em 20 graus, que caracteriza a porção flexível da amostra termoplástica, três picos são observados no intervalo entre 40 e 80 graus, caracterizando as porções de cristalitos, isto é, porções rígidas do material. Esse perfil é observado em materiais poliméricos maleáveis.

Figura 46- Difratograma de raio X para amostra de filme sem esterilização



Fonte: Autor,2021.

Figura 47- Difrátogramas de raio X para os filmes de Poliuretano esterilizados com diferentes técnicas.



Fonte: Autor,2021.

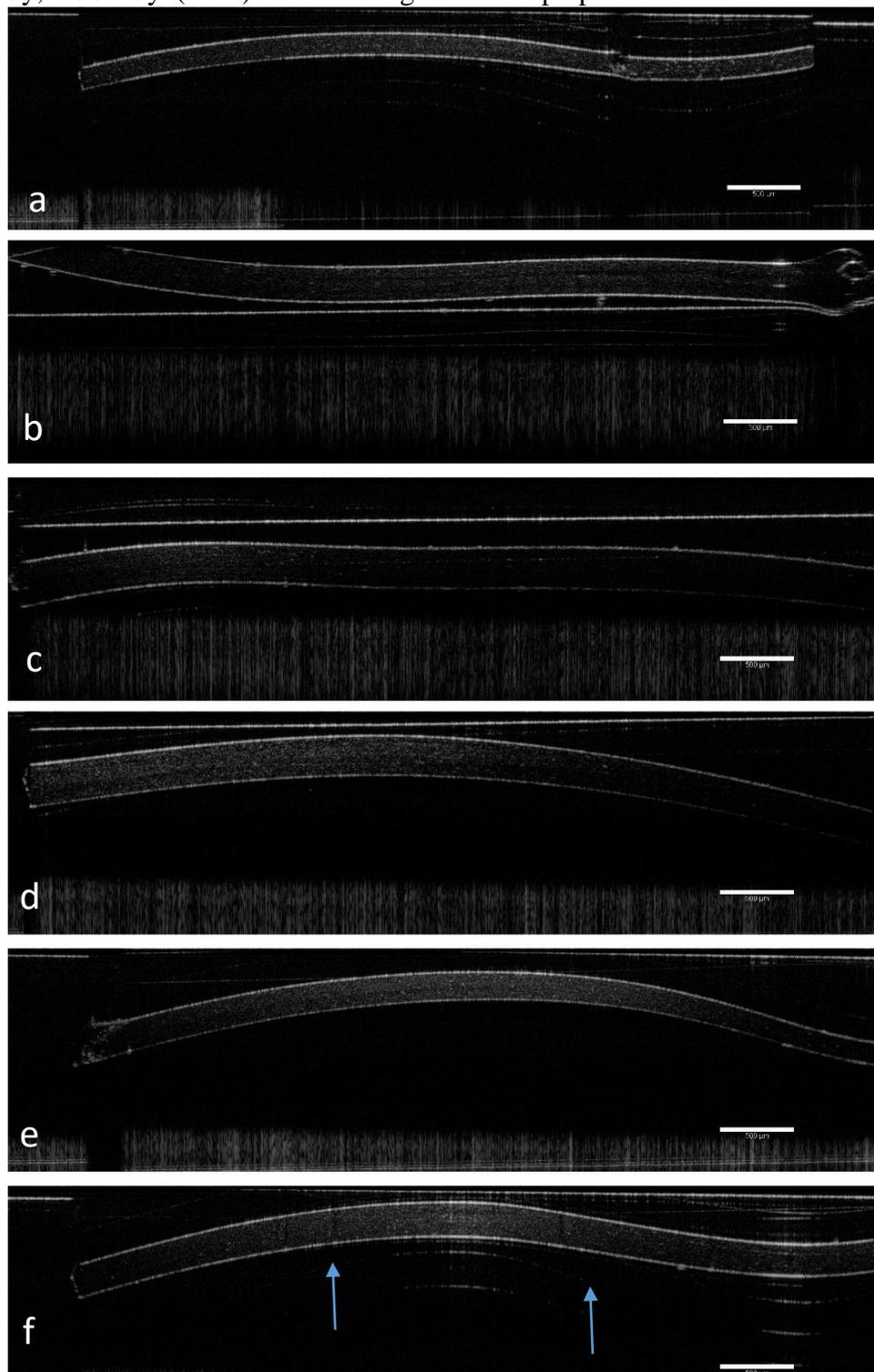
Assim como nas técnicas anteriores, os difratogramas (Figura 47) apresentaram perfis similares com bandas características na mesma região. Seguindo a característica de intensidade da banda foi possível avaliar que para a esterilização com plasma e Óxido de etileno a cristalinidade é aumentada, enquanto para a esterilização por radiação gama foi diminuída a cristalinidade, sendo mais evidenciada na dose de 50 kGy, porém termicamente ficou similar ao padrão não esterilizado utilizado.

7.4 Tomografia por coerência óptica (OCT)

Tomografia por coerência óptica é baseada em interferometria de baixa coerência com fonte de luz superluminescente compacta, com isto a técnica auxiliou no controle de espessura dos filmes e possíveis defeitos estruturais devido à esterilização. A técnica permite gerar imagens de alta resolução, em tempo real e não destrutiva, sem necessidade de preparo prévio da amostra.

As imagens (Figura 48) são das membranas compostas pelo filme de poliuretano termoplástico não esterilizado, esterilizado por técnicas convencionais ou por radiação ionizante.

Figura 48- Figuras obtidas por tomografia por coerência óptica para os filmes de poliuretano. a: Não esterilizado; b: Plasma; c: Óxido de Etileno; d: 15 kGy; e: 25 kGy; f: 50 kGy. (setas) indicam irregularidades perpendiculares a borda do material



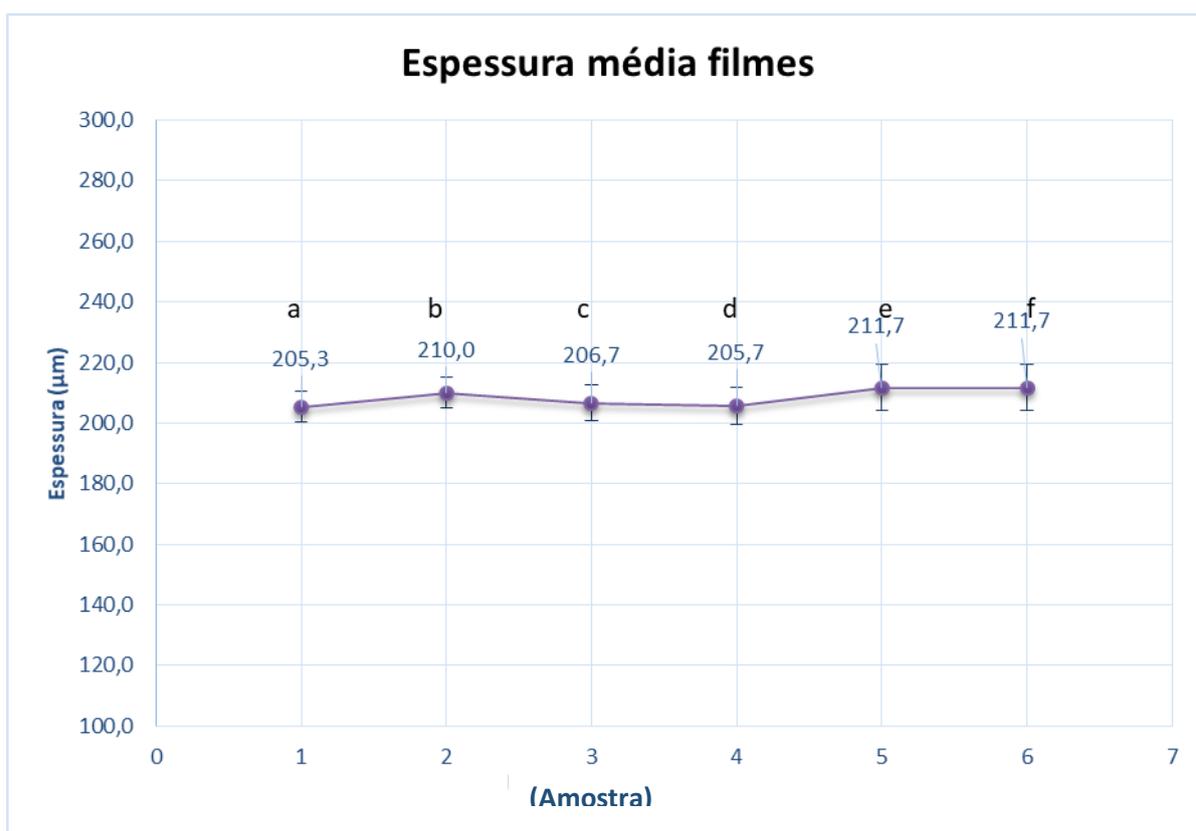
Fonte: Autor, 2021.

Desta forma, é possível observar na Figura 48 que todas as amostras apresentam as espessuras similares, em torno de 200 μm , validando o método de manufatura.

Todos os filmes apresentaram o mesmo perfil, apenas o filme esterilizado por irradiação gama com dose absorvida de 50 kGy apresentou irregularidades perpendiculares às bordas (evidenciados pelas setas), isto é, dentro do material.

Por meio da análise das imagens pelo programa computacional Image J®, foi possível medir a variação de espessura nas amostras. Pode-se observar na figura 49 a variação da espessura em função da técnica de esterilização.

Figura 49- Espessura média dos filmes para cada amostra. a) Filme sem esterilização; b) esterilizado por Óxido de Etileno; c) esterilizado por Plasma; d) esterilizado por radiação ionizante dose de 15 kGy; e) dose de 25 kGy; f) dose de 50 kGy



Fonte: Autor, 2021.

As medições revelam que as amostras não sofrem grandes alterações, porém é possível observar a variação do desvio padrão das espessuras quando comparado ao valor do não estéril na Tabela 6.

Tabela 6- Valores para espessura e desvio padrão dos filmes.

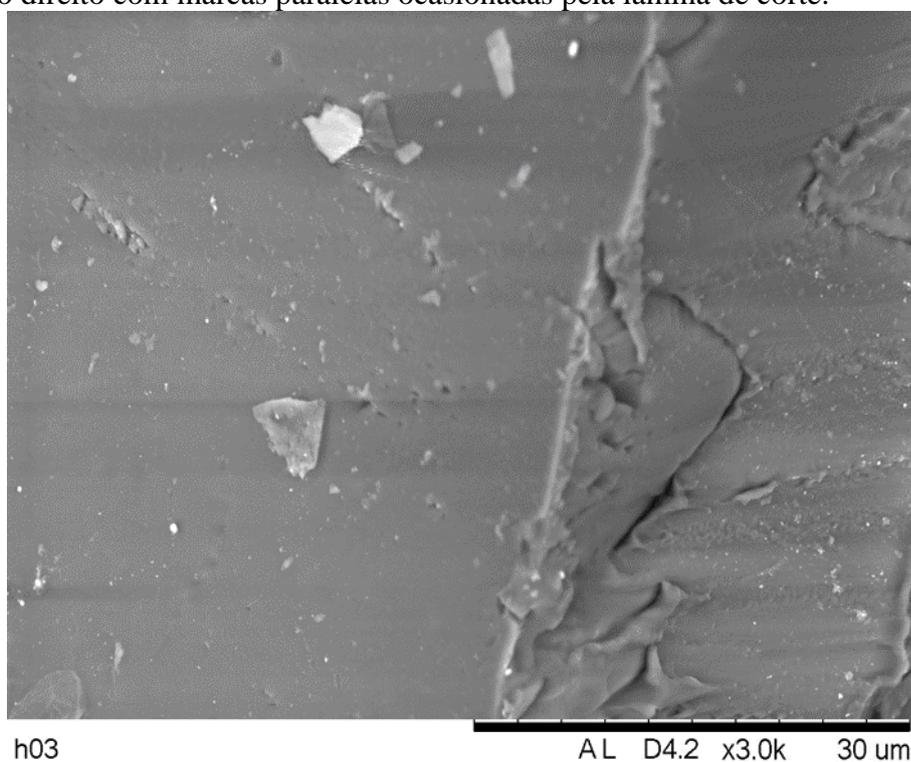
Esterilização	Espessura (μm)			Média (μm)	Desvio padrão
Sem esterilização	210	206	200	205,3	5,03
Plasma	215	210	205	210,0	5,00
Óxido de etileno	210	200	210	206,7	5,77
15 kGy	200	205	212	205,7	6,03
25 kGy	205	220	210	211,7	7,64
50 kGy	210	205	220	211,7	7,64

Fonte: Autor, 2021.

7.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

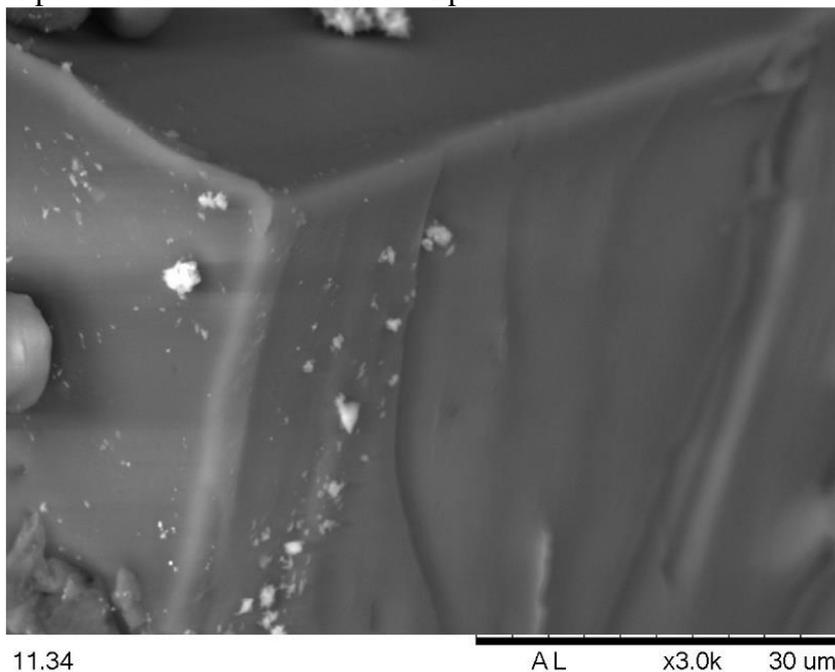
O microscópio eletrônico de varredura é um tipo de microscópio capaz de produzir imagens de alta resolução da superfície de uma amostra. A técnica é utilizada para estudo de superfície permitindo a observação de bolhas e falhas geradas pela técnica de manufatura.

Figura 50- Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para filmes de poliuretano não estéril. Superfície homogênea posicionada ao lado esquerdo, e sessão de corte ao lado direito com marcas paralelas ocasionadas pela lamina de corte.



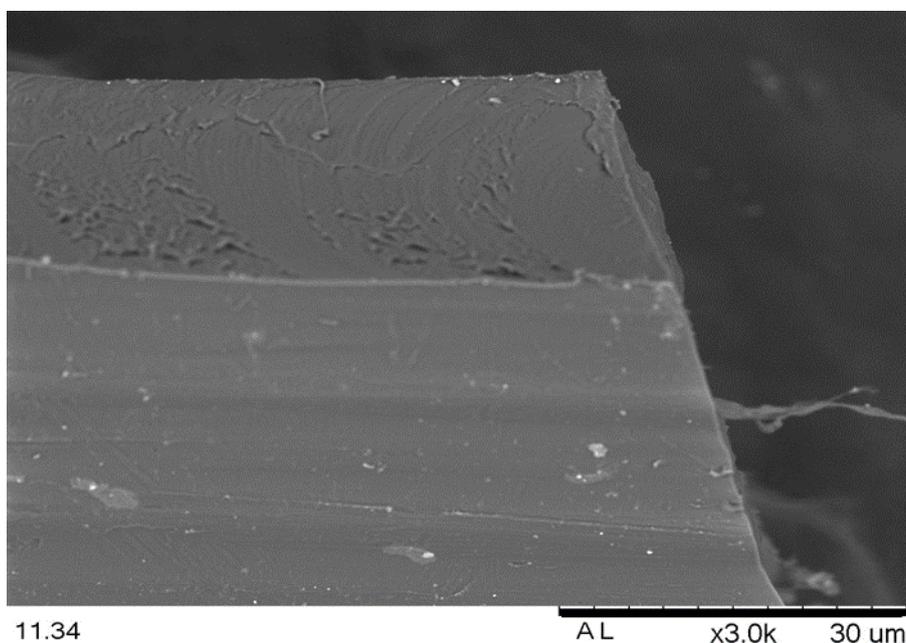
Fonte: Autor, 2021.

Figura 51- Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para filmes de poliuretano esterilizado por plasma. Superfície homogênea posicionada na parte superior da figura, Linhas paralelas na lateral ocasionadas pela lamina de corte.



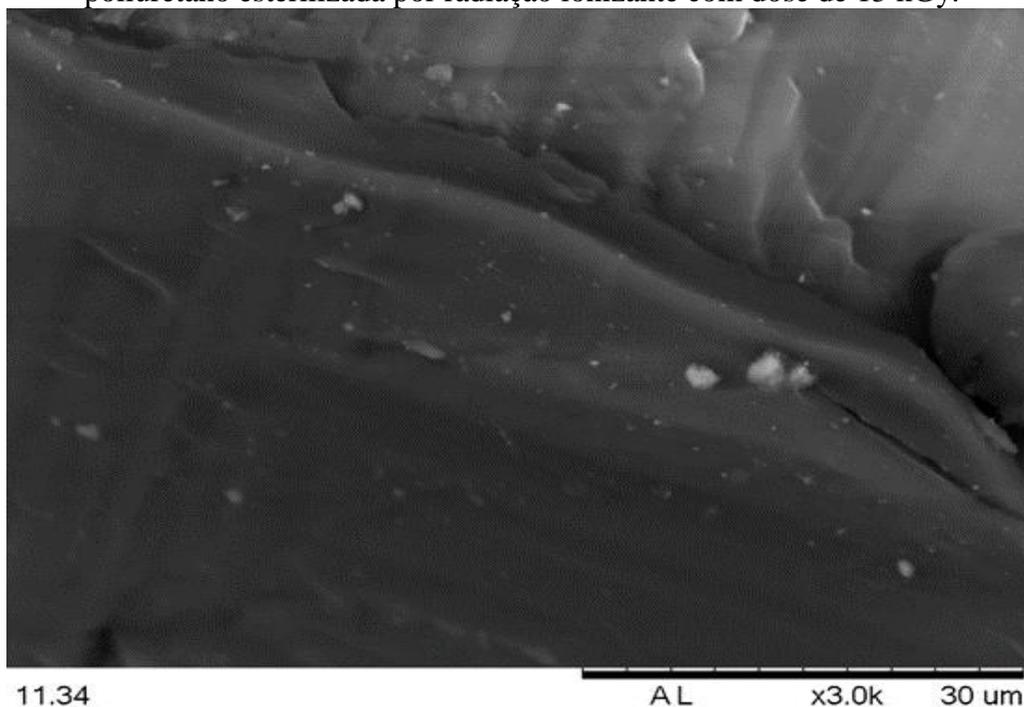
Fonte: Autor, 2021

Figura 52- Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para filmes de poliuretano esterilizada por Óxido de etileno. Superfície homogênea na parte inferior da figura.



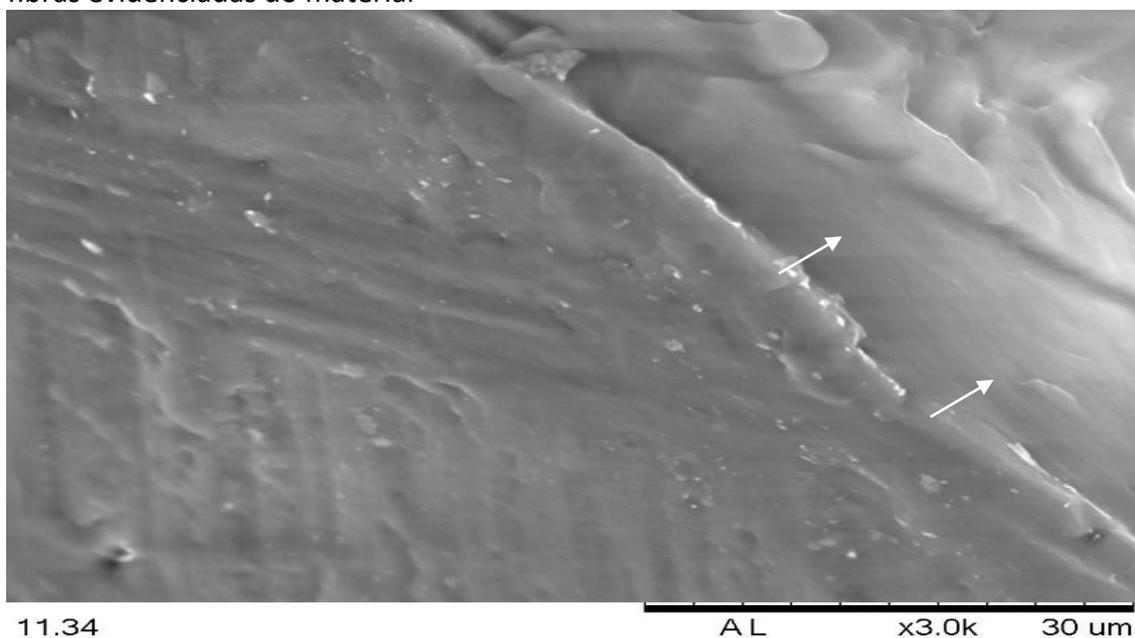
Fonte: Autor, 2021

Figura 53- Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para filmes de poliuretano esterilizada por radiação ionizante com dose de 15 kGy.



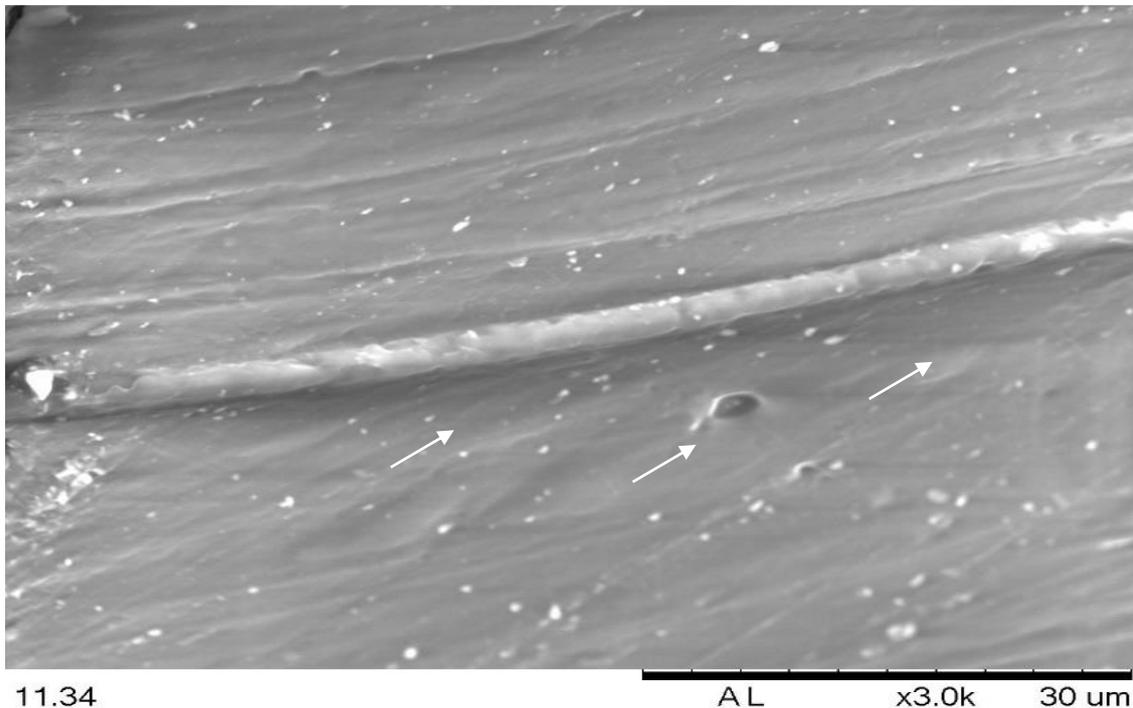
Fonte: Autor, 2021

Figura 54- Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para filmes de poliuretano esterilizada por radiação ionizante com dose de 25 kGy. As setas indicam fibras evidenciadas do material



Fonte: Autor, 2021

Figura 55- Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para filmes de poliuretano esterilizada por radiação ionizante com dose de 50 kGy. (setas) indicam fibras evidenciadas do material. Objeto bem definido como linha ao centro da imagem é referente ao *stent* metálico que compõe a metodologia de manufatura recoberto pelo filme.



Fonte: Autor, 2021

Os filmes submetidos à esterilização por plasma, Óxido de etileno e dose de 15 kGy (Figuras 51, 52 e 53) mantiveram suas características superficiais amorfas, já as amostras tratadas com 25 kGy (Figura 54) e 50 kGy (Figura 55) apresentam a superfície do filme polimérico com “aspecto enrugado” com fibras mais evidentes indicando uma possível modificação de caráter físico. Esta característica gerada a partir da esterilização por radiação gama em doses maiores, deve ser avaliada juntamente com o teste de tração, indicando se o material modificou sua resistência.

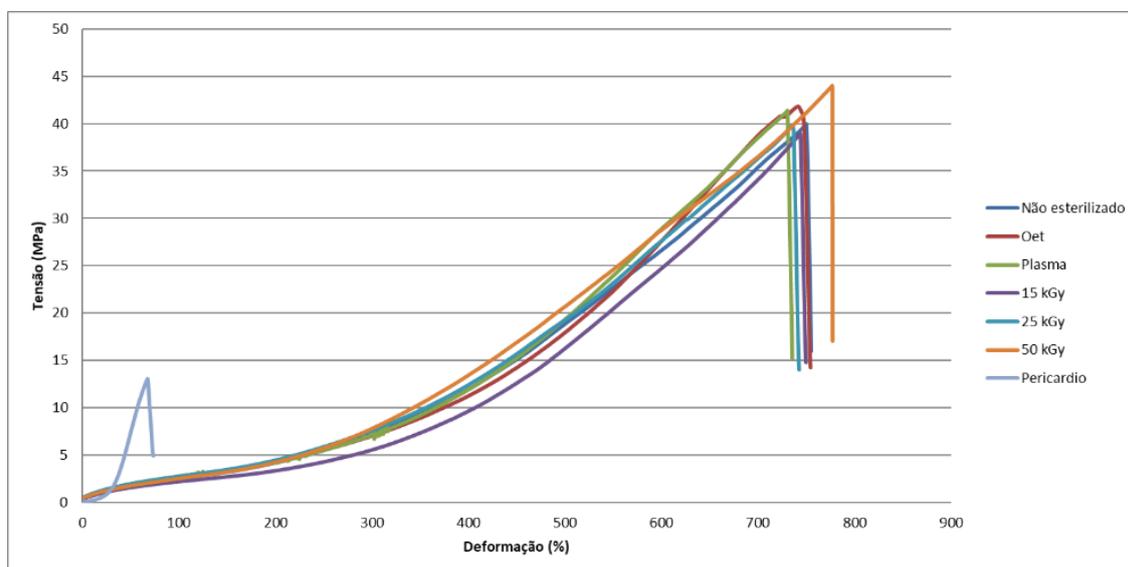
7.6 Ensaio de tração

O ensaio de tração é o ensaio mais utilizado na caracterização mecânica dos polímeros. O ensaio consiste na aplicação de uma carga uniaxial crescente à amostra, ao mesmo tempo em que são medidas as variações na sua dimensão. O ensaio de tração une todos os resultados apresentados até então, este teste é capaz de fornecer informações sobre a resistência que o material tem à força de tração, podendo também sugerir a durabilidade do produto. Por ser um material termoplástico é esperado que tenha alta

elasticidade, porém devido ao tratamento para esterilização este pode perder esta característica. A resistência a tração, sendo o material mais rígido ou mais maleável vai determinar sua aplicabilidade.

A tensão suportada até o ponto de rompimento das amostras possui valores muito próximos para as amostras esterilizadas de filme quando comparadas ao filme que não recebeu nenhum tipo de tratamento (Figura 56), porém existem diferenças discretas que corroboram o estudo de caracterização iniciado anteriormente, como a análise térmica. A amostra esterilizada pela técnica de plasma perde resistência a tração, enquanto que a amostra esterilizada por radiação ionizante na dose de 50 kGy ganha resistência. A discreta variação nos valores sugere que ocorre a mudança em caráter físico do material quando as técnicas de esterilização são alteradas. De forma comparativa foi realizado o ensaio em pericárdio bovino, utilizado mais comumente na manufatura de válvulas cardíacas, este demonstrou ser aproximadamente três vezes menos resistente a tração que os filmes produzidos, com uma deformação aproximadamente 10 vezes maior (Tabela 6).

Figura 56- Curvas obtidas a partir do ensaio de tração para os filmes de poliuretano termoplástico e pericárdio bovino.

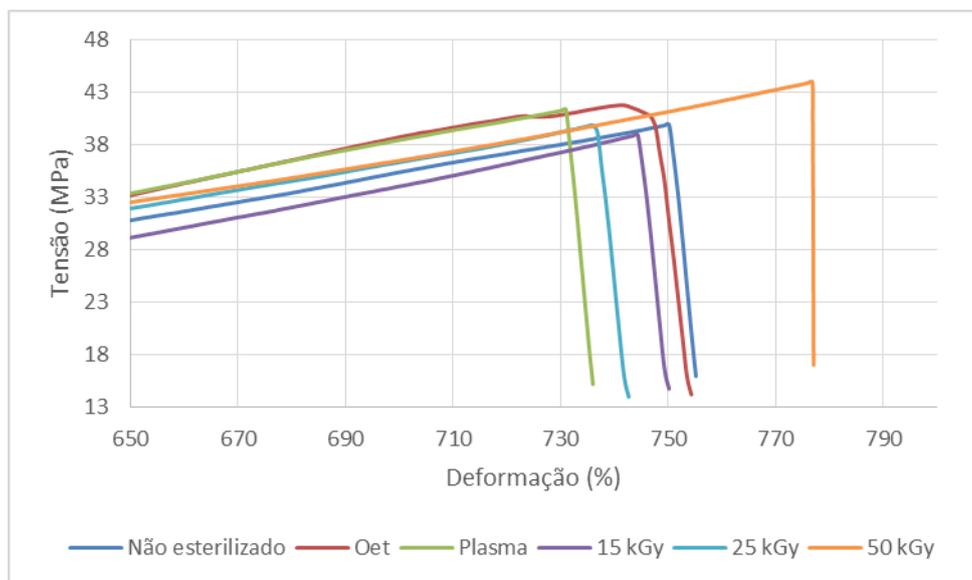


Fonte: Autor, 2021.

A grande diferença entre material biológico (pericárdio bovino) e o sintético é evidenciada na Figura 57. Para este trabalho de forma comparativa foi reduzido o estudo para os filmes produzidos e suas respectivas esterilizações, como visto na Figura 58, onde técnicas de esterilização como Óxido de Etileno e plasma diminuíram a resistência a tração, enquanto que por radiação ionizante as doses de 15 e 25 kGy mantiverem

características próximas ao sem nenhum tipo de tratamento, já a dose de 50 kGy conferiu uma maior resistência a tração para os filmes, enquanto que as técnicas de esterilização usuais apresentam resultados com resistência inferior a amostra sem nenhum tipo de tratamento.

Figura 57- Ampliação Curvas obtidas a partir do ensaio de tração para os filmes de poliuretano termoplástico



Fonte: Autor, 2021

Tabela 7- Resultados para ensaio de tração, com valores de tensão aplicada versus deformação dos filmes e pericárdio bovino.

Amostra	Deformação (%)	Tensão aplicada (Mpa)
Pericárdio Bovino	75,83	13,08
Sem esterilização	750,14	39,96
Óxido de Etileno	739,50	39,68
Plasma	739,17	39,58
Dose 15 kGy	742,50	39,00
Dose 25 kGy	744,17	39,90
Dose 50 kGy	776,81	44,00

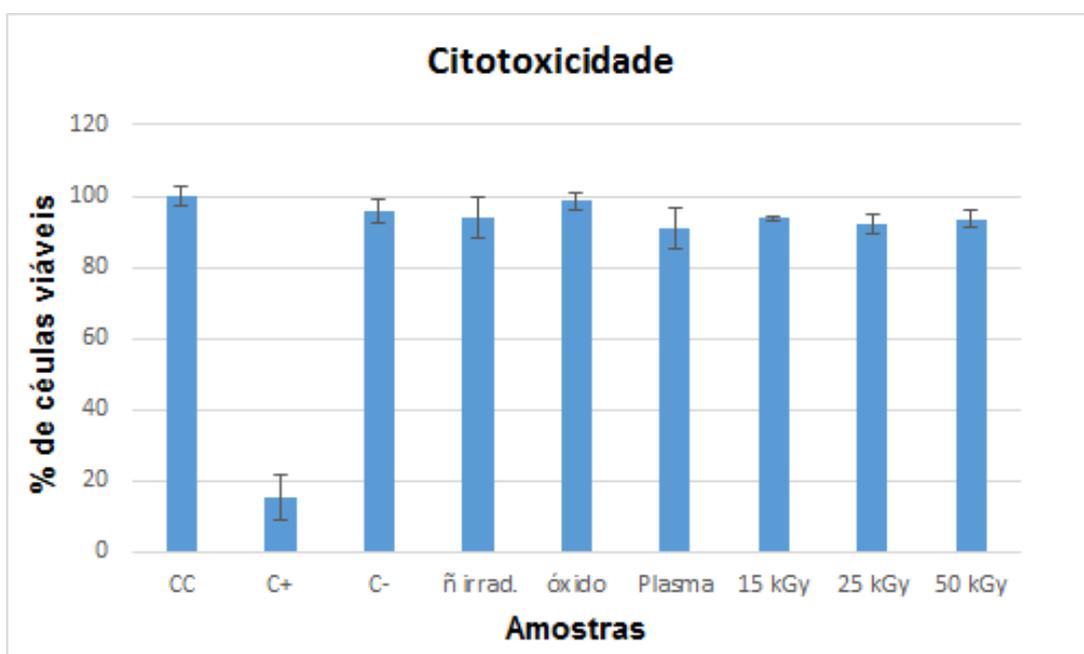
Fonte: Autor, 2021

7.7 Citotoxicidade

Como parte dos ensaios de biocompatibilidade, o primeiro a ser efetuado é o ensaio de citotoxicidade, pois se um composto, amostra, extrato ou qualquer outro biomaterial a ser estudado apresenta qualquer resultado positivo para a toxicidade, ou seja, tóxico para as células, não podemos seguir adiante com os próximos experimentos, antes de revermos a possibilidade de modificações das amostras testadas ou mudanças no processo de obtenção, para futura utilização.

Citotoxicidade é a capacidade intrínseca de um material em promover alteração metabólica nas células em cultura, podendo culminar ou não em morte celular.

Figura 58- Histograma comparativo para a avaliação de citotoxicidade.



Fonte: Autor, 2021.

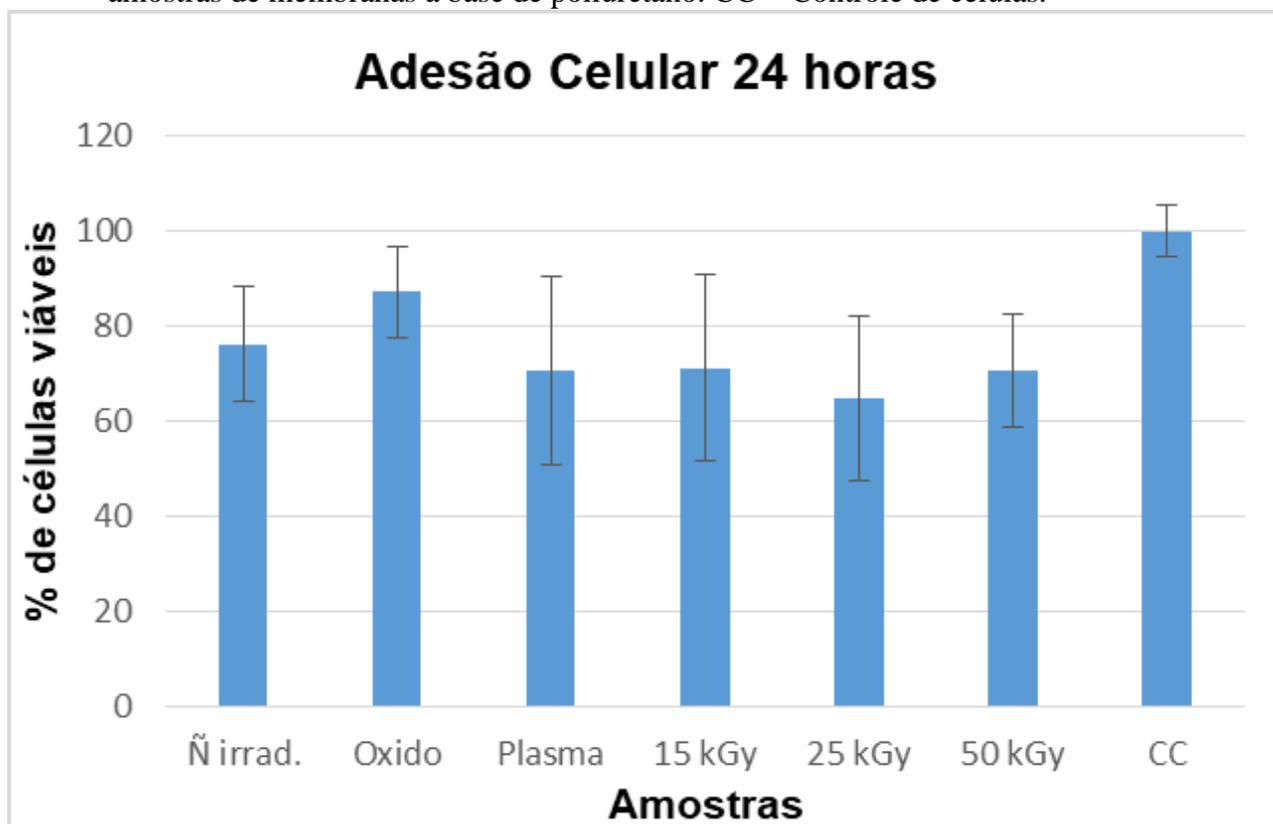
Analisando a Figura 58, podemos verificar que nem o processo de obtenção do filme (não esterilizado), assim como nenhum dos métodos de esterilização modificaram significativamente a compatibilidade do material, apresentando viabilidade celular acima de 90% em relação ao controle de células.

7.8 Adesão

A necessidade do estudo da interação do filme polimérico com a célula é dependente de características físico-químicas que permitam a identificação da célula com a matriz extracelular, a interação permite a célula aderir ao substrato e se desenvolver. Por isso, a ciência dos materiais busca desenvolver e aperfeiçoar materiais que ofereçam melhor interação com os diversos tipos celulares para o emprego na aplicação específica

de cada material. Como pode ser observado na Figura 59, as células aderiram adequadamente ao material no período observado, não havendo diferenças significativas entre as membranas esterilizadas ou não.

Figura 59- Gráfico de adesão celular efetuada com os fibroblastos murinos sobre as amostras de membranas a base de poliuretano. CC = Controle de células.

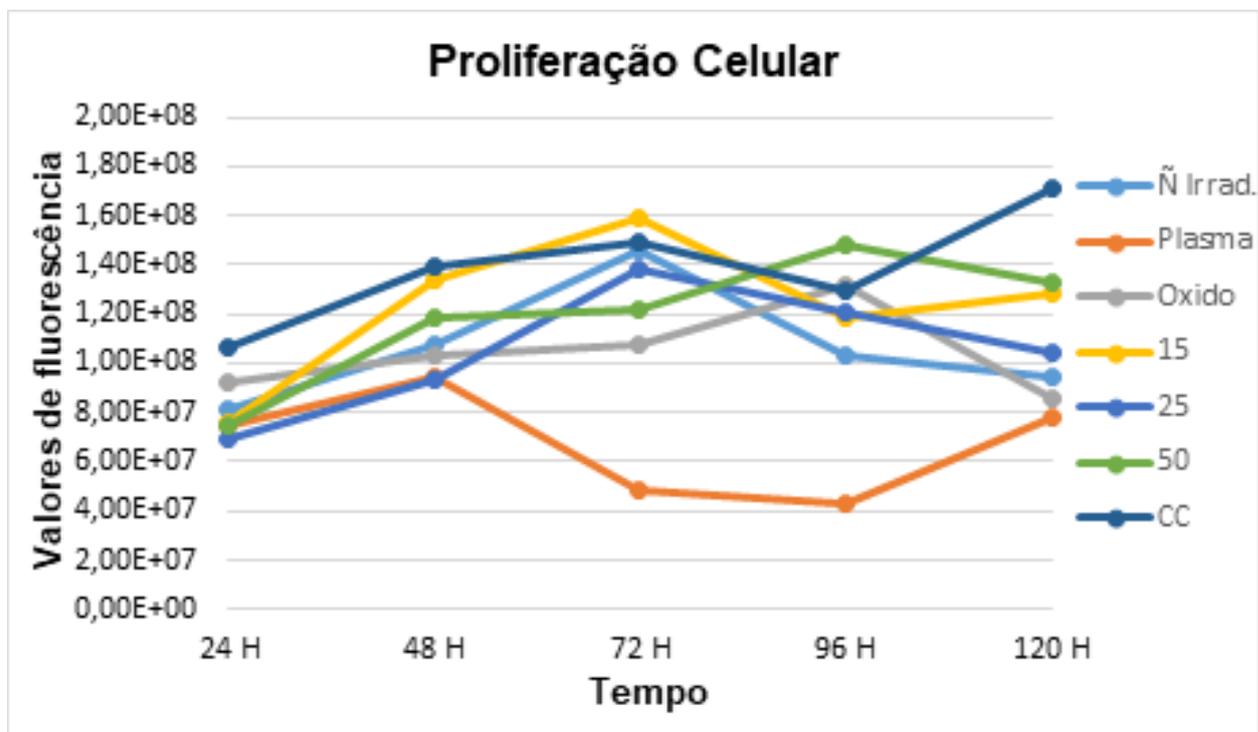


Fonte:Autor, 2021.

7.9 Proliferação

Assim como para o teste de adesão e citotoxicidade a proliferação avalia a viabilidade do material de interagir e permanecer em um organismo. A proliferação ou não das celular irá definir a aplicação deste material, já que em alguns casos a proliferação não é interessante pela possível formação de fibras, perdendo a característica de maleabilidade e flexibilidade.

Figura 60- Gráfico de proliferação celular efetuada com os fibroblastos murinos sobre as amostras de membranas a base de poliuretano. CC = Controle de células.



Fonte:Autor, 2021.

Pode-se observar no gráfico da Figura 60 que nas primeiras 48 horas, para todas as amostras, a proliferação foi crescente. Em 72 horas continuou crescente exceto para a amostra esterilizada por plasma. Em 96 horas de experimento a proliferação desacelerou e manteve uma estabilidade até o final do experimento, demonstrando que o material é viável como biomaterial, sem grandes variações.

8.0 DISCUSSÃO

A avaliação das características físicas, químicas e biológicas na aplicação de um filme proposto como biomaterial é de suma importância, principalmente quando este pode ser utilizado de diversas maneiras. O conjunto dos resultados irá direcionar a melhor aplicação.

O ciclo de vida de um biomaterial apresenta etapas determinantes, como a síntese e a escolha da metodologia de esterilização e ambas devem ser caracterizadas. A síntese, seguindo as exigências de caracterização física e química, para determinar a natureza do material gerado e após esse detalhamento a escolha da esterilização deve ser realizada, e como proposta, deve ser escolhida a que tem menor interferência nas características iniciais para o desenvolvimento do mesmo, porém, vale ressaltar que muitas vezes a esterilização muda positivamente a característica do material, possibilitando aplicações específicas. Por esse motivo a caracterização após a etapa de esterilização é de extrema importância e deve ser uma união de fatores e técnicas.

A técnica de espectroscopia vibracional na região do infravermelho é capaz de evidenciar os modos vibracionais que a cadeia polimérica apresenta, expondo os grupos funcionais característicos. Antes de efetuar o estudo comparativo entre os filmes na sua forma estéril ou não, é importante verificar qual a identidade química que está sendo exposta, e se esta, está condizente com a teoria, por exemplo, na avaliação do espectro característico do filme sem nenhum tipo de esterilização (SHRIVER, 2008; BATSCHAUER, 2002).

No espectro do material não esterilizado (Figura 35), observou-se a banda de amida I com alta intensidade causada por um estiramento vibracional entre o Carbono, Oxigênio e Nitrogênio na região de 1460 cm^{-1} , em conjunto com a deformação angular do grupamento éster na região de 1012 cm^{-1} , sendo que esse primeiro conjunto de modos vibracionais caracterizam o grupo uretano do polímero, corroborando que o material de partida (*pellet*) se manteve característico após a manipulação para formação do filme. Os grupamentos de anel aromático são caracterizados pelas bandas na região de 2857 cm^{-1} de estiramento vibracional e 1303 cm^{-1} para deformação angular, estas bandas são as responsáveis por possíveis mudanças de coloração no material, por serem consideradas grupos cromóforos, que podem ser ativados pela luz ultravioleta ou pela radiação ionizante. As Figuras 36 a 40 referentes ao material após esterilização por diferentes técnicas, seguem a mesma atribuição. Na Tabela 2 as principais bandas do

filme manufacturado foram definidas, e são essenciais para sua caracterização, o *pellet* por ser comercial e com formulação protegida por patente, não permite a comparação na integra com a literatura, sendo necessária a atribuição por meio de grupos característicos, no caso, poliuretano termoplástico não aromático com base policarbonato (PAVIA, 2012).

Após a definição dos grupos característicos do polímero estudado, a segunda etapa foi a de verificar se após a metodologia de esterilização o material perderia algum grupo funcional, modificaria sua estrutura química ou evidenciaria regiões vibracionais. A análise da Figura 41 em conjunto com a Tabela 3 permite avaliar que a característica química do material não foi modificada, isto é, o polímero mantém sua identidade e nenhum grupamento funcional foi gerado. As diferenças observadas são evidenciadas na intensidade de transmitância das bandas correspondentes, com variações discretas, pois a interação com a metodologia de esterilização, ou seja, plasma, Óxido de etileno e radiação ionizante, alteram minimamente os modos vibracionais das moléculas, tornando-os menos ou mais energéticos. Para os grupamentos amida e amida I houve uma pequena diminuição no estado energético das ligações, indicando uma possível estabilização quando o material é esterilizado por radiação ionizante, isso ocorre pela ligação ser com o Oxigênio, grupo que apresenta radicais livres que são alvos preferenciais da interação da radiação ionizante com a molécula, já a banda amida II (definida como uma deformação angular) não apresenta esta estabilização (SKOOG & LEARY, 1992). Essas modificações são observadas também nos outros grupos que apresentam Oxigênio e estiramento com movimentação vibracional da ligação, sendo mais evidentes nos filmes esterilizados por radiação ionizante.

Nos grupos aromáticos a deformação angular foi mais intensa por se tratar de um grupo cromóforo, para o filme esterilizado com a dose absorvida de 50 kGy a diminuição da intensidade foi mais evidenciada na deformação angular e no estiramento vibracional, sendo o valor de intensidade de 90,11% (Tabela 3) para o material não esterilizado, enquanto que para o material irradiado o valor foi de 86,16%, esta modificação pode não alterar a característica química da molécula polimérica, porém por se tratar da ativação de um grupo cromóforo, levando à sua oxidação, pode-se modificar as características físicas, mecânicas e de durabilidade do material. Desta maneira com estes resultados, verificou-se a não modificação química da cadeia polimérica após esterilização.

Para avaliação em caráter físico-químico, técnicas analíticas foram necessárias. A análise térmica determina a resistência que as ligações químicas têm no material, e qual a energia necessária na forma de calor para quebrá-las ou modificá-las. O termo estabilidade térmica é acompanhado da possível resistência e durabilidade que o material pode vir a ter.

Assim como para a espectroscopia, fez-se necessária a caracterização do material antes da possível modificação que as técnicas de esterilização podem vir a causar. A realização da caracterização do material (*pellet*) antes de qualquer modificação com solvente orgânico, é crucial para o estudo, este resultado (Figura 42) é capaz de avaliar o evento que ocorre com o aumento de temperatura em função do tempo, sendo observada a variação de massa em decorrência desta mudança. A termogravimetria derivada é uma ferramenta matemática utilizada para confirmar a temperatura em que o evento se inicia e termina (GOMES, 2007).

Na Figura 42 existem dois eventos significativos de perda de massa, o material mostrou-se quimicamente resistente, isto é, sem modificação de grupamentos orgânicos, com alterações reversíveis até 369 °C, como descrito na Tabela 4, ocorrendo o primeiro evento de perda de massa onde o material sofreu decomposição térmica característica de queima orgânica com variação de 89,08% de sua massa inicial. O segundo evento iniciado em 420 °C também é caracterizado como decomposição térmica, porém com uma menor variação de massa, agora de 9,07%. A descrição apresentada pelo fabricante do *pellet*, expõe que o material contém Sulfato de Bário em sua composição, um sal muito utilizado para contraste em materiais transparentes quando avaliados em equipamentos médicos, por ser um material de natureza inorgânica não sofrerá decomposição nas temperaturas atingidas pelo equipamento, justificando a porcentagem baixa de resíduo branco restante no cadinho pós estudo.

Após manufatura, o filme sem esterilização foi exposto as mesmas condições que o *pellet*, ambos apresentando o mesmo perfil térmico (Figura 43), corroborando o resultado da espectroscopia de que o material não é alterado quimicamente. O filme apresentou, durante o estudo, dois eventos de perda de massa, o primeiro de decomposição térmica com variação de 92,04% (Tabela 3) iniciado em 373 °C, o segundo também de decomposição térmica com variação de 5,69% de massa. A pequena variação de porcentagem de massa em relação ao *pellet*, se deve ao fato do material não estar mais na forma inicial, isto é, envelado, o que permite uma maior dificuldade de quebra de

ligações pelo calor. O material estando na forma de filme, isto é, com a área superficial mais exposta, permite que as ligações sejam mais facilmente quebradas, liberando mais energia que é representada pela variação da linha base da curva no final do primeiro evento (Figura 44). Essa grande liberação de calor em forma de energia é chamada de *overlap*. Por ter apresentado uma maior variação de massa no primeiro evento (92,04%), o segundo apresentou uma menor variação (5,69%), a porcentagem de resíduo (2,27%) está dentro do estipulado pela formulação do fabricante ($\leq 3,00\%$). Existe também, a alteração do início do primeiro evento para uma temperatura de 373 °C, mostrando que mesmo com uma maior variação de perda de massa (de 89,08% para 92,04%), o material se mostrou mais estável termicamente, após a manufatura e modificação estrutural para a forma filme, enquanto no *pellet* o início se deu em 369 °C.

De forma comparativa os filmes foram esterilizados e submetidos as condições de variação de temperatura em função do tempo. As variações de massa para o primeiro evento foram muito próximas entre as amostras, sendo essas pouco significativas, mostrando que a queima orgânica do material, por meio do evento de decomposição, se manteve energeticamente constante, mesmo com mudança de técnicas de esterilização, a diferença apresentada está nos intervalos de início do evento como mostrado na Tabela 4. Os filmes esterilizados pelas técnicas de plasma e Óxido de Etileno iniciaram a decomposição em temperaturas menores, sendo 92,04% para o plasma e 91,47% para o Óxido de Etileno, indicando que são menos estáveis termicamente e possivelmente apresentam perda discreta de resistência. Os materiais esterilizados pela técnica de radiação ionizante, pelo contrário, apresentaram um aumento de temperatura para início do evento sendo 92,37%, 91,34% e 92,26% para as doses absorvidas de 15, 25 e 50 kGy respectivamente. O aumento discreto dessas temperaturas remetem ao fato de que a radiação ionizante pode fortalecer as ligações cruzadas e interação física entre as cadeias poliméricas, pois termoplásticos apresentam interação física e não química no envelhecimento, isto pode significar um aumento da resistência do filme, mas com o aumento da dose absorvida proporcional ao aumento do intervalo de início do evento, também pode indicar enrijecimento deste, já que agora é necessária mais energia para ser decomposto (CANEVAROLO; MATOS, J.R.; MACHADO, L.D.B., 2007). Todas as amostras apresentaram resíduos dentro do intervalo previsto pelo fabricante de no máximo 3,00% para resíduos sólidos (GUIDE LUBRIZOL, 2014).

Ainda se tratando de técnicas termoanalíticas, a calorimetria exploratória diferencial completa e corrobora os resultados da termogravimetria. Esta permite avaliar as alterações químicas com eventos de combustão e mudanças de caráter físico, como a fusão e transições energéticas, que não envolvem perda de massa, mas envolvem a mudança física do material com diminuição de interação intercadeia.

Para avaliar em conjunto com a termogravimetria, a curva calorimétrica do *pellet* foi realizada como forma de caracterização completa do material. A curva de calorimetria exploratória do *pellet* (Figura 44) corrobora o resultado de que o material não sofre alteração química, isto é, não sofre variação de massa até os 373 °C. No caso desta técnica é possível observar três eventos no intervalo de estabilidade química, o primeiro evento em 75,80 °C corresponde a transição vítrea do material (T_g), esta transição expõe o momento em que o material passa de uma forma vítrea (rígida) para uma forma borrachosa (maleável) pois ocorre o relaxamento das cadeias com a quebra das interações físicas. A transição vítrea para materiais termoplásticos é reversível, justamente por ser uma interação física que pode ser recomposta com o resfriamento do material (vide item 4.3.4). O segundo evento físico é o de transição cristalina (T_c) em 276 °C, no caso de polímeros que são organizados em meros e aglomerações de blocos (cristalitos), essa organização representativa forma uma rede estável, que nos termoplásticos apresenta segmentos rígidos e outros flexíveis capazes de conferir diferentes características a cada filme. Essas redes organizadas podem estar homogêneas ou heterogêneas dependendo da forma de manufatura ao qual o filme é submetido. Para o *pellet* as cadeias estão enoveladas, então a energia necessária para o rompimento desses aglomerados é um pouco maior, gerando um evento bem definido onde o material passará de uma forma borrachosa para um estado de transição (T_c), e desta para a fusão (T_m), que é o terceiro evento observado em torno de 329 °C. Quando em forma de *pellet* o evento de fusão é bem definido e caracterizado pela liberação de energia do material, e absorção desta pelo meio, no caso, o sensor localizado no forno, por isso o evento está como endotérmico a absorção de energia pelo meio, logo, liberação de energia pelo material. O pico é bem definido pois o material funde as cadeias rígidas e flexíveis ao mesmo tempo. Em conjunto com a fusão, complementando o resultado, ocorre um grande evento energético de decomposição, responsável, como vimos anteriormente, pela degradação do material quase que em sua totalidade (DE PAIVA, 2006).

As curvas DSC para os filmes esterilizados (Figura 45) abrangeram temperaturas com intervalos menores, pois o evento de transição vítrea é o mais importante, principalmente pela expectativa de condições reais a que o filme será submetido, dentro de um organismo ou em uma câmara fria por exemplo. A temperatura final deste estudo foi estipulada antes do evento de transição cristalina e fusão, já que após essa faixa o material perde suas características físico-químicas e não é possível realizar o resfriamento, desta forma é observado-se comportamento térmico similar, com o mesmo número de eventos em intervalos de temperaturas próximos, corroborando o estudo realizado na termogravimetria.

No primeiro aquecimento o intervalo a ser observado é a temperatura de transição vítrea do material, que em todas as amostras apresentam valores similares como descrito na Tabela 4. Para a esterilização por plasma a temperatura de primeiro evento tem diminuição de 77,71 °C para 71,00 °C, enquanto que para a esterilização por Óxido de etileno observamos um aumento para 81,69 °C. Já para as esterilizações realizadas por radiação ionizante a mudança na faixa de temperatura do evento se mostrou pouco relevante, isso significa que o material não sofreu alteração de ordem física, e que a esterilização por gás (Óxido de etileno) e por plasma alteram fisicamente a estrutura da cadeia polimérica, podendo gerar um material menos estável, como observado anteriormente. Após o resfriamento, no segundo aquecimento, em relação ao primeiro (Tabela 5) a transição vítrea é deslocada para valores maiores devido ao fortalecimento das ligações cruzadas onde a energia necessária para que a cadeia sofra a modificação de ordem física, é maior. Neste caso o material que se manteve com as características mais próximas ao de partida (118,37 °C) foi o filme esterilizado na dose absorvida de 25 kGy (115,69 °C).

Em sistemas poliméricos existe um agregado de diversos meros que podem formar monocristais, isto é, arranjos organizados da cadeia, sendo estes observados na curva de calorimetria exploratória diferencial, onde o material apresenta transição cristalina e faixa de fusão na forma de pico. Alguns modelos para sistemas poliméricos foram propostos por Hermann em 1930, que denominou o sistema de “micela franjada” (4.6.3) onde os segmentos de diferentes cadeias se organizam em arranjos semelhantes a cristais verdadeiros, e outros segmentos formariam uma fase amorfa entre as micelas. Esses agregados de cristais são chamados de cristalitos (CANEVAROLO, 2010).

A técnica de difração de raio X é capaz de propor a caracterização do material, mostrando a forma amorfa (curva distribuída entre 10 e 30 graus) nos segmentos flexíveis, e em formato de sinais mais evidentes (acima de 30 graus) com graus de organização da cadeia maior, isto é, segmentos rígidos. O filme sem nenhum tipo de esterilização (Figura 46) seguiu o difratograma esperado para a classe de termoplásticos, com a banda mais evidente caracterizando o material como amorfo em sua maior parte, isso por ele ser transparente e flexível, caracterizado principalmente pela porção de policarbonato, já as partes rígidas são representadas pelos cristalitos (PIZATTO, 2015). Para a análise comparativa dos filmes (Figura 47) observa-se que o aumento no grau de estiramento de amostras de poliuretano, provocado pelas diferentes técnicas de esterilização, promoveu a formação de picos mais evidentes, devido à cristalização de segmentos flexíveis sob tensão (FIORIO, 2011).

É interessante apontar que assim como para a técnica de calorimetria exploratória diferencial na organização molecular da cadeia polimérica, para as amostras de plasma e Óxido de etileno houve uma mudança de faixa de fusão, indicando que estas poderiam estar sofrendo modificação em sua estrutura física. A técnica de difração de raio X corrobora esse resultado, mostrando que ambas aumentaram seus respectivos graus de cristalinidade, possibilitando a diferenciação discreta em seus perfis térmicos e de resistência. Já para a esterilização com radiação ionizante, o grau de cristalinidade foi diminuído de forma crescente em relação a dose, indicando que a parte amorfa se torna predominante.

Com as técnicas de caracterização físico-químicas é notória a mudança de organização molecular intercadeia que o material sofre, com técnicas que utilizam produtos químicos como a de Óxido de etileno e alteração de temperatura como a esterilização por plasma, enquanto que para a esterilização por radiação ionizante o material apresenta discretas mudanças em seu perfil. As próximas técnicas que complementam o estudo são de caráter físico, e vão expor modificações importantes para a escolha da aplicação do material.

A primeira técnica utilizada foi a tomografia de coerência óptica que permite a avaliação por meio de imagens em alta resolução da espessura do filme, fruto do processo de manufatura e de possíveis defeitos estruturais do mesmo, devido ao processo e posteriormente à esterilização.

As amostras apresentam espessura similar (Figura 48), indicando que o processo de manufatura é eficaz e reproduzível. A avaliação dos filmes mostra que as camadas de filme aplicadas se intercalam sem gerar pontos de falha paralelas, que poderiam sugerir defeitos, mas isso não ocorre.

Nas amostras esterilizadas por Óxido de Etileno e plasma nenhuma alteração foi apresentada, mas para a esterilização por radiação ionizante na dose absorvida de 50 kGy, pontos de “falhas” perpendiculares à superfície do filme foram apresentados, essas irregularidades podem interferir no comportamento físico do filme.

A variação de espessura das amostras pós esterilização indica o que as outras técnicas evidenciaram (Figura 49 e Tabela 6), que ocorre uma ligeira reorganização da cadeia, modificando discretamente suas características físico-químicas. O desvio padrão da espessura é proporcional a dose aplicada na esterilização por radiação ionizante.

Outra técnica de caracterização por imagem é a microscopia eletrônica de varredura, muito utilizada para avaliar a superfície do material e expor falhas como bolhas, rachaduras e alteração física.

Por ser um material de proporção geral amorfa, o estudo da superfície busca essas possíveis deformações causadas pelas técnicas de esterilização. O material sem nenhum tipo de esterilização (Figura 50) apresentou superfície homogênea e livre de defeitos, isto é, bolhas ou falhas, evidenciando sua característica amorfa indicada na técnica de difração de raios X e na tomografia de coerência óptica. As técnicas de esterilização por plasma (Figura 51) e Óxido de Etileno (Figura 52) mantêm o mesmo perfil de imagem que o filme sem nenhum tipo de tratamento, com característica homogênea sem defeitos visíveis.

A esterilização realizada por meio da radiação ionizante, interage com a cadeia de forma a reorganiza-la. A amostra esterilizada com 15 kGy (Figura 53) mantém a característica amorfa, porém com discreto indício de mudança superficial, iniciando o destaque das fibras poliméricas geradas pela interação, como indicado pelas setas. Nas doses absorvidas de 25 kGy (Figura 54) e 50 kGy (Figura 55) as fibras ficam mais evidentes, conferindo aspecto enrugado ao material. Em conjunto com as outras técnicas, notamos que essa possível modificação está atrelada com a diminuição do grau de cristalinidade, porém a sua estabilidade térmica é mantida. O conjunto de técnicas é capaz de demonstrar que não ocorre grandes modificações devido a dose escolhida, porém para

corroborar tais resultados, o ensaio de tração irá demonstrar a extensão dessas alterações na resistência e elasticidade do material.

Os materiais poliméricos apresentam perfil viscoelástico, fato que torna o seu comportamento mecânico complexo. As propriedades em tensão são influenciadas pela forma como são preparados os corpos de prova, velocidade de tração empregada, e pelas condições ambientais nas quais os corpos de prova foram expostos (CASSU, 2005)

A resistência à tração e o alongamento na ruptura podem ser correlacionados quantitativamente com a estrutura do polímero. Materiais com grande teor de ligações cruzadas, como os utilizados nas espumas rígidas, são fortes e duros, porém quebradiços, já os elastômeros e filmes flexíveis têm alongamento na ruptura muito maior (CARMO, 2020). A parte inicial em linha reta da curva de tensão/deformação (Figura 56), onde o material exibe perfeita elasticidade, representa o desnovelamento e alinhamento das cadeias macromoleculares longas e flexíveis. A extensão posterior do polímero ocasiona o deslizamento das macromoléculas com o rompimento de ligações secundárias entre cadeias adjacentes, podendo resultar em deformações permanentes.

O ensaio de tração foi realizado inicialmente com a proposta de comparar a diferença entre um material biológico hoje utilizado em *stents* e implantes constituídos de pericárdio bovino com o material sintético de filme termoplástico, era esperado que o material sintético se comportasse de uma maneira mais resistente que o pericárdio (COSTA, 2005), porém a diferença foi muito expressiva como visto na (Figura 57), onde o material sintético se mostrou no mínimo dez vezes mais resistente à tração que o pericárdio em relação a deformação, já em relação a tensão aplicada mostrou um valor três vezes maior. O ponto de ruptura do pericárdio (Tabela 7) foi em uma tensão aplicada de 75,83% com deformação de 13 MPa, enquanto que para o material não estéril foi aplicada uma tensão de 750,14% para a ruptura com deformação de 39,96 MPa.

Os filmes apresentaram características de perfil de tração elastoméricas, mostrando que são maleáveis e flexíveis, além de ter deformação reversível e resistente, indicando uma alta durabilidade e resistência a tração, todos apresentaram módulo de Yong (representado pela tensão aplicada) até sua deformação próximos, com diferenças discretas assim como nos outros testes de caracterização.

Ainda na Tabela 6 é possível realizar a comparação dos valores de tensão aplicada nos momentos de ruptura e/ou deformação dos filmes. O filme sem esterilização

apresentou módulo de Young em tensão aplicada de 39,96 MPa com deformação de 750,14%, as esterilizações realizadas com Óxido de Etileno e plasma apresentaram respectivamente 739,00% e 739,17% de deformação com tensão aplicada de 39,68 MPa e 39,58 MPa indicando uma menor resistência a tração aplicada em comparação a amostra antes da esterilização. Assim como nas outras técnicas essas duas metodologias de esterilização apresentaram resultados diferentes da esterilização com radiação ionizante, mesmo que discreto. Para definição da aplicabilidade, é notória a influência química e térmica causadas pelas técnicas de esterilização, que além de deixarem possíveis resíduos no material, podem fazer esses perderem características de resistência térmica e mecânica, o que impacta na sua durabilidade. As amostras esterilizadas com radiação ionizante nas doses absorvidas de 15 kGy e 25 kGy, tiveram resistência a tração mantidas próximas as características do material não estéril, com deformação de 742,50% na tensão de 39,00 MPa para 15 kGy e deformação de 744,17% na tensão de 39,90 MPa para 25 kGy, como é possível visualizar na Tabela 7, enquanto que para a dose absorvida de 50 kGy (44 MPa) a resistência a tração foi aumentada, indicando uma possível reticulação das cadeias poliméricas. O aparecimento das fibras indicadas na técnica de microscopia eletrônica de varredura não significam que o material está ficando mais rígido, e sim mais resistente, como demonstrado no ensaio de tração. É necessário realizar a junção das técnicas de caracterização para avaliar o perfil gerado pós esterilização, se o material de interesse deve ser mais macio, maleável, rígido, etc. A aplicabilidade irá depender dos resultados apresentados em casa dose, ressaltando que um material mais rígido pode não ser de interesse de algumas áreas.

Após a caracterização química e física dos filmes é necessário saber se esses são biocompatíveis e se a forma de esterilização poderia inviabilizar sua aplicabilidade.

O primeiro ensaio de biocompatibilidade a ser efetuado foi o de citotoxicidade, pois se uma amostra a ser estudada apresenta resultado positivo, ou seja, tóxico para as células, não podemos seguir com os próximos experimentos, antes de revermos a possibilidade de melhorias das amostras.

Na Figura 58, estão representados os resultados dos testes de citotoxicidade dos filmes produzidos nesse trabalho. Podemos observar que todas as amostras se mostraram atóxicas, independente das características de cada uma delas, e da quantidade de dose de radiação a que foram submetidas, todas com viabilidade celular acima de 90%, um ótimo indicativo para utilização das membranas, principalmente para a metodologia de

manufatura do filme que utiliza solvente orgânico de classe II segundo a Farmacopéia Brasileira, e pela esterilização realizada por Óxido de Etileno, que poderia ter adsorvido resíduos de produto químico na rede polimérica, inviabilizando sua utilização causados pela toxicidade.

Para o teste de adesão e proliferação nas primeiras 24 horas as células aderiram ao material de forma adequada, com resultados superiores a 60% independente da forma de esterilização utilizada, indicando ambiente propício e aceito pelas células.

Nas Figuras 59 e 60, estão representados os resultados dos testes de adesão e proliferação respectivamente, dando continuidade aos experimentos de biocompatibilidade, uma vez que foi comprovado pelo ensaio de citotoxicidade que suas amostras não apresentam níveis tóxicos significativos, estando aptas à continuidade dos testes. Nas primeiras 48 horas todos os filmes apresentaram ambiente propício a proliferação, elevando a quantidade de células que aderiram ao material. Nas horas seguintes o material esterilizado por plasma apresentou queda na proliferação celular e estabilização após 120 horas de experimento. As outras amostras apresentaram estabilização já em 72 horas indicando que o material é biocompatível, mas não permite grande proliferação celular, o que para a aplicabilidade de filmes de revestimento é muito interessante, já que uma grande proliferação e adaptabilidade celular pode levar a formação de *'panus'*, isto é, membranas constituídas de material biológico capazes de inviabilizar as características elastoméricas do filme. A amostra esterilizada por plasma apresentou comportamento diferente em relação as outras amostras, indicando que o processo de esterilização influencia na interação entre célula e superfície do material, sugerindo que as cadeias e suas ligações expostas são modificadas pelo processo. Com isso podemos definir que a esterilização não impacta na aceitabilidade celular ao material manufaturado.

Resumidamente, após a esterilização, o estudo das possíveis modificações físicas e químicas necessitou de técnicas complementares entre si, para constatar que o material não sofreu modificações significativas, com isso a termogravimetria e a calorimetria exploratória diferencial mostraram que a técnica de esterilização interfere na estabilidade térmica dos filmes, mesmo que de forma discreta, tornando o material esterilizado por plasma e Óxido de Etileno menos estáveis termicamente, enquanto que os esterilizados por radiação ionizante mantiveram as características. As outras técnicas utilizadas como o infravermelho e difração de raios X corroboraram os resultados de que a composição

química do material não é alterada, independente da metodologia utilizada para a esterilização, porém as técnicas com uso de imagem sendo a tomografia por coerência óptica e a microscopia eletrônica de varredura sugerem a degradação do material em doses mais elevadas, apresentando modificação do mesmo. Assim, se fez necessário um estudo com o auxílio de técnicas de caráter físico para complementar e confirmar os resultados obtidos. O teste mecânico corroborou os resultados obtidos na análise térmica, demonstrando que o método de esterilização altera ligeiramente as características físicas do material, deixando-o mais resistente quando esterilizado radiação ionizante à dose absorvida de 50 kGy.

O teste de citotoxicidade confirmou que a metodologia de manufatura do filme não altera a característica de não toxicidade do *pellet* comercial e tampouco as técnicas de esterilização, assim como o de adesão e proliferação indicando um ambiente propício a aceitação das células, mas não permite grande proliferação celular, o que pode ser favorável para diversas aplicações na área da saúde.

9.0 CONCLUSÕES

O presente trabalho desenvolveu e validou a metodologia de manufatura do filme polimérico e definiu, dentre as técnicas de esterilização, qual tem melhor aplicabilidade para dispositivos biocompatíveis.

Chegou-se a um valor ideal de temperatura e umidade que garantem a reprodutibilidade da espessura dos filmes para as técnicas de *deeping e casting*.

Fez-se necessário a utilização de técnicas complementares para melhor avaliação dos resultados para caracterização química, física e de biocompatibilidade. Sendo que a utilização destas técnicas de forma individual não possibilitou uma conclusão definitiva.

Segundo o estudo realizado concluiu-se que a radiação ionizante até a dose de 25 kGy, é a ideal para o processo de esterilização. Não modificou as características químicas. Também mostrou melhora no perfil de degradação térmica nas técnicas TG e DSC sem comprometimento do estado amorfo definido pela técnica de DRX, enquanto que para as técnicas de Óxido de Etileno e plasma a estabilidade térmica foi diminuída. No ensaio de tração a dose de 50 kGy teve resistência a tração aumentada. As amostras esterilizadas mantiveram o perfil de características de biocompatibilidade.

O estudo permitiu a criação da metodologia de processo que gerou a patente de invenção com numeração BR 1020170202658, podendo ser aplicada para filmes de revestimento de dispositivos médicos e esterilização dos mesmos.

10.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCIMED; Regional analysis of the biomaterials market Nord Pas De Calais and Pays De La Loire, **Biomatin**, 2011. Disponível em: <http://www.biomatin.eu/pdf/Regional_analysis_of_the_biomaterial_market.pdf>, Acesso em: jun. 2020.

ALLEGRA, G.; BAREIS, R. E; **Purl & Appl**, 1987.

ALMEIDA F., E.; ASSIS, C.M.; VERNICK,L.O. ; GUASTALDI, A.C. Biomateriais: Deposição de hidroxiapatita sobre superfície de Ti-cp modificada por aspersão térmica, **Química Nova**, v.30, n.5, p.1-10, 2007.

ALVES, W. F.; **Preparação e caracterização mecânica, térmica e elétrica de misturas de poliuretano derivado do óleo de mamona e poli (o-metoxianilina) para avaliação na aplicação como sensores para língua eletrônica**. Dissertação (Doutorado) Programa de pós- graduação em química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

ANDO, R. A.; **Espectroscopia Vibracional, Raman Ressonante e Eletrônica de Nitroderiados em Sistemas Conjugados**. Tese (Mestrado), Instituto de Química USP, São Paulo, 2005.

ARAUJO, G.L.B. **Caracterização no estado sólido dos polimorfos de tibolona**. Tese (Doutorado em Fármaco e Medicamentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ARAUJO, G.L.B.; MERCURI, L.P.; MATOS, J.R.; Análise térmica aplicada a fármacos e medicamentos. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N.; Biofarmacotécnica, **Guanabara Koogan**. p.32-65, 2009.

BALL, D. W.; Físico-química. 2.Ed., **Thomson Learning**, 2003.

BATSCHAUER, A. L.; **Projeto de Reatores Eletrônicos Para Lâmpadas de vapor de Sódio de Alta Pressão de 250W e 400W**, Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica). Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2002.

BENKE, D.; OLAH, A.E.; MOHLER, H. Protein chemical analysis of Bio-oss boné substitute and evidence on its carbonated content., **Biomaterials**; v.22; p.1005-1012, 2001.

BLOMFIELD P, WHEATLEY DJ, PRESCOTT RJ, MILLER HC. Twelveyear comparison of a Bjork-Shiley mechanical heart valve with porcine bioprostheses. **New Engl J Med**. v. 324, n. 9, p.573-9, 1991.

BRAGA, C. R. **Preparação e análise das propriedades Térmicas mecânicas e morfológicas de filmes de poliuretano utilizados no revestimento de stents esofágicos**. Florianópolis: Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2004.

BRANEMARK, P. Osseointegration and its experimental background. **Journal Prosthet Dent**, v. 50, p.399-410, 2003.

BURGOS, A. C. **Caracterização de nanocompósitos de poliuretano-uréia por DRX montmorilonite e u- Raman**: Dissertação (Doutorado), Faculdade de Engenharia da Universidade de Antioquia, Antioquia, 2010.

CAETANO, M., Ciência e Tecnologia da Borracha, **CTB Borracha**, 2010, Disponível em:< http://ctborracha.com/?page_id=6723>, Acesso em: jan. 2021.

CLARO NETO, S. **Caracterizações físicoquímica de um poliuretano derivado de óleo de mamona utilizado para implantes ósseos**, Tese (Doutorado), Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 1997.

CALLISTER, W. D. Ciência Engenharia dos Materiais- Uma introdução, **LTC**, v.2, cap. 4-5, 2002.

CALLISTER, W. J. Materials Science and Engineering. New York, **John Wiley & Sons**, v.7, 2007.

CAMPBELL, I.; Introduction to syntetic polimers.2.Ed. **Oxford University Press**, p.243, 2000.

CANEVAROLO, S. V. Ciência dos polímeros- um texto básico para tecnólogos e engenheiros, **Artliber**, v. 2, p. 40-41, 2006

CANGEMI, J. M. Poliuretano: De travesseiros a preservativos, um polímero versátil. **Química e Sociedade**, p.159-165. 2008

CAO, W.; HENCH, L.L. Bioativos materials, **Ceramics International**, v. 22, n.6, p. 493-507, 1996.

CARDOSO, R. M.; **Modificação superficial de poliuretano para a preparação de válvulas cardíacas**. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia), Faculdade de Ciências e Tecnilogia, Departamento de Física, São Paulo, 2012.

CARVALHO, J.E.; **Caracterização do poliuretano de óleo vegetal para confecção de dispositivo de assistência ventricula**. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

CLEGG, D.W.; COLLYER, A.A. Irradiation effects on polymers. New York: **Wiley Interscience**, 1964
COELHO, R.M.P.; Reciclagem e desenvolvimento Sustentável no Brasil, **Recóleo LTDA**, cap.3, p 53-102, 2009.

COHEN I., Biomaterials in Cardiology, **InspiredMD Corporation**, 2010, Tel-Aviv, Disponível em:
<http://www.weizmann.ac.il/ICS/booklet/22/pdf/ilana_cohen.pdf>, Acesso em:jun. 2021.

COSTA, Carlos Alberto de Souza et al. Biocompatibilidade do polímero de poliuretano vegetal derivada do óleo de mamona em estudo comparativo com cimento de óxido de zinco e eugenol: avaliação histopatológica de implantes subcutâneos de ratos, **Odonto** 2000, v. 1, n. 1, p. 44-8, 1997.

COSTA J. N. L.; Comparação entre o pericárdio bovino decelularizado e o pericárdio bovino convencional utilizado na confecção de biopróteses valvares cardíacas; **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v.20, n.1, São José do Rio Preto, 2005.

CRUZ, V. D. **Avaliação das propriedades antiproliferativas da β lapachona em cultura de células de osteossarcoma canino**, Tese (Doutorado em Ciência Animal.), Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2015

CRUZ, M. P.; **Aplicação de resíduo industrial para isolamento térmico: Proposta para utilização do poliuretano de mamona com agregado de resíduo plástico termofixo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Engenharia de produção; 2006.

DA SILVA M.H.P, Apostila de Biomateriais, endereço eletrônico: http://200.19.182.147/Materiais/Arquivos_Biomateriais.html Acesso em: 25/05/2021. 2000.

DAHM M, LYMAN WD, SCHWELL AB, FACTOR SM, FRATER RW. Immunogenicity of glutaraldehyde-tanned bovine pericardium. **J Thorac Cardiovasc Surg.**, v.99, n.6, p.1082-90. 1990.

DEDAVID, B. A.; Microscopia Eletrônica de varredura- Aplicações e preparação de amostras, materiais poliméricos, metálicos e semicondutores, **Edipucrs**. Porto Alegre 2007.

DE PAIVA, JANE MF et al. Avaliação da temperatura de transição vítrea de compósitos poliméricos reparados de uso aeronáutico. **Polímeros**, v. 16, n. 1, p. 79, 2006.

FAEZ, R., REIS, C., SCANDLUCCI, P., & KOSIMA, O. M.; Polímeros condutores, **Química Nova Escola**, p.2-3, 2000.

FIORIO, R.; **Síntese e caracterização de poliuretano termoplástico contendo poss via extrusão**. Dissertação (Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, Porto Alegre, 2011.

FRISH, K. C., & KLEMPER, D.; Comprehensive polymer Science. Oxford, Inglaterra, **Pergamon**; v. 5,1989.

FONSECA, T. C. **Desenvolvimento de um sistema computacional para o planejamento radioterápico com a técnica IMRT aplicado ao código MCNP com interface gráfica 3D para modelos de voxel**, Dissertação (Doutorado), Universidade federal de Minas gerais, Minas Gerais, 2009.

GLYN, P.O. Radiacion y operacion di bancos de tejidos, **Peru Printing**, Peru, p.57-70, p. 73-88, 2001.

GOULAS, A.E. RIGHANAKOS, K.A.; KONTOMINAS, M.G. Effect of ionizing radiation on physicochemical and mechanical properties of commercial multilayer coextruded flexible plastics packaging materials. **Radiation Physics and Chemistry**, v.69, n.5, p.411-417, 2004.

GOMES, A. C. R. **Síntese, caracterização e estudo termoanalítico de etanossulfonatos de terras raras**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GORNI, A. A. Recursos Básicos sobre Plásticos e Polímeros, **Gorni**, 2013, Disponível em: <http://www.gorni.eng.br/hist_pol.html> Acesso em: jan. 2021.

GRAND VIEW RESEACH, Crescimento e tendências do mercado de biomateriais, 2020, Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-biomaterials-market>>, Acesso em: out.2021.

GONG G, SEIFTER E, LYMAN WD, FACTOR SM, BLAU S, FRATER RW. Bioprosthetic cardiac valve degeneration: role of inflammatory and immune reactions. **J Heart Valve Dis**, v.2, n.6, p.684-93, 1993

HAINES, P. J. Thermal Methods of Analysis, Applications and Problems. **Blackie Academic & Professional**- 1ªEd, Glasgow, 1995.

HAGE, E. **Aspectos Históricos sobre o Desenvolvimento da Ciência e da Tecnologia de Polímeros**, Dissertação (Doutorado) São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia de Materiais, 1998.

HAMMAD, A.A. Microbiological aspects of radiation sterilization, In. International atomic energy agency. Trends in radiation of health care products; Viena, **IAEA**, p. 119-128, 2008

HORTON, N. C., & Mathew, P. A. NKp44 and natural cytotoxicity receptors as damage-associated molecular pattern recognition receptors, **Frontiers in immunology**, v.6, 2015.

IGNÁCIO, HELENCAR et al. Utilização da poliuretano da mamona nas formas compacta e porosa no preenchimento de falha óssea: estudo experimental em cães. **Rev Bras Ortop**, v. 37, n. 5, p. 187-94, 2002.

IONASHIRO, M.; GIOLITO, I; Cerâmicas, **Cerâmica**, v 26, n.121, p. 17, 1980.

ISO 11137- Gamma Sterilisation Validation , Sterilising dose, 2014.

ISO 14644-4, Projeto, construção e partida (requisitos, planejamento, ensaios; aprovação e edocumentação)

ISO 13485: 2004 Sistemas de gestão de qualidade- Fundamentos e Vocabulário, Associação Brasileira de normas Técnicas –ABNT, Rio de Janeiro, 2000.

ISO 10993: 2018 Biological evaluation of medical devices Part 1- Evaluation and testing whitening a risk of management process.

ISO 10993: 2012 Biological evaluation of medical devices Part 18- Chemical characterization of materials

JAYABALAN M. Biological interactions: causes for risks and failures of biomaterials and devices. **J Biomater**, v.8, p.64-71. 1993.

JURAITIS, K. R., & DOMICIANO, J. B.; Método de análise térmica diferencial através da técnica de fluxo de calor conhecido, **Semana das Ciências exatas e da Terra**, v. 10, n. 4, 1989.

KAYAIGA, R.; MILLER, W. V.; GUDINO, M.D. Tissue transplant transmitted infections. Transfusion, **Transplante Am J**, v. 31, p. 277-284, 1991.

KLOSS, R. J.; **Síntese e caracterização de poliuretanos Biodegradáveis a base de POLI(e-caprolactona)diol**. Dissertação (Doutorado em Ciências) - Área de concentração Química Orgânica, Setor de ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

KUMAR, C. R.. **Eur Polym J.**, v38, p. 2231, 2012

KOLFF, W.J.; AKUTSU, T.; DREYER, B., NORTHON, H. Artificial Heart in the Chest and Use of polyurethanes for making Hearts, **Valves and Aortas. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs**, TAPGO group, v. 5, p.298-303, 1959.

LAGE, L.; **Poliuretanas: Caracterização, avaliação estrutural e efeito induzido pela radiação gama.** Dissertação (Doutorado), São Paulo, Brasil: Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Instituto de Química; 2003.

LOH, X.J., Biodegradable thermogelling poly (ester urethane)s consisting of poly(lactic acid) e Thermodynamics of micellization and hydrolytic degradation. **Biomaterials.**, v. 29, p. 2164-2172, 2008.

LUBRIZOL, Guide of TPU for applications, **Lubrizol Corporation**, 2015.

LUCAS, E. F. Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica. **E-papers**, 2001

MARTINHO JUNIOR, A.C., **Estudo dos efeitos da radiação ionizante em cartilagem costal humana por meio de termogravimetria e tomografia por coerência óptica**, Tese (Doutorado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo, 2012.

MANO, E. B.; Introdução a polímeros. São Paulo: **Blucher**, v.1, 1999.

MANO, E. B.; Polímeros como materiais de engenharia. **Edgard Blücher**, v.1, 2000.

MARQUES, B. R.; **Poliuretano derivado de óleo de mamona: De Meio Ambiente a Biocompatibilidade.** Dissertação (Mestrado), Universidade Salesiana, Departamento de Química, Lins; 2009.

MATOS, J.; Técnicas de caracterização de polímeros aplicados à Análise térmica. **L. D. B.** São Paulo, **Artliber**; v.1, 2004.

MELCHIORS, M.; SONNTAG, M.; KOBUSCH, C.; JURGENS, E.; Desenvolvimentos recentes em revestimentos aquosos de poliuretano de dois componentes (2K-PUR), **Progress in organic coatings**, v.40, p. 99. 2000.

MELO, J. S., & MORENO, M. J.; Química de polímeros. **Revista da universidade de Coimbra, Coimbra**: Imprensa da Universidade de Coimbra; 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; PUBLICAÇÃO: Cinco estados recebem mutirão de cirurgia ortopédica, **Saúde**, 2014, Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2012/09/cincoestadosrecebemmutiraodecirurgiaortopedica>>, Acesso em: jun. 2021.

MISRA, A. K.; Single-Pulse Standoff Detecção Raman de Produtos Químicos de 120 m Distância durante o dia. **Espectroscopia Aplicada**, 2012.

MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos; terapia gênica. **Rocca**, p. 503, 2007.

MOTHÉ, C.; Análise Térmica de materiais, **Artliber**, v.1, 2009.

NELSON, D. Principios de Bioquímica de Lehninger, São Paulo: **Artfed**, 5ª Ed., v.1,2011.

NOGUEIRA, J. S., BATHISTA A. L. B.; Da SILVA E. O.; **Introdução a polímeros**, Universidade Federal de Mato Grosso departamento de física grupo de pesquisa em novos materiais, 2000.

O PETROLEO, Mercado brasileiro de biomateriais, 2019, Disponível em: <<https://opetroleo.com.br/mercado-brasileiro-de-biomateriais-esta-previsto-para-crescer-us-518-bilhoes-em-2022/>>, Acesso: out. 2021.

OERTEL, G. Polyurethane handbook: chemistry, raw materials, processing application and proprieties. New York: **Hanser**, 1994.

ORÉFICE, R. L., Pereira, M. M., & Mansur, H. S. Biomateriais: fundamentos e aplicações. Rio de janeiro: **Guanabara- Cultura médica**, 2013.

PAVIA, D. L.; Introduction to Organic Lab Techniques, **Cengage Learning**, 3ª Ed, v. 1, 2012.

PIRES A. R; Biomaterials: types, applications, and market; Departamento de Engenharia de Materiais e de Bioprocessos, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

PONOMAREVA, N. I.; POPRYGINA, T.D.; KARPOV, S.I.; LESOVOI M.V.; AGAPOV, B.L. Microemulsion method for producing hydroxyapatite, **Russian Journal of general Chemistry**, v.80, n.5, p.905-908, 2010.

RANBY, B.; In conjuted polymers na ralated materials- the interconection of chemical and eletronic structure. Edited by W.R. Salaneck, I. Lundstron and B.Ranby. **Oxford Science, Publications**, p.502, 1993.

RATNER BD, Bryant SJ. Biomaterials: where we have been and where we are going. **Annu Rev Biomed Eng**; v.6, p.47-75. 2004.

RAVAGLIOLI, A.; KRAJEWKI, A. Bioceramics, Materials, Propities ans Applications, **Chapman & hall**, p.422, 1992.

REZENDE C.M., M.C.SILVA, M.G.LARANJEIRA, & BORGES, M.; Estudo experimental do poliuretano de óleo de mamona (*Ricinus communis*) como substituto parcial do tendão calcâneo comum em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 695-700, 2001.

RODA, D. O.; Materiais, Tudo sobre plásticos, 2014, Disponível em <<http://www.tudosobreplasticos.com/materiais/pu.asp>>; Acesso em: jan 2021.

RODRIGUES, A. D. Espectroscopias de infravermelho, Raman e fotoluminescência: potencialidades e complementaridades. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v.34, n. 4, 4309, 2012.

RODRIGUES, P.; **Síntese, caracterização e correlações, estruturas/propriedades de redes mistas de polianilina/poliuretano com arquitetura molecular pré desenhada**, Dissertação (Doutorado em programa de Doutor em Ciências), Universidade Federal do Paraná, p.40, 2004.

ROMANOVA, V. Fourier transform Raman and Fourier transform infrared spectra of cross-linkes polyuretaneurea films synthesized from solutions. **Journal of Raman Spectroscopy**, v.33, p.769-777, 2002

RUTALA, W.A.; WEBER, D.J. Desinfection and sterilization in helth care facilities: what clinicians need to know. **Clinical Infectious Diseases**, v.39, p. 702-709, 2004.

SADOWSKA, J. P., CZUPRYNSKI, B., & LISZKOWSKA, J.; New polyol for production of rigid poliurethane- polyisocyanurate foams, **Kazimierz Wielki**, University, Poland; 2011.

SALLES, A. Biomateriais na Engenharia, Biomateriais,2011, endereço eletrônico: <http://biomateriaisnaengenharia.blogspot.com.br/2011/11/definicao-de-biomateriais_21.html>, Acesso em :jan. 2021.

SALVIO NETO, H.; **Estudo de compatibilidade fármaco/ excipiente e de estabilidade do prednicarbato por meio de técnicas termoanalíticas e encapsulação do fármaco em sílica mesoporosa do tipo SBA-15**. Tese (Doutorado em Fármaco e Medicamentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SANSEVERINO, A. M.; Microondas em síntese orgânica. Universidade federal do Rio de Janeiro, Departamento de Química Orgânica, **Química Nova**, v.25, 2010.

SELVARAJU, R., & A.RAJA.; FTIR spectroscopic,Thermal analysis of huan urinary stones ans their characterization, **Elsevier**; v.137, p. 1397-402, 2014.

SILVERSTEIN, R. M. ; Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, **Guanabara**, 3 Ed., 2007.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P.; Química inorgânica. Porto Alegre: **Bookman**, 4ªEd. ,2008.

SILVER, F., & DOILLON, C. (). Interations of Biological and implantable materials. New Jersey: **John Wiley Et Sons Inc**. 1989.

SINHORETI, M. A., VITTI, R. P., & SOBRINHO, L. C. Biomateriais na Odontologia: Panorama atual e perspectivas futuras. **Revista da Associação Paulista de cirurgiões dentistas**, v.67, n.4, 2013.

SKOOG, D. A.; LEARY, J.J. Principles of Instrumental Analysis. Saunders College: **Fort Worth**, 4ª ed., p.695- 696, 1992.

SCHOEN FJ, Golomb G, Levy RJ. Calcification of bioprosthetic heart valves: a perspective on models. **J Heart Valve Dis.**, v.1, n.110-114, 1992.

SCHERMAN J., MD; TAVI fow low to middle income countries; Oxford Academic; **European Heart Journal**, 2017.

SILVERMAN, G.J. Sterelization and preservation by ionizing irradiation. In: BLOCK, S.S. [ed]. Disinfection, Sterelization and preservation, **Malvea**, 4^a Ed., p.566-579. 1991.

STEVENS, M.M. Biomaterials for boné tissue engineering, **Review, Materials today**, v.5, n.11, p.18-25 ,2008.

UNITED NATINOS;World population ageing; Department of Economic and Social Affairs Population Division, 2013; Disponível em: <<http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WorldPopulationAgeing2013.pdf>>; Acesso em: jun. 2021.

VILAE, W., Polímeros e suas propriedades. Poliuretanos, 2013, Disponível em: <<http://www.poliuretanos.com.br/Cap1/131Isocianatos.hTf>>, Acesso em: mar. 2021.

WENDLANDT, W. W.; Thermal Analysis, **Wiley**. 3^aed, 1986.

ZIELINSK, A.; **Properties of poliurethane (PU)**. University of technology Gdansk;2001

ZECK, S. E.; **Utilização de espumas uretânicas no tratamento de óleo mineral isolante contaminado com PCB**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Paraná, Àrea de concentração Química Organica, 2004.

YUSOF, N. Effect of Radiation on Microorganisms- Mechanism of radiation Sterelization In: NATHER, A ; The Scientific basis of tissue transplantation- Advances in tissue banking Singapura, **World Scientific Printers**, v.5, 1^aed, p 342-357,2001.

YOSHITO, D., **Cultivo e irradiação de fibroblastos humanos em meio enriquecido com lisanato de plaquetas para obtenção de camada de sustentação em cultura de células de epiderme**, Dissertação (Mestrado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, 2011.

WILLIAMS, D.F. Definitions in Biomaterials, New York, **Elsevier**, v.72, 1987.

WILLIAMS, D.F. On the mechanisms of biocompatibility, **Biomaterials**, v.29, p.2841-2953, 2008.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.
