

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Química

Programa de Pós Graduação em Química

Felipe Kessler

**Fotofuncionalização Superficial de Polímeros:
indução de biocompatibilidade e biodegradabilidade**

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Química

Prof. Dr. Daniel Eduardo Weibel

Orientador

Porto Alegre, Abril de 2014

A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre Agosto de 2010 e Abril de 2014, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação do Professor Doutor Daniel Eduardo Weibel. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Gunar Vingre da Silva Mota Prof. Dra. Rosane Michele Duarte Soares

Profa. Dra. Marta Elisa Rosso Dotto Prof. Dr. Henri Stephan Schrekker

Prof. Dr. Daniel Eduardo Weibel

Orientador

Felipe Kessler

Autor

Para aqueles que me inspiraram,
para os que amo e que me amam, e, principalmente
para aqueles que acreditaram no potencial de um simples guri curioso.

“**S**omewhere, something incredible is waiting to be known.”

-Dr. Carl Sagan

Agradecimentos

Esta é uma simples menção de agradecimentos, porém não deixa de ser sincera e refere-se as pessoas que possibilitaram a realização do trabalho de quatro anos, contribuindo de diversas formas para que este documento se concretizasse. Eu deixo os meus agradecimentos...

Ao meu orientador, Professor Daniel, que acreditou no meu potencial desde o primeiro momento, e proporcionou mais do que orientação, pois foi alguém que esteve ao meu lado, me ensinando, discutindo, duvidando, apoiando e possibilitando cada passo deste longo caminhar.

Aos meus orientadores de doutorado sanduíche no Reino Unido, Professor Nicholas Paul Lockyer e John Vickerman, pela grande oportunidade de aprendizado e experiência que me concederam, bem como toda a estrutura e espaço no Manchester Institute of Biotechnology.

A minha grande amiga e colaboradora Letícia Marconatto pela grande contribuição neste trabalho e por me introduzir ao mundo das biocoisas, certamente este trabalho jamais seria realizado sem sua valiosa parceria. Em especial a colega Gabriela A. Lando, que sempre esteve junto a este projeto de muitas mãos e que certamente continuará o trabalho daqui para frente.

A minha família por todo apoio nestes anos, em especial aos meus pais Osmar e Beatriz e minha irmã Walquíria.

Ao instituto de Química, bem como seu corpo de professores, em especial os professores: Jairton Dupont, Nadya Pesce da Silveira, Dimitrius Samios, Ricardo Bof de Oliveira e Claudio Radtke pelo apoio em estrutura e equipamentos.

Ao LNLS pelo apoio financeiro e concessão das instalações, em especial aos pesquisadores e técnicos da Grupo VUV e Raios-X moles.

A CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e Fungos de Importância Médica (Centro de Biotecnologia), em especial aos professores Augusto Schrank, Marilene Henning Vainstein pela grande colaboração.

Ao Laboratório de Hematologia e Células Tronco (Faculdade de Farmácia), em especial a Daniela Steffens e Professora Patrícia Pranke, pelas colaborações.

Aos meus colegas e amigos dos laboratórios LINDIM e LAMOCA (UFRGS), SARC (University of Manchester) aos quais não citarei nomes para não cometer injustiças, mas que se estão lendo estes agradecimentos é porque contribuíram de alguma forma, seja um café, uma conversa jogada fora em meio uma reação ou outra, ou com amizade que se fez ao longo dos anos.

Aos colegas do Laboratório de Fotoquímica e Superfícies (que fizeram parte e os que fazem parte) que não somente foram fundamentais no trabalho, mas também, sempre tornaram cada dia de pesquisa em ótimos e insólitos momentos de convivência, amizade e aprendizado.

Um especial agradecimento aos meus amigos: Francine, Tiago, Ricardo e Gisele. Vocês com certeza estarão sempre no meu coração e na minha lembrança, pois foram mais que amigos, foram irmãos emprestados neste admirável mundo louco.

Aos meus amigos, que não estão citados por conta do espaço, mas que sabem o quanto sua amizade foi importante para mim e que nos momentos altos e baixos da vida, estiveram ao meu lado.

Lista de trabalhos gerados a partir dos resultados obtidos

1. Controlling the surface wettability of poly(sulfone) films by UV-assisted treatment: benefits in relation to plasma treatment.
Polymer International - v 62, p. 310–318, 2013.
2. Biodegradation improvement of poly(3-hydroxy-butyrate) films by entomopathogenic fungi and UV-assisted surface functionalization.
Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology – v. 130, p. 57-67, 2014.
3. Wettability and Cell Spreading Enhancement in Poly(Sulfone) and Polyurethane Surfaces by UV-Assisted Treatment for Tissue Engineering Purposes
Tissue Engineering and Regenerative Medicine – v. 11, p. 23-31, 2014.
4. Radiation Sensitive Novel Polymeric Resist Materials: Iterative Synthesis and Their EUV Fragmentation Studies.
ACS Applied Materials & Interfaces 02/2014; DOI:10.1021/am405905p – no prelo
5. Processo de biodegradação de materiais poliméricos naturais e sintéticos pela ação de micro-organismos não patogênicos. 2012, Brasil.
Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020120293838
Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

Sumário

| | |
|---|-----|
| Lista de Figuras..... | 8 |
| Lista de Tabelas..... | 13 |
| Lista de Abreviaturas | 14 |
| Resumo | 15 |
| Abstract..... | 16 |
| 1. Introdução..... | 17 |
| 2. Referencial Bibliográfico | 19 |
| Fotofuncionalização de materiais poliméricos | 19 |
| Biomateriais e biocompatibilidade | 25 |
| Biodegradabilidade | 32 |
| 3. Objetivos | 41 |
| 3.1 Objetivo Geral | 41 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 41 |
| 4. Parte Experimental | 41 |
| 4.1 Preparações dos Filmes | 41 |
| 4.2 Fotofuncionalizações superficiais | 42 |
| 4.2.1 Caracterização dos filmes | 42 |
| 4.3 Ensaio de Adesão e Viabilidade Celular..... | 45 |
| 4.3.1 Caracterização e isolamento das células tronco mesenquimais | 45 |
| 4.3.2 Ensaio de adesão celular..... | 46 |
| 4.3.3 Ensaio de viabilidade celular | 47 |
| 4.3.4 Análise Estatística..... | 47 |
| 4.4 Testes de Biodegradação | 47 |
| 4.4.1 Linhagens utilizadas e manutenção | 47 |
| 4.4.2 Suspensão de esporos de <i>M. anisopliae</i> | 48 |
| 4.4.3 Condições de cultivo para testes de degradação de polímeros | 48 |
| 4.4.4 Remoção dos microrganismos..... | 49 |
| 4.4.5 Caracterização pós-degradação..... | 49 |
| 5. Resultados e Discussões..... | 50 |
| 5.1 Caracterização química das superfícies modificadas..... | 50 |
| 5.2 Adesão e Viabilidade Celular..... | 90 |
| 5.3 Biodegradabilidade | 98 |
| 6. Conclusões | 158 |
| 7. Referências..... | 160 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Esquema de reações desencadeadas pela absorção de um fóton de radiação UV por um cromóforo em uma cadeia polimérica. | 21 |
| Figura 2. Mecanismo de iniciação das principais reações fotoquímicas envolvendo composto com cromóforo carbonílico..... | 24 |
| Figura 3. Reação do corpo ao reconhecer um biomaterial como corpo estranho. 1. O cirurgião implanta o biomaterial. 2. Uma monocamada de proteínas se adsorve na superfície. 3. As células interagem com a camada proteica. 4. Células não reconhecem a conformação proteica e começam a secretar agentes sinalizadores. 5 e 6. Começa a síntese de colágeno formando uma cápsula acelular em volta do biomaterial. ⁷⁸ | 27 |
| Figura 4. Ilustração simplificada da interação de uma superfície com material biológico. a) A proteína solúvel em uma camada aquosa entre o biomaterial e a superfície polimérica expõe os domínios de forma correta, as células reconhecem como superfície adequada. b) A proteína não exhibe a orientação conformacional adequada com a superfície e, consequentemente, os domínios não estão expostos na conformação certa, as células reconhecem como corpo estranho e dispara a reação inflamatória..... | 31 |
| Figura 5. Produção mundial de polímeros em 2011. | 32 |
| Figura 6. Os cinco estágios do processo de biodegradação..... | 36 |
| Figura 7. Espectros de FTIR-ATR das amostras de PHB não tratadas (ST) e tratadas com O ₂ em presença de UV durante 60 e 180 min. Setas indicam mudança de intensidade ou modificação na banda. | 51 |
| Figura 8. Espectros de FTIR-ATR das amostras de PSU não tratadas (ST) e tratadas com O ₂ em presença de UV durante 30 e 120 min. Setas indicam mudança de intensidade ou modificação na banda. | 52 |
| Figura 9. Espectros de FTIR-ATR das amostras de PU (ST) não tratadas e tratadas com O ₂ em presença de UV durante 30 e 120 min. Setas indicam mudança de intensidade ou modificação na banda. | 52 |
| Figura 10. Espectros NEXAFS C 1s para amostras de PHB sem tratamento e tratadas com radiação UV em presença de O ₂ durante 30, 120 e 210 min..... | 58 |
| Figura 11. Espectros NEXAFS O 1s para amostras de PHB sem tratamento e tratadas com radiação UV em presença de O ₂ durante 30, 120 e 210 min..... | 60 |
| Figura 12. Possíveis reações fotoquímicas envolvidas durante os tratamentos | 61 |
| Figura 13. Espectros NEXAFS C 1s para amostras de PSU sem tratamento e tratadas com radiação UV em presença de O ₂ durante 30 min. Onde: a) C 1s → π* _{C=C} (285.2 eV); b) C 1s → 2π* _{C=C} (286.4 eV); c) C 1s → π* _{C-O} (286.7 eV); d) C 1s → σ* _{C-C} (290.2 eV); e) C 1s → σ* _{C-O} (294.6 eV); f) C 1s → π* _{C=C} (285.2 eV); e g) C 1s → π* _{C=O} (288.2 eV) | 63 |
| Figura 14. Espectros NEXAFS C 1s para amostras de PSU sem tratamento e tratadas com radiação UV em presença de O ₂ durante 30 e 120 min..... | 63 |
| Figura 15. Fragmentos de íons positivos de filmes de PHB..... | 65 |
| Figura 16. Fragmentos de íons negativos de filmes de PHB. | 66 |
| Figura 17. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PHB ST..... | 66 |
| Figura 18. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PHB ST. | 67 |
| Figura 19. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PHB 60. | 69 |
| Figura 20. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PHB 60. | 69 |
| Figura 21. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PHB 180. | 70 |
| Figura 22. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PHB 180. | 70 |

| | |
|--|-----|
| Figura 23. Principais fragmentos para espectros Tof-SIMS positivos previstos para filmes de PSU. | 71 |
| Figura 24. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PSU ST..... | 72 |
| Figura 25. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PSU ST. | 73 |
| Figura 26. Principais fragmentos para espectros Tof-SIMS negativos previstos para filmes de PSU. | 74 |
| Figura 27. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PSU 30. | 75 |
| Figura 28. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PSU 30. | 76 |
| Figura 29. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PSU 120. | 78 |
| Figura 30. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PSU 120. | 78 |
| Figura 31. Espectro Tof-SIMS positivo PU ST..... | 79 |
| Figura 32. Possíveis estruturas da fragmentação de íons positivos no espectro Tof-SIMS da PU ST. | 80 |
| Figura 33. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra PU 30..... | 81 |
| Figura 34. Representação simplificada do rearranjo Photo-Fries no segmento rígido da PU. | 83 |
| Figura 35. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PU 120..... | 84 |
| Figura 36. Espectro Tof-SIMS de íons negativos da amostra de PU ST..... | 86 |
| Figura 37. Possíveis estruturas da fragmentação de íons negativos no espectro Tof-SIMS da PU ST. | 86 |
| Figura 38. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PU 30. | 87 |
| Figura 39. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PU 120. | 90 |
| Figura 40. Exemplo de uma imagem das amostras avaliadas com núcleos de células tronco mesenquimais marcados com DAPI em uma área de $97.2 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ | 91 |
| Figura 41. Gráfico do número médio de células aderidas após 6 horas de cultivo. As letras indicam amostras pertencentes ao mesmo grupo estatístico, ou seja que não há diferença estatística entre grupos de mesma letra..... | 92 |
| Figura 42. Resultados do ensaios de viabilidade celular pelo método MTT durante um, quatro e sete dias para linhagem de células tronco mezenquimais da linhagem 1310. | 93 |
| Figura 43. Resultados do ensaios de viabilidade celular pelo método MTT durante um, quatro e sete dias para linhagem de células tronco mezenquimais da linhagem 2710. | 93 |
| Figura 44. Resultados do ensaios de viabilidade celular pelo método MTT durante um, quatro e sete dias para linhagem de células tronco mezenquimais da linhagem 0311. | 93 |
| Figura 45. Média dos resultados do ensaios de viabilidade celular pelo método MTT durante um, quatro e sete dias para todas as linhagens de células tronco mezenquimais..... | 94 |
| Figura 46. Imagens da amostra controle do PHB ST. A) Microscopia óptica (MO) – X40. B) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) – X5.000. Após o tempo de incubação de 10 dias. | 98 |
| Figura 47. Imagens de MO do crescimento do fungo sobre amostras de PHB. A) PHB ST após 10 dias de incubação; B) PHB ST após 20 dias de incubação . C) PHB 60 após 10 dias de incubação; D) PHB 60 após 20 dias de incubação; E) PHB 180 após 10 dias de incubação; e F) PHB 180 após 20 dias de incubação. | 100 |
| Figura 48. Imagens de MEV das superfícies das amostras de PHB após o cultivo do fungo. A) PHB ST após 10 dias de incubação; B) PHB ST após 20 dias de incubação . C) PHB 60 após 10 dias de incubação; D) PHB 60 após 20 dias de incubação; E) PHB 180 após 10 dias de incubação; e F) PHB 180 após 20 dias de incubação..... | 101 |
| Figura 49. Imagens da amostra controle do PSU ST. A) Microscopia óptica – X40. B) Microscopia Eletrônica de Varredura – X5.000. Durante o tempo de incubação de 30 dias. | 102 |

| | |
|---|-----|
| Figura 50. Imagens de MO do crescimento do fungo sobre amostras de PSU. A) PSU ST após 30 dias de incubação; B) PSU ST após 60 dias de incubação . C) PSU 30 após 30 dias de incubação; D) PSU 30 após 60 dias de incubação; E) PSU 120 após 30 dias de incubação; e F) PSU 120 após 60 dias de incubação. | 103 |
| Figura 51. Imagens de MEV das superfícies das amostras de PSU após o cultivo do fungo. A) PSU ST após 30 dias de incubação; B) PSU ST após 60 dias de incubação . C) PSU 30 após 30 dias de incubação; D) PSU 30 após 60 dias de incubação; E) PSU 120 após 30 dias de incubação; e F) PSU 120 após 60 dias de incubação..... | 104 |
| Figura 52. Imagens da amostra controle do PU ST. A) Microscopia óptica – X40. B) Microscopia Eletrônica de Varredura – X5.000. Durante o tempo de incubação de 30 dias. | 105 |
| Figura 53. Imagens de MO do crescimento do fungo sobre amostras de PU. A) PU ST após 30 dias de incubação; B) PU ST após 60 dias de incubação . C) PU 30 após 30 dias de incubação; D) PU 30 após 60 dias de incubação; E) PU 120 após 30 dias de incubação; e F) PU 120 após 60 dias de incubação. | 106 |
| Figura 54. Imagens de MEV das superfícies das amostras de PU após o cultivo do fungo. A) PU ST após 30 dias de incubação; B) PU ST após 60 dias de incubação . C) PU 30 após 30 dias de incubação; D) PU 30 após 60 dias de incubação; E) PU 120 após 30 dias de incubação; e F) PU 120 após 60 dias de incubação. | 107 |
| Figura 55. Microscopia Eletrônica de Varredura de PU. A) MEV – X500. B) Região ampliada de A. MEV – X2.000..... | 108 |
| Figura 56. Dados de perda de massa das amostras de PHB controles (indicados pela letra C) e degradadas durante 10 dias com as linhagens em H ₂ O e MCM. O tempo de tratamento está indicado no nome da amostra, sendo PHB para polímeros não tratados, PHB60 para polímeros tratados com radiação UV em presença de O ₂ por 60 min e PHB 180 para amostras tratadas por 180 min..... | 109 |
| Figura 57. Dados de perda de massa das amostras de PHB controles (indicados pela letra C) e degradadas durante 20 dias com as linhagens E6 e CG97, e, em H ₂ O E MCM. O tempo de tratamento está indicado no nome da amostra, sendo PHB para polímeros não tratados, PHB60 para polímeros tratados com radiação UV em presença de O ₂ por 60 min e PHB 180 para amostras tratadas por 180 min..... | 110 |
| Figura 58. Dados de perda de massa das amostras de PSU controles (indicados pela letra C) e degradadas durante 30 dias com a linhagem E6, em dois meios de cultivo (H ₂ O ou MCM). O tempo de tratamento está indicado no nome da amostra, sendo PSU para polímeros não tratados, PSU30 para polímeros tratados com radiação UV em presença de O ₂ por 30 min e PSU120 para amostras tratadas por 120 min..... | 112 |
| Figura 59. Dados de perda de massa das amostras de PSU controles (indicados pela letra C) e degradadas durante 60 dias com a linhagem E6, em dois meios de cultivo (H ₂ O ou MCM). O tempo de tratamento está indicado no nome da amostra, sendo PSU para polímeros não tratados, PSU30 para polímeros tratados com radiação UV em presença de O ₂ por 30 min e PSU120 para amostras tratadas por 120 min..... | 112 |
| Figura 60. Dados de perda de massa das amostras de PU controles (indicados pela letra C) e degradadas durante 30 dias com a linhagem CG97, em dois meios de cultivo (H ₂ O ou MCM). O tempo de tratamento está indicado no nome da amostra, sendo PU para polímeros não tratados, PU30 para polímeros tratados com radiação UV em presença de O ₂ por 30 min e PU120 para amostras tratadas por 120 min. | 114 |
| Figura 61. Dados de perda de massa das amostras de PU controles (indicados pela letra C) e degradadas durante 60 dias com a linhagem E6, e dois meios de cultivo (H ₂ O ou MCM). O tempo de tratamento está indicado no nome da amostra, sendo PSU para polímeros não | |

| | |
|--|-----|
| tratados, PSU30 para polímeros tratados com radiação UV em presença de O ₂ por 30 min e PSU120 para amostras tratadas por 120 min. | 114 |
| Figura 62. Espectros de FTIR-ATR representativos PHB ST, e PHB ST degradados por 10 e 20 dias. | 117 |
| Figura 63. Espectros de FTIR-ATR representativos de PHB 60, e PHB 60 degradados por 10 e 20 dias. | 117 |
| Figura 64. Espectros de FTIR-ATR representativos de PHB 180, e PHB 180 degradados por 10 e 20 dias. | 117 |
| Figura 65. Espectros de FTIR-ATR representativos de PU ST, e PU ST degradados por 30 e 60 dias. | 118 |
| Figura 66. Espectros de FTIR-ATR representativos de PU 30, e PU 30 degradados por 30 e 60 dias. | 119 |
| Figura 67. Espectros de FTIR-ATR representativos de PU 120, e PU 120 degradados por 30 e 60 dias. | 119 |
| Figura 68. Espectros de FTIR-ATR representativos de PSU ST, e PSU ST degradados por 30 e 60 dias. | 120 |
| Figura 69. Espectros de FTIR-ATR representativos de PSU ST, e PSU ST degradados por 30 e 60 dias. | 121 |
| Figura 70. Espectros de FTIR-ATR representativos de PSU ST, e PSU ST degradados por 30 e 60 dias. | 121 |
| Figura 71. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PHB ST degradada por 10 dias pela linhagem CG97. | 130 |
| Figura 72. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PHB ST degradada por 10 dias pela linhagem CG97. | 130 |
| Figura 73. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PHB 60 degradada por 10 dias pela linhagem CG97. | 131 |
| Figura 74. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PHB 60 degradada por 10 dias pela linhagem CG97. | 132 |
| Figura 75. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PHB 180 degradada por 10 dias pela linhagem CG97. | 132 |
| Figura 76. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PHB 180 degradada por 10 dias pela linhagem CG97. | 133 |
| Figura 77. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PHB ST degradada por 10 dias pela linhagem E6. | 133 |
| Figura 78. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PHB ST degradada por 10 dias pela linhagem E6. | 134 |
| Figura 79. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PHB 60 degradada por 10 dias pela linhagem E6. | 137 |
| Figura 80. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PHB 60 degradada por 10 dias pela linhagem E6. | 137 |
| Figura 81. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PHB 180 degradada por 10 dias pela linhagem E6. | 138 |
| Figura 82. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PHB 180 degradada por 10 dias pela linhagem E6. | 138 |
| Figura 83. Imagem de Tof-SIMS de PHB 60' X E6. A) Ions totais. B) 69 m/z. C) 155 m/z. D) 215 m/z. E) 69+155+297 m/z. F) 297m/z. | 140 |
| Figura 84. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PSU ST degradada por 30 dias pela linhagem CG97. | 143 |

| | |
|---|-----|
| Figura 85. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PSU ST degradada por 30 dias pela linhagem CG97..... | 143 |
| Figura 86. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PSU 30 degradada por 30 dias pela linhagem CG97..... | 144 |
| Figura 87. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PSU 30 degradada por 30 dias pela linhagem CG97..... | 145 |
| Figura 88. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PSU 120 degradada por 30 dias pela linhagem CG97..... | 146 |
| Figura 89. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PSU120 degradada por 30 dias pela linhagem CG97..... | 146 |
| Figura 90. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PU ST incubada por 30 dias com a linhagem CG97. | 148 |
| Figura 91. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PU ST incubada por 30 dias com a linhagem E6. | 149 |
| Figura 92. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PU ST incubada por 30 dias com a linhagem CG97. | 150 |
| Figura 93. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PU ST incubada por 30 dias com a linhagem E6. | 150 |
| Figura 94. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PU 30 incubada por 30 dias com a linhagem CG97. | 151 |
| Figura 95. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PU 30 incubada por 30 dias com a linhagem CG97. | 152 |
| Figura 96. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PU 30 incubada por 30 dias com a linhagem CG97. | 153 |
| Figura 97. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PU 30 incubada por 30 dias com a linhagem E6. | 153 |
| Figura 98. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PU120 incubada por 30 dias com a linhagem CG97. | 155 |
| Figura 99. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PU120 incubada por 30 dias com a linhagem E6. | 155 |
| Figura 100. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PU120 incubada por 30 dias com a linhagem CG97..... | 156 |
| Figura 101. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PU120 incubada por 30 dias com a linhagem E6..... | 156 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|-----|
| Tabela 1. Concentrações e especificações dos filmes preparados por evaporação em placa de Petri (10 cm) | 42 |
| Tabela 2. Concentrações e especificações dos filmes preparados por <i>spin-coating</i> em discos de vidro (1,5 cm). | 42 |
| Tabela 3. Valores de WCA para amostras não tratadas e tratadas nos tempos de irradiação indicados. | 50 |
| Tabela 4. Composição elementar em percentagem das amostras não tratadas de PHB, PSU e PU e tratadas na presença de radiação UV em presença de O ₂ | 54 |
| Tabela 5. Grupos funcionais e suas relativas intensidades a partir do ajuste do sinal de C 1s para amostras não tratadas de PHB, PSU e PU e tratadas com radiação UV em presença de O ₂ | 55 |
| Tabela 6. Energias, assinaturas e área proporcional de cada pico para os espectro de NEXAFS C 1s do PHB sem tratamento e tratado com radiação UV em presença de O ₂ | 59 |
| Tabela 7. Energias, assinaturas e área proporcional de cada pico para os espectro de NEXAFS O 1s do PHB sem tratamento e tratado com radiação UV em presença de O ₂ | 59 |
| Tabela 8. Massa molar média (Mw), número médio de unidade de massa molar (Mn) e o índice de polidispersividade (PDI) para amostras não tratadas de PHB, PU e PSU e após os tratamentos com radiação UV em presença de O ₂ | 123 |
| Tabela 9. Massa molar média (Mw), número médio de unidade de massa molar (Mn) e o índice de polidispersividade (PDI) para os controles das amostras não tratadas de PHB, PU e PSU e após os tratamentos, analisadas após 10 e 20 dias de cultivo para PHB e 30 e 60 dias de cultivo para PU e PSU. | 124 |
| Tabela 10. Massa molar média (Mw), número médio de unidade de massa molar (Mn) e o índice de polidispersividade (PDI) para as amostras degradadas de PHB, PU e PSU não tratadas e após os tratamentos, analisadas após 10 e 20 dias de cultivo para PHB e 30 e 60 dias de cultivo para PU e PSU. | 126 |

Lista de Abreviaturas

| | | | |
|------------------|---|----------|---|
| C 1s | Orbital 1 s do carbono | PCL | Policaprolactona |
| C 1s – π | Transição do elétron do orbital s à um orbital π | PDI | Índice de polidispersividade |
| | | PHA | Polihidróxialcanoato |
| | | PHB | Polihidróxibutirato |
| C60 ⁺ | Fulereno ionizado positivamente | PHB180 | PHB irradiado por 180 min |
| CG97 | Linhagem do fungo <i>Metharizium Ani.</i> | PHB60 | PHB irradiado por 60 min |
| | | PHBST | PHB sem tratamento |
| | | PHBV | Polihidróxibutirato-co-valeriato |
| | | PMMA | Polimetilmetacrilato |
| Cove/MCM | Meio de cultura com mínimo de nutrientes | PSU | Polissulfona |
| Ee | Energia de excitação | PSU120 | PSU irradiado por 120 min |
| eV | Elétron-Volt | PSU30 | PSU irradiado por 30 min |
| FTIR-ATR | Espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier | PSUST | PSU sem tratamento |
| GPC | Cromatografia de permeação em Gel | PU | Poliuretana |
| H2O | Meio de cultura água-ágar | PU120 | PU irradiada por 120 min |
| K α -Al | Fonte de raios-X | PU30 | PU irradiada por 30 min |
| LNLS | Laboratório Nacional de Luz Síncrotron | PUST | PU sem tratamento |
| MCM | Meio de cultura com mínimo de nutrientes = Cove | SGM | Monocromador de Grade esférica |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura | THF | Tetrahidrofurano |
| Mn | Número médio de monômeros | | Espectrometria de Massas por Ions |
| | | Tof-SIMS | Secundários por Tempo-de-Vôo |
| MO | Microscopia óptica | μ L | microlitro |
| MSC | Células tronco mesenquimais | UV | Radiação ultravioleta |
| Mw | Massa molecular média | VUV | Radiação ultravioleta de vácuo |
| NEXAFS | Espectroscopia de absorção de raios-X = XANES | W | Watts |
| Nm | Nanômetro | WCA | Ângulo de contato em água |
| O ₂ | Gás oxigênio | XPS | Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X |

Resumo

A fotofuncionalização de superfícies poliméricas é um método simples, prático, de baixo custo e complexidade experimental que possibilita obter superfícies poliméricas com controle das propriedades superficiais dependendo do tipo de tratamento aplicado. As superfícies obtidas são estáveis e livres de contaminantes (resíduos de reagentes ou solventes), o que é de grande importância para aplicações biotecnológicas. Neste trabalho, filmes de polissulfona (PSU), polihidróxibutirato (PHB) e poliuretana (PU) foram caracterizados e funcionalizados com radiação UV em presença de uma atmosfera reativa (O_2) para melhorar a sua molhabilidade, adesão e crescimento celular. As superfícies obtidas foram caracterizadas e submetidas a testes para avaliação para a aplicabilidade do método de fotofuncionalização em dois focos diferenciados da biotecnologia: engenharia de tecidos e biodegradação de materiais poliméricos. Resultados das técnicas de análise de superfícies mostraram a conversão eficaz das superfícies de polímeros hidrofóbicos para hidrófilicos com enxerto de novos grupos funcionais oxidados durante os tratamentos fotoquímicos. Alguns dos filmes tratados mostraram um maior número de células tronco mezenquimais aderidas em comparação com os filmes não tratados e este número é comparável com o número de células aderidas no grupo de controle. Os resultados demonstraram que a resposta de células não depende apenas da hidrofilicidade, mas também das alterações na química da superfície, que ocorrem como resultado do tratamento com radiação UV na presença de oxigênio. Melhor adesão e crescimento celular nos substratos poliméricos modificados pela presente metodologia fotofuncionalização confirmam a biocompatibilidade das superfícies tratadas. O mesmo método de funcionalização da superfície foi usada como passo inicial para atingir a degradação controlada de PHB, PSU e PU filmes por fungo entomopatogênico. As superfícies tratadas foram investigadas por meio de técnicas de análise de superfície (WCA, FTIR-ATR, XPS, NEXAFS, GPC, Microscopia Óptica, MEV, Gravimetria e Tof-SIMS). Após os tratamentos, foram detectados novos grupos oxigenados em novos ambientes químicos sobre a superfície de polímeros. A atmosfera oxidante não permitiu a formação de ligações C=C, indicando que reações de fotodegradação são suprimidas durante/pelos tratamentos, resultando em enxerto de oxigênio nas cadeias de polímeros. Quanto maior a hidrofilicidade e a concentração de grupos funcionais oxigenados na superfície dos filmes tratadas melhor a biodegradação dos filmes. Observou-se um claro aumento no crescimento deste fungo quando grupos oxigenados foram enxertados na maior parte das superfícies de polímeros. Esta metodologia simples pode ser utilizada para melhorar e controlar a taxa de degradação de polímeros em aplicações que requerem uma taxa de degradação controlável, ou, no manejo de resíduos de materiais poliméricos.

Abstract

The photofunctionalization of polymer surfaces is a simple, practical, low cost and experimental complexity, and enables to obtain polymer surfaces with controlled chemical selectivity and surface properties depending on the type the treatment applied. The surfaces obtained are stable and free from contaminants (residues of reactants or solvents), very important characteristic for material applied in biotechnological applications. The surface of Polihidroxitirato (PHB), Polissulfone (PSU) and Poliuretano (PU) films were treated with ultraviolet radiation (UV) in the presence of oxygen to improve their wettability, adhesion and cell spreading properties. Surface analysis results illustrated the effective conversion of the polymers surfaces from hydrophobic to hydrophilic with grafting of new oxidized functional groups during the photochemical treatments. Some of treated films showed a larger number of adhered mezenquimal stem cells compared to the untreated films and that number of adhered cells was comparable to the number of adhered cells in the control group. The results showed that the cell response does not only depend on the hydrophilicity but on the chemical surface alterations which occur as a result of UV-assisted treatment in the presence of oxygen. Better cell adhesion, spreading and growing on the polymers substrates modified by the present fotofunctionalization methodology confirmed the biocompatibility of the treated surfaces. The same method of surface functionalization was used as initial step to achieve controlled degradation of PHB, PSU and PU films by entomopatogénico fungo. Treated surfaces were investigated by surface analysis techniques (WCA, FTIR-ATR, XPS, NEXAFS, GPC, Optical Microscopy, SEM, Gravimetry, and Tof-SIMS). After the UV-assisted treatments, new carbonyl groups in new chemical environments were detected on the polymers surface. The oxidizing atmosphere did not allow the formation of C=C bonds, indicating photodegradation reactions are suppressed during or by the treatments, resulting on oxygen grafting in the polymers chains. The higher hydrophilicity and concentration of oxygenated functional groups at the surface of the treated films possibly improved the biodegradation of the films. It was observed a clear increase in the growth of this fungus when oxygenated groups were grafted on the most part of polymers surfaces. This simple methodology can be used to improve and control the degradation rate of polymers films in applications that require a controllabile degradation rate, or on waste manegement of polymeric materials.

1. Introdução

Tanto em aplicações nas ciências dos materiais, quanto em qualquer processo ou fenômeno, seja natural ou artificial, a superfície de um material é o primeiro plano de contato, qualquer que seja a vizinhança. As características superficiais dos diversos materiais tem um efeito muito importante no dia a dia e o uso final depende, fundamentalmente, de propriedades relativas à superfície, como: adesão, atrito, brilho, permeabilidade, molhabilidade, etc. A natureza mostra extensivos exemplos sobre a importância de características superficiais que evoluíram até produzir superfícies com propriedades autolimpantes, autoadesivas, redução do atrito, etc. Em produtos industriais há também um grande impacto das propriedades superficiais no produto final obtido, bastando somente mencionar o Teflon® como um de tantos exemplos. A grande parte de interação entre organismos vivos com qualquer outro corpo dá-se em primeira instância pela superfície. Tão grande é a importância das propriedades superficiais, quanto o empenho dos pesquisadores em controlar e projetar superfícies com propriedades específicas às suas necessidades, tanto com materiais sintéticos como naturais.

Tornar uma superfície funcional é adaptá-la a um dado uso ou processo, de modo a maximizar as propriedades ou resultados requeridos do mesmo. Este preceito é largamente empregado nas indústrias de revestimentos, anticorrosivos, e em muitos processos e instalações industriais, onde se procura evitar o contato de determinado composto ou material com as instalações e maquinários para que um ou outro não se contamine ou degrade. A modificação superficial polimérica segue o mesmo preceito ao tentar adequar superfícies, tanto química quanto morfológicamente, (hidrofóbicas, hidrofílicas, rugosas ou não, aderentes ou não) para aplicações que terão propriedades superficiais muitas vezes distintas e únicas para cada processo, sem que as propriedades químicas e físicas originais do polímero sejam alteradas.

Nos últimos anos técnicas de modificação de superfícies tem recebido grande atenção, como estudos utilizando implantação iônica¹, plasma^{2,3}, enxertia química⁴, radiação UV^{5,6}, VUV⁷, etc. O substancial avanço no conhecimento de processos e de técnicas fotoquímicas, nas últimas décadas, permite enxergar o potencial associado ao uso da luz para transformar de forma controlada uma superfície. O objetivo máximo das modificações fotoquímicas de superfícies é utilizar o fóton como único reagente.⁸ Esse paradigma de modificação superficial fotoquímico está

baseado principalmente no rápido crescimento e compreensão dos fenômenos de manipulação a nível molecular das superfícies de diversos materiais acoplado à extensa base de conhecimento fotoquímico acumulado.

As propriedades que se deseja alcançar, em uma modificação superficial, podem ser dificultadas pela característica ou influência do método de escolha de modificação. Mesmo passível de alcançar o resultado requerido, a nova superfície pode deteriorar-se durante o processo de modificação, seja por degradação química ou térmica, ou então, como um efeito colateral, outras propriedades podem ser modificadas, como a morfologia, ou propriedades térmicas e mecânicas.⁹ Contrária à tecnologia de plasma ou descarga em corona, as tecnologias baseadas na fotofuncionalização além de alcançar uma modificação seletiva não alteram efetivamente a morfologia do material e fornecem superfícies com boa estabilidade.¹⁰⁻¹⁴ A base do processo é a interação do fóton com a superfície do material e o grupo químico que pretende-se enxertar. A energia é absorvida do fóton pelas moléculas que se elevarão a um estado excitado de energia dando início a reação. A eficiência do processo depende da estrutura química dos materiais envolvidos e da energia e intensidade do fóton.⁹

Essa combinação abre novas e promissoras possibilidades de funcionalização superficial com radiação eletromagnética poli ou monocromática com controle da quantidade e tipo de grupos funcionais enxertados na superfície do material.^{10,15-18} O uso de radiação UV em combinação com uma atmosfera gasosa reativa, adiciona vantagens como baixa complexidade e custo experimental, comparado aos tratamentos de tecnologia do plasma, e, ausência do uso de foto-iniciadores que geralmente elevam os custos de produção. A interface de modificação (sólido/gás) é outro atrativo da técnica, pois uma vez que não envolve solventes ou compostos líquidos que poderiam contaminar a superfície (fenômeno da plastificação).^{10,16} O resultado final é uma modificação com controle da química superficial, sem alteração morfológica e livre de etapas adicionais de purificação o que torna este processo atrativo em várias aplicações biotecnológicas que necessitam do controle da química de superfície dos materiais utilizados.

2. Referencial Bibliográfico

Fotofuncionalização de materiais poliméricos

Uma opção interessante para funcionalizar a superfície de um material é o tratamento com radiação eletromagnética. O mecanismo de ação da técnica baseia-se na excitação eletrônica das moléculas, induzindo o rompimento das ligações, podendo gerar radicais que, na presença de outro composto ou monômero, podem formar ligações covalentes, enxertando-se assim novos grupos funcionais nas moléculas.¹⁹ Os processos de fotofuncionalização em atmosfera reativa ocorrem na interface polímero/reagente, porém, o uso de reagentes no estado gasoso e sem o uso de fotossensibilizadores evita problemas de plastificação e contaminação de superfície.^{20,21} Para tanto, é de fundamental importância que os polímeros e reagentes selecionados atendam a um dos seguintes requisitos:

- O polímero deve conter em sua estrutura pelo menos um grupo fotorreativo, ou seja, um sítio na molécula (átomo, ligação, elétron) que ao absorver um fóton de radiação ative-se (excitação, rearranjo, ejeção de elétrons, rompimento de ligação) promovendo um estado metaestável (radical ou íon) que posteriormente em contato com o reagente na atmosfera, forme a ligação química;
- Caso o polímero não possua nenhum grupo fotorreativo, a espécie a ser enxertada deve contê-lo.
- Caso nenhum dos dois (polímero ou espécie à ser enxertada) possuam grupos fotorreativos, pode-se fazer uso de compostos fotossensibilizadores ou foto-iniciadores.

A disponibilidade de diferentes fontes de radiação e o controle do fluxo de energia das irradiações possibilita o ajuste de parâmetros reacionais como a velocidade de iniciação e propagação e a extensão das modificações. Todo o processo dá-se a temperatura ambiente e dispensa-se quase que totalmente o uso de catalisadores, solventes poluentes ou com elevado grau de toxicidade. Pode-se ressaltar também como vantagens a elevada eficiência reacional, o elevado grau de pureza e homogeneidade do produto final e, é claro, a simplicidade experimental, com considerável economia de energia e recursos.⁹ A principal desvantagem é o tempo de irradiação que é relativamente grande (ordem de minutos à horas dependendo da potência da fonte) em relação a técnicas que utilizam os tratamentos com plasma.^{5,22-29}

As vantagens apresentadas pelo tratamento com radiação UV fizeram com que alguns grupos de pesquisa iniciassem a utilização de radiação UV para controlar a formação de espécies radicais na superfície do material e transformar a química superficial de maneira desejada. Alguns estudos utilizando radiação laser³⁰⁻³⁴, lâmpadas de alta potência³¹ ou uma combinação de radiação UV com oxidação com ozônio³⁵⁻³⁷, utilização de radiação UV para produzir superfícies com molhabilidade adaptável ao comprimento de onda aplicado³⁸, melhoria da adesão entre polímeros utilizando a irradiação UV³⁹, síntese de nanopartículas de prata em superfícies poliméricas com propriedades bactericidas⁴⁰ mostram as importantes modificações produzidas pela radiação e a incorporação de diferentes grupos funcionais na superfície. Sem sombra de dúvida, a enxertia induzida por radiação UV é uma ótima ferramenta para a modificação superficial polimérica, especialmente quando se deseja alterar propriedades de superfícies.^{41,42} Tais propriedades como molhabilidade, biocompatibilidade, adesividade estão intrinsecamente correlacionadas com o tipo de grupamento químico enxertado na superfície.⁴³⁻⁵³

A imobilização de proteínas requer tanto superfícies hidrofóbicas quanto hidrofílicas, mas a presença de grupos nitrogenados revela-se imprescindível para a facilitação da formação de ligação peptídica.^{43,54,55} Nahar et al. prepararam uma membrana de celulose foto reativa através da reação de 1-fluoro-2-nitro-4-azidobenzeno, um foto-iniciador com os grupos hidroxila das moléculas celulósicas da membrana. A membrana obtida foi exposta a tratamentos com UV em presença de diferentes soluções contendo diferentes tipos de carboidratos.⁵⁶ A irradiação induziu a uma ligação covalente sem a modificação estrutural dos carboidratos comprovados por testes de imobilização de proteínas seletivas àquelas substâncias.

A maior parte dos trabalhos envolvendo a exposição de materiais poliméricos à radiação UV tem como objetivo o estudo da fotodegradação destes materiais⁵⁷⁻⁷⁰. O efeito da radiação UV, em particular da região do UV próximo (290-400 nm) já é bem conhecida pela comunidade científica. Cabe ressaltar aqui, para o melhor entendimento, alguns aspectos mecanísticos da interação da radiação com materiais poliméricos.⁷¹

O processo de absorção de fóton de radiação UV e as reações desencadeados por este, podem ser resumidas em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Independente do tipo de reação fotoquímica, estas três

etapas estão sempre envolvidas. A Figura 1 traz um esquema resumido destas três etapas.

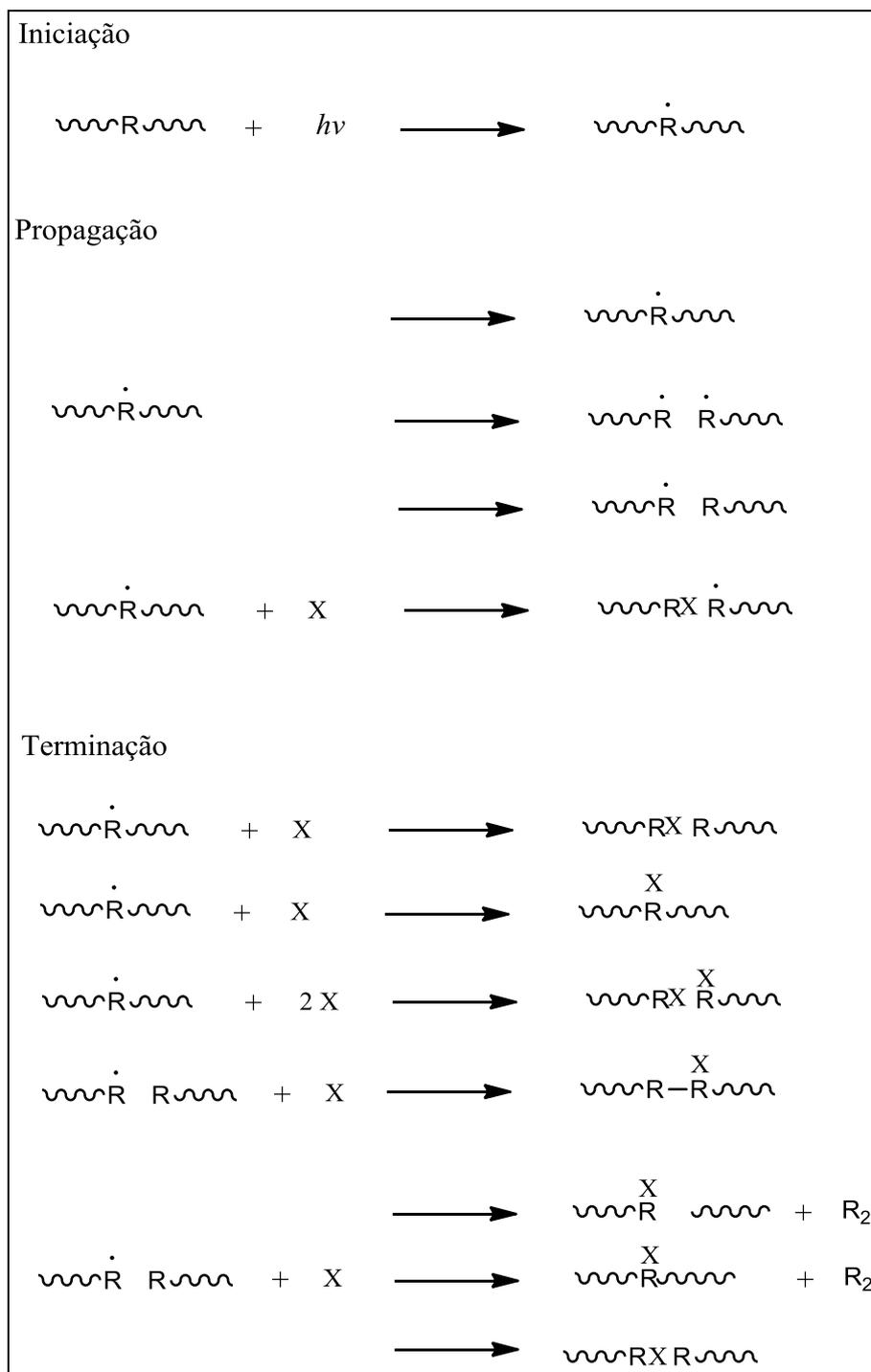


Figura 1. Esquema de reações desencadeadas pela absorção de um fóton de radiação UV por um cromóforo em uma cadeia polimérica.

A iniciação de forma resumida na Figura 1 pode acontecer em diferentes maneiras: direta absorção de um fóton levando o grupo à um estado excitado de maior energia; rompimento de ligações da cadeia polimérica pela absorção de um

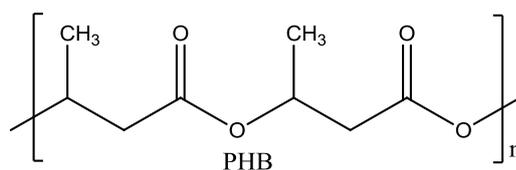
fóton; e clivagem por um fotossensibilizador (neste caso a formação do radical é por forma indireta, onde um composto fotossensível abstrai um átomo de hidrogênio da molécula polimérica, ou transfere um energia à mesma originando um radical).

Um vez formado o radical pode iniciar-se a etapa de propagação. Nesta etapa podem ocorrer vários processos, nos quais as principais reações fotoquímicas se desenrolam. Como se pode observar na Figura 1, a própria molécula polimérica pode sofrer um rearranjo de modo a atingir um nível de menor energia. Neste processo de propagação, outras ligações podem ser quebradas, podendo ocorrer nova abstração de átomos de hidrogênio e a formação de um radical livre, que promoverá a clivagem de outras partes da molécula polimérica. Em presença de um outra espécie (representada pelo X na Figura 1) poderá acontecer a incorporação desta espécie na cadeia polimérica, bem como novos rearranjos, onde novos radicais serão formados.

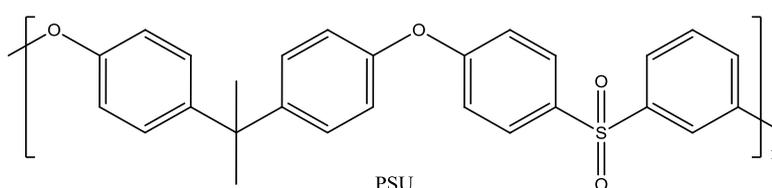
A terminação pode acontecer pela reação do radical formado com outros átomos da cadeia polimérica (abstração de hidrogênio, *cross-linking*), com compostos presentes que não fazem parte da cadeia polimérica, ou rearranjo onde o radical pode combinar-se com outro radical, ou outra espécie, e ser eliminado da cadeia polimérica, geralmente como espécie gasosa. Os produtos finais da terminação vão depender da estrutura química do polímero, do tempo de irradiação, e do comprimento de onda utilizado, na vizinhança da superfície (liquida ou gasosa).

Dependendo da estrutura química do polímero é possível prever algumas etapas do processo. Para fins práticos serão abordados as possíveis reações fotoquímicas que podem ocorrer com os polímeros que foram utilizados neste trabalho.

Dentre os polímeros biodegradáveis, destaca-se o polihidroxibutirato (PHB), que é um polímero natural do tipo poliéster obtido por meio de bactéria que, hiperalimentada com açúcar ou com outra fonte de carbono, armazena energia na forma de poliéster. O PHB pode ser processado como um termoplástico convencional por diversas técnicas para ser utilizado nas mais diversas aplicações, como embalagens, recipientes e materiais descartáveis, com propriedades mecânicas similares às dos plásticos convencionais. O PHB também é estável sob circunstâncias de armazenamento ambientais e durante o seu uso, podendo durar mais de quatro anos em prateleiras e armários.

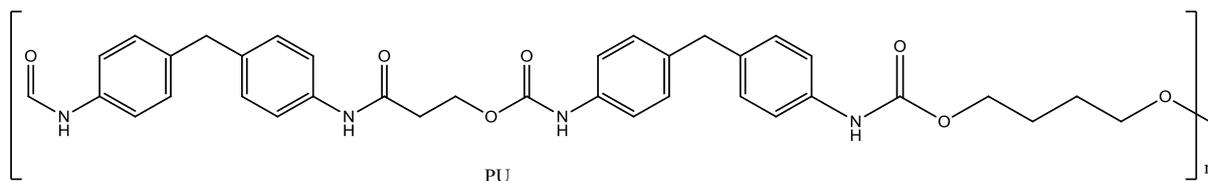


A polissulfona (PSU) pertence à classe dos polímeros termoplásticos e é formada por dois monômeros: difenilsulfona e bisfenol-A. É altamente resistente aos ácidos minerais, álcalis e eletrólitos, em pH variando de 2 a 13, e em muitos solventes não-polares. É resistente a agentes oxidantes, tem alta resistência à compactação, sendo muito utilizada em meios que necessite altas pressões, tem a mais alta temperatura de trabalho de todos os termoplásticos. Sua resistência a altas temperaturas, dá-lhe um papel de um retardante de chama, sem comprometer a sua estrutura. Sua alta estabilidade à hidrólise permite o uso em aplicações médicas que exigem autoclave e esterilização à vapor. Usada na fabricação de membranas para aplicações em hemodiálises, recuperação de águas residuárias, processamento de alimentos e bebidas, separação de gases. Ainda como resina é utilizada na fabricação de peças e equipamento elétricos, médico-hospitalares, domésticos e na indústria automobilística e eletrônica. As modificações químicas feitas na PSU têm como objetivo principal aumentar sua afinidade com a água, melhorando assim as suas propriedades como suporte de membranas de purificação da água e aplicações biotecnológicas.



A Poliuretana (PU) é um polímero que compreende uma cadeia de unidades orgânicas unidas por ligações uretânicas. É amplamente usado em espumas rígidas e flexíveis, em elastômeros duráveis e em adesivos de alto desempenho, em selantes, em fibras, vedações, preservativos, carpetes, peças de plástico rígido e tintas. A poliuretana pode ter uma variedade de densidades e de durezas, que mudam de acordo com o tipo de monômero usado e de acordo com a adição, ou não, de aditivos que podem melhorar a resistência à combustão, a estabilidade química, entre outras propriedades. Embora as propriedades da poliuretana possam ser determinadas principalmente pela escolha do poliálcool (segmento flexível), o

diisocianato (segmento rígido) também exerce algumas influências nas suas propriedades mecânicas.



Como citado antes, os polímeros envolvidos neste trabalho são poliéteres, e com exceção do PHB, que é um poliéster. Tanto em poliéteres quanto em poliésteres, o cromóforo da cadeia polimérica é o sítio carbonílico, e é através dele que as reações fotoquímicas serão desencadeadas. As principais reações fotoquímicas envolvendo este tipo de grupo fotoreativo são as reações Norrish Tipo I e Norrish Tipo II e a abstração de hidrogênio. A Figura 2 mostra o mecanismo de iniciação destas reações fotoquímicas.

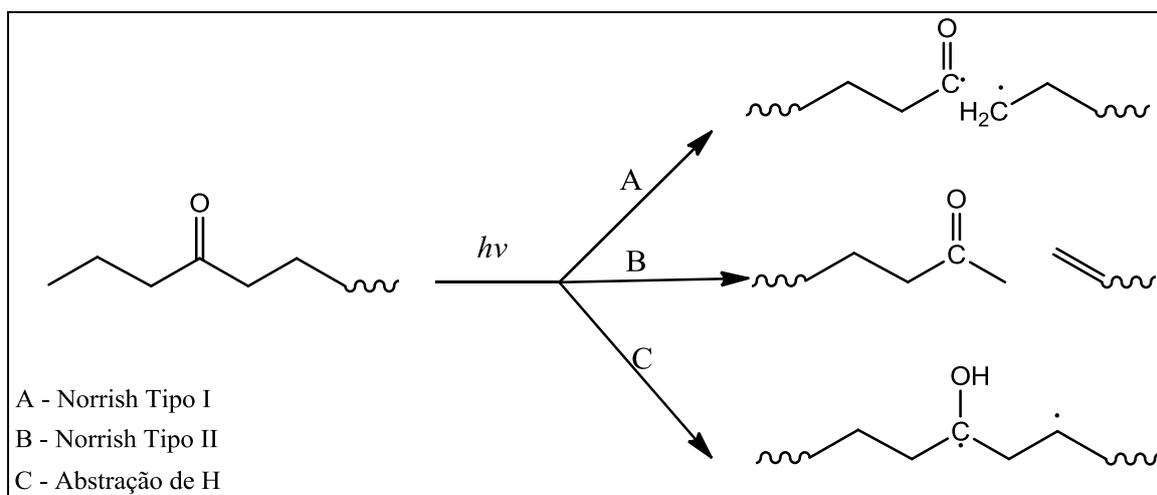


Figura 2. Mecanismo de iniciação das principais reações fotoquímicas envolvendo composto com cromóforo carbonílico.

Na reação Norrish Tipo I, há a formação de um radical pela clivagem da ligação adjacente à carbonila podendo gerar dois radicais. Na reação Norrish Tipo II, há a clivagem da ligação β -carbonila, normalmente acompanhada da formação de uma ligação C=C no carbono não carbonílico onde ocorreu a clivagem. Na reação do tipo abstração de hidrogênio, a excitação da carbonila pela absorção do fóton de radiação UV leva a abstração de um átomo de hidrogênio em posição γ -carbonila,

ou então podendo haver também, no caso dos polímeros a abstração de hidrogênio inter molecular. No caso de um poliéster, estas reações acontecem da mesma maneira, porém a ligação rompida é a O-C na cadeia polimérica. Na PSU o cromóforo da cadeia polimérica passível de funcionalização são as ligações C=C dos anéis aromáticos. Este sítio de funcionalização é passível de formação de radical por excitação de elétrons para um nível energético maior e também a abstração de hidrogênio do anel aromático.¹⁷

Biomateriais e biocompatibilidade

Em 2012 o mercado global de biomateriais atingiu 44 bilhões de dólares, sendo estimado para 2017, 89 bilhões de dólares.^{72,73} Os desafios para os próximos anos e as ideias inovadoras levam à um constante desenvolvimento de produtos que abrangem desde a área de pesquisa básica até o produto final entregue ao consumidor. Embora haja muitas diferentes aplicações e usos para polímeros na área de biomateriais, atualmente a engenharia de tecidos merece grande destaque.⁷⁴ Sendo uma das áreas em que o material utilizado requer grande controle de propriedades físico-químicas, há um grande esforço da comunidade científica no estudo do aumento de biocompatibilidade de polímeros.

Um biomaterial pode ser definido como um material que pretende interagir com sistemas biológicos para tratar, avaliar, reparar, substituir qualquer órgão, função ou tecido de um corpo. Segundo Nair *et. al*, um biomaterial deve ter as seguintes características⁷⁵:

- O material não pode provocar ou sustentar nenhuma resposta inflamatória ou tóxica quando implantado no corpo;
- O material deve ter a capacidade de abrigar vida;
- O tempo de degradação do material deve ser compatível com o tempo necessário ao processo de regeneração;
- O material deve conter apropriadas propriedades mecânicas para a determinada aplicação e a variação destas propriedades mecânicas com a degradação deve ser compatível com as necessidades do processo de regeneração;
- Os produtos de degradação não devem ser tóxicos, ou seja, devem ser propícios a serem metabolizados pelo corpo;

- O material deve ser apropriadamente permeável e possuir boa processabilidade para aplicação requerida.

Nas últimas duas décadas do século XX, houve uma mudança no paradigma de polímeros estáveis para polímeros biodegradáveis, ou seja, próteses bioestáveis estão sendo substituídas por próteses biodegradáveis, que são consumidas conforme o corpo se repara.⁷⁵ O grande desafio de aumentar cada vez mais a biocompatibilidade destes materiais parte de um problema antigo, desde que as primeiras próteses foram utilizadas para substituir ou reparar tecidos danificados: a reação inflamatória. A superfície do material é o primeiro ponto de contato com o corpo, se o corpo reconhecê-la como um elemento estranho, haverá uma forte reação do organismo, desencadeando um processo inflamatório e levando a sérias complicações.⁷⁶ O tipo de interação entre uma superfície e o meio que mantém a interface entre os tecidos vivos, depende de elementos-chaves no meio biológico: proteínas. Uma vez que a conformação e a quantidade de proteínas adsorvidas regulam a resposta celular frente a uma dada superfície, entender esta relação é crucial para o desenvolvimento de novos materiais (Figura 3).⁵⁴ Do mesmo modo, com relação à hemocompatibilidade, quando sangue é aplicado a qualquer material extracorpóreo há a imediata absorção de proteínas séricas (ou do soro). Isto leva à adesão de plaquetas e a coagulação sanguínea causando a trombose. Como as proteínas séricas tem uma maior afinidade com superfícies hidrofóbicas, várias estratégias que buscam a hemocompatibilidade como o recobrimento de superfícies ou a manipulação da sua molhabilidade são as mais utilizadas.⁷⁷

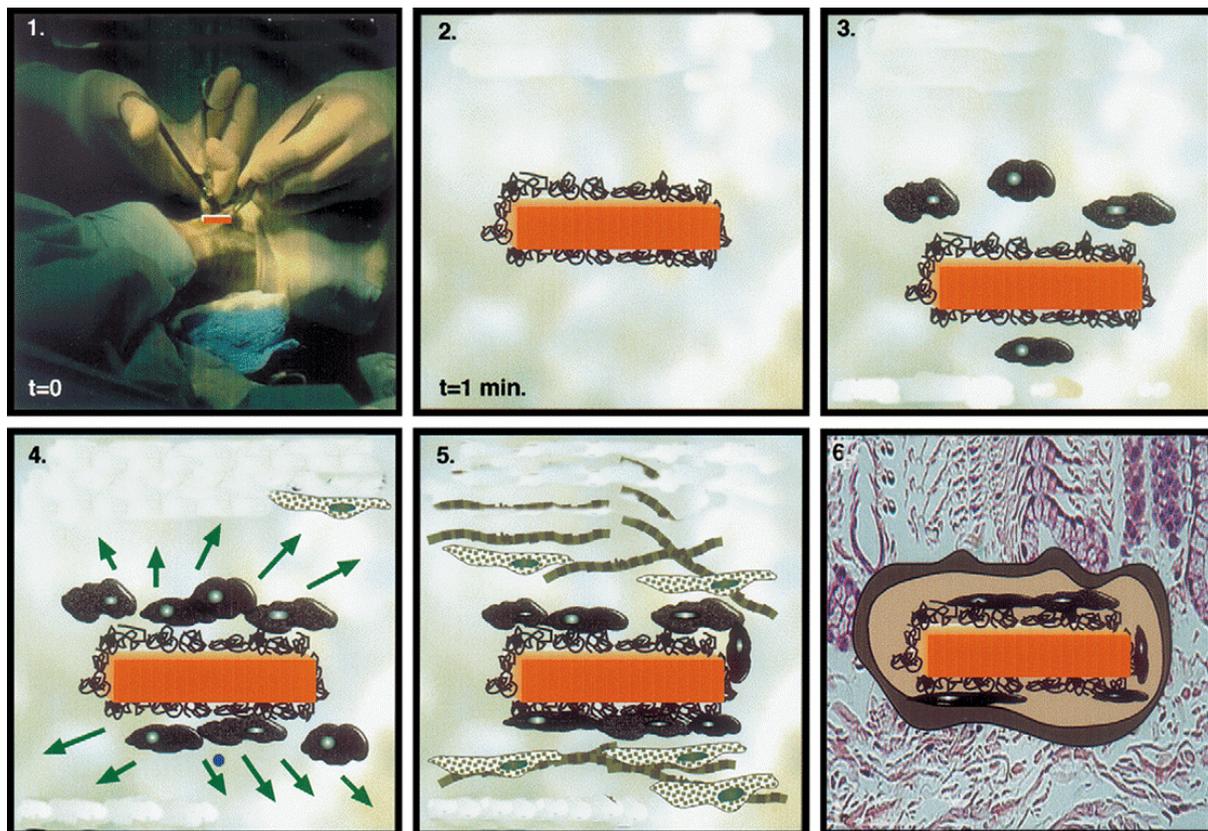


Figura 3. Reação do corpo ao reconhecer um biomaterial como corpo estranho. 1. O cirurgião implanta o biomaterial. 2. Uma monocamada de proteínas se adsorve na superfície. 3. As células interagem com a camada proteica. 4. Células não reconhecem a conformação proteica e começam a secretar agentes sinalizadores. 5 e 6. Começa a síntese de colágeno formando uma cápsula acelular em volta do biomaterial.⁷⁸

Uma vez conhecida a importância da superfície para o problema, várias estratégias tem sido sugeridas. Superfícies poliméricas com propriedades anti-inflamatórias⁷⁹, também com imobilização de compostos bioativos², ou incorporação dos mesmos na matriz polimérica tem conseguido alcançar resultados significativos. Uma grande tendência é o uso de componentes da membrana extracelular para recobrimentos de superfícies⁸⁰, ou materiais inspirados na membrana extracelular em uma tentativa de mimetizar os compostos já encontrados no organismo^{81,82}, porém mesmo respondendo bem ao crescimento celular estes materiais tem certa dificuldade em suprir as necessidades requeridas nas aplicações especialmente quanto às propriedades mecânicas e facilidade de processamento.

O uso de polímeros naturais⁸³⁻⁸⁶ também é uma alternativa que emergiu nos últimos anos, seguindo a ideia de mimetizar moléculas que não seriam reconhecidas pelo corpo como um material estranho, aliado a possibilidade de

metabolização do mesmo pelo corpo com o tempo.⁸² Dentre os polímeros naturais, os polihidroxialcanoatos (PHA) tem mostrado *in vitro* uma ótima biocompatibilidade com diferentes tipos de células, aliados a facilidade de processamento e propriedades mecânicas necessárias para aplicações onde os implantes necessitam de determinada resistência. Estudos como a inserção de grupos oxigenados na cadeia polimérica a partir de copolímeros com o intuito de modificar as propriedades superficiais como molhabilidade e carga de superfície também tem encontrado resultados satisfatórios.⁸⁷ Os PHA's estão sendo utilizados para melhorar a biocompatibilidade em engenharia de tecidos, recobrimento de próteses vasculares, especialmente pela sua degradabilidade no corpo, pois são facilmente suscetíveis a degradação por via hidrolítica.^{75,88} Dentre os PHA's, o PHB mostra grande versatilidade para aplicação biomédica.⁸⁹ Blendas de PHB para reparação de células cartilaginosas conseguiram bons resultados frente outros polímeros naturais.⁹⁰ Modificação por plasma do PHB levou a um maior crescimento celular, principalmente pela modificação morfológica.⁹¹ O uso de PHB, para mimetizar a membrana extracelular através de nanofibras, também tem sido realizado mostrando uma melhor biocompatibilidade.⁹² Neste tipo de polímero a molhabilidade parece ter um importante papel, Chen *et al.* mostraram que superfícies mais hidrofóbicas de PHB podem induzir ao efeito contrário, levando a inibição do crescimento, podendo mesmo vir a ser usado como agente preventor de formação de tecidos.⁹³

Pode-se citar outro grande candidato já bem conhecido na área médica: a PSU. Membranas de PSU são largamente utilizadas em membranas de diálise e hemodiálise, devido a uma satisfatória biocompatibilidade. Alguns estudos mostraram que a superfície destas membranas são sensíveis ao método de esterilização que pode inclusive influenciar negativamente na biocompatibilidade.⁹⁴ Uso da PSU na entrega controlada de drogas também conseguiu recentes avanços⁹⁵. Porém, a estratégia de mimetizar a membrana extracelular através membranas de PSU recobertas pela técnica *layer-by-layer* com quitosana, sulfato condroitina, ácido hialurônico e polissacarídeos não levaram a um acréscimo na biocompatibilidade, inclusive levando ao aumento de expressão de Colágeno Tipo III, que alterará o ambiente de interação celular.⁹⁶

A modificação da superfície da PSU com plasma de O₂ e dopamina melhorou a biocompatibilidade das membranas.⁹⁷ PSU enxertada com polivinilpirrolidona (PVP), conseguiu uma ótima interação celular principalmente nas superfícies com menor

concentração de PVP, onde diferenças na rugosidade da superfície durante condições úmidas mostram diferentes efeitos na resposta biológica.⁹⁸ Ioan *et al.* estudaram a modificação da superfície de PSU com o enxerto de grupos nitrogenados, encontrando uma adesão maior de glóbulos vermelhos, respondendo positivamente à variação da molhabilidade da superfície.⁴⁷

Blendas de PSU e fosfolipídios foram preparadas onde a parte fosfolipídica era a componente principal na superfície dos filmes suprimindo-se a adesão de plaquetas e proteínas na superfície comparadas a PSU sem tratamento.⁹⁹ Redes e blendas de quitina e polissulfona foram estudadas, porém com baixa adesão.¹⁰⁰ Mesmo sendo utilizado em hemodiálise com grande êxito, este tipo de membrana não se mostra compatível com o tecido renal quando se pensa em engenharia de tecidos,¹⁰¹ ou seja, há uma necessidade de melhoria das propriedades deste polímero para seu uso na engenharia de tecidos.

Com quase 50 anos de aplicação na área biomédica, a PU ainda é um dos polímeros mais utilizados e pesquisados para aplicações biotecnológicas, sua moderada biocompatibilidade e propriedades químicas e mecânicas ainda são um grande atrativo na utilização em engenharia de tecidos.¹⁰² Do mesmo modo que nos exemplos citados acima, estudos mostraram que a superfície do polímero, uma vez modificada, altera a resposta biológica. A resposta nem sempre mostra-se positiva, como o exemplo de PU recobertas com prata que ao serem implantadas *in vivo*, apesar de evitar o crescimento de bactérias e fungos, disparavam reações inflamatórias.¹⁰³ A morfologia de membranas de PU também foi avaliada tendo como parâmetro de análise o seu ângulo de contato em água, mostrando que amostras mais porosas e hidrofílicas possuem uma maior biocompatibilidade com as espécies testadas.¹⁰⁴ Aplicações como a regeneração óssea necessitam de um polímero moldável que possa ser customizado as necessidades do hospedeiro do implante e ainda com boas propriedades mecânicas. A obtenção de PU modificada, que somasse às suas propriedades térmicas e mecânicas a possibilidade de degradação corpórea sem que seus subprodutos sejam tóxicos ao organismo seria de grande interesse.¹⁰⁵

Nos três exemplos de materiais citados (PHB, PSU e PU) nota-se que há relevante potencial de suas aplicações na engenharia de tecidos, porém um ótimo desempenho ainda necessita ser alcançado em termos de biocompatibilidade/processabilidade. A manufatura de andaimes ou *scaffolds* destes materiais ainda requerem que suas propriedades superficiais atendam de modo controlado e

específico às necessidades de cada tipo de tecido a ser cultivado ou reparado. Especificidade, simplicidade de um baixo custo de produção são características sempre buscadas pela indústria, em qualquer setor. A versatilidade e seletividade do método de UV assistida nos leva a crer que as superfícies alcançadas por este método são as mais adequadas para a aplicação em uma área tão sensível como a área de biomateriais.

A interação entre um tecido celular e a superfície de um implante é um processo dinâmico. Moléculas de água e íons dissolvidos na água são os primeiros elementos que circundam a superfície de um biomaterial durante os primeiros segundos de contato inicial.³³ A molhabilidade da superfície tem um papel importante na propriedade de adesão das moléculas da membrana extracelular. A adesão dessas moléculas é responsável pela proliferação e diferenciação das células semeadas.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Também foi observado que a adesão celular é determinada pela adsorção e disposição de proteínas extracelulares.¹⁰⁹ Também um fato conhecido que a adesão celular está ligada com o tipo de proteína adsorvida na superfície do implante, e também, que dependerá do tipo de interação entre a proteína e a superfície do implante.⁸⁷ Como foi observado em outro estudo¹¹⁰, materiais hidrofóbicos tem uma alta afinidade com uma vasta variedade de proteínas e rapidamente, após o primeiro contato de um biomaterial com material biológico, as superfícies desses biomateriais são cobertas com uma camada de proteínas do plasma, predominantemente albumina, fibrinogênio, IgG, fibronectina, etc. Essas proteínas aderem fortemente à superfície, o que ocasiona mudanças na sua estrutura tridimensional.

As mudanças conformacionais dessas proteínas adsorvidas são comumente responsáveis pelo disparo de reações adversas do organismo, como processos inflamatórios e coagulação, onde o organismo reconhece o implante como corpo estranho (Figura 4). Também é sabido que, proteínas em geral tendem a se ligar menos em superfícies hidrofílicas do que em superfícies hidrofóbicas e, geralmente, essa adesão proteica não modifica significativamente a estrutura conformacional da proteína.¹¹⁰ Seguindo estes preceitos, pode-se dizer que, quando a célula atinge a superfície, a característica da camada proteica formada ditará a resposta celular, sendo que a característica da superfície do biomaterial influenciará as características da camada de proteínas adsorvidas .

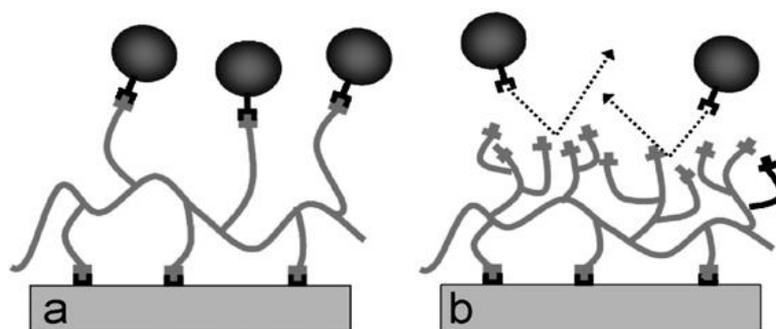


Figura 4. Ilustração simplificada da interação de uma superfície com material biológico. a) A proteína solúvel em uma camada aquosa entre o biomaterial e a superfície polimérica expõe os domínios de forma correta, as células reconhecem como superfície adequada. b) A proteína não exibe a orientação conformacional adequada com a superfície e, conseqüentemente, os domínios não estão expostos na conformação certa, as células reconhecem como corpo estranho e dispara a reação inflamatória.

A adsorção proteica em um superfície em meios fisiológicos envolve dois estágios. Primeiro, as proteínas são diretamente adsorvidas na superfície do material através de vários tipos de interação entre a proteína e a superfície, que é regulada pela química da superfície. Isto ocorre em condições aquosas e haverá a formação de uma única camada de proteínas adsorvidas. Em segundo, proteínas ainda dissolvidas no meio aquoso interagem com a monocamada pré-adsorvida que adequou a sua conformação conforme as características da superfície do material.¹¹¹

A cultura de células nestes materiais implantados é um dos fatores que melhor avalia seu caráter de biocompatibilidade e as técnicas de viabilidade e adesão celular¹¹² oferecem dados qualitativos e quantitativos com relação a possível resposta do corpo frente a estes materiais. Entre a vasta gama de tipos de tecidos e células que podem ser utilizados nos ensaios de adesão e viabilidade celular, uma grande aposta são as células-tronco mesenquimais (MSC). Diferentes de outros tipos de células-tronco, as MSC estão presentes em praticamente todos os tecidos do corpo. Este tipo de célula-tronco adulta é capaz de automultiplicar-se, diferenciar-se em diversos tipos de tecidos celulares e induzir a regeneração de células do tecido danificado pela expressão de fatores de indução e crescimento.¹¹³ Estas células mostram-se muito vantajosas para o uso em engenharia de tecidos pela capacidade de amenizar repostas inflamatórias do organismo frente a um implante ou procedimento operatório promovendo uma cicatrização mais eficiente dos tecidos danificados.¹¹⁴

Considerando os aspectos abordados anteriormente e a eminência de desenvolvimento de materiais cuja a química de superfície possa ser controlada de maneira eficiente e, a experiência prévia do grupo no estudo de modificação de superfícies de materiais poliméricos utilizando radiação eletromagnética,^{10,11,15,17,18,115-117} acredita-se que o uso desta técnica possibilitará a aplicação dos materiais obtidos na engenharia de tecidos. Sendo assim pretende-se investigar a influência da fotofuncionalização de polímeros induzida por radiação UV em presença de atmosfera reativa.

Biodegradabilidade

Todo este potencial de controle de processos e adequação de produtos para uma aplicação específica nos leva ainda a pensar em um problema antigo, do mesmo modo crescente e atual: a degradação de produtos poliméricos. O uso de polímeros, em substituição a qualquer outro material nos mais diversos setores da sociedade, é crescente e exponencial. Sua versatilidade de processamento e propriedades físico-químicas conferem grande durabilidade. Infelizmente, sem o correto manejo e descarte de resíduos, a durabilidade somente agrava o problema. A produção mundial de polímeros em 2011 foi de 235 milhões de toneladas (Figura 5) sendo que deste percentual aproximadamente 12 milhões de toneladas são produzidas na América Latina, com um crescimento que vêm se mantendo em torno de 9% ao ano, desde 1950.¹¹⁸

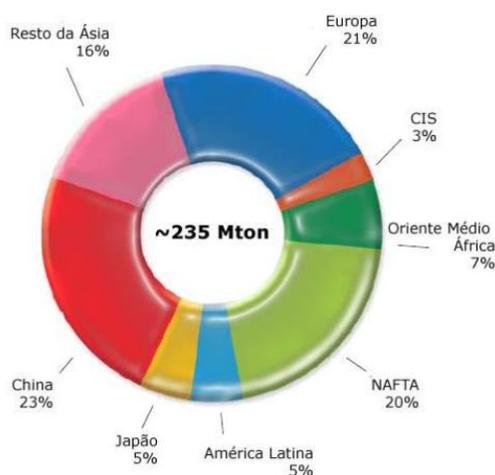


Figura 5. Produção mundial de polímeros em 2011.

Frente a este problema crescente, a comunidade científica volta-se aos polímeros naturais, polímeros que são produzidos ou encontrados na natureza e tenta-se adequar as especificidades destes materiais aos usos que se destinam. Estes polímeros possuem um tempo de degradação mais reduzido em comparação aos polímeros sintetizados a partir do petróleo. Porém, mesmo com um menor tempo de degradação, o equilíbrio entre o que é produzido e o que é degradado em um mesmo espaço de tempo continua extremamente desajustada. No Brasil não há uma política efetiva de reciclagem dos polímeros. Os dados de 2011 mostram que a reciclagem mecânica dos materiais plásticos pós-consumo atingiu a marca média de 21% do total produzido, sendo que a capacidade seria de 37%, levando-se em conta toda a infraestrutura de coleta seletiva e usinas de reciclagem espalhadas pelo país.¹¹⁹

Com relação ao descarte dos materiais poliméricos, três caminhos podem ser traçados para conter o problema: 1. Reciclagem efetiva e abrangente; 2. Desenvolvimento de polímeros “verdes”. 3. Repensarmos totalmente o processo de descarte e degradação de resíduos poliméricos.

É necessário encontrar alternativas ao velho modo de manejo de resíduos, o aterro sanitário. Alternativas que abranjam a maior variedade de materiais poliméricos disponíveis, de modo que acelere a degradação em mesmo ritmo que a produção de novos materiais e talvez também agregue valor econômico ao que é desperdiçado. Muitos esforços tem sido empregados para resolver o problema da acumulação de polímeros, principalmente em encontrar métodos que sejam rápidos, de baixo custo e eficiente para solucionar o problema da disposição destes materiais ao redor do globo. Resumidamente as estratégias pesquisadas para tentar encontrar soluções¹²⁰ compatíveis para a realidade podem ser sumarizadas em:

- Substituição de polímeros sintéticos por polímeros de origem natural e biodegradáveis;
- Blendas de polímeros sintéticos não biodegradáveis com polímeros sintéticos biodegradáveis;
- Pré-tratamento de polímeros que incluem via térmica, eletromagnética (UV, micro-ondas, radiação de alta energia) ou química;
- Cultivo de microrganismos que são mais eficientes na degradação polimérica;
- Incorporação do microrganismo na própria formulação do polímero.

A degradação polimérica pode ser considerada como o resultado de mudanças de propriedades resultante de reações químicas, físicas e biológicas.¹²¹ Pode-se classificar a degradação polimérica dependendo da natureza das reações dos agentes causadores, Singh e Sharma⁷¹ detalham esta classificação em:

- *Degradação Foto-oxidativa*: é o processo de decomposição do material pela ação da luz, e, em geral, é considerada a primeira fonte de degradação de materiais poliméricos quando descartados no meio ambiente. Normalmente, comprimentos de onda da região do UV próximo (290-400 nm) são capazes de induzir a clivagem de ligações. Os segmentos flexíveis das macromoléculas (normalmente amorfas) oxidam-se e tornam-se potencialmente passíveis de hidrólise;
- *Degradação Térmica*: embora similar do ponto de vista de mecanismo de oxidação, a degradação térmica ocorre pela despolimerização da cadeia polimérica, e este processo geralmente começa pelos grupos terminais das cadeias iniciando ciclos de auto-oxidação, iniciados por calor ou até mesmo por radiação eletromagnética. Uma vez iniciada, haverá reações radiculares em cascata levando a formação de diferentes produtos dependendo da estrutura química do material. Normalmente é acompanhada pela evolução gasosa;
- *Degradação Mecanoquímica*: envolve a degradação de polímeros sob stress mecânico e/ou forte irradiação por ultrassom. Quando excessivo estresse é aplicado ao material, a cadeia polimérica quebra e produz um par de radicais que darão início a reações subsequentes. Na presença de oxigênio, a primeira quebra resulta na formação de radicais peróxidos;
- *Degradação Catalítica*: consiste no reaproveitamento de materiais poliméricos pela transformação catalítica em insumos. As poliolefinas são o principal alvo desta degradação. Normalmente envolve a submissão do material à pirólise, com uso de catalizadores como o Pt-Co, Pt-Mo, zeólitas, metais de transição, e hidratos de zircônio.
- *Biodegradação*: processo que envolve a transformação bioquímica dos materiais poliméricos por microrganismos em compostos mineralizados. Ambos processos hidrolíticos e enzimáticos podem contribuir para a degradação em diferentes estágios. A biodegradação inclui todos os tipos de

degradação que ocorrem *in vivo* por reações metabólicas ou não. A biodegradação é o estágio final de degradação do material polimérico no meio ambiente, e o tempo que leva para completar dependerá das condições ambientais em que o material e o microrganismo estão inseridos, das características do microrganismos e da estrutura do polímero.

De acordo com a norma D-5488-54d da ASTM (*American Society for Testing and Materials*)¹²², biodegradação é o termo definido para um processo que é capaz de decompor materiais em CO₂, CH₄, H₂O, compostos inorgânicos ou biomassa, onde o mecanismo predominante é a ação enzimática dos microrganismos. São conhecidos cinco estágios (Figura 6) diferentes envolvidos no processo de biodegradação polimérica, descritos a seguir:

1. *Solubilização*. É quando a hidratação do material polimérico ocorre e, nesse processo, a hidrofiliabilidade é uma característica importante. A hidratação auxilia na hidrólise enzimática-catalítica, além de desestabilizar as estruturas secundárias e terciárias das cadeias poliméricas;
2. *Ionização*. A protonação ou perda de Hidrogênio de um grupo ligado a cadeia polimérica. Pode ser induzida pela variação de pH do meio, ou pela ação de radiação eletromagnética.
3. *Hidrólise*. Normalmente polímeros que contém ou foram capazes de gerar grupos éster ou anidridos nas outras etapas são passíveis de hidrólise. Essa etapa tem grande importância, pois gera produtos de baixo peso molecular. Os poliésteres são considerados polímeros biodegradáveis pela sua facilidade de sofrer hidrólise. A hidrólise é uma etapa não enzimática e ocorre de forma randômica na cadeia polimérica.
4. *Hidrólise enzimática-catalizada*. Neste momento ocorrem reações específicas com os produtos de menor peso molecular formados na etapa anterior. Uma série de reações ocorrem e, normalmente, em meio aquoso. Reações de oxidação e redução, novas hidrólises, esterificação, e síntese, podem ocorrer formando novos produtos para serem assimilados pela célula do microrganismo. Nesta etapa, o microrganismo envolvido reconhece se o substrato pode ser uma possível fonte de carbono e a hidrofiliabilidade aqui é essencial.
5. *Assimilação do microrganismo*. Uma vez obtido os produtos requeridos o microrganismo absorve-os para a continuidade de seu metabolismo.

Nesta etapa ocorre a mineralização com liberação de água e gases para o meio.

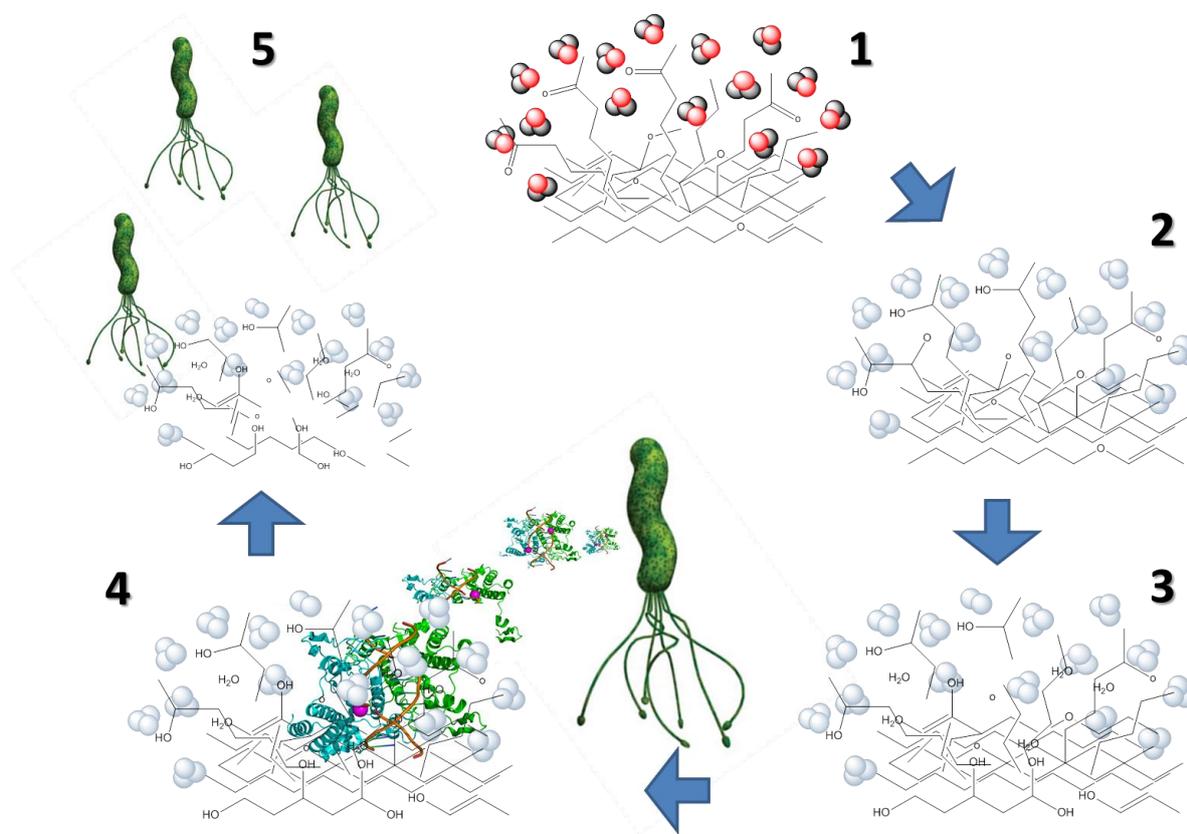


Figura 6. Os cinco estágios do processo de biodegradação.

Neste sentido vários grupos de pesquisadores tem procurado aumentar a biodegradabilidade de materiais poliméricos valendo-se de várias técnicas experimentais. Por exemplo, em um estudo foi obtido melhoria da hidrofiliicidade do PHB por implantação de íons carboxílicos em altas energias de aceleração.¹²³ Modificação química de superfícies de PHB também melhoraram sua degradabilidade¹²⁴, tratamentos com ozônio foram extensivamente estudados com PHB e a sua influência na degradabilidade.³⁶ Darby *et. al*, na década de 60, estudaram mais de 100 tipos de poliuretanas e chegaram a conclusão que poliésteres de poliuretana são mais suscetíveis ao ataque fúngico que poli-éteres de poliuretana.¹²⁵ Amostras injetadas de PHB foram expostas a biodegradação em ensaio de solo simulado obtendo resultados que sugerem uma degradação camada-por-camada satisfatória em três meses.¹²⁶ Amostras de PHB, PHBV e PCL foram submetidas ao cultivo em reator microbiológico obtendo degradação satisfatória após 30, 122 e 200 dias, respectivamente.¹²⁷ A biodegradação de polietileno,

avaliada por compostagem controlada, foi estimulada após a irradiação de baixa dose de radiação UV durante 25 dias.¹²⁸ Copolímeros de lignina e poliestireno mostram ser mais suscetíveis à degradação que o próprio poliestireno.¹²⁹ Filmes de poliésteres aromáticos e alifáticos foram submetidos à degradação em solo, com simulação da ação solar, avaliados durante 40 semanas, e, após a oitava semana, houve uma degradação significativa, avaliada pelas suas propriedades mecânicas.⁵⁹ Alguns dos chamados polímeros verdes podem mostrar, durante o processo de biodegradação, uma redução aparente em massa e volume, porém, em análise mais profunda mostra que a ação da luz, atmosfera e solo pode conduzir a subprodutos que resistem no solo por muito mais tempo ou levam a uma contaminação pior do que somente o polímero como o caso do polietileno oxibiodegradável.¹³⁰

O tipo de técnica utilizada para avaliação da biodegradação é muito importante, dependendo do tipo de avaliação que se deseja. A degradação em solo é uma das técnicas mais utilizadas¹³¹ e faz parte dos métodos recomendados para os testes de biodegradabilidade.¹³² Biodegradação em solo e consórcio de microrganismos é uma interessante alternativa que reflete o tipo de manejo de resíduos mais adotado historicamente, ou seja o aterro controlado.¹³³ Porém, o sucesso da técnica vai depender de outras variáveis que interferem na biodiversidade empregada, como tipo de solo, umidade, compostos, tipo de lama e quantidade de ácidos húmicos, etc.^{36,134,135}

Shimao¹³⁶ traz uma importante revisão sobre diversas classes de polímeros sintéticos e naturais, e baseado em outros estudos, mostra que a principal rota de degradação dos polímeros é, em primeiro momento, a hidrólise, levando à reações subsequentes de quebra de cadeia e formando produtos de baixo peso molecular que serão assimilados por microrganismos. Shah *et al.* também trazem uma excelente revisão¹³⁷ sobre degradação biológica de polímeros. De maneira geral, a ação de qualquer microrganismo sobre uma superfície segue um mesmo caminho: 1. O microrganismo reconhece que o substrato (polímero) ao qual está à disposição, pode ser uma fonte de carbono; 2. Há a secreção de enzimas extracelulares; 3. As enzimas secretadas irão atacar o substrato e promover de quebra do polímero em produtos de baixo peso molecular; 4. Estes produtos de hidrólise serão absorvidos pelo microrganismo que excretará novos compostos e também compostos mineralizados (CO₂, CH₄, H₂O, etc.). Conseqüentemente, esse processo promove a

erosão da superfície e, conforme a característica do polímero, o processo continuará até o completo desaparecimento.¹³⁷

Embora no ambiente, a biodegradação seja desempenhada tanto por fungos quanto por bactérias, a seleção de linhagem de certos organismos e, mesmo, a modificação genética destes pode ser considerada como uma das alternativas mais interessantes. Fungos, em especial, podem produzir diferentes tipos de enzimas que podem atacar uma grande variedade de polímeros.¹³⁸ *Metarhizium anisopliae* é um fungo filamentosso entomopatogênico encontrado em vários ambientes naturais e pode ser um potencial microrganismo degradador de polímeros, secreta uma diversa gama de enzimas lipolíticas e hidrolíticas (proteases, lipases, esterases e chitinases) e, também, produz metabólitos como ácido cítrico e oxálico¹⁸ que podem auxiliar no processo degradativo. Durante o processo de infecção, *M. anisopliae* utiliza essas enzimas para atravessar a cutícula do hospedeiro (artrópodes em geral), os quais possuem uma carapaça de quitina altamente complexa, resistente e hidrofóbica.^{72,139} Este microrganismo também possui uma grande plasticidade podendo infectar mais de 300 espécies de insetos e crescer nas mais variadas condições de cultivo.¹⁴⁰

Entre outras vantagens na utilização deste microrganismo, para a degradação de polímeros está na produção de uma estrutura chamada apressório. Como pode ser visto na Figura 7, essa estrutura é uma diferenciação que ocorre na extremidade da hifa influenciada por baixos níveis de complexos nitrogenados e por condições topográficas, a qual exerce uma pressão mecânica sobre a superfície, sendo responsável também por secreção enzimática. Tão variada e interessante é sua expressão enzimática, que é frequentemente explorada na indústria catalítica.^{139,141}

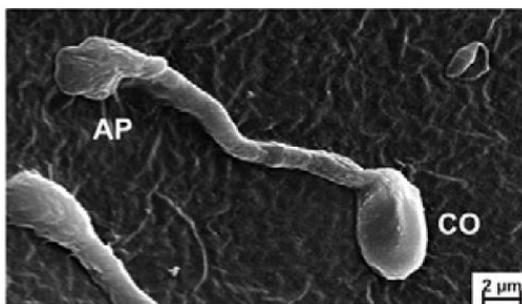


Figura 7. Imagem de microscopia eletrônica de varredura do esporo do *Metharizium anisopliae* em desenvolvimento. As letras CO indicam o esporo, AP indica o apressório. A ligação entre estas duas estruturas chama-se hifa.¹⁴²

Embora várias alternativas de polímeros biodegradáveis e biopolímeros tenham surgido nos últimos anos, algumas barreiras tem imposto limitações para sua adoção na indústria em geral. Um dos principais problemas são os custos envolvidos. A maioria dos polímeros de origem natural, ou blends de polímeros naturais e polímeros sintéticos ainda possuem custo de produção elevados, quando comparados com polímeros derivados do petróleo, tornando-os menos competitivos. Ainda há uma disposição comercial muito limitada de monômeros, o que elevam ainda mais os custos de produção e as opções de aplicabilidade. Outros fatores, como processabilidade, limitação de desempenho, custos e não controle do tempo em que o material começará a degradar, são obstáculos a serem ultrapassados. Polímeros de origem natural como celulose e amido não são passíveis de reciclagem mecânica e possuem baixo valor calorífico para a incineração, restando como forma de descarte o costumeiro aterro sanitário.

Uma grande variedade de polímeros absorve radiação UV solar o que leva à reações fotolíticas, foto-oxidativas e termo-oxidativas, resultando na degradação destes materiais quando expostos no meio ambiente.^{143,144} Há um grande esforço na síntese de novos polímeros para que tornem-se passíveis de biodegradação quando descartados. Uma alternativa bastante estudada nas últimas décadas é o uso de aditivos, que são sensíveis a radiação solar.¹⁴⁵ Porém a vasta maioria das aplicações em que os polímeros são utilizados, necessita de estabilidade frente as interpéries que o material possa ser submetido. Frente a este paradoxo entre viabilizar maior estabilidade ou tornar o polímero facilmente degradável, a questão ambiental sai prejudicada.^{146,147,148}

Considerando todos os aspectos descritos anteriormente, acredita-se que ao modificar uma superfície polimérica seletivamente, ou seja, aumentar a concentração de grupos que potencialmente serão sujeitos à hidrólise e empregando um microrganismo de conhecidas características de ação degradadora na natureza, seria possível não somente acelerar, mas também controlar a velocidade de degradação de polímeros naturais e sintéticos, como uma alternativa metodológica simples e eficaz de manejo de resíduos poliméricos.

Este trabalho procura através de um olhar multidisciplinar, a avaliação da aplicação da metodologia de modificação superficial por UV-assistida em filmes poliméricos, em dois campos potenciais da biotecnologia: materiais para engenharia

de tecidos, tendo como fator de avaliação a adesão e crescimento celular *in vitro*; o manejo de resíduos poliméricos, tendo como fator de avaliação o controle e indução de biodegradabilidade.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Estudar a influência da modificação superficial polimérica induzida por radiação UV em presença de O₂ na interface de biodegradação fúngica e avaliar se o tratamento aplicado aos materiais pode ser utilizado na produção de biomateriais para engenharia de tecidos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliação da influência da modificação superficial polimérica em condições de biodegradação fúngica *in vitro* utilizando duas linhagens diferentes de *Metarhizium anisopliae*;
- Avaliação da biocompatibilidade dos polímeros modificados superficialmente através de ensaios de adesão e viabilidade celular com células-tronco mesenquimais.

4. Parte Experimental

4.1 Preparações dos Filmes

Todos os materiais utilizados foram lavados com uma sequência de três solventes, em ordem crescente de suas polaridades, a fim de remover qualquer contaminação orgânica. Os solventes utilizados foram heptano Synth (99,0%), clorofórmio Fmaia (99,8%) e álcool isopropílico Synth (99,5%). Foram utilizados três polímeros neste trabalho: PU Ellastolan® (BASF®, PU 1185A10) PHB (Sigma Aldrich, UK) e PSU (Sigma Aldrich, USA). Oxigênio 99,99% (Air Liquide Brazil Ltda.) foi utilizado como recebido.

Devido à variedade de técnicas de análise de superfície utilizadas e as especificidade de amostra que cada técnica exige, após vários testes preliminares decidiu-se preparar amostras por duas técnicas diferentes: Filmes de

aproximadamente 60 micrômetros de espessura foram preparados por evaporação simples (*casting*) em placa de Petri conforme as especificações da Tabela 1. Filmes com espessuras médias entre um e dois micrômetros foram preparadas pela técnica de *spin-coating* sobre substrato de vidro conforme as especificações da Tabela 2. Após o preparo, todos os filmes foram armazenados em envelopes de alumínio e mantidos em dessecador até o momento da modificação superficial.

Tabela 1. Concentrações e especificações dos filmes preparados por evaporação em placa de Petri (10 cm)

| Polímero | Solvente | Massa de amostra(g) | Volume solução |
|----------|------------------|---------------------|----------------|
| PHB | Clorofórmio | 0,25 | 50 mL |
| PSU | Clorofórmio | 0,830 | 25 mL |
| PU | Tetrahidrofurano | 0,400 | 50 mL |

Tabela 2. Concentrações e especificações dos filmes preparados por *spin-coating* em discos de vidro (1,5 cm).

| Polímero | Solvente | Concentração | Gotas (0,1mL) |
|----------|------------------|---------------------------------------|---------------|
| PHB | Clorofórmio | $3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ | 10 |
| PSU | Clorofórmio | $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ | 5 |
| PU | Tetrahidrofurano | $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ | 5 |

4.2 Fotofuncionalizações superficiais

As fotofuncionalizações superficiais seguem a metodologia estabelecida por Kessler (2010)¹⁸, porém, em reator modificado devido à necessidade de amostras em quantidades estatísticas. O sistema fotoquímico consiste em: uma fonte de radiação UV de média pressão (400 W), com linhas de radiação de interesse em 254, 265, 280, 302, 313 e 365 nm; entrada de gás com fluxo regulável; um disco de amostra giratório com controle de atmosfera, com capacidade de 32 amostras por vez. Um fluxo constante de $5 \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ de O_2 foi utilizado durante a irradiação, com prévia purga. Finalmente, após as fotólises, as amostras foram lavadas com 500 mL de água deionizada e acondicionadas ao dessecador em envelopes de alumínio.

4.2.1 Caracterização dos filmes

Ângulo de Contato em Água (WCA – *Water Contact Angle*): Através desta técnica é possível determinar o grau de molhabilidade de uma superfície, caracterizando-a como hidrofóbica ou hidrofílica. O WCA de amostras não tratadas e tratadas de todos os polímeros estudados foram medidos à temperatura ambiente 24 horas após os tratamentos usando o método da gota séssil. Uma gota (4-6 µl) de água deionizada foi gentilmente depositada nas amostras usando uma microsseringa e a sua imagem foi fotografada. A gota foi observada diretamente com um microscópio digital. Os valores de WCA reportados são médias de três medidas, realizadas em diferentes áreas de cada superfície. Os valores de WCA foram calculados utilizando o software SurfTens v. 3.0.

Espectroscopia Vibracional no Infravermelho por Transformada de Fourier – Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR – *Fourier Transformed Infra Red Spectroscopy – Attenuated Total Reflectance*): Esta técnica permite a identificação de funcionalidades orgânicas presentes em uma superfície. As análises de FTIR-ATR foram realizadas utilizando um aparelho modelo Alpha-P (Bruker) com um prisma de diamante, a 45 graus e uma resolução espectral de 4 cm⁻¹ e 24 varreduras para cada amostra.

Cromatografia de Permeação em Gel (GPC – *Gel Permeation Chromatography*): Este tipo de cromatografia é muito usado para determinação de características estruturais das cadeias poliméricas como a massa molecular média, o número médio de monômeros, etc. A avaliação da massa molecular média (M_w), e o índice de polidispersividade (PDI) foi realizada por cromatografia de permeação em gel com um cromatógrafo da Central Analítica da UFRGS, modelo Viscotek VE 2001 com detector triplo (Índice de Refração, Viscosimétrico e por Espalhamento de Luz) Viscotek TDA 302, e uso como eluente solvente orgânico THF ou CHCl₃ a um fluxo de 1 mL.min⁻¹ e colunas de PS/DVB a 45 °C.

Espectroscopia de Fotoelétrons de Raios-X (XPS – *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*): As análises de XPS determinam qualitativamente e quantitativamente a química superficial sendo possível a caracterização dos elementos químicos presentes e as ligações químicas de cada elemento. Os espectros de XPS foram obtidos principalmente no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas. Utilizando as instalações da linha de luz SGM (*Spherical Grating Monochromator* - 250–1000 eV). Foi utilizado um analisador

hemisférico Perkin Elmer 10-360. Os espectros foram obtidos com um passo de energia de 58.6 eV (E_e : 700 eV) para as análises de varreduras iniciais e 23.5 eV de energia de passo (E_e 380 eV) para os espectros de alta resolução de cada elemento. Alguns dados foram obtidos no Laboratório de Superfícies e Interfaces Sólidas (LASIS-UFRGS), utilizando um aparelho de XPS equipado com um analisador hemisférico de sete *channeltrons* (Omicron N.T. GmbH, Germany). A fonte de excitação foi a radiação $K\alpha$ - Al (1486.6 eV). Os passos de energia utilizados foram de 50 eV e 10 eV, respectivamente para as varreduras iniciais e os espectros de cada elemento. A posição do sinal correspondendo a ligação C-C do C1s foi utilizada como energia de calibração (285 eV). Os espectros obtidos foram ajustados após a subtração da linha de base (Shirley) utilizando a construção de curvas Gaussianas-Lorenzianas obtidas pelo software Casa XPS.

Espectroscopia de Absorção de Raios-X de Estrutura Fina da Pré-Borda (NEXAFS – Near Edge X-Ray Absorption Fine Spectroscopy): Esta análise fornece informações complementares a técnica de XPS e possui uma grande resolução para diferenciação das ligações químicas e o meio ao qual se encontram. As análises de NEXAFS foram realizadas no LNLS, utilizando as instalações da linha de luz SGM (*Spherical Grating Monochromator* - 250–1000 eV), onde possui uma resolução espectral ($E/\Delta E$) em torno de 2000, utilizando um monocromador na fonte de fótons. Todas as análises foram realizadas em câmara de ultra alto vácuo, com uma pressão não superior a 10^{-7} Pa. As amostras foram posicionadas diretamente ao manipulador usando uma fita condutora de dupla face. O feixe de radiação foi desfocado para obter um diâmetro final de 5 mm. Não houve carregamento significativo das amostras durante os experimentos. Os espectros NEXAFS foram obtidos pelo rendimento total de elétrons (TEY – corrente de elétrons gerada na amostra) simultaneamente com o monitor do fluxo de fótons (grade de Au).^{17,149} Os dados obtidos foram normalizados para corrigir as flutuações da intensidade do feixe. O ajuste dos espectros NEXAFS foram obtidos utilizando o software BGAUSS (BGAUSS Version 3.05)¹⁵⁰ seguindo o procedimento descrito detalhadamente por Weibel *et al.*¹⁷

Espectrometria de Massas de Íons Secundários por Tempo-de-Voo (TOF-SIMS): A técnica permite a informação química quantitativa e qualitativa de superfícies bem como é capaz de fornecer juntamente a informação química-espacial das superfícies estudadas. A Espectrometria de massas de íons

secundários por tempo-de-voou (Time-of-flight Secondary Ions Mass Spectrometry) é uma técnica de espectrometria de massas que utiliza um feixe de íons primários para gerar fragmentos ionizados na superfície de uma amostra sólida, para então analisar estes fragmentos pela sua relação massa-carga (m/z). Todas as análises foram feitas utilizando um sistema descrito como "BIOTOF" Braun, Blenkinsopp *et al.*¹⁵¹ O sistema é equipado com um canhão de íons primários de C_{60}^+ . Todos os espectros das amostras foram adquiridas tanto no modo positivo quanto no modo negativo, utilizando como energia de feixe primário de 20 keV, e mantendo-se uma corrente na amostra de 60 pA. Para evitar o carregamento da superfície das amostras, foi utilizado um canhão de elétrons de 15eV de energia no modo pulsado mantendo-se uma corrente em torno de 2nA. Em todos os casos, a dose de íons primários foi mantido abaixo de 1×10^{12} íons /cm² e a dose de elétrons foi em um nível abaixo de qualquer dano significativo. As análises de Tof-SIMS foram parte do projeto de doutorado sanduíche (CAPES/PDSE) intitulado "Espectrometria de massas por íons secundários por tempo-de-voou", desenvolvido durante o período de março de 2012 a março de 2013, no Surface Research Analysis Centre – Manchester Institute of Biotechnology, University of Manchester – Inglaterra. Sob a orientação do Prof. Nicholas Paul Lockyer e Prof. John C. Vickerman. Do total de análises efetuadas, foram obtidos um grande volume de dados (mais de 2000 espectros de massas). O principal objetivo do projeto era o ganho de experiência para transferência de tecnologia, para o Laboratório de Fotoquímica e Superfícies.

4.3 Ensaio de Adesão e Viabilidade Celular

Todos os testes biológicos desta seção foram resultado da colaboração para o uso de estrutura e pessoal do Laboratório de Hematologia e Células Tronco, localizado na Faculdade de Farmácia da UFRGS. Os protocolos já estão estabelecidos pelo grupo.¹⁵²

4.3.1 Caracterização e isolamento das células tronco mesenquimais

O protocolo de Bernardi *et al.* foi utilizado para isolar a polpa dentária.¹⁵³ A extração de dentes decíduos foi realizada na Faculdade de Odontologia da UFRGS com a assinatura do termo de consentimento pelos responsáveis dos pacientes, de

acordo com a aprovação do Comitê de ética da UFRGS registrado sobre o nº 296/08.

Após a extração, todos os dentes foram imersos em 1 mL de meio de cultura DMEM (Sigma Aldrich), 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 mg/mL de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina (Gibco) e 0,45 mg/mL de gentamicina (Gibco) em temperatura ambiente para o transporte para o laboratório. A polpa foi então separada do tecido dental em condições estéreis, picada e incubada a 37°C durante 60 min, tamponada com 0,2% de colagenase tipo I (Gibco). A suspensão celular resultante foi semeada em placa de 12 poços. O meio de cultura foi trocado após 24 horas e depois disto, a cada 3 dias. Quando a cultura alcançou 90% de confluência, foi realizada a passagem usando Tripsina-EDTA 0,5% (Sigma-Aldrich)

As células foram mantidas em cultura até a quinta passagem e também após os experimentos serem realizados. Neste momento, a caracterização das células foi realizada pela diferenciação de adipócitos, condrócitos, osteócitos por imunofenotipagem. As células obtidas foram imunofenotipadas com os anticorpos CD14, CD29, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD184, HLA-DR (PharMingen-BD Biosciences), e STRO-1 (Santacruz) e marcadas com FITC ou PE (corantes fluorescentes). Apenas células vivas foram analisadas enquanto as células mortas (positivas para 7AAD(7-amino actinomicina D, Initrogen) foram excluídas). A aquisição das leituras foi realizada com um citômetro de fluxo, modelo FACSAria (BD Biosciences).

4.3.2 Ensaio de adesão celular

Aproximadamente 45000 células foram semeadas em cada filme e comparadas com o grupo controle. O grupo controle foram as células cultivadas diretamente na superfície de placa de cultura, o que se conhece como o melhor parâmetro para o cultivo de células. Três diferentes culturas de células-tronco mesenquimais foram usadas e todos os experimentos foram feitos em triplicata. Após seis horas de cultivo as células foram coradas com o marcador de núcleo celular 4',6-diamidino-2-phenilindol (DAPI). Após, as amostras foram observadas em microscópio óptico e fotografadas em nove pontos randômicos em uma área de $97,2 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ e então a média de células por matriz foi calculada. O resultado foi expresso com número médio de células por grupo.

4.3.3 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio colorimétrico MTT é baseado na habilidade de células vivas em reduzir o brometo de 3 - [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 difeniltetrazólio (MTT) pela ação da succinato desidrogenase mitocondrial em células vivas e ativas. As medidas foram feitas em triplicata no primeiro, segundo e sétimo dia de cultivo das células nos filmes. Três diferentes culturas (linhagens) de células tronco foram utilizadas, um total de 45000 células foram semeadas nas superfícies dos filmes e após determinado tempo as células foram incubadas com 0,25 microgramas/mL de solução de MTT em tampão CMF por duas horas. Dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado para dissolver os cristais formados e então a concentração dos mesmos foi determinada por espectrofotômetro modelo Wallac EnVision (Perkin Elmer) em dois comprimentos de onda: 560 nm e 630 nm. Os resultados foram calculados com a diferença entre as leituras em 560 nm e 630 nm, e expressas como o valor médio da triplicata por grupo.

4.3.4 Análise Estatística

Os resultados dos ensaios de adesão e de viabilidade celular foram expressos como médias e seus desvios padrões. As análises de adesão foram verificadas pelo teste estatístico ANOVA (one way) e pela verificação Tukey. As análises de viabilidade celular foram verificadas por grupos (*Hotelling*) com uma verificação *post-hoc* de Tukey . O nível de confiança estabelecido foi de 95%. Estes resultados foram gerados por SPSS versão 16.0.

4.4 Testes de Biodegradação

Todos os testes de biodegradação desta seção foram resultado da colaboração para o uso de estrutura e pessoal do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, do Departamento de Biologia Molecular, localizado no Centro de Biotecnologia da UFRGS.

4.4.1 Linhagens utilizadas e manutenção

Duas linhagens do fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae* foram selecionadas: CG97 e E6. A linhagem E6 foi isolada de *Deios flavopicta* (Homoptera:Cercopídea), oriunda do Espírito Santo, já a linhagem CG97 foi isolada de *Coleopteros*, oriunda de Brasília. Para manutenção destas linhagens foi utilizado Meio Cove Completo (MCC) (glicose 1%; nitrato de sódio 0,6%; peptona 0,2%; extrato de levedura 0,05%; triptona 0,15% e ágar 1,5%). Após esterilização em autoclave foram adicionados 2% de solução salina (KCl 2,6%; MgSO₄.7H₂O 2,6%; KH₂PO₄ 7,6% (m/v)) e 0,04% de solução de elementos traços (Na₂B₄O₇ 0,004%; CuSO₄ 0,04%; FeSO₄ 0,001%; MgSO₄ 0,08% e ZnSO₄ 0,08% (m/v)), previamente preparadas e esterilizadas em autoclave. As culturas foram incubadas em estufa a 28°C por sete dias e armazenadas a 4°C.

4.4.2 Suspensão de esporos de *M. anisopliae*

A suspensão de esporos das duas linhagens (E6 e CG97) foram repicadas em placas de Petri contendo um meio de mínimos nutrientes (MCM), a partir de colônias estoque do fungo, por aproximadamente sete dias à 28°C. Após a incubação de sete dias, os esporos foram ressuspensos em solução estéril de Tween 80 0,01%, com auxílio de uma alça de Drigalski. A suspensão foi então centrifugada por 5 min a 7000 rpm, lavada com água destilada estéril centrifugada novamente. Em seguida os esporos foram ressuspensos em água estéril em aproximadamente 5 mL. Após a ressuspensão os esporos foram contados em câmara de Neubauer.

4.4.3 Condições de cultivo para testes de degradação de polímeros

Os testes foram realizados em placas de Petri de vidro, previamente esterilizadas em autoclave, contendo meio MCM, ou água-ágar (H₂O) (ágar 1,5% (m/v)), após esterilização dos meios em autoclave foram adicionadas solução de sais e solução de elementos traços.

Os polímeros a serem testados foram previamente pesados e esterilizados com etanol 70%. Após a secagem, essas amostras foram depositadas sobre o meio de cultura, com a adição de solução contendo 10⁷ esporos. Nas amostras controles não houve adição desta solução. Os sistemas assim montados foram incubados à

28°C por 10 e 20 dias quando continha PHB e, por 30 e 60 dias quando continham PU e PSU.

4.4.4 Remoção dos microrganismos

Após os períodos de incubação as amostras foram retiradas dos cultivos e lavados com Etanol 70%, após secos a temperatura ambiente, as amostras foram levadas a ultrassom com 50 mL de água deionizada para cada amostra.

4.4.5 Caracterização pós-degradação

Gravimetria: A gravimetria consiste na análise da perda da massa ocasionada, nesta situação, pela ação do microrganismo sobre o polímero. As amostras foram pesadas em Balança FQ112 (RADWAG220/C/2 - peso mínimo 10mg com erro de 1mg) antes e após a incubação com fungo. Após a incubação as amostras foram lavadas, secas e pesadas até que houvesse estabilidade no peso na terceira casa decimal da balança. A porcentagem de redução foi alcançada tomando-se a diferença entre a massa inicial das amostras não degradadas e a massa final, dividindo-se este resultado pela massa inicial.

Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier – Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR): mesmo citado no item 4.2.1

Cromatografia de Permeação em Gel: mesmo citado no item 4.2.1

Microscopia Óptica: As análises foram realizadas com uma magnificação de 40 vezes em microscópio óptico Zeiss – modelo Axioskop 4o.

Microscopia Eletrônica de Varredura: As análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS. Amostras metalizadas com ouro foram analisadas com microscópio eletrônico de varredura JEOL – modelo JSM 6060, com feixe de 8-10 kV e magnificações variadas entre 500 e 10000 vezes.

Espectrometria de Massas de Íons Secundários por Tempo-de-Voo: mesmo citado no item 4.2.1

5. Resultados e Discussões

5.1 Caracterização química das superfícies modificadas

Os valores de WCA citados na Tabela 3 mostram que as irradiações levaram a redução dos ângulos de contato dos três tipos de polímeros. PHB e PSU obtiveram uma redução mais drástica sendo que após 180 min de tratamento suas superfícies são consideradas praticamente superhidrofílicas. Já para a PU houve uma redução menos acentuada obtendo-se para 120 min de tratamento um valor de WCA de 31 graus.

Tabela 3. Valores de WCA para amostras não tratadas e tratadas nos tempos de irradiação indicados.

| Tempo de Tratamento (min) | Nome da amostra | WCA (°) médio | Desvio (±) |
|---------------------------|-----------------|---------------|------------|
| 0 | PHB | 72 | 0,6 |
| 60 | PHB60 | 40 | 0,1 |
| 180 | PHB180 | 12 | 0,1 |
| 0 | PU | 92 | 0,5 |
| 30 | PU30 | 43 | 1,2 |
| 120 | PU120 | 31 | 0,5 |
| 0 | PSU | 80 | 0,1 |
| 30 | PSU30 | 32 | 2,0 |
| 120 | PSU120 | <10 | 1,3 |

As análises de FTIR-ATR vem a confirmar o que foi observado nas análises de WCA. As Figuras 7, 8 e 9 mostram os espectros de FTIR-ATR dos polímeros sem tratamento e polímeros tratados nos tempos de irradiação indicados. A inserção de grupos oxigenados nos três polímeros é bem clara. Na Figura 7, pode-se notar que para 60 min de irradiação não há uma modificação evidente no espectro. Para a amostra de PHB 180 há uma modificação mais evidente, como do pico com valor mínimo de transmitância em 1718 cm^{-1} correspondente ao estiramento do grupo C=O, ao acréscimo de sinal em um ombro deste mesmo em 1680 cm^{-1} , também correspondente a outro estiramento de grupo C=O.¹⁵⁴ Há também uma forte modificação de outros sinais, principalmente correspondentes aos grupos éster localizados em 1450 cm^{-1} e 1041 cm^{-1} .¹⁵⁴ Este aumento de bandas e picos localizados em frequência de estiramentos de grupos oxigenados e a redução de

WCA mostram a inserção de novos grupos oxigenados na superfície das amostras de PHB, conferindo o caráter hidrofílico

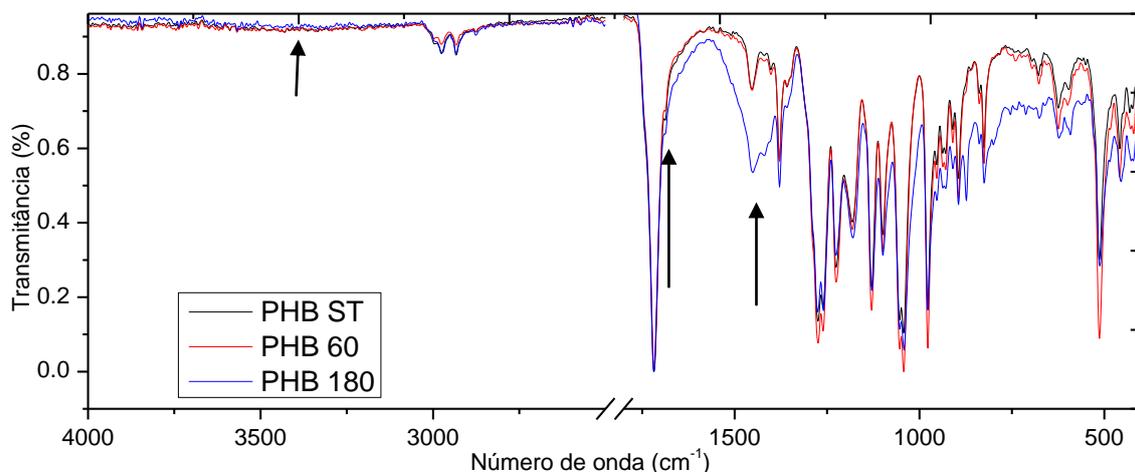


Figura 7. Espectros de FTIR-ATR das amostras de PHB não tratadas (ST) e tratadas com O₂ em presença de UV durante 60 e 180 min. Setas indicam mudança de intensidade ou modificação na banda.

A Figura 8 mostra os espectros de FTIR-ATR das amostras de PSU não tratadas e tratadas com O₂ em presença de radiação UV durante 30 e 120 min. Nestes podemos observar claramente que quanto maior o tempo de tratamento, maior é a funcionalização da superfície de PSU. Nos tratamentos de PSU 30 e PSU 120 há o surgimento da banda localizada em 3600-3100 cm⁻¹, característica de estiramento de grupos OH, e também o acréscimo de uma banda entre 1720 e 1680 cm⁻¹ característicos de estiramento de grupos C=O. ¹⁶ Há também modificação de sinais em 967, 947, 920, 795, 756 e 713 cm⁻¹ que normalmente indicam típica substituição no anel aromático.

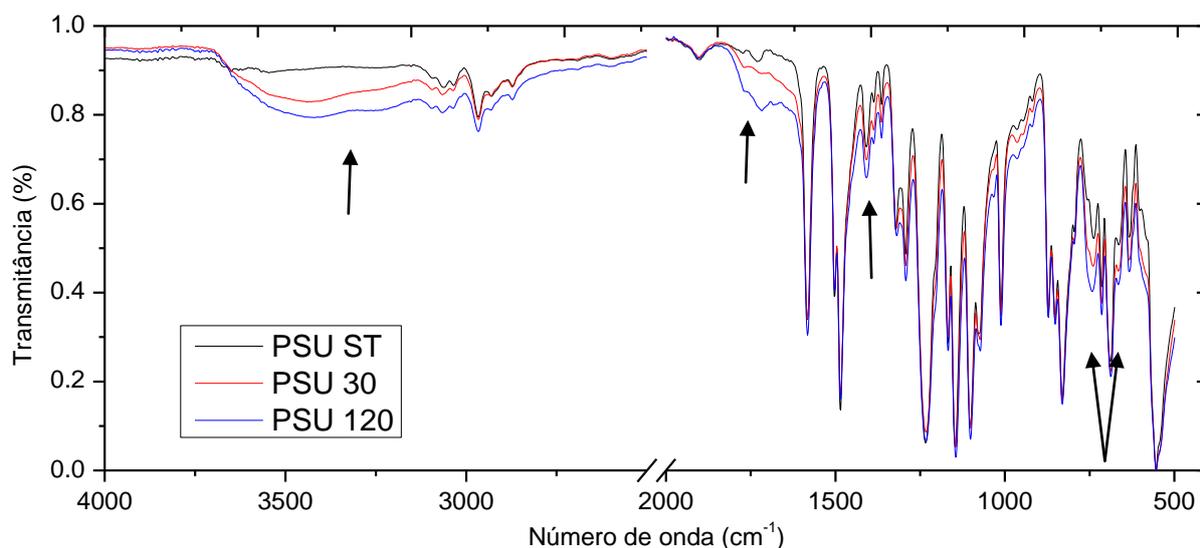


Figura 8. Espectros de FTIR-ATR das amostras de PSU não tratadas (ST) e tratadas com O₂ em presença de UV durante 30 e 120 min. Setas indicam mudança de intensidade ou modificação na banda.

Do mesmo modo há evidência da funcionalização das superfícies de filmes de PU tratados com radiação UV em presença de O₂, indicados na Figura 9. Os espectros de FTIR-ATR mostram o mesmo comportamento anterior de inserção de grupos oxigenados na superfície do polímero. Levando a superfície a adquirir um caráter hidrofílico após os tratamentos.

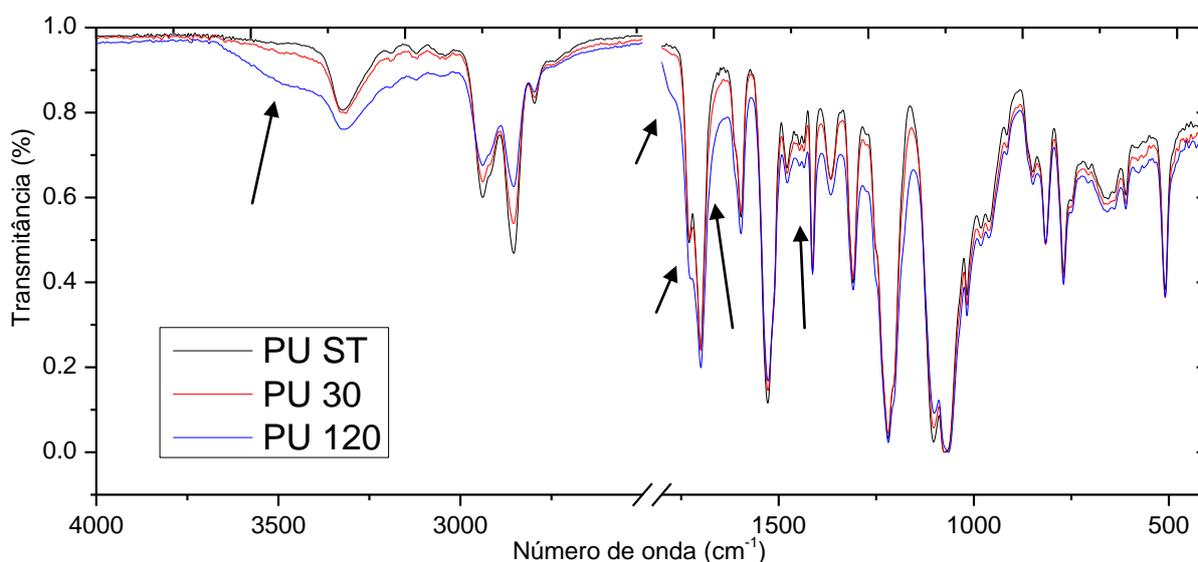


Figura 9. Espectros de FTIR-ATR das amostras de PU (ST) não tratadas e tratadas com O₂ em presença de UV durante 30 e 120 min. Setas indicam mudança de intensidade ou modificação na banda.

As análises de XPS trazem uma melhor compreensão do tipo de grupamentos oxigenados que foram enxertados nas superfícies dos filmes. A composição elementar da superfície de cada amostra está detalhada na Tabela 4, extraídos dos espectros *survey* que podem ser visualizados nas publicações.^{10,11,16,18,155}

Pode-se notar a partir dos dados da Tabela 4 que quanto maior é o tempo de tratamento, maior é a percentagem do sinal de O 1s. Do mesmo modo há o decréscimo do sinal de C 1s, e os sinais de Si 2p, S2p e N 1s não sofrem muita alteração, possivelmente indicando o sítio de ação dos tratamentos não afeta estes grupos na molécula do polímero.

Pode-se observar comportamentos bem distintos para cada polímero observando a mudança nas porcentagens dos componentes do sinal de C 1s indicados na Tabela 5 (Os espectros constam nas publicações^{10,11,16,18,155}). Os dados referentes ao PHB na amostra sem tratamento há a presença de 60% de sinal correspondente as ligações C-C, 21% de ligações C-O e 19% de ligações C=O. Logo após o tratamento de 60 min há uma rápida conversão das ligações C=O em um novo grupo CO. As ligações C-C aumentam e as ligações C-O sofrem um pequeno decréscimo. A partir da estrutura da molécula de PHB e o comportamento conhecido na literatura de polímeros para irradiação UV de baixa dose pode-se sugerir que há a formação de cruzamento de cadeias por uma excitação do grupo C=O, havendo o surgimento de grupos CO diferenciados em termos de eletronegatividade e deslocamento químico dos grupos oxigenados já presentes no polímero. Para 180 min de tratamento esta tendência continua, porém com um decréscimo da contribuição de ligações C-C. A resolução do aparelho não nos permite no caso do PHB diferenciar no ajuste do espectro as ligações C-C e C=C, porém baseado nos dados de FTIR-ATR acredita-se que a formação de ligações duplas não estaria acontecendo, porém esta dúvida é esclarecida nos dados de NEXAFS e Tof-SIMS que serão discutidos adiante.

Tabela 4. Composição elementar em percentagem das amostras não tratadas de PHB, PSU e PU e tratadas na presença de radiação UV em presença de O₂.

| Amostra | Composição elementar (%) | | | | |
|---------|--------------------------|------|------|------|------|
| | Si 2p | S 2p | C 1s | N 1s | O 1s |
| PHB | 3,4 | - | 69,3 | - | 27,3 |
| PHB60 | 4,0 | - | 64,5 | - | 31,5 |
| PHB180 | 9,6 | - | 54,6 | - | 35,7 |
| PSU | - | 3,3 | 85,8 | - | 10,9 |
| PSU30 | - | 2,2 | 84,8 | - | 12,9 |
| PSU60 | - | 2,8 | 77,5 | - | 19,7 |
| PSU120 | - | 3,6 | 75,6 | - | 20,8 |
| PU | - | - | 88 | 2 | 10 |
| PU15 | - | - | 85 | 2 | 13 |
| PU60 | - | - | 82 | 3 | 15 |
| PU120 | - | - | 76 | 3 | 20 |

O cálculo da seção de choque foi considerado para correta proporção dos elementos.
Os valores foram corrigidos por tabelas de valores R.S.F.

Ainda segundo os dados da Tabela 5, pode-se observar um comportamento de funcionalização diferenciado para PSU. Há uma efetiva conversão de grupos de ligações C=C em ligações oxigenadas, sendo que há uma superfície composta predominantemente por grupos C-O para a amostra de PSU 30 e para PSU 120 quase não há presença de ligações C=C e há um balanço diferenciado na composição da superfície entre a amostra de PSU 30 e PSU 120. Para PSU 30, conforme mostrado o somatório de ligações oxigenadas mostra a presença de 43% de contribuições de sinal vindas de ligações com grupos oxigenados, sendo eles em maioria C-O e C=O. Na amostra de PSU 120 há uma presença menor de grupos C=O e C-O, refletido também no somatório de grupos oxigenados, de 27%, e na maior presença de ligações C-C. Estas diferenças estão basicamente ligadas ao sítio de funcionalização da PSU, que serão discutidas após a apresentação de dados de NEXAFS e Tof-SIMS.

Tabela 5. Grupos funcionais e suas relativas intensidades a partir do ajuste do sinal de C 1s para amostras não tratadas de PHB, PSU e PU e tratadas com radiação UV em presença de O₂.

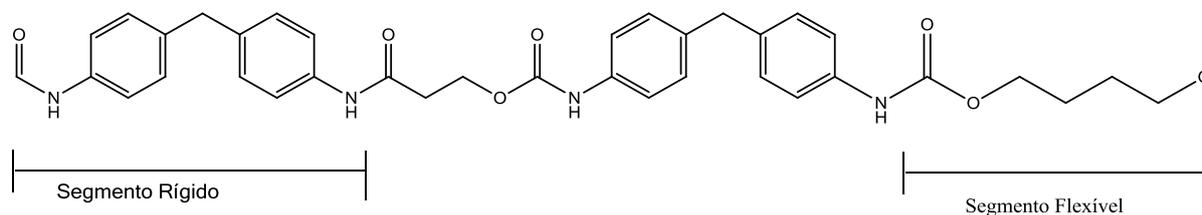
| Amostra | Grupos funcionais (%) – C 1s | | | | | | | |
|---------|------------------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|------------------|
| | C=C | C-C | C-N | C-S | C-O | C=O | COO | ΣCO _x |
| PHB | - | 60** | - | - | 21 | 19 | - | 40 |
| PHB60 | - | 62** | - | - | 18 | 11 | 9* | 38 |
| PHB180 | - | 59** | - | - | 20 | 11 | 10* | 41 |
| PSU | 15 | 54 | - | 13 | 18 | - | - | 18 |
| PSU30 | 20 | 28 | - | 9 | 27 | 11 | 5 | 43 |
| PSU60 | 12 | 41 | - | 9 | 17 | 5 | 16 | 38 |
| PSU120 | 1 | 61 | - | 11 | 17 | 5 | 5 | 27 |
| PU | 19 | 37 | 20 | - | 18 | 5 | 1 | 24 |
| PU15 | 20 | 39 | 20 | - | 12 | 4 | 5 | 21 |
| PU60 | 21 | 34 | 21 | - | 13 | 6 | 5 | 24 |
| PU120 | | 76** | | - | 16 | 5 | 3 | 24 |

* Corresponde não especificamente a grupos COO mas uma espécie diferente de grupo CO, com caráter eletronegativo diferenciado dos demais grupos CO do PHB.

** Corresponde as amostras que foram analisadas no LASIS – UFRGS.

ΣCO_x Corresponde a soma dos grupos oxigenados que compõe o sinal da C 1s.

Contrária a PSU, onde o sítio de funcionalização é o anel aromático, a PU exibe um comportamento diferenciado. Segundo os dados do ajuste de sinal do C 1s, as ligações C=C parecem não sofrer muita alteração durante os tratamentos, assim como o somatório da ligações oxigenadas. Para a amostra PU tratadas há uma clara conversão de ligações C-O em COO, juntamente com a diminuição de C=O e após 120 min de tratamento há uma recuperação do sinal de C-O e C=O, porém com retenção de grupos COO. Este comportamento provavelmente se deve a característica da molécula de PU. A funcionalização se dá no seguimento flexível do poliéter de PU.



Uma rápida abstração de hidrogênio por foto reação Norrish tipo II poderia levar à formação de radical no carbono adjacente ao grupo carbonila. Conseqüentemente em presença de O₂, o radical formado poderia sofrer neutralização levando à formação de grupos OH e COO, e/ou reticulação (*cross-linking*) por diferentes arranjos na cadeia polimérica. Porém, estas possibilidade serão melhor exploradas após a discussão dos dados de Tof-SIMS.

NEXAFS é a técnica mais precisa para determinar mudanças no ambiente químico de superfícies, em parte devidamente ao uso da radiação síncrotron como fonte de excitação, e esta possui grande seletividade e resolução.^{156,157} Na Figura 10 (com detalhamento na Tabela 6) os espectros NEXAFS C1s para amostras de PHB não tratadas e tratadas com radiação UV em presença de O₂ mostram que após os tratamentos há um deslocamento a um valor de energia de fóton a valores de menor energia. Sabendo-se que a resolução da linha de luz utilizada para as medições (SGM) é ~0,14 eV, o deslocamento observado foi de -0.5 eV. Este deslocamento foi igual para todas as amostras tratadas, mostrando que o tratamento altera a superfície de modo que um novo ambiente químico está presente, diferente das amostras tratadas. Este resultado pode ser explicado pela presença de um ambiente químico ao redor do sítio de excitação (C 1s(C=O) → π*_{C=O}) que possui uma eletronegatividade menor comparado com PHB sem tratamento.¹⁵⁷

A contribuição relativa de cada pico foi calculada pela integração das curvas feitas nos ajustes dos espectros NEXAFS (Tabela 6). Esta contribuição relativa toma como referência a área da primeira transição (C 1s → π*_{C=O}) em cada um dos espectros. Para a amostra de PHB sem tratamento os principais componentes correspondem as seguintes transições: C 1s → π*_{C=O}, C 1s → σ*_{C-H}, C 1s → σ*_{C-C} e C 1s → σ*_{C-O}. Após 30 min de fotólises, há um decréscimo na transição C 1s → π*_{C=O} e um acréscimo a transição C 1s → σ*_{C-O} indicando que há mais grupos éster na superfície do PHB comparado com os filmes de PHB sem tratamento. Também pode ser observado uma sobreposição do sinal em 288.9 eV talvez correspondendo as transições C 1s → π*_{C=O} ou C 1s → σ*_{C-H}.^{158,159} Após 120 min de tratamento as transições C 1s → π*_{C=O} e C 1s → σ*_{C-O} dominam o espectro NEXAFS e a intensidade das transições C 1s → σ*_{C-O} e C 1s → σ*_{C-C} decrescem. Com 210 min de tratamento o sinal de C 1s → σ*_{C-O} aumenta novamente mostrando uma recuperação dos grupos éster.

Os espectros NEXAFS O 1s para amostras de PHB sem tratamento e tratadas com radiação UV em presença de O₂ por 30, 120 e 210 min mostrados na Figura 11 e detalhados na Tabela 7 confirmam os mesmos grupos encontrados nos espectros NEXAFS C 1s. Pode-se ressaltar aqui que após 210 min de fotólises a alta intensidade de todas as transições sugerem que a superfície dos filmes tratados é dominada por grupos C=O e C-O com uma concentração superior as amostras

não tratadas.

Um problema quanto ao uso de radiação UV é a possibilidade de foto degradação durante o processo de funcionalização. Como o PHB possui um grupo éster na sua cadeia, a direta absorção de radiação UV pode levar por reações Norrish Tipo I e Norrish Tipo II a descarboxilização.⁶⁶ Geralmente poliéster da classe das policaprolactonas, estas reações são facilmente observadas em estudos de degradação. Uma reação Norrish Tipo I leva a formação de um radical por uma quebra da cadeia polimérica e eliminação de CO₂ por descarboxilização da carbonila, deixando para trás o rearranjo de ligações C=C. Na reação Norrish Tipo II, uma abstração de um átomo de hidrogênio inter ou intramolecular leva a quebra da cadeia polimérica podendo ser acompanhada ou não por uma reação de cruzamento de cadeias.¹⁶⁰

Os produtos finais destas reações baseados na estrutura do PHB, pode levar a evidente formação de ligações C=C.^{59,60,66,160} As análises de WCA e FTIR-ATR mostraram que estas novas superfícies hidrofílicas obtidas pelos tratamentos incorporaram grupos oxigenados na cadeia polimérica. O grau de molhabilidade pode ser controlado pelo tempo de tratamento Nas análises de FTIR-ATR a modificação no grupo éster, assim com nas análises de XPS é evidente, e mesmo a análise de NEXAFS não mostra nenhuma indicação da formação de ligações C=C. Isto indica que a reação Norrish Tipo II é suprimida durante os tratamentos.

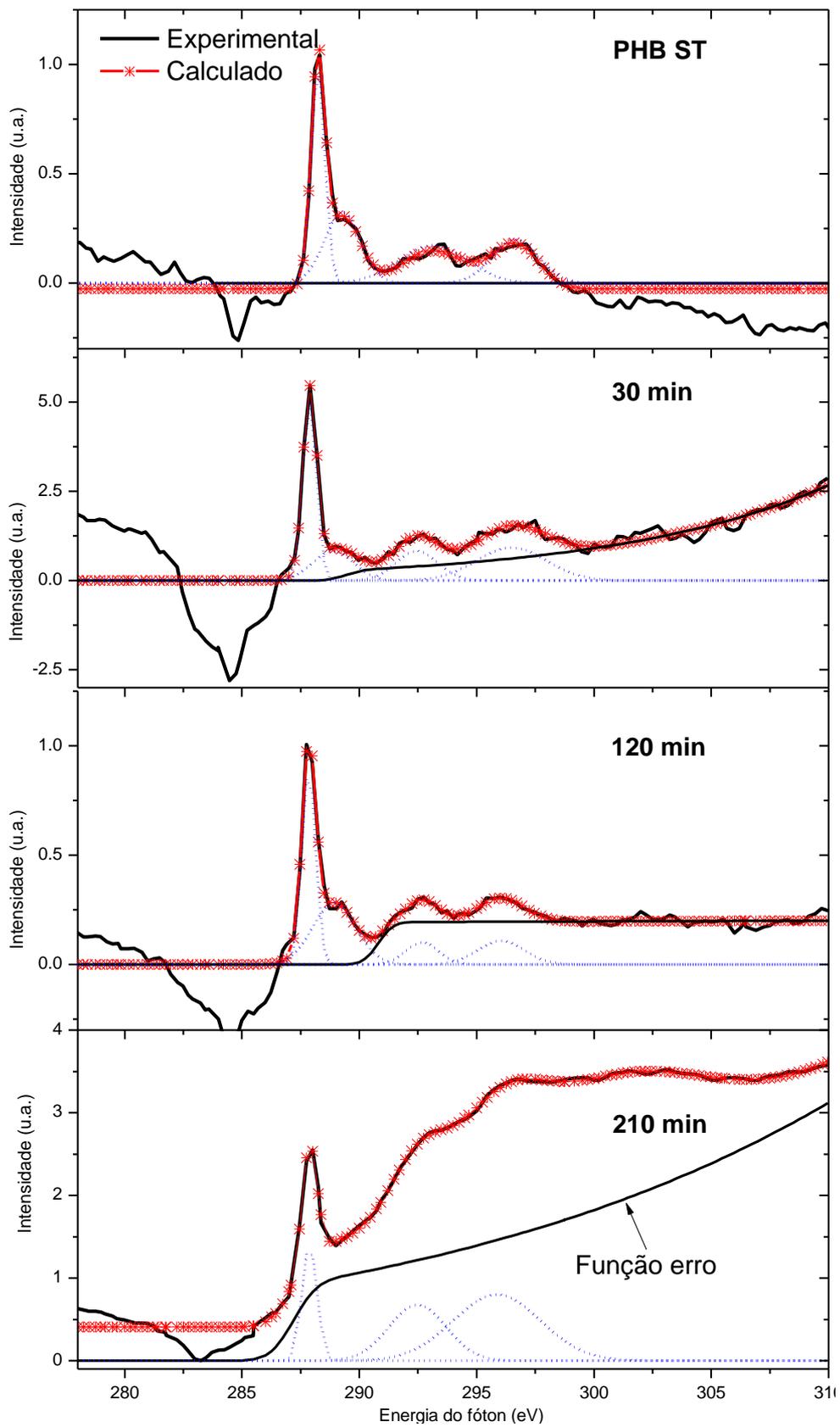


Figura 10. Espectros NEXAFS C 1s para amostras de PHB sem tratamento e tratadas com radiação UV em presença de O₂ durante 30, 120 e 210 min.

Tabela 6. Energias, assinaturas e área proporcional de cada pico para os espectro de NEXAFS C 1s do PHB sem tratamento e tratado com radiação UV em presença de O₂.

| Tempo de Tratamento | Energia (eV) | Assinatura (orbital) | Contribuição Relativa |
|---------------------|--------------|------------------------------|-----------------------|
| Sem tratamento | 288.3 | $\pi^*_{C=O}$ | 1.0 |
| | 289.3 | σ^*_{C-H} | 0.8 |
| | 293.1 | σ^*_{C-C} | 0.8 |
| | 296.5 | σ^*_{C-O} | 0.7 |
| 30 min | 287.8 | $\pi^*_{C=O}$ | 1.0 |
| | 288.9 | $\pi^*_{C=O}/\sigma^*_{C-H}$ | 0.5 |
| | 289.6 | σ^*_{C-H} | 0.5 |
| | 296.5 | σ^*_{C-O} | 0.9 |
| 120 min | 287.8 | $\pi^*_{C=O}$ | 1.0 |
| | 288.9 | $\pi^*_{C=O}/\sigma^*_{C-H}$ | 1.0 |
| | 292.7 | σ^*_{C-C} | 0.2 |
| | 295.9 | σ^*_{C-O} | 0.4 |
| 210 min | 287.8 | $\pi^*_{C=O}$ | 1.0 |
| | 292.4 | σ^*_{C-C} | 1.8 |
| | 295.7 | σ^*_{C-O} | 2.7 |

Tabela 7. Energias, assinaturas e área proporcional de cada pico para os espectro de NEXAFS O 1s do PHB sem tratamento e tratado com radiação UV em presença de O₂.

| Tempo de Tratamento | Energia (eV) | Assinatura (orbital) | Contribuição Relativa |
|---------------------|--------------|----------------------|-----------------------|
| Sem tratamento | 531.5 | $\pi^*_{C=O}$ | 1.0 |
| | 534.1 | σ^*_{C-O} | < 0.1 |
| | 536.6 | σ^*_{C-O} | < 0.1 |
| | 539.9 | σ^*_{C-O} | 1.5 |
| | 546.5 | $\sigma^*_{C=O}$ | 0.8 |
| 30 min | 531.5 | $\pi^*_{C=O}$ | 1.0 |
| | 535.5 | σ^*_{C-O} | < 0.1 |
| | 539.7 | σ^*_{C-O} | 5.4 |
| | 544.8 | $\sigma^*_{C=O}$ | 0.8 |
| 120 min | 531.5 | $\pi^*_{C=O}$ | 1.0 |
| | 536.6 | σ^*_{C-O} | < 0.1 |
| | 539.7 | σ^*_{C-O} | 1.2 |
| | 545.4 | $\sigma^*_{C=O}$ | 1.6 |
| 210 min | 531.5 | $\pi^*_{C=O}$ | 1.0 |
| | 539.6 | σ^*_{C-O} | 0.8 |
| | 543.1 | σ^*_{C-O} | 2.1 |

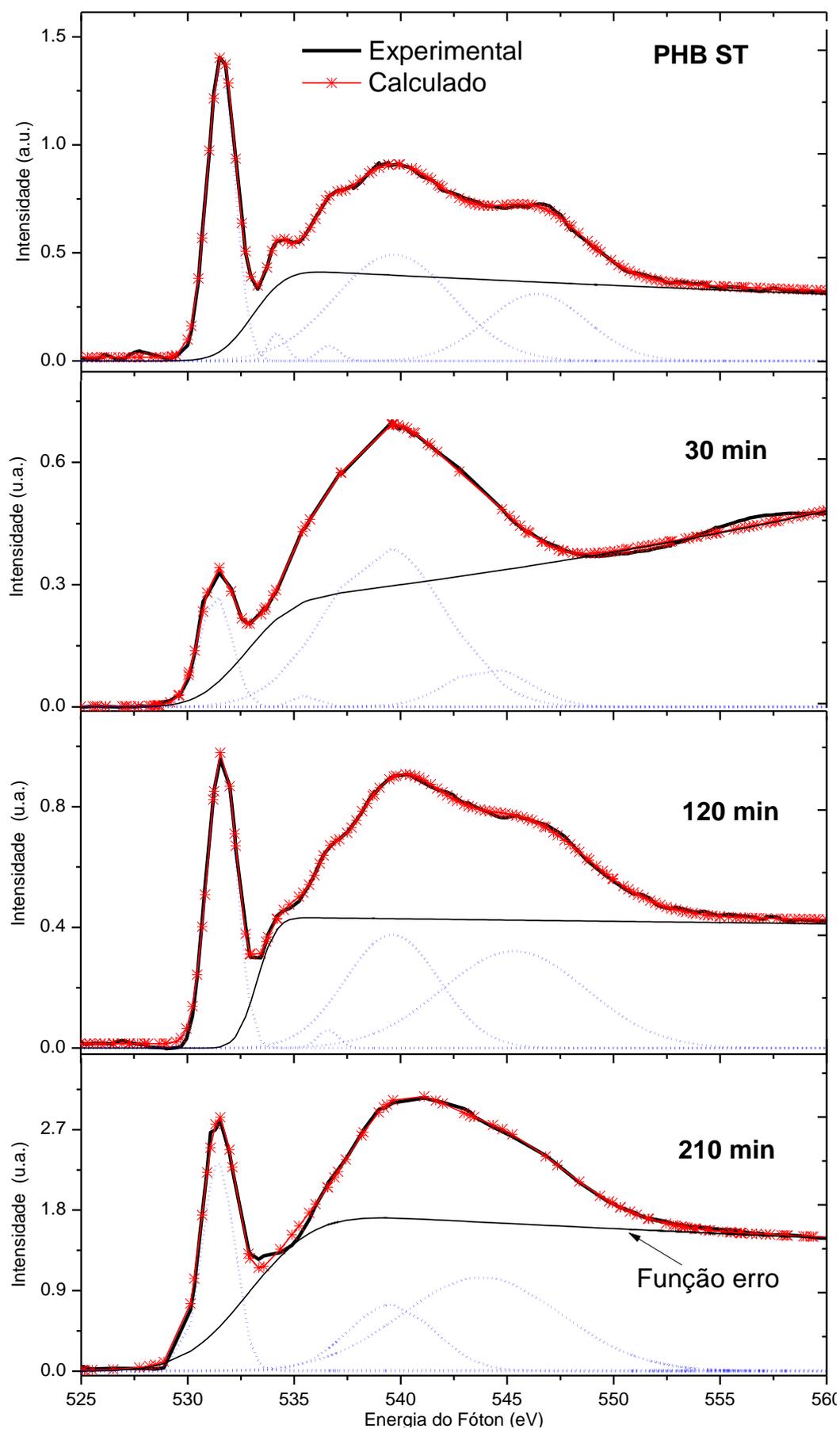


Figura 11. Espectros NEXAFS O 1s para amostras de PHB sem tratamento e tratadas com radiação UV em presença de O₂ durante 30, 120 e 210 min.

A Figura 12 mostra um esquema simples para tentar entender os resultados dos tratamentos fotoquímicos. Após a absorção do fóton, uma reação Norrish Tipo I leva a quebra ligação da cadeia adjacente ao grupo éster formando dois radicais, R_1 e R_2 . A reação Norrish Tipo I pode ocorrer em ambos os lados do grupo éster. Porém foi observado em filmes de PMMA, que possui estrutura similar ao PHB, que a clivagem é favorável ao lado esquerdo quando se usa uma dose média de radiação UV com um laser de excímeros de 248 nm.¹⁶⁰ Independente do lado que ocorra a clivagem, o mecanismo sugerido por Sadi *et al.*⁶⁶ mostra que os produtos de degradação serão os mesmos. Continuando na reação mostrada na Figura 12, uma abstração intermolecular de hidrogênio na presença de O_2 leva ao produto (i). O novo grupo carbonílico ligado com dois carbonos não oxigenados pode justificar os deslocamento de energia nas transições $C\ 1s \rightarrow \pi^*_{C=O}$ nas análises de NEXAFS e também ao novo grupo que foi adicionado ao ajuste do espectro das análises de XPS. A abstração de hidrogênio intermolecular pode ser favorecida pela alta cristalinidade do PHB considerando a proximidade das cadeias.¹⁶¹ Após esta abstração, há a formação de um novo radical e a continuidade de abstrações de hidrogênios.

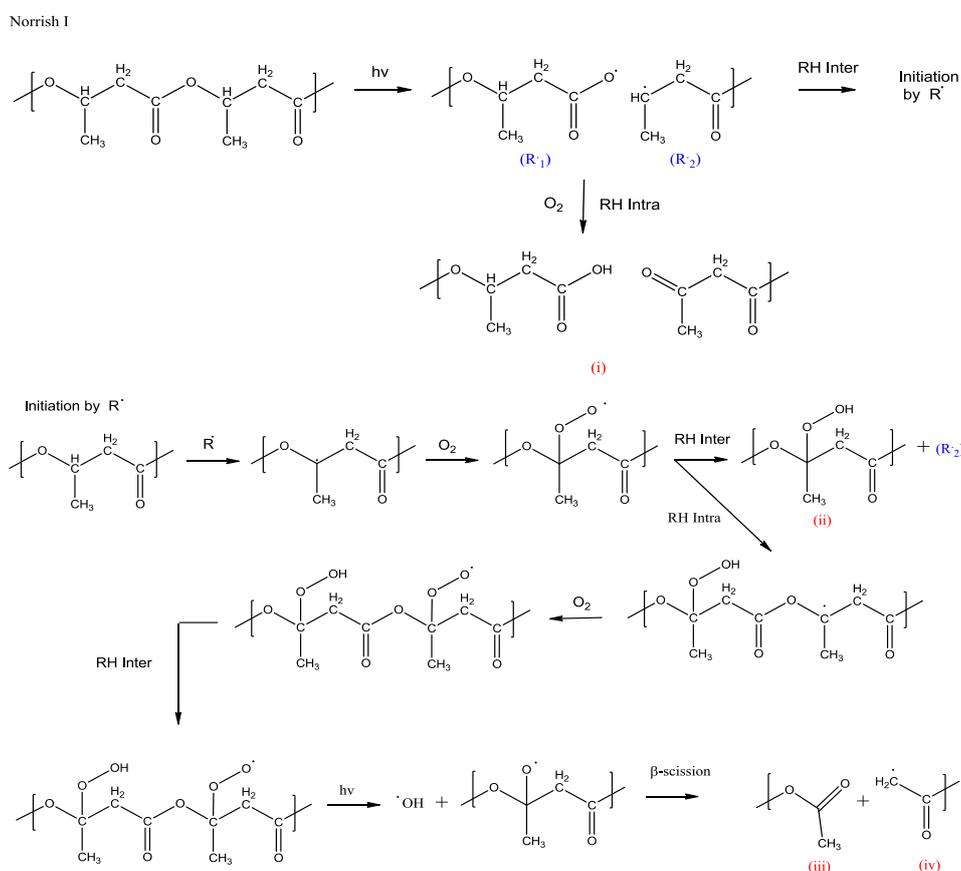


Figura 12. Possíveis reações fotoquímicas envolvidas durante os tratamentos

A presença de O_2 é decisiva pois promove a neutralização dos radicais formados durante o processo pela oxidação. A sequência das reações mostradas na Figura 12 leva aos produtos (ii) e (R_2) por uma nova abstração de hidrogênio intermolecular. Os grupos peróxidos poderiam justificar o novo sinal de O 1s (534,0 eV) encontrados nas análises de XPS (dado não mostrado, mas presente na publicação¹⁵⁵) e também a grande intensidade e grupos éster observados nos espectros NEXAFS de C 1s e O 1s para 30 e 210 min de tratamento. No caso de uma abstração intramolecular de hidrogênio em presença de O_2 haverá a formação de grupos peróxido e após uma nova abstração, este novo intermediário poderá eliminar radical OH por uma neutralização. Uma β -cisão finalmente leva aos produtos (iii) e (iv). Os produtos (i) e (iii) também podem originar o deslocamento químico observado nos espectros NEXAFS de C1s. O produto (i) possui um grupo hidroxila ligado ao grupo carbonílico. O produto (iii) possui grupos metílicos ligados ao grupo carbonila. Em ambos os casos o ambiente menos eletronegativo próximo ao grupo carbonila é gerado pelo processo de modificação UV. Ainda pode se considerar que o produto (iv) pode sofrer oxidação com a presença de O_2 .

O ajuste de sinal dos espectros experimentais de NEXAFS das amostras de PSU não tratada e após os tratamentos são apresentados na Figura 13, onde pode-se observar as seguintes contribuições para o espectro NEXAFS de C 1s para a PSU sem tratamento: a, C 1s \rightarrow $\pi^*_{C=C}$ (285.2 eV); b, C 1s \rightarrow $2\pi^*_{C=C}$ (286.4 eV); c, C 1s \rightarrow π^*_{C-O} (286.7 eV); d, C 1s \rightarrow σ^*_{C-C} (290.2 eV); e, C 1s \rightarrow σ^*_{C-O} (294.6 eV). Após os tratamento os espectros NEXAFS de C1s mostram um decréscimo no sinal correspondente a transição C 1s \rightarrow $\pi^*_{C=C}$ e o aparecimento de um novo sinal em 288.5 eV. Note na Figura 14 que o aparecimento deste sinal é proporcional ao tempo de tratamento e é originado de uma transição C 1s \rightarrow $\pi^*_{C=O}$.^{156,162}

O que confirma os dados de XPS e FTIR-ATR. O desaparecimento de ligações duplas no espectro NEXAFS C 1s das amostras tratadas de PSU e a modificação nas bandas de substituição de anéis aromáticos nos espectros de FTIR-ATR, combinado com a inserção de carbonilas observadas por todas as análises nos levam a crer que os novos grupos oxigenados estão sendo enxertados nos anéis aromáticos da molécula de PSU, porém, é necessário a análise dos espectros de Tof-SIMS.

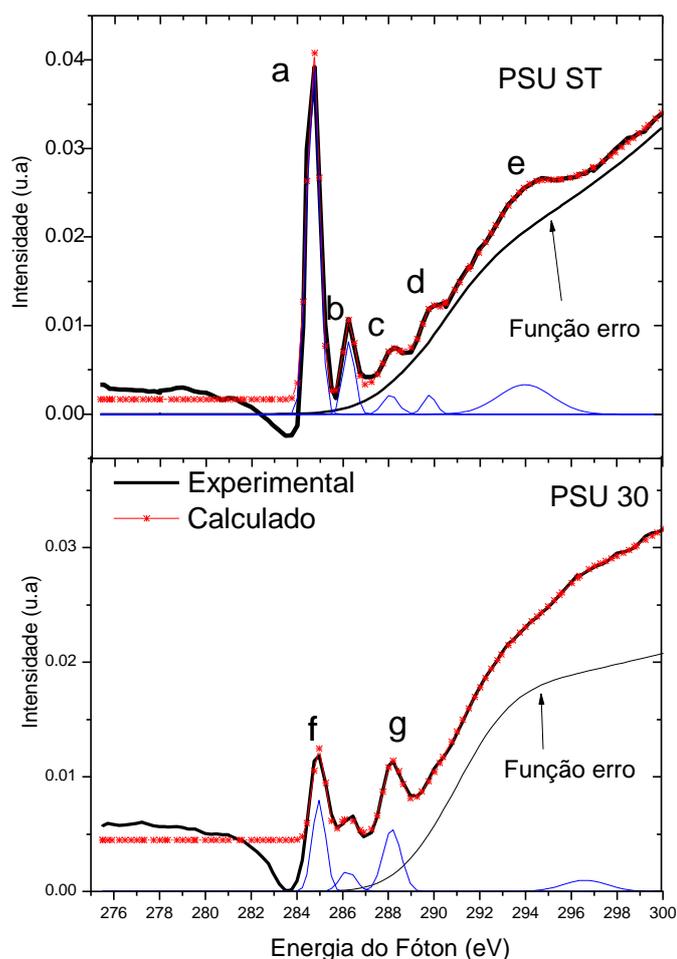


Figura 13. Espectros NEXAFS C 1s para amostras de PSU sem tratamento e tratadas com radiação UV em presença de O₂ durante 30 min. Onde: a) C 1s → π*_{C=C} (285.2 eV); b) C 1s → 2π*_{C=C} (286.4 eV); c) C 1s → π*_{C=O} (286.7 eV); d) C 1s → σ*_{C-C} (290.2 eV); e) C 1s → σ*_{C-O} (294.6 eV); f) C 1s → π*_{C=C} (285.2 eV); e g) C 1s → π*_{C=O} (288.2 eV) .

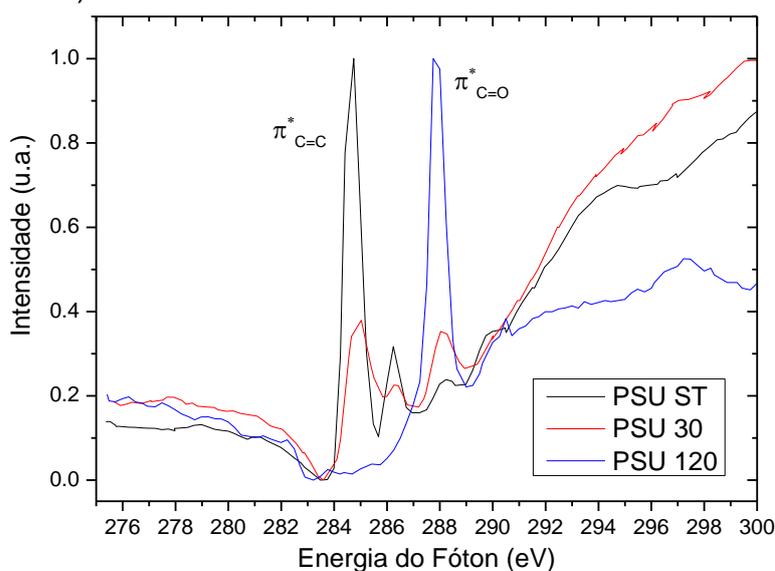


Figura 14. Espectros NEXAFS C 1s para amostras de PSU sem tratamento e tratadas com radiação UV em presença de O₂ durante 30 e 120 min.

Os espectros Tof-SIMS de PHB ST mostraram fragmentação típica para este tipo do polímero já visto na literatura^{163,164} tanto para íons positivos (Figura 15) quanto para íons negativos (Figura 16). Os principais fragmentos expressos em valores de m/z mostrados no espectro de íons positivos da Figura 17 podem ser relacionados com os fragmentos da Figura 15 de forma satisfatória.

Da mesma forma os fragmentos de íons negativos majoritários são encontrados na literatura¹⁶⁴ e estão citados na Figura 16. Comparando-os aos valores encontrados na espectro Tof-SIMS (Figura 18) pode-se dizer que a fragmentação ocorre do mesmo modo que encontrado por Davies *et al.* Ainda analisando o espectro de baixas massas (Figura 18) pode-se citar os fragmentos 12, 13, 16, 17, 24, 41, 43 e 45 m/z que podem ser atribuídos respectivamente aos íons : C⁻, CH⁻, O⁻, OH⁻, C₂⁻, C₂H⁻, C₂HO⁻, C₃H₃O⁻ e CHO₂⁻. Mesmo com a ressalva que a fragmentação no intervalo 0 a 100 m/z normalmente não é muito considerada, devido a possibilidade do que se chama de ruído químico (reações secundárias entre fragmentos, “resíduo de fundo” do vácuo, etc.) ainda algumas observações deste intervalo se mostram pertinentes.

Possíveis estruturas para fragmentação positiva do Polihidróxibutirato (PHB ST)

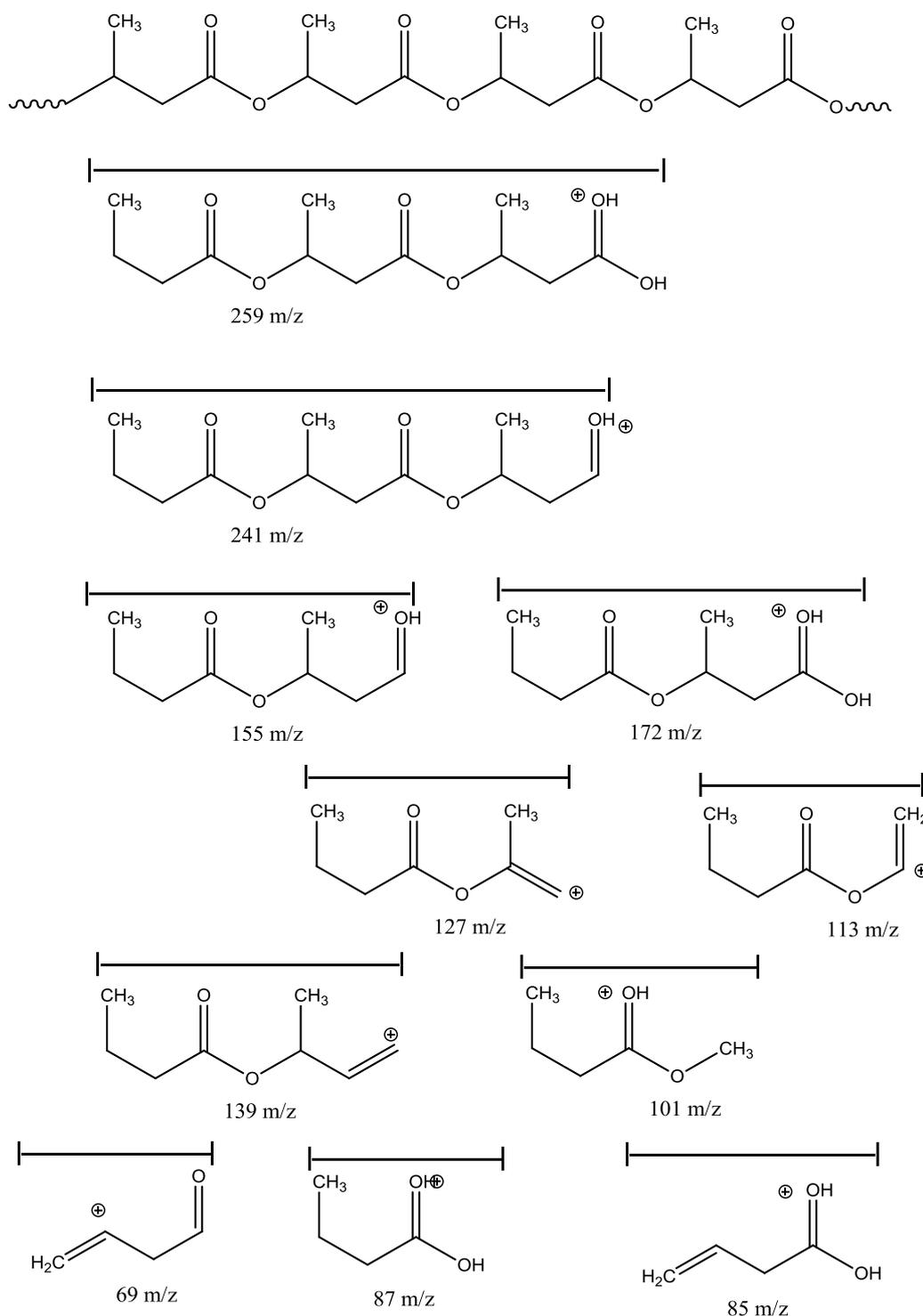


Figura 15. Fragmentos de íons positivos de filmes de PHB.

Possíveis estruturas para fragmentação negativa do Polihidróxibutirato (PHB ST)

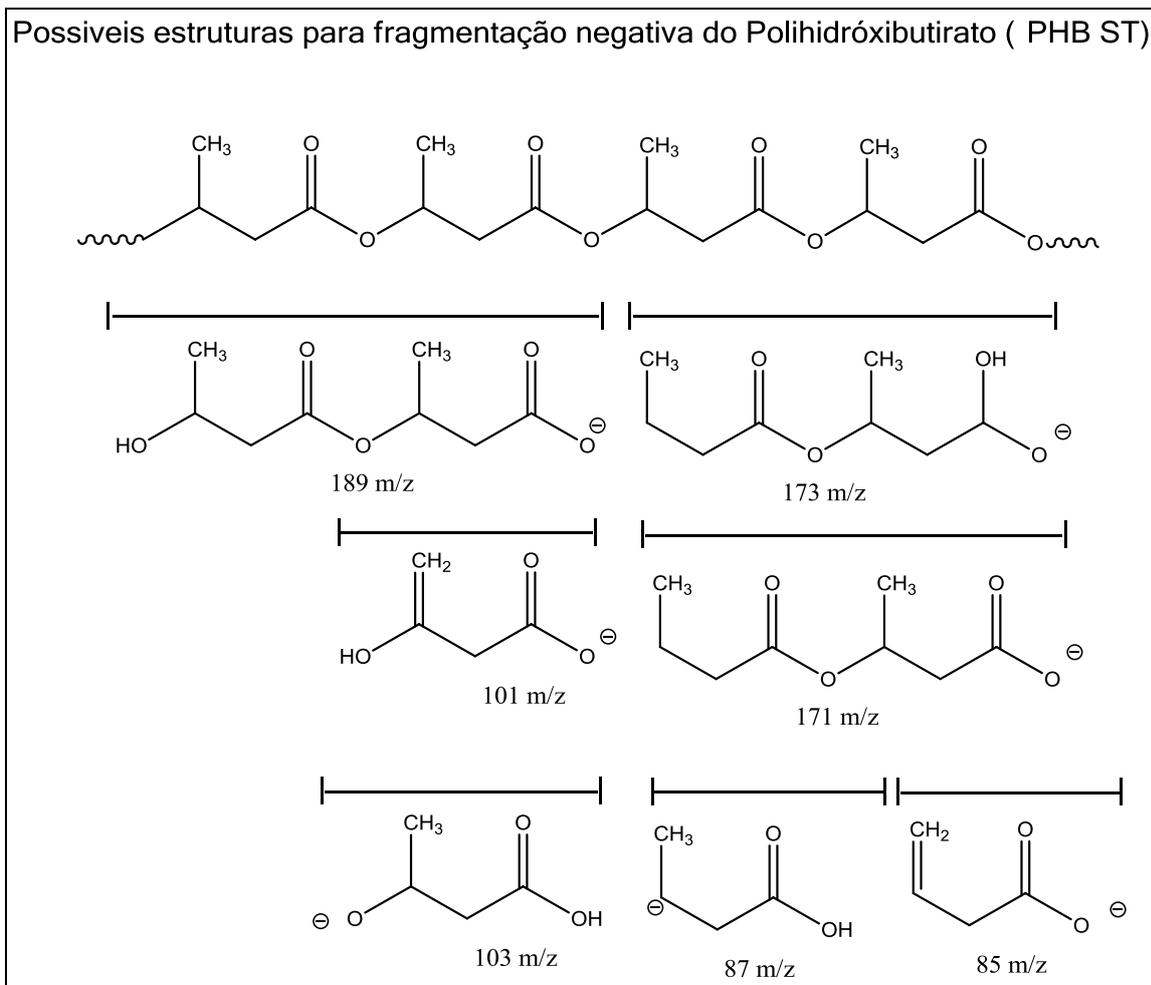


Figura 16. Fragmentos de íons negativos de filmes de PHB.

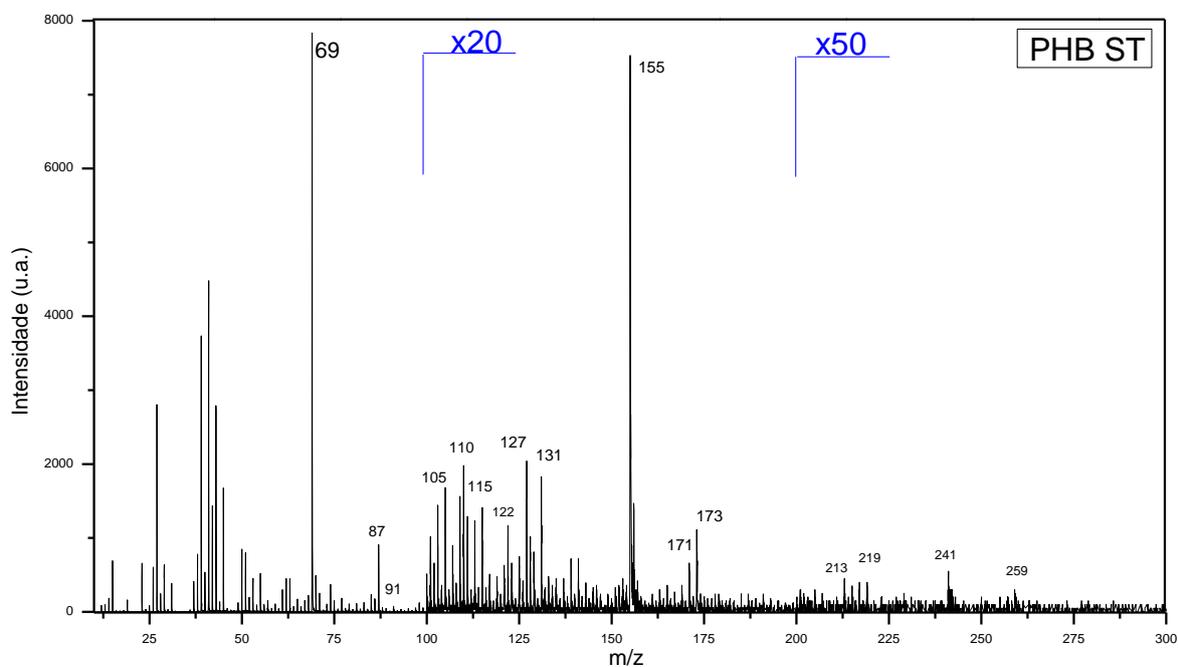


Figura 17. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PHB ST.

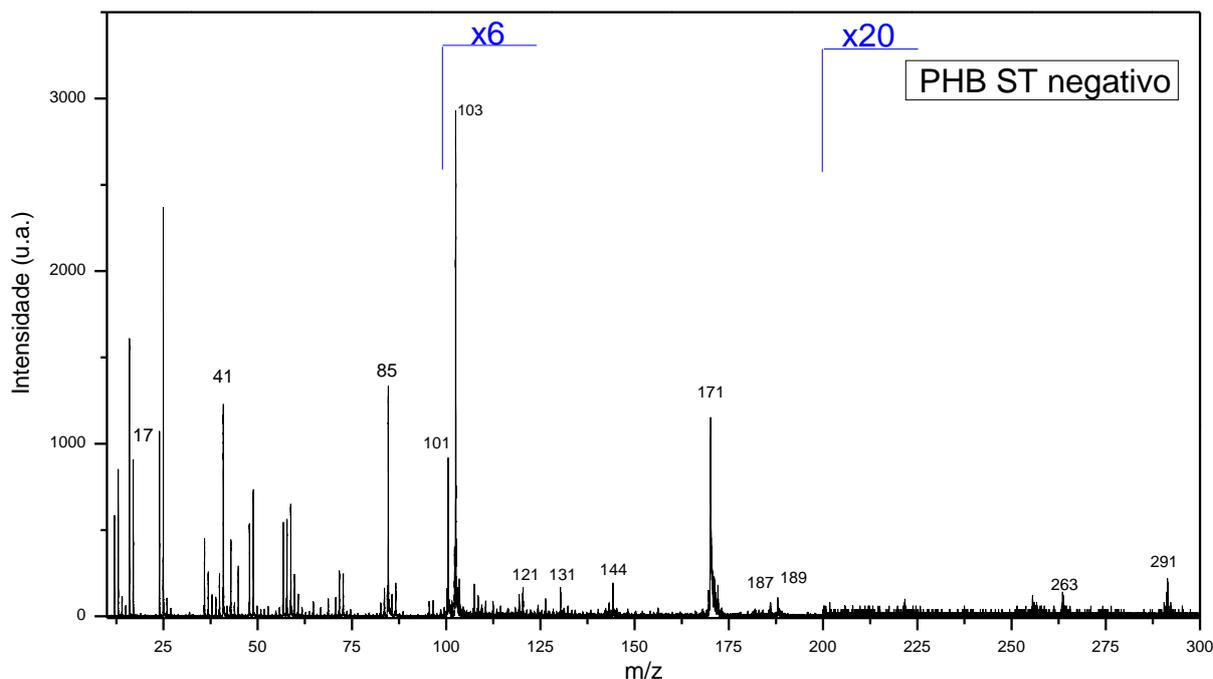


Figura 18. Espectro ToF-SIMS (modo negativo) da amostra de PHB ST.

Após os tratamentos a fragmentação exibida revela uma discreta diferença, entre os espectros positivos das amostras não tratadas com as amostras tratadas por 60 min e por 180 min (Figuras 19 e 21). Os valores de 110, 127, 131, 137, 173 e 217 m/z sofrem alterações em suas intensidade. Estes intervalos de m/z correspondem ao intervalo de fragmentação de duas a três unidades monoméricas no modo de clivagem em múltiplas cadeias, ou seja não há uma quebra homogênea em cada monômero ou dímero, e sim em partes que somam um monômero mais metade de um dímero. Sabe-se pelo mecanismo proposto por Davies *et al.*¹⁶⁴ que neste polímero o principal sítio de fragmentação é a carbonila. O sítio de funcionalização e interação da radiação UV, como mostrados nas técnicas de análise de superfície anteriores é a carbonila, sendo que qualquer modificação neste sítio apresentará mudança na característica de fragmentação da molécula. O que pode ser visto nos espectros apresentados. Um fragmento interessante que aparece somente nos espectros de PHB 60 e PHB 180 é o fragmento positivo 191 m/z . Assumindo como principal produto obtido pelas fotólises é o produto (i) do esquema proposto exibido na Figura 12, o fragmento 191 m/z seria coerente. Como a modificação superficial proposta se baseia na inserção de grupos eletronegativos na superfície, uma maior modificação nos espectros negativos de massa já era prevista. Comparando-se os espectros de massas de íons negativos (Figuras 18, 20

e 22), das amostras sem tratamento com os espectros de massas das amostras tratadas durante 60 e 180 min pode-se notar algumas diferenças.

Primeiramente, no mecanismo sugerido é assumida uma formação de grupos OH devido aos rearranjos da cadeia polimérica e a inserção de mais oxigênio neutralizando os radicais formados pela excitação da radiação UV. O fragmento 17 m/z mostra que a presença de uma concentração de grupos oxigenados na superfície dos filmes tratados é maior que nos filmes não tratados, tanto em 180 min quanto com 60 min de tratamento. Porém, os maiores indicadores de mudança de ambiente químico na superfície estão também em intervalos de massas de maiores valores como os fragmentos de m/z: 103, 144, 166, 181. O fragmento 144 m/z já estava presente na fragmentação do espectro negativo do PHB ST, e corresponde a fragmentação de clivagem de múltiplas cadeias, onde o sítio de clivagem não é o mesmo para cada parte da molécula. Como visto anteriormente nos espectros positivos, esta fragmentação também é factível de ser favorecida se houvesse a formação do produto (i) mostrado na Figura 12. Embora não mostrado nos espectros de PHB 60 e PHB 180, o fragmento 103 m/z possui uma intensidade muito maior em relação aos outros fragmentos no mesmo intervalo de massa, e do mesmo modo que citado antes, faz parte dos possíveis fragmentos que seriam favorecidos com a funcionalização sugerida. Assim como 181 m/z.

Como salientado anteriormente estes grupos de fragmentos quando presentes ou modificados indicam uma reestruturação molecular na cadeia polimérica, também atribuída à modificação no tipo de carbonila ao longo da cadeia, pois com a quebra de ligação em pontos aleatórios, a fragmentação de múltiplas cadeias seria favorecida. Ainda sustentando a inserção de grupos oxigenados na superfície dos filmes, há o aparecimento de fragmentos antes ausentes no espectro Tof-SIMS negativo do polímero sem tratamento como os fragmentos em valores de m/z de : 210, 251, 308, 322, 336. Com exceção de 210 m/z, os outros fragmentos são a soma de fragmentos encontrados no PHB ST com átomos de oxigênio enxertados ao longo da cadeia: 251 m/z ($\sim 220 \text{ m/z} + 2 \text{ O}$), 308 m/z ($291 \text{ m/z} + \text{OH}$), 322 m/z ($291 \text{ m/z} + \text{OH} + \text{O}$) e 336 m/z ($\sim 291 + 3 \text{ O}$).

Os espectros Tof-SIMS das amostras de PHB não tratadas e tratadas confirmam os resultados encontrados com as demais técnicas de caracterização onde há a enxertia de oxigênio ao longo da cadeia polimérica do PHB gerando novos grupos oxigenados e um ambiente químico de superfície totalmente diferente

do restante da matriz polimérica e que confirma os mecanismos de reação fotoquímica demonstrados na Figura 13.

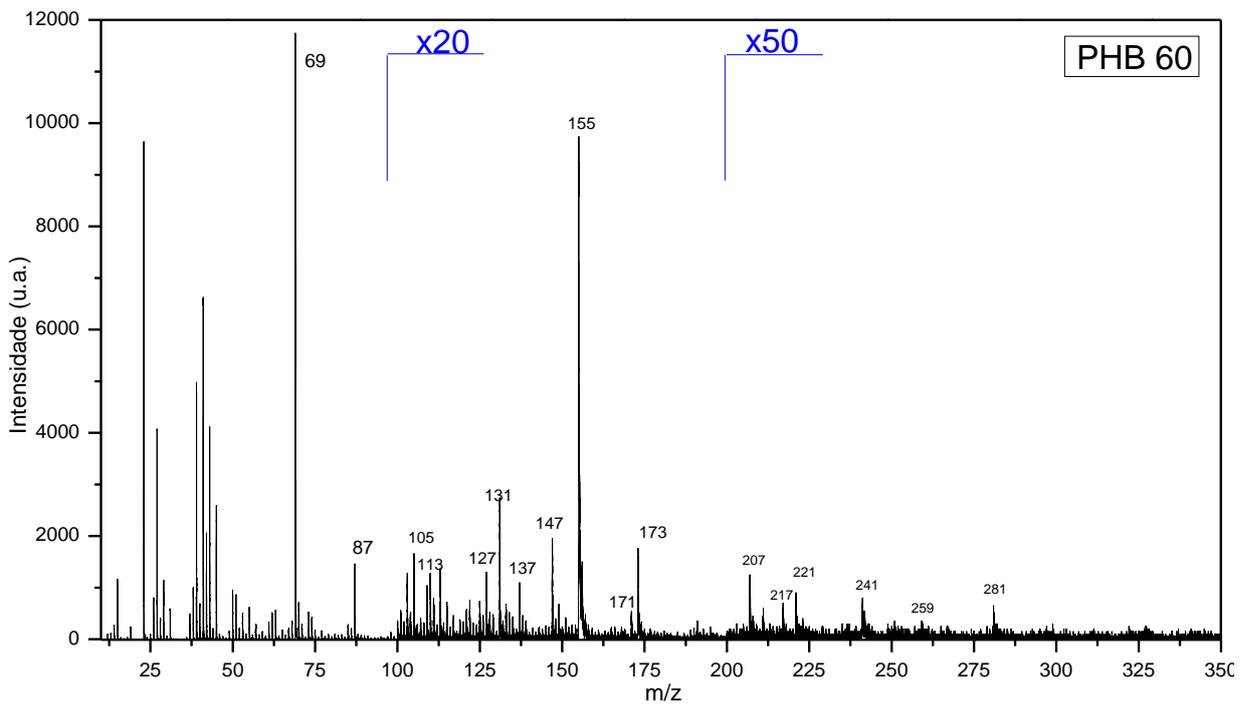


Figura 19. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PHB 60.

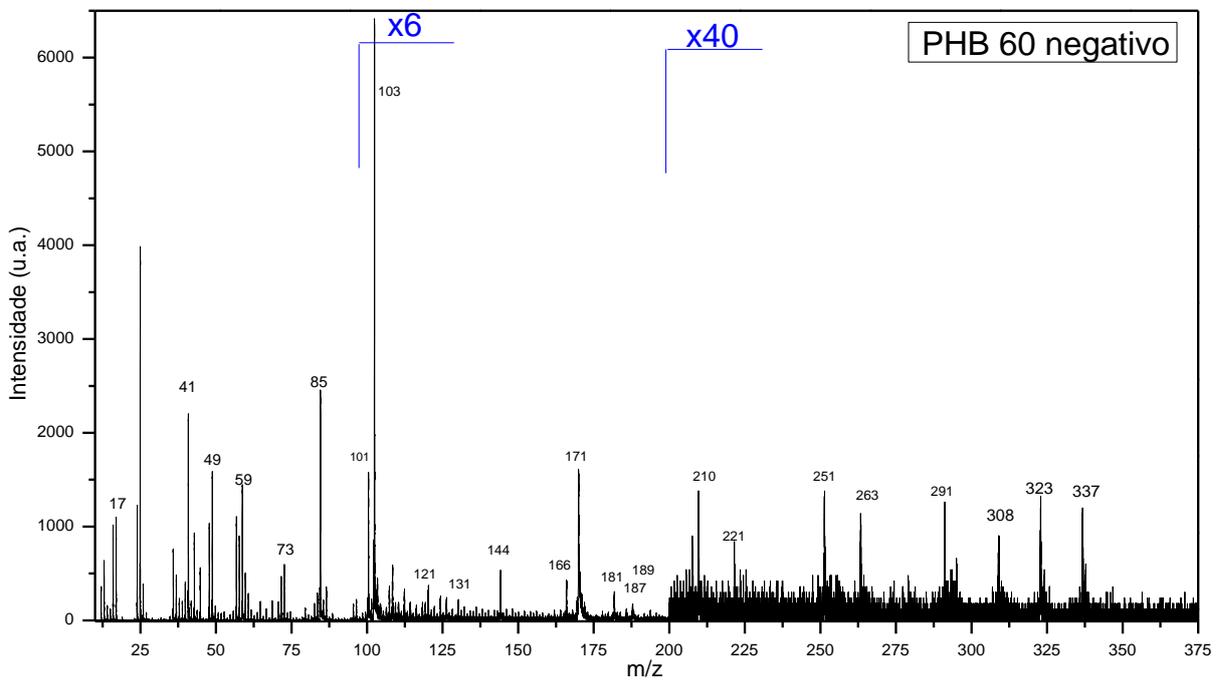


Figura 20. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PHB 60.

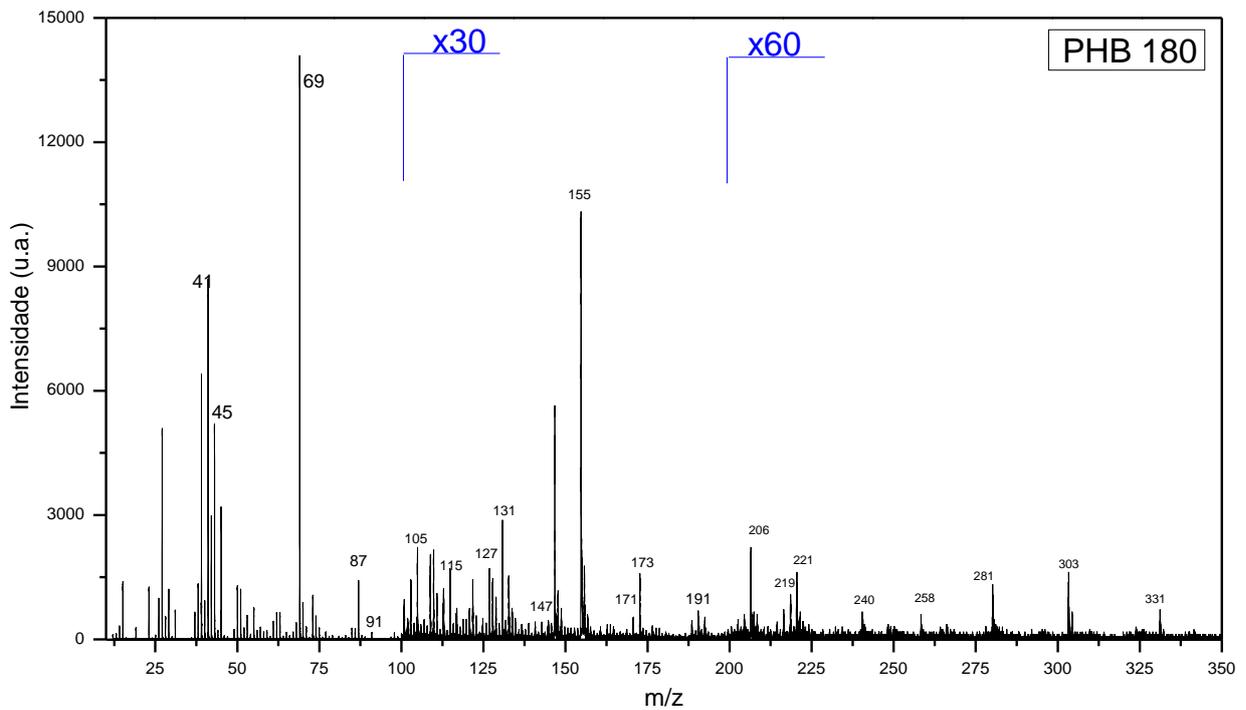


Figura 21. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PHB 180.

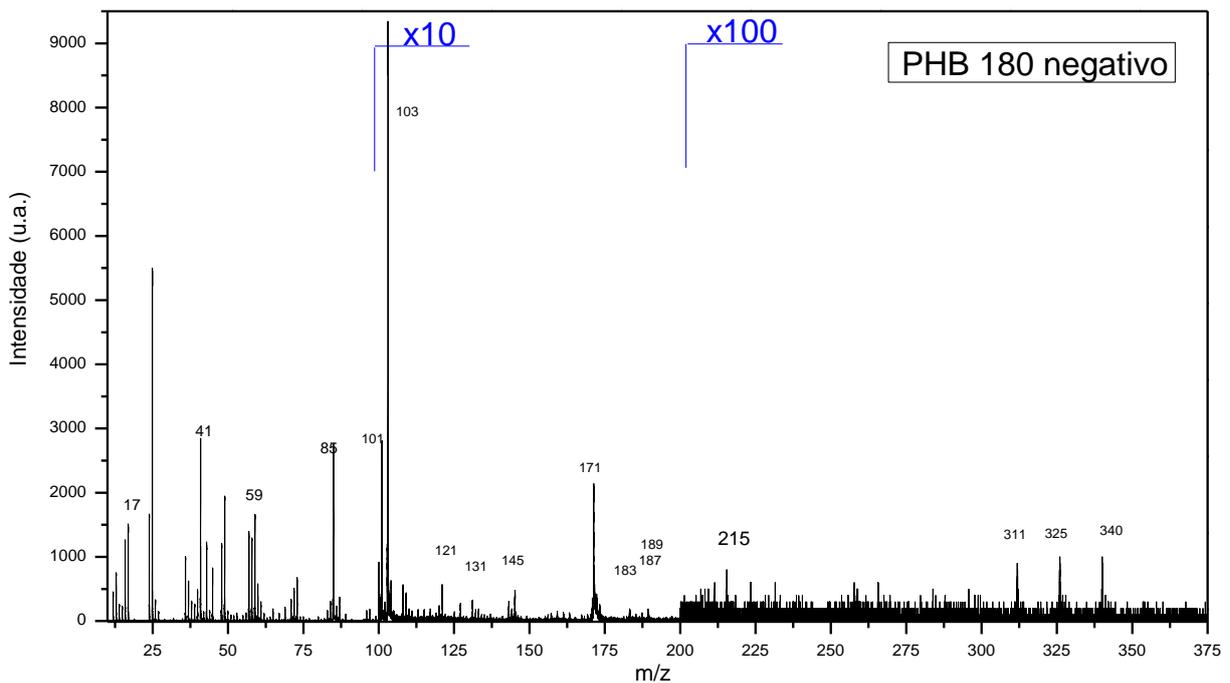


Figura 22. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PHB 180.

Apesar da literatura não conter muitas análises de Tof-SIMS envolvendo PSU, foi possível comparar os espectros experimentais de PSU sem tratamento com alguns espectros de filmes PSU obtidos por outras técnicas¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. Foi encontrada uma boa correlação entre os fragmentos obtidos para PSU ST com os

fragmentos encontrados neste trabalho. A Figura 23 traz os principais fragmentos para espectros ToF-SIMS positivos previstos para filmes de PSU.

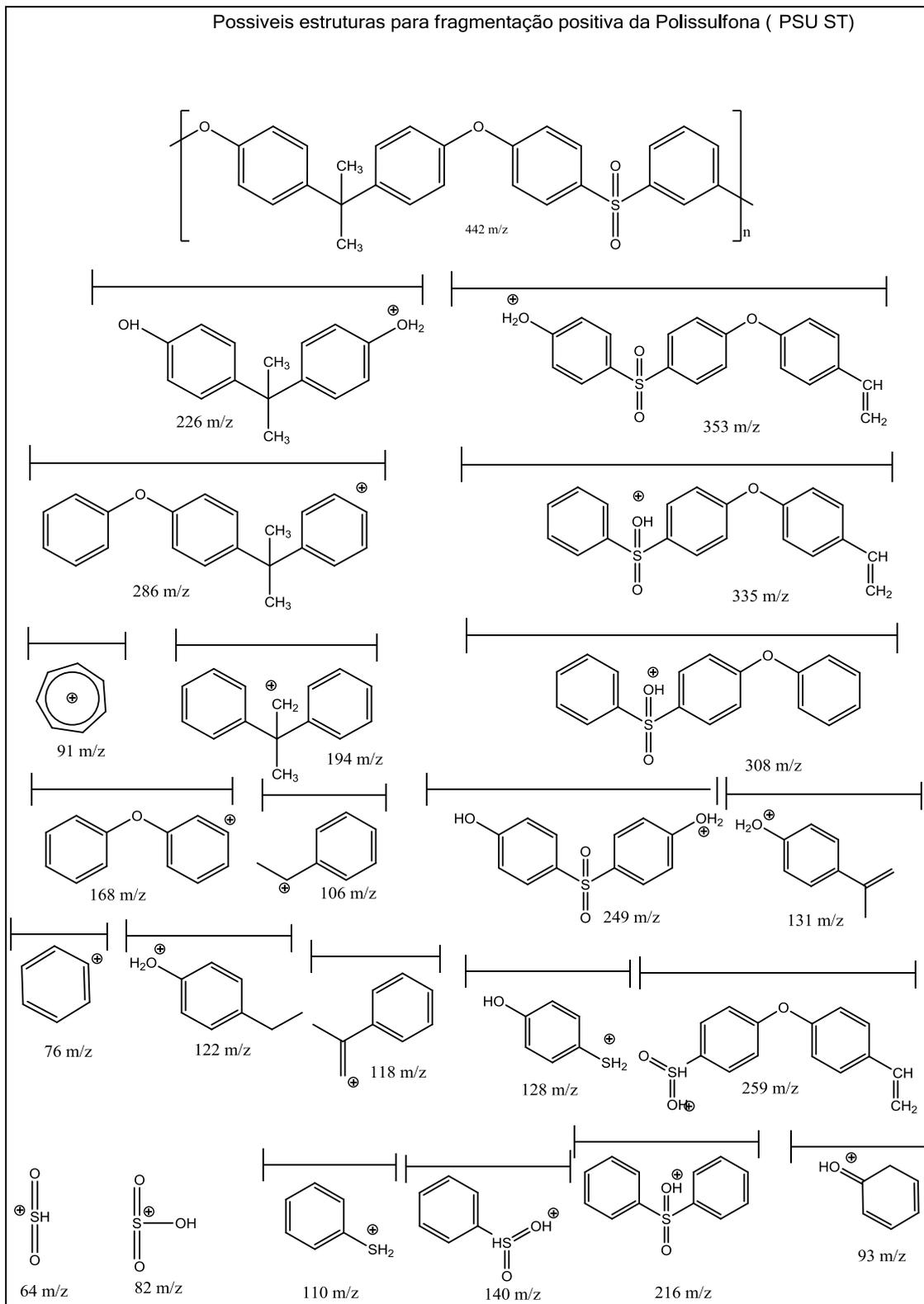


Figura 23. Principais fragmentos para espectros ToF-SIMS positivos previstos para filmes de PSU.

O espectro Tof-SIMS positivo para PSU ST (Figura 24) possui a maioria de seus fragmentos em acordo com o que é proposto acima com algumas diferenças que não prejudicam a análise dos mesmos, pois decorrem de pequenas diferenças na fragmentação e reações posteriores entre os íons gerados durante o caminho percorrido entre a superfície da amostras e o detector (mais de 2 metros). Não houve presença de fragmentos significativos em intervalos acima de 400 m/z. O espectro Tof-SIMS negativo para PSU ST (Figura 25) possui a maioria de seus fragmentos em acordo com os fragmentos propostos com base na literatura (Figura 26).

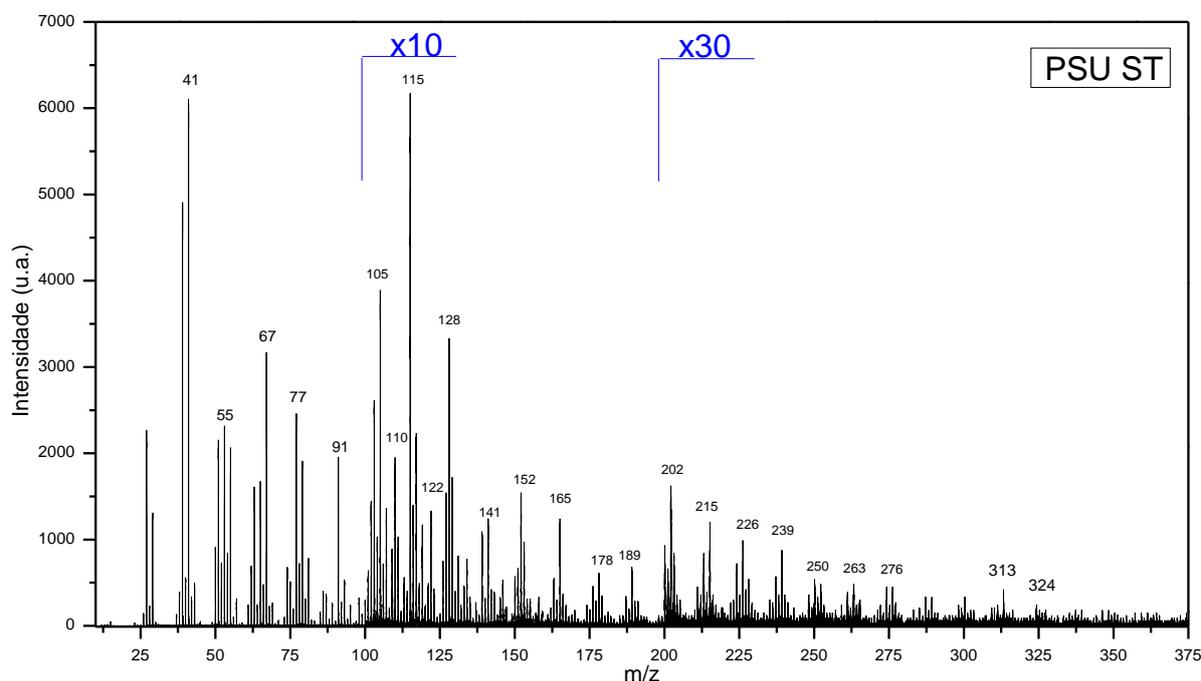


Figura 24. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PSU ST.

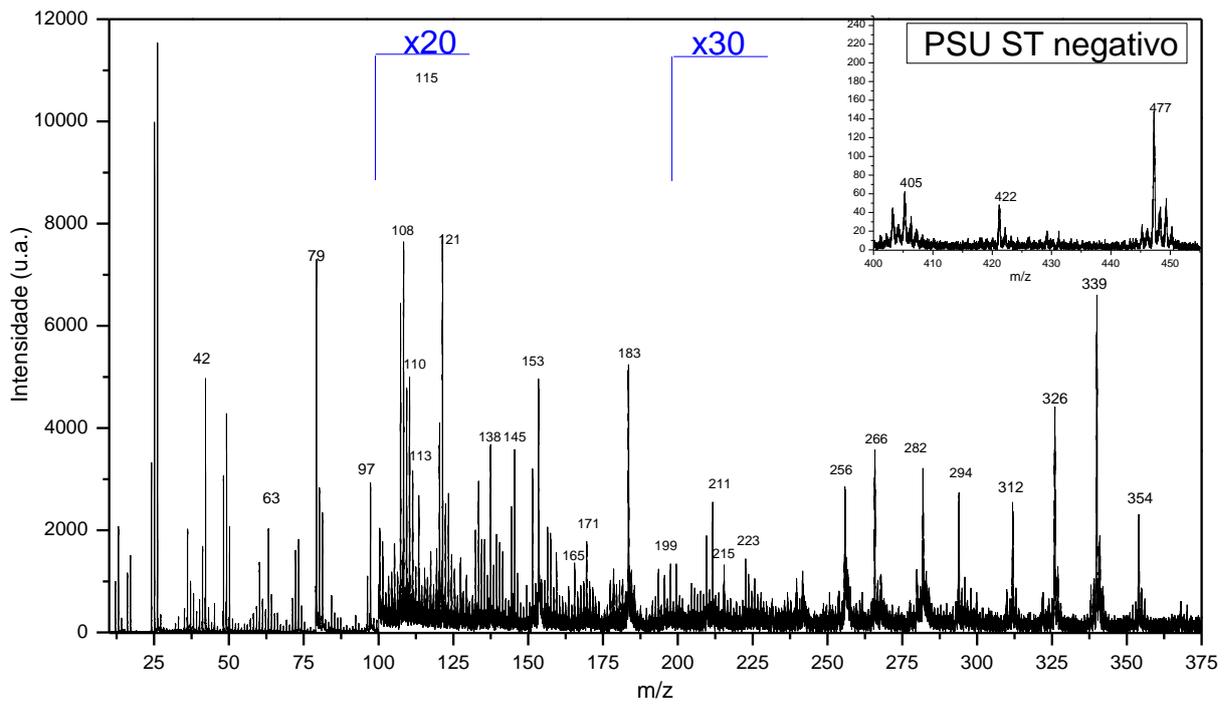


Figura 25. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PSU ST.

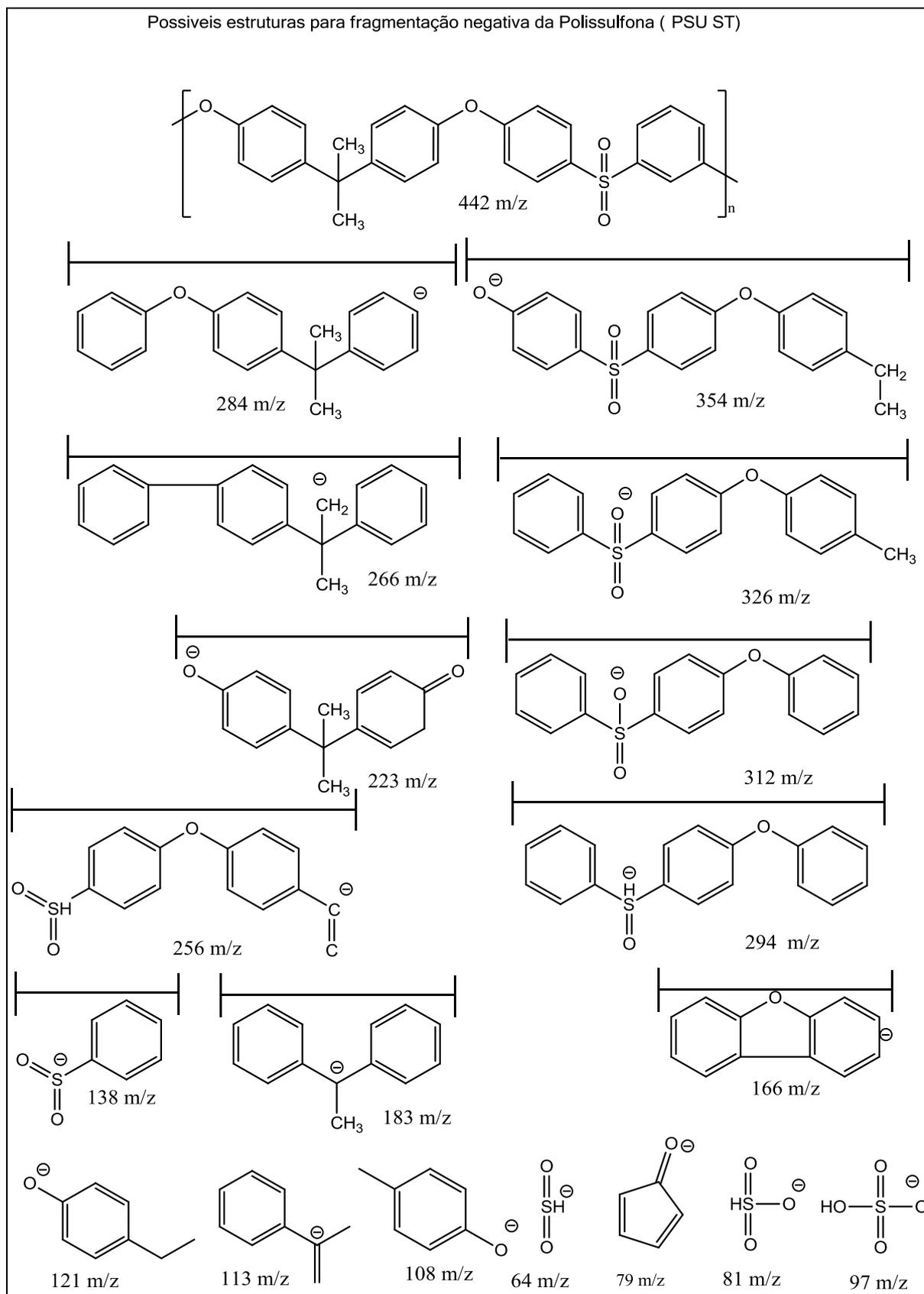


Figura 26. Principais fragmentos para espectros ToF-SIMS negativos previstos para filmes de PSU.

A avaliação dos espectros de massa dos polímeros tratados se dá em comparação aos espectros sem tratamento. Pode-se observar nos espectros Tof-SIMS positivos para as amostras de PSU 30 e PSU 120 (Figuras 27 e 29) que há um aumento nos fragmentos correspondentes a 18, 19, 57 e 85 m/z. Estes fragmentos podem ser identificados respectivamente como H_2O , H_3O , C_3H_5O e $C_4H_5O_2$. Enquanto os fragmentos em 77 e 91 m/z, identificados como os fragmentos do anel aromático e tropílio, sofrem decréscimo. Ainda nas Figuras 27 e 29 pode-se observar que o fragmento em 115 m/z decresce em relação ao PSU ST e os fragmentos 101, 128 133 e 191 m/z sofrem acréscimo dependente do tempo de tratamento, ou seja, quanto maior o tempo de tratamento maior é a modificação. Como pode ser visto nos fragmentos ilustrados na Figura 23, o fragmento 115 m/z se refere ao anel aromático ligado a dois carbonos alifáticos. O íon 101 m/z pode ser do fragmento $C_4H_5O_3$. As fragmentações 128, 131, e 133 podem surgir das combinações dos íons 115 e 122 m/z mais um átomo de oxigênio.

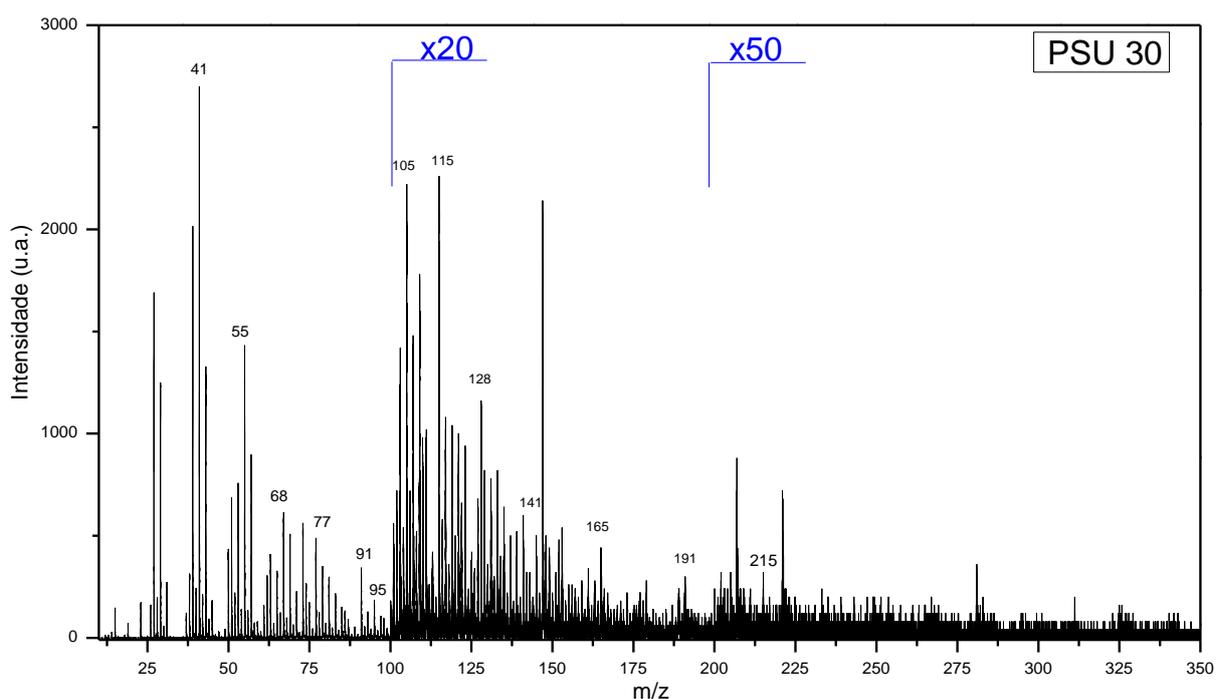


Figura 27. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PSU 30.

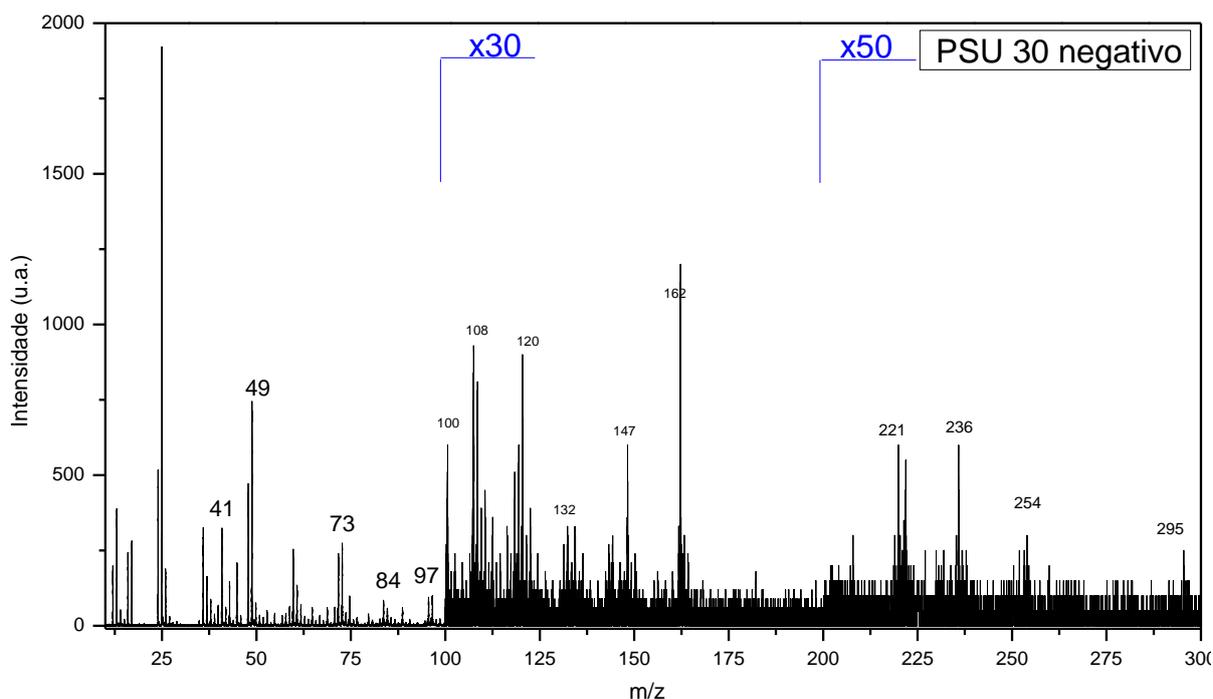


Figura 28. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PSU 30.

Nos intervalos maiores que 200 m/z da Figura 27 pode-se dizer que o espectro mostra que as fragmentações presentes no PSU ST deste mesmo intervalo estão praticamente ausentes, restando apenas em menor intensidade o fragmento 215 m/z. Demais fragmentações são praticamente inexistentes. Para a amostra tratada por 120 min, a intervalos de massa maiores de 200 m/z, há a presença dos fragmentos 249 e 247 m/z. Valendo-se dos fragmentos mostrados na Figura 16 pode-se atribuir, assumindo a inserção de grupos oxigenados nos anéis aromáticos que o íon 249 m/z pode ser o resultado de $216 + 2$ oxigênios, enquanto 247 m/z, assumindo-se um rearranjo do fragmento 259 m/z da Figura 16, porém sem a cadeia de carbonos terminais, resultando em uma massa 232 m/z, se a essa massa adicionamos 2 oxigênios, temos o fragmento 267 m/z encontrado após os tratamentos. Esta hipótese ainda se confirma nos fragmentos 325, 341 e 356 m/z. Tomando como partida o fragmento 308 m/z da PSU sem tratamento, ao adicionarmos um oxigênio a molécula obtemos 325m/z, ao adicionarmos dois oxigênios, obtemos 341 m/z e ao adicionarmos três oxigênios o fragmento 356 m/z também é válido.

Para os espectros de Tof-SIMS negativos das amostras de PSU 30 e PSU 180 (Figuras 28 e 30), pode-se se confirmar algumas hipóteses levantadas nas análises dos espectros Tof-SIMS positivos. Para PSU 30 (Figura 29) podemos

ressaltar a quase ausência da fragmentação 79 m/z, e a dominância dos fragmentos 41 (C₂OH), 73 (C₆H, C₂H₅COO ou C₄H₉O), 84 (C₄H₅O₂) e 97m/z (HSO₄). Ainda na Figura 29 podemos observar que após os tratamentos os fragmentos do íons 108 e 120 m/z decrescem em intensidade enquanto os fragmentos 100, 132, 147 e 162 m/z crescem em intensidade. Os demais íons presentes no espectro negativo da PSU ST (Figura 25), não estão presentes, revelando uma superfície totalmente diferenciada. Em fragmentações em intervalo de massas maiores que 200 m/z, se repete a mesma tendência vista anteriormente nos espectros positivos de PSU 30, onde há um grande decréscimo na fragmentação, onde podemos observar na Figura 29 a presença do íons 221, 236, 254 e 295 m/z que podem ser visualizados na Figura 25. Observa-se a mesma tendência para as amostras de PSU 120 (Figura 30), onde que, do mesmo modo que para PSU 30, a inserção de grupos oxigenados nos anéis aromáticos muda completamente a fragmentação, deixando de haver fragmentos de grande massa (>200 m/z).

As análises de Tof-SIMS confirmam juntamente com as demais análises superficiais a inserção de grupos oxigenados na superfície do PSU após os tratamento com radiação UV em presença de O₂. O decréscimo de evidências de ligações duplas e também a presença de fragmentos aromáticos nos espetros Tof-SIMS sugerem que há uma inserção de átomos de oxigênio no anel aromático, tornando a cadeia polimérica mais suscetível a fragmentação. Para PSU 30, haveria uma tendência de formação de grupos C=O e OH pela enxertia de átomos de oxigênio diretamente no anel aromático. Esta reação com a molécula de O₂ poderia resultar em uma inserção de radical peróxido, que após um rearranjo molecular, como um mecanismo Photo-Fries, por exemplo, levaria a inserção de um segundo átomo no anel aromático. No caso do PSU 120 os rearranjos subsequentes desta inserção e a continua irradiação pode levar a abertura do anel em alguns pontos da molécula, conferindo os grupos encontrados nas análises de XPS uma menor quantidade de grupos C=O, porém mantendo-se quantidades de grupos C-OH e COO. Esta abertura de anel revela-se na quase inexistência dos sinais de C=C nos espectros de XPS e NEXAFS e na fragmentação observadas nos espectros de Tof-SIMS.

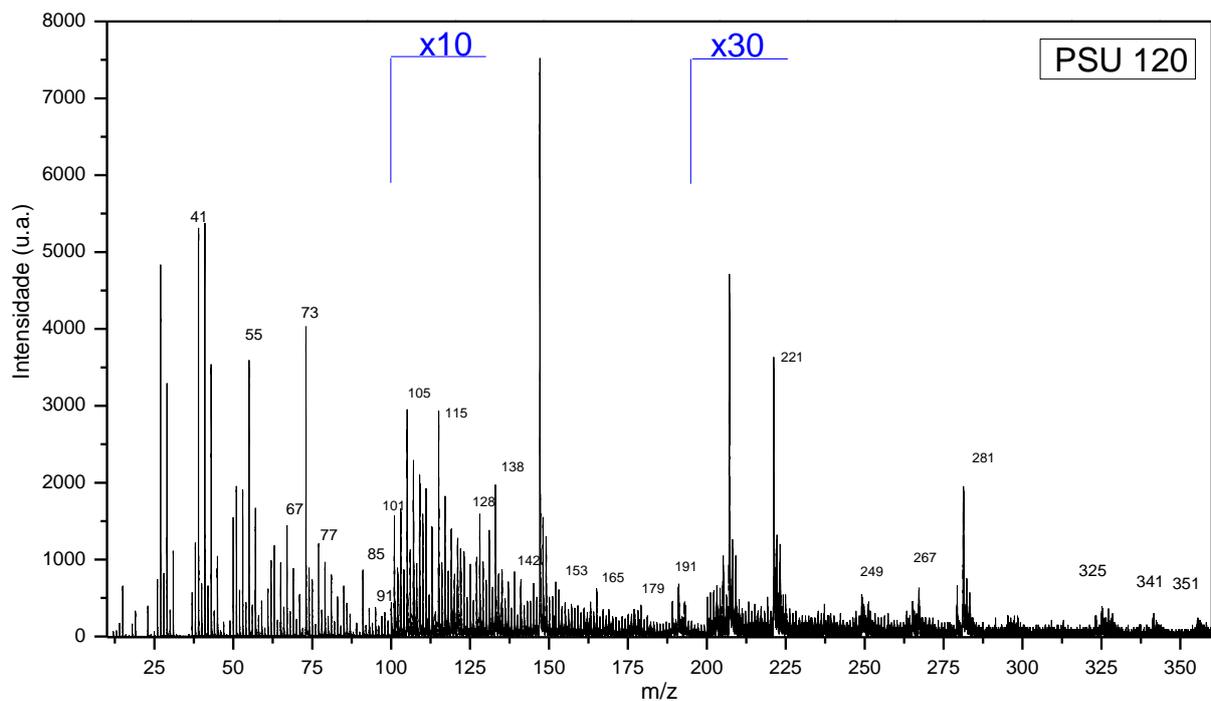


Figura 29. Espectro ToF-SIMS (modo positivo) da amostra de PSU 120.

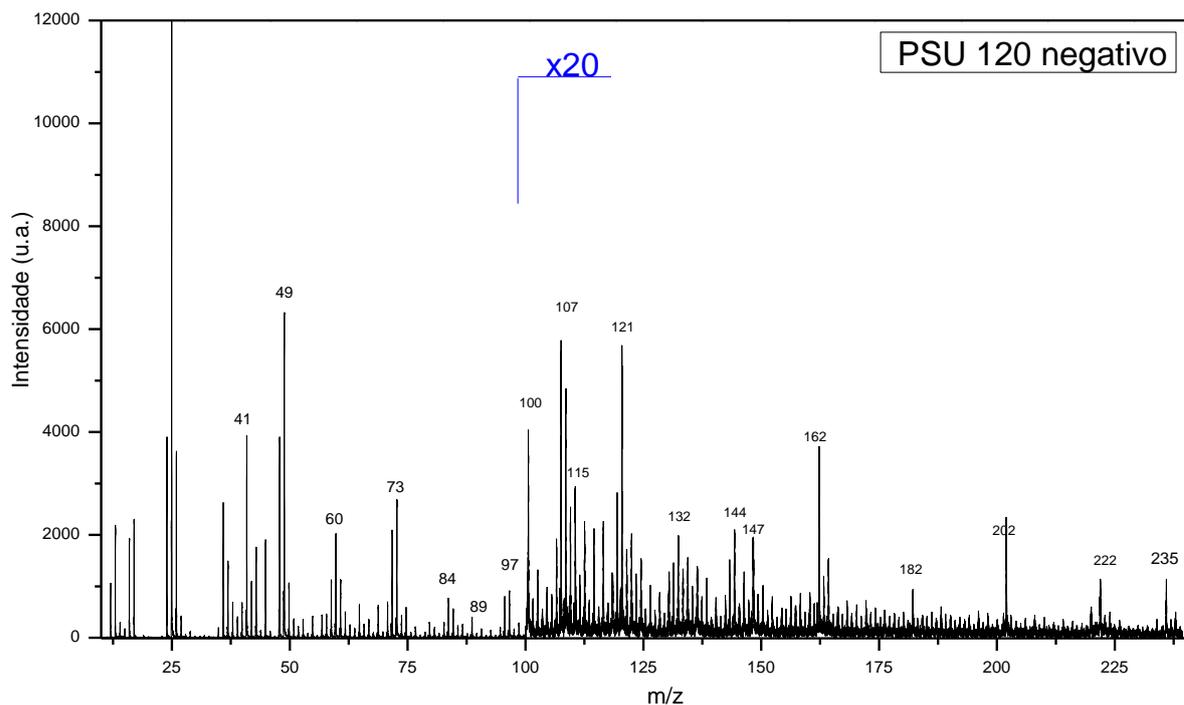


Figura 30. Espectro ToF-SIMS (modo negativo) da amostra de PSU 120.

A Figura 31 mostra o espectro de íons positivos da PU sem tratamento. Podemos identificar entre os fragmentos encontrados, vários já descritos na literatura.¹⁶⁸⁻¹⁷⁴ A cadeia polimérica da PU pode ser separada em dois segmentos: rígido e flexível. O segmento rígido é composto pelo diisocianato de difenilmetano.

O segmento flexível é composto 1,4 butano-diol. As possíveis fragmentações de ambos segmentos estão representadas na Figura 32 para íons positivos da PU ST.

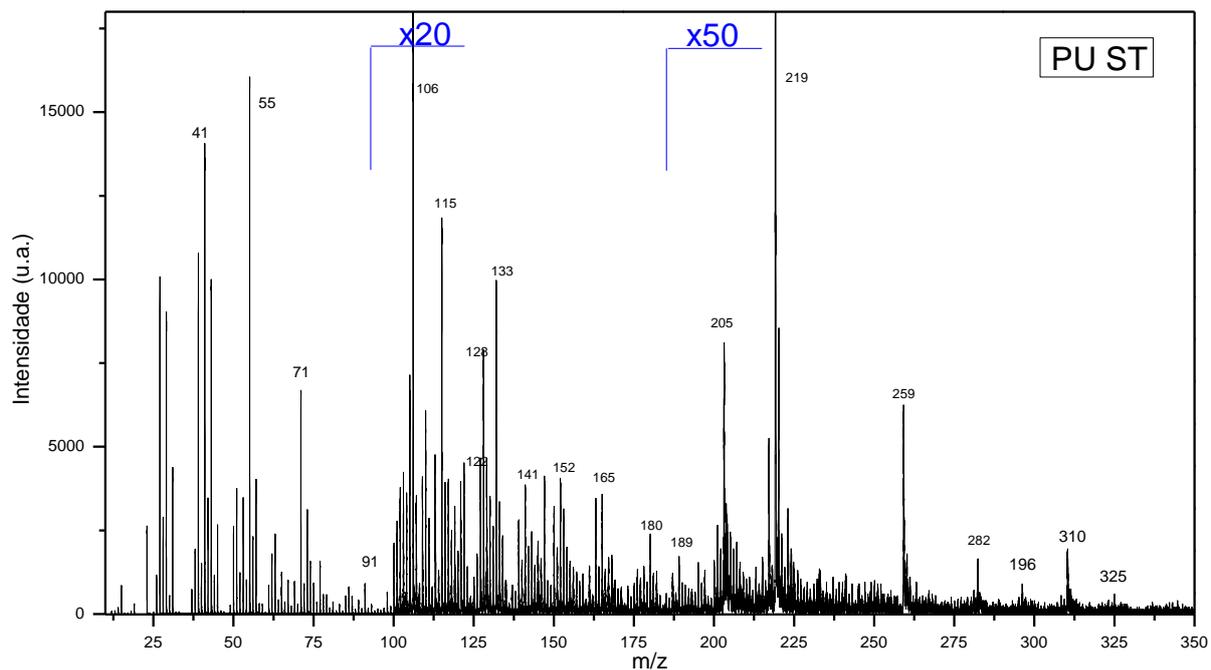


Figura 31. Espectro Tof-SIMS positivo PU ST

Após as irradiações há uma visível mudança no espectro de íons positivos da PU. Comparando os espectros tof-sims de íons positivos das amostras PU30 e PU120 (Figuras 33 e 35) com da amostra de PU ST (Figura 31) podemos notar várias mudanças na fragmentação, que indicam a funcionalização da superfície dos polímeros por ação da radiação UV em presença de O_2 . No espectro de íons positivos da PU30, há o acréscimo do fragmentos 55 m/z e 63 m/z.

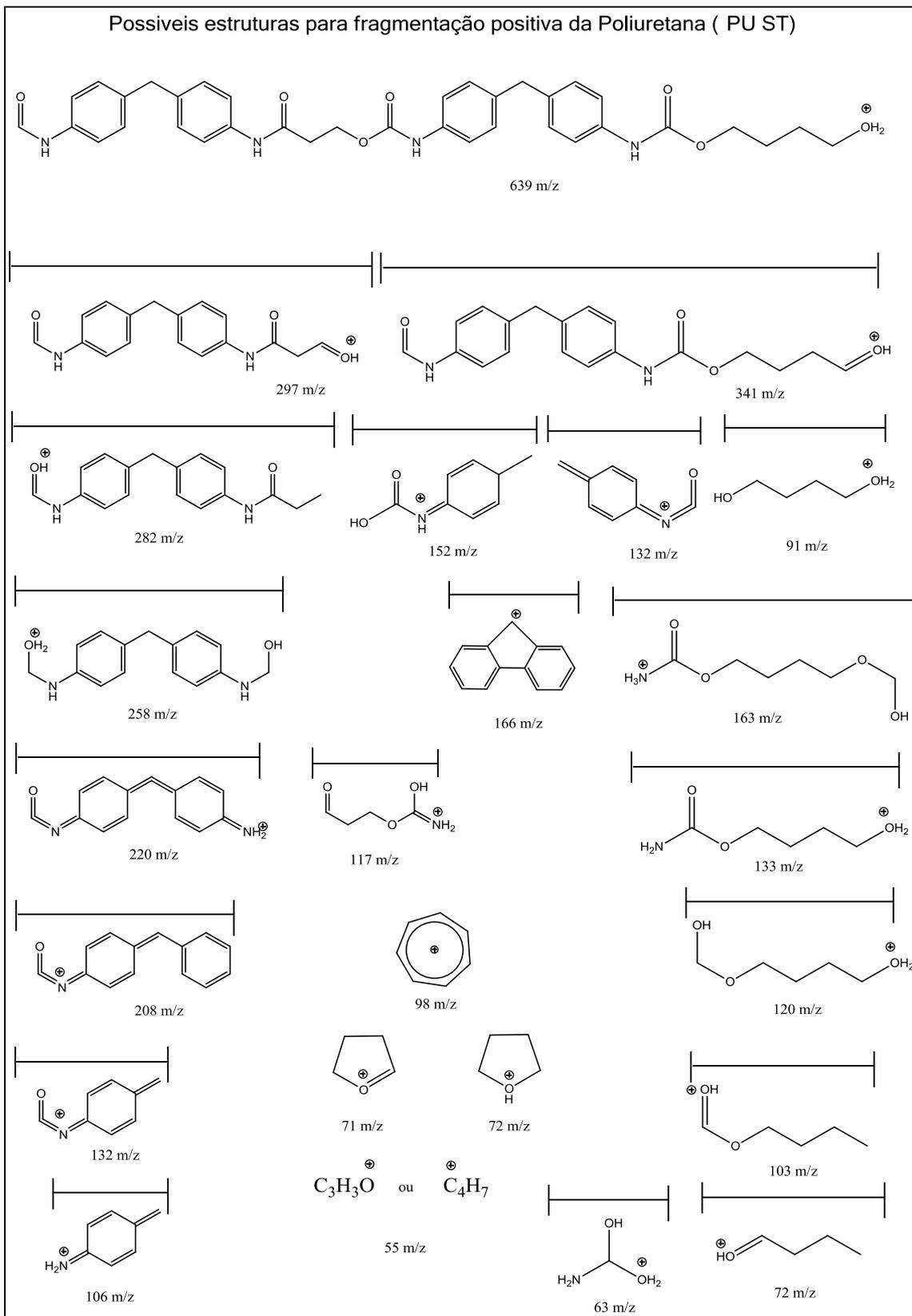


Figura 32. Possíveis estruturas da fragmentação de íons positivos no espectro Tof-SIMS da PU ST.

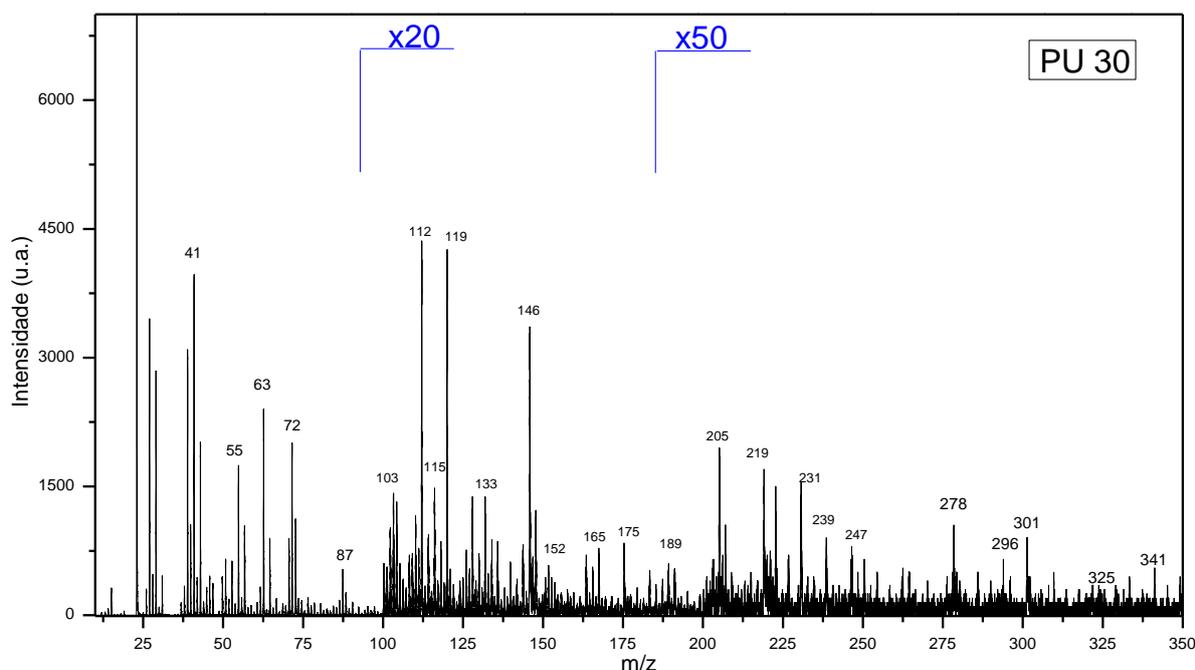
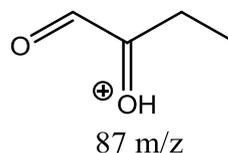
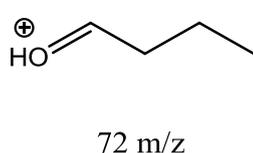
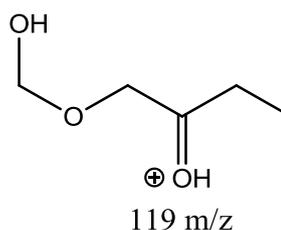
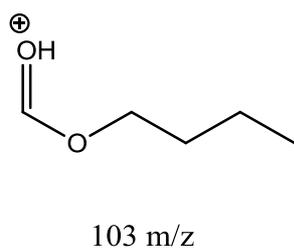


Figura 33. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra PU 30.

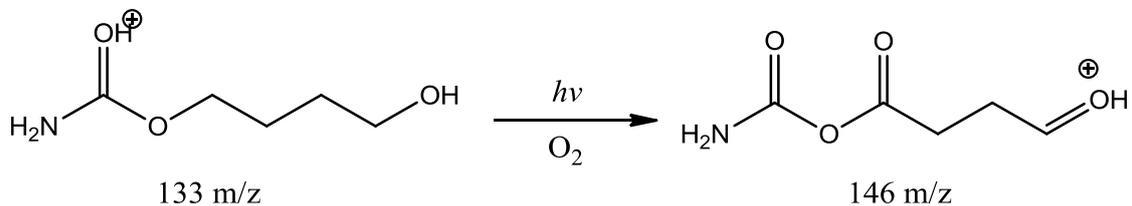
Surge um novo fragmento com os tratamentos em 87 m/z. Este fragmento pode ser formado pela inserção de um átomo de oxigênio no segmento flexível da molécula de PU, possibilidade esta que foi discutida anteriormente.



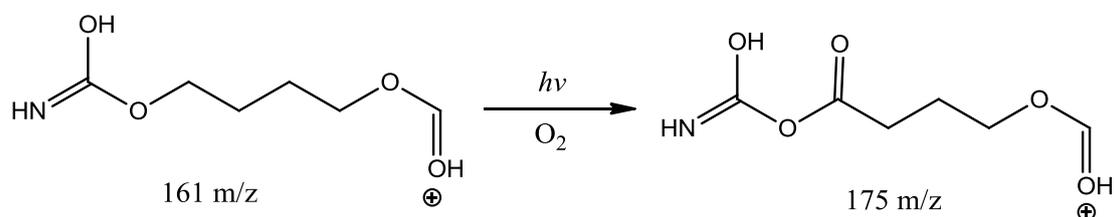
Pode-se ressaltar ainda um decréscimo no fragmento 106 m/z. que faz parte dos segmentos rígidos da cadeia de PU. O fragmento 119 m/z tem um acréscimo de intensidade e também pode indicar a incorporação de oxigênio no segmento flexível da molécula, especialmente se considerarmos o fragmento 103 m/z que se origina do mesmo segmento e adicionarmos um átomo de oxigênio obtemos o fragmento 119 m/z.



A ideia ainda pode se sustentar modificação de outros fragmentos no espectro. O fragmento 133 m/z, que sofre um decréscimo de intensidade, e notamos que surge um novo fragmento em 146 m/z. Novamente o rearranjo com um átomo de oxigênio resolve a estrutura.



Do mesmo modo o fragmento 175 m/z, não presente no espectro positivo da PU ST e presente no espectro positivo da PU 30, também confirma os fragmentos anteriores, no esquema abaixo, tomando como base o fragmento 161 m/z obtemos:



Ainda podemos observar que um inserção de um átomo de oxigênio na estrutura flexível da molécula de PU afetaria a intensidade de fragmentações maiores, relacionadas com este segmento. Isto é observado para as fragmentações, 325 e 310 m/z que reduzem de intensidade para PU 30.

A ausência de mudança na fragmentação indica também que determinadas partes da molécula não se modificam. Confirmando dados de análise de XPS, onde verificamos que as ligações C=C e C-N não sofrem grandes alterações e as mudanças de molhabilidade são recorrentes a inserção de oxigênio na superfície da PU. Os fragmentos 152, 165 e 189 m/z, não se modificam em intensidade. Como pode ser observado na Figura 32, estes fragmentos correspondem a fragmentos de estrutura rígida da molécula de PU, que contém anéis aromáticos. Embora nos inícios dos estudos esperava-se que, assim com a PSU, as ligações aromáticas poderiam ser modificadas pelo processo, porém a não modificação destes fragmentos, juntamente com as demais análises anteriores confirmam que para o tempo de tratamento de 30 min em presença de radiação UV e O₂, a PU basicamente sofre ataque em seu segmento flexível, ou seja, as cadeias alifáticas.

Mesmo assim, apesar de não haver modificação nas ligações duplas dos anéis aromáticos da PU, a ação da radiação UV pode induzir modificações conformacionais que podem resultar em diferenças na fragmentação da superfície do polímero. Podemos observar no espectro da Figura 33 que há uma redução de intensidade nos fragmentos 219 m/z, e 259 m/z, estes fragmentos são fragmentos filhos da primeira quebra da molécula de PU em 295 m/z. São formados pelo grupo di-isocianato do segmento rígido do PU. É conhecido na literatura^{175,176} que este grupo e, em especial as poliuretanas, sob ação de radiação Visível ou UV, podem sofrer o rearranjo Foto-Fries, que desloca o carbono do grupo cianeto em uma posição *meta* à sua posição original sem que haja quebra da cadeia polimérica, como pode se observar na Figura 34.

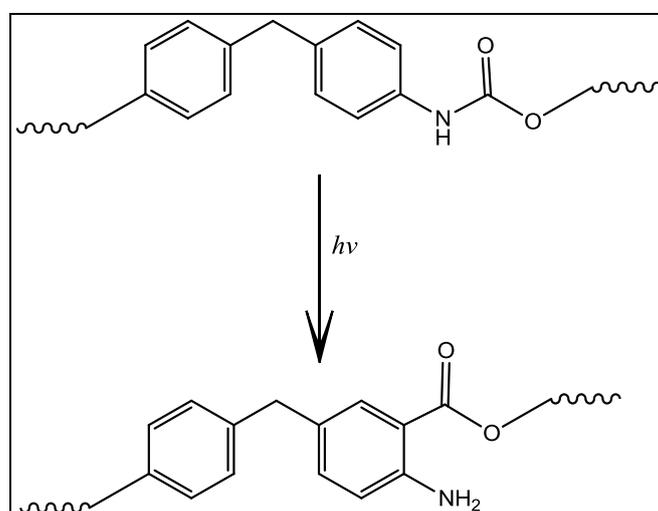
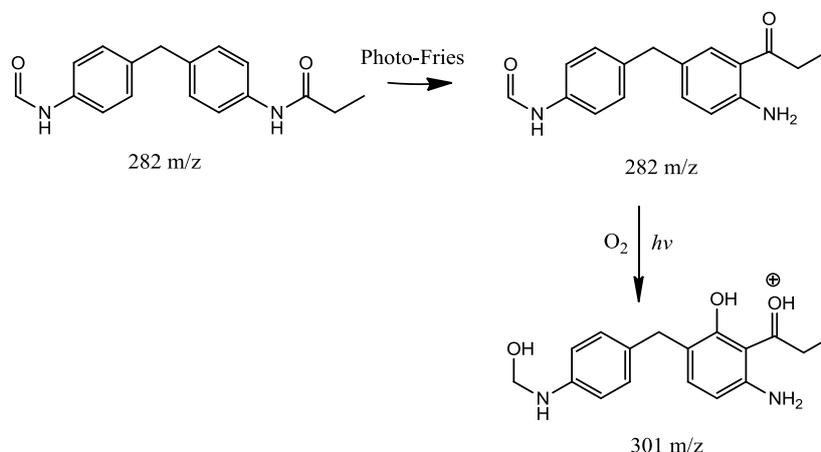


Figura 34. Representação simplificada do rearranjo Photo-Fries no segmento rígido da PU.

Este rearranjo acontece na PU, neste caso, possibilitaria uma nova janela de funcionalização na molécula. Como demonstrado no esquema abaixo, após sofrer o rearranjo Photo-Fries, esta nova carbonila ligada diretamente ao anel aromático, poderia sob irradiação UV extrair um H em posição γ -carbonila no anel aromático. A extração levaria à formação de um radical que sob atmosfera de O_2 , promoveria uma nova inserção de oxigênio à molécula. Sendo assim, o fragmento 286 m/z que corresponde à uma fragmentação onde um possível rearranjo Photo-Fries, presente no espectro, também poderia originar com um acréscimo de um átomo de oxigênio o fragmento 301 m/z, presente apenas no espectro de íons positivos da PU30. Ainda o rearranjo Photo-Fries implica em uma redução nas fragmentações menores

como 259, 219 e 120 m/z, o que é observado comparando os espectros positivos de PU ST e PU 30 (Figuras 31 e 33).



Com o aumento do tempo de irradiação em presença de O_2 , é esperado que em algum ponto, possa ocorrer a quebra da cadeia polimérica. O espectro de íons positivos da amostra de PU 120, mostrado na Figura 35, revela uma grande modificação na superfície da PU, especialmente no que diz à sua fragmentação.

À primeira vista, o mesmo comportamento observado para os espectro de PU 30 é verificado, como o aumento de intensidade das fragmentações 55, 63 e 72 m/z, além do surgimento da fragmentação 87 m/z.

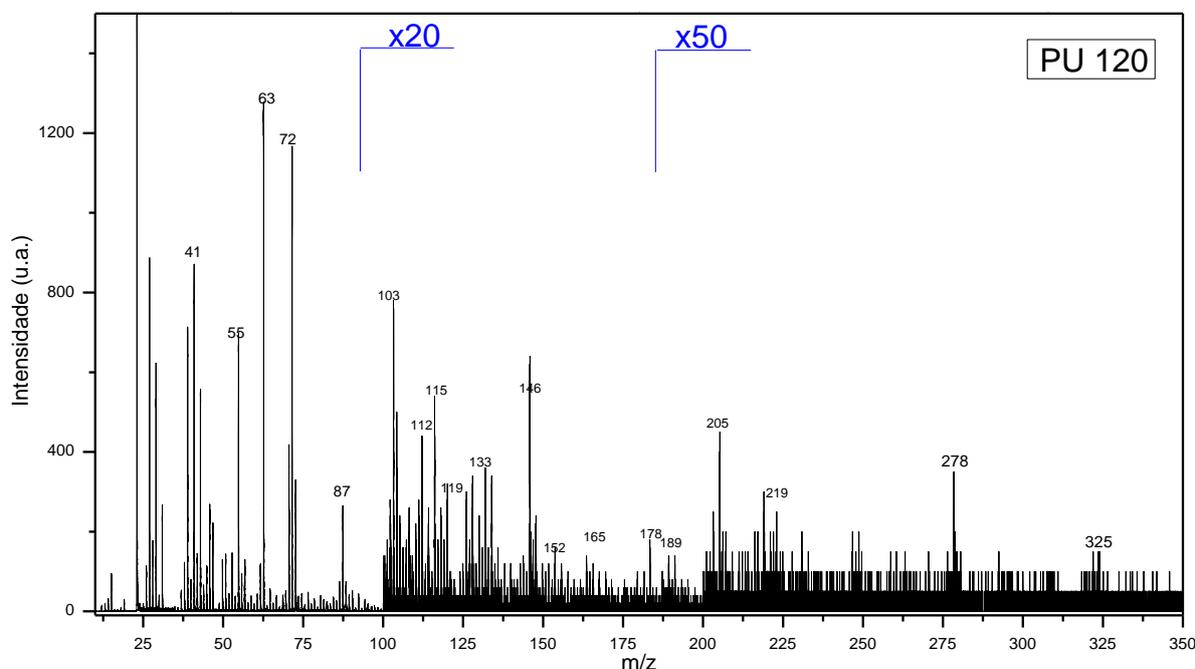


Figura 35. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PU 120.

Do mesmo modo, os fragmentos localizados entre o intervalo de massas de 100 a 130 m/z, mantêm-se os mesmos. O fragmento 146 m/z que como antes discutido, demonstra a funcionalização do segmento flexível da molécula e aparece como uma importante componente do espectro, porém, a partir disto, começam significativas diferenças. Podemos notar um decréscimo nas fragmentações 152, 165, 175, 178 e 189 m/z. Ainda as fragmentações do intervalo de massas acima de 200 m/z sofrem grande redução restando apenas os fragmentos 278 e 325 m/z e ainda em pequena intensidade. Esta grande redução de fragmentação em intervalos maiores, como observado antes para o PHB pode significar a quebra da cadeia polimérica (possivelmente com *cross-linking* das cadeias poliméricas), a contínua irradiação em presença de oxigênio leva a uma saturação dos sítios disponíveis para a funcionalização da molécula, conseqüentemente o próximo passo é a quebra da cadeia polimérica, de modo a minimizar a energia absorvida. Isto é refletido diretamente na fragmentação de massas, já que a quebra ocorre randomicamente na cadeia, os fragmentos menores ainda aparecerão no espectro, porém os fragmentos de maior massa, acabam diminuindo de intensidade. Cabe ressaltar ainda que a introdução de oxigênio na cadeia polimérica acarreta no acréscimo de pontos de quebra no momento da fragmentação na análise de massas, ou seja a ausência de fragmentos maiores na superfície da PU 120, não necessariamente aponta para fotodegradação, mas para uma maior concentração de grupos oxidados na superfície, como apontam as demais análises de superfície.

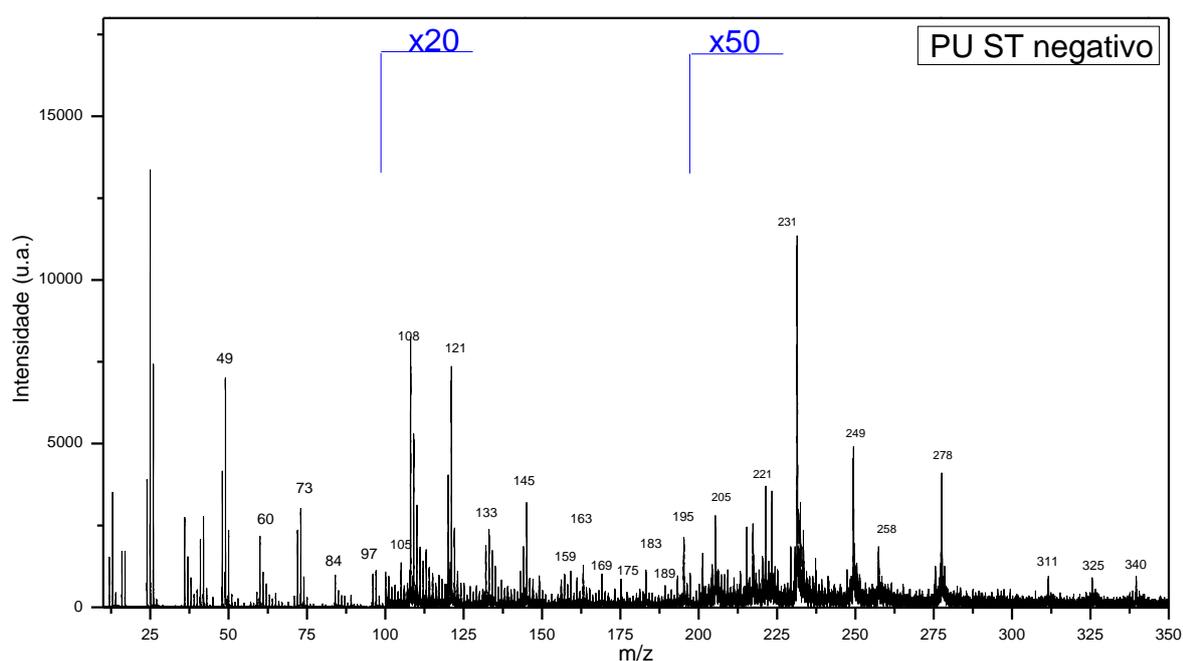


Figura 36. Espectro Tof-SIMS de íons negativos da amostra de PU ST.

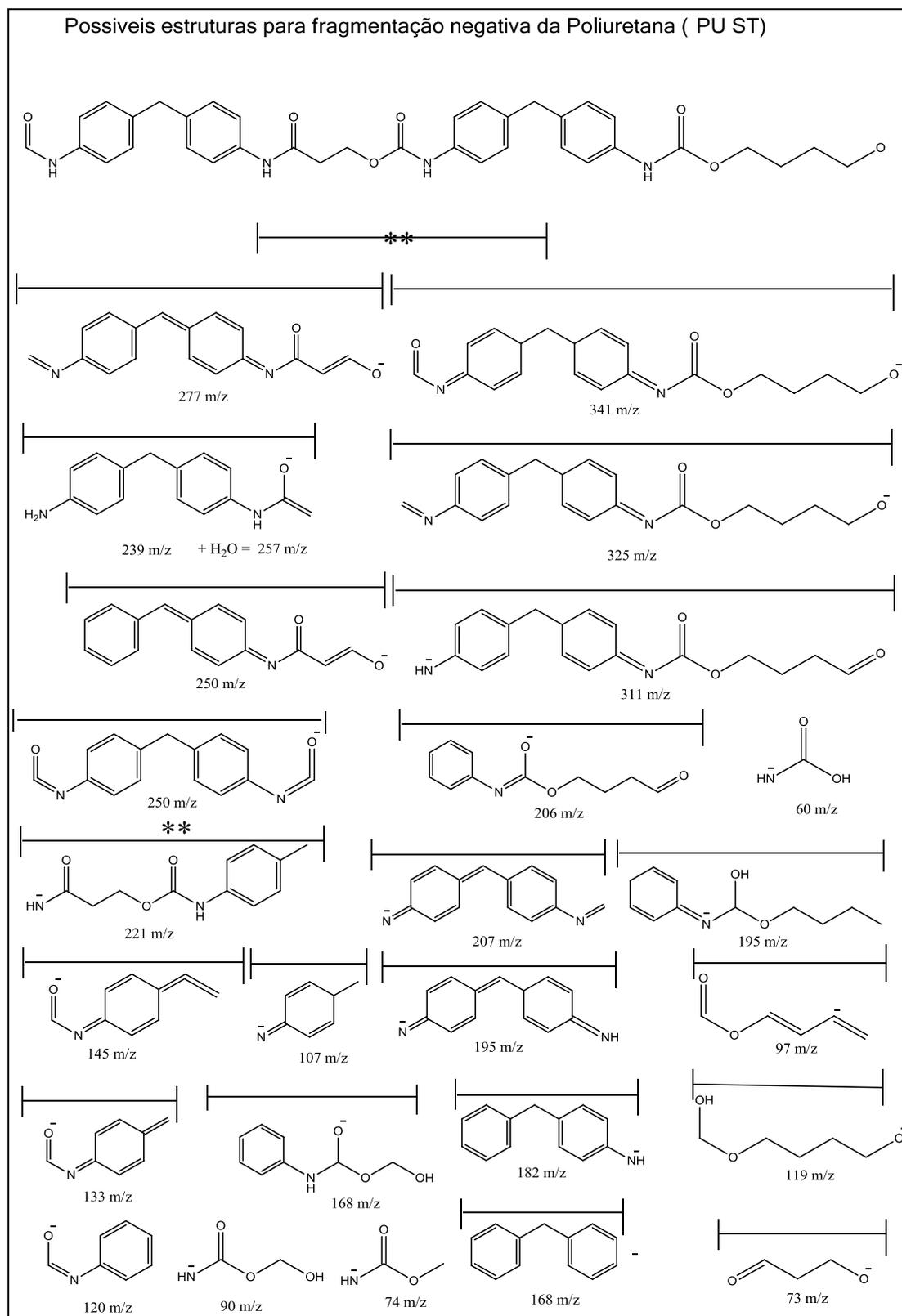


Figura 37. Possíveis estruturas da fragmentação de íons negativos no espectro Tof-SIMS da PU ST.

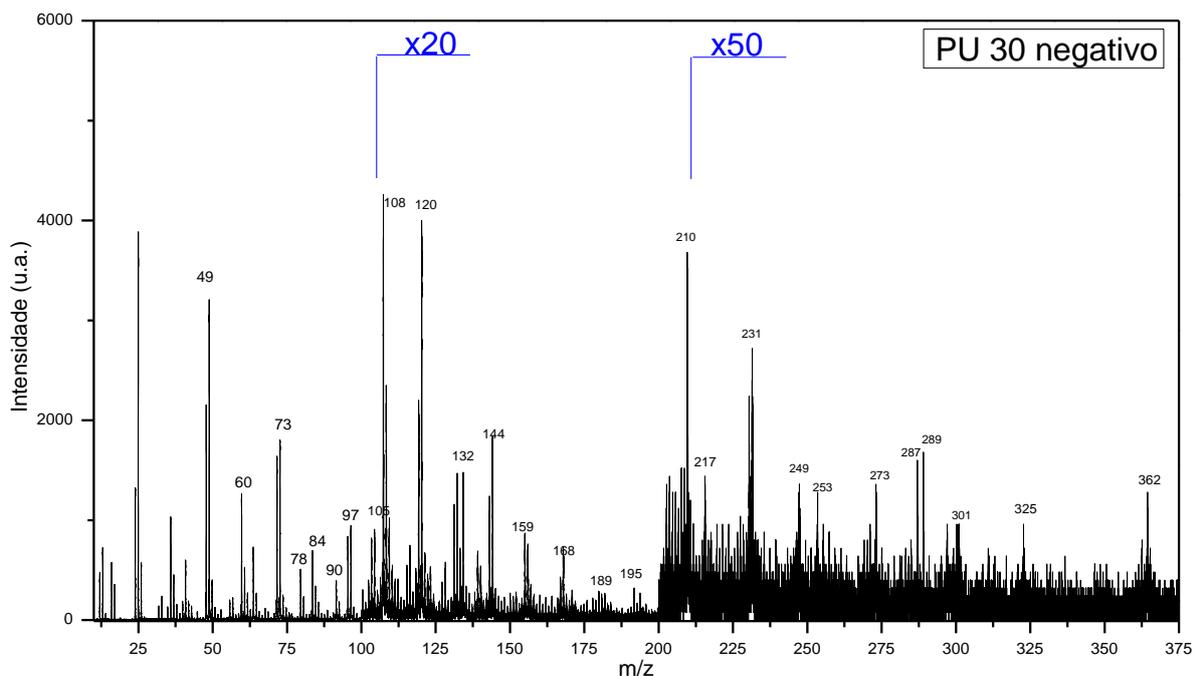
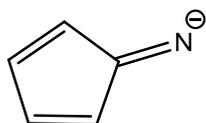


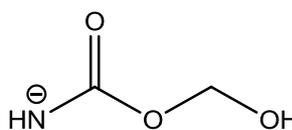
Figura 38. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PU 30.

Quando se analisa polímeros que possuem muitos grupos eletronegativos em sua estrutura, a análise dos íons negativos se faz necessária, pois há a preservação da informação estrutural de fragmentos que possuem carga negativa. A Figura 36 mostra o espectro de íons negativos da amostra de PU ST. Embora haja muita informação neste espectro, a maioria dos trabalhos da literatura não apresenta o espectro negativo. A Figura 36 traz possíveis estruturas de fragmentos negativos para PU ST, que foram encontradas na literatura,^{168,169,171,174} ainda assim alguns fragmentos são sugeridos com base nas leis de fragmentação de massas.

Novamente realizando a análise comparando dos espectros da PU ST (Figura 36) com espectros da PU 30 (Figura 38). Podemos observar que há um aparente aumento na intensidade dos fragmentos 49, 60 e 73 m/z. Pode-se destacar neste intervalo de massa ainda os fragmentos 78 m/z e 90 m/z. Estes fragmentos não estão presentes na PU ST, e observando as estruturas abaixo, mostram o fragmento 90 m/z provém da inserção de oxigênio na cadeia polimérica.



78 m/z

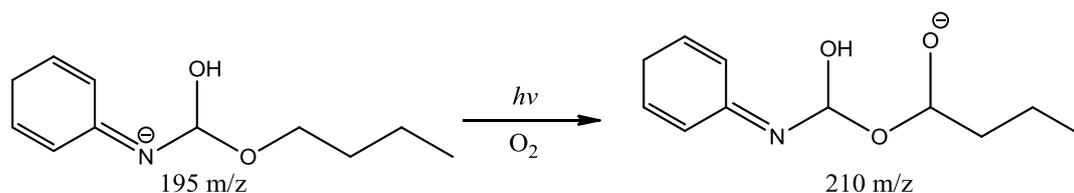


90 m/z

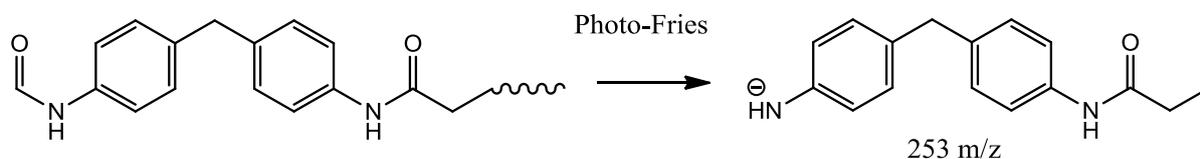
Do mesmo modo do que foi observado nos espectros positivos, os fragmentos correspondentes aos segmentos aromáticos da molécula de PU não sofreram mudança, tais como os fragmentos 108, 120, 133, 165, 168, 159 e 189 m/z.

Porém os fragmentos 163, 175 e 183 m/z, deixam de aparecer no espectro da Figura 38. Considerando as possíveis fragmentações de íons negativos da Figura 37, podemos ressaltar que estes fragmentos são derivados da fragmentação 221m/z, que também desaparece do espectro de íons negativo da PU 30. Isto também poderia justificar um rearranjo Photo-Fries, como discutido anteriormente.

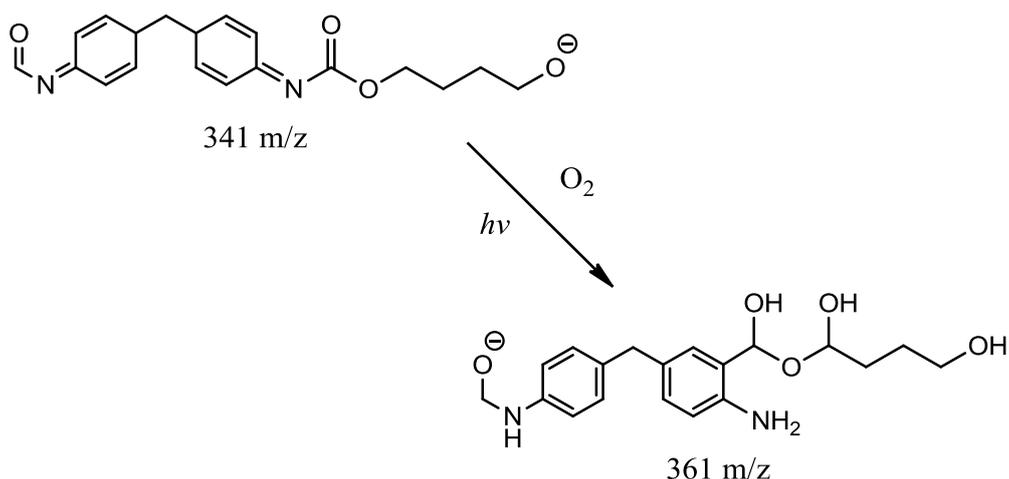
A maior modificação no espectro de íons negativos da PU 30 fica por conta do intervalo de massa acima de 200 m/z. O fragmento 206 m/z decresce em intensidade enquanto o fragmento 210 m/z aumenta, frente a este comportamento pode-se e ao que foi observado nos espectros positivos pode se sugerir as seguintes estruturas:



O fragmento 253 m/z que surge no espectro pode ser derivado também de um rearranjo Photo-Fries, o que também explica o decréscimo do fragmento 206 m/z.



O fragmento 362 m/z também ausente no espectro de íons negativos da PU ST reforça a idéia de inserção de oxigênio no segmento flexível da molécula e o decréscimo do fragmento 341 m/z sugere a seguinte reação:



Comparando os resultados dos espectros Tof-SIMS positivos e negativos para a PU 30, pode-se assumir que as estruturas de anéis aromáticos são afetadas apenas pelo rearranjo Photo-Fries, e que possa haver uma eventual inserção de um átomo de oxigênio no anel aromático. Porém, esta inserção não ocasiona a ruptura do anel, ou mesmo a redução de ligações duplas como foi observado para os resultados de XPS e FTIR. Ainda, com base nos fragmentos encontrados, pode-se dizer que para 30 min de irradiação UV em presença de O_2 , a PU a principal reação fotoquímica é a Norrish Tipo II com abstração de H em posição γ -carbonila, não levando a quebra da cadeia pela presença atmosfera reativa.

A Figura 39 traz o espectro de íons negativos da PU 120 mostra a fragmentação característica da PU ST sobreposta com fragmentos observados para amostra de PU 30. Embora os fragmentos observados possam ser justificados do mesmo modo que para PU 30, pode-se observar uma menor intensidade dos fragmentos nos intervalo de massa superior a 200 m/z. O mesmo comportamento que para os íons positivos, o que reforça a ideia já discutida, onde em um tempo mais longo de irradiação a cadeia polimérica começa a sofrer clivagem, dando lugar a reações Norrish Tipo II.

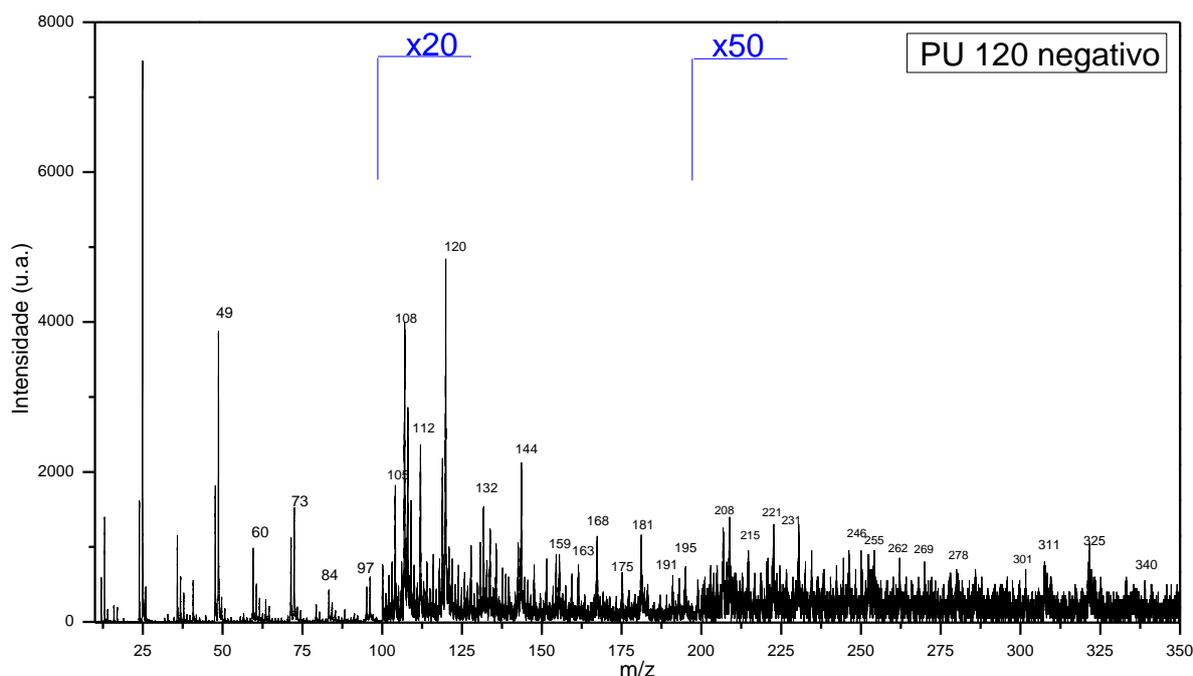


Figura 39. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PU 120.

Em resumo a cadeia polimérica para PU30 conta com a inserção de átomos de oxigênio no segmento flexível da molécula e rearranjo Photo-Fries tornando o grupo nitrogenado mais disponível na cadeia polimérica. As superfícies de PU120 além dos mesmo processos visto em PU30 provavelmente sofrem quebra da cadeia polimérica em posições randômicas na superfície, conferindo uma maior inserção de oxigênio nos radicais formados pela quebra. Mesmo assim para PU 120 o segmento rígido da molécula tende a se manter, confirmando os dados de XPS.

5.2 Adesão e Viabilidade Celular

Nos ensaios de adesão, as células tronco mesenquimais foram semeadas nas superfícies poliméricas e, após um período de seis horas, seus núcleos foram marcados (Figura 40) e contados. Os valores médios observados para todas as amostras estão presentes na Figura 41, onde as letras indicam amostras pertencentes ao mesmo grupo estatístico, ou seja, que não há diferença estatística ($p > 0.6$) entre grupos de mesma letra.

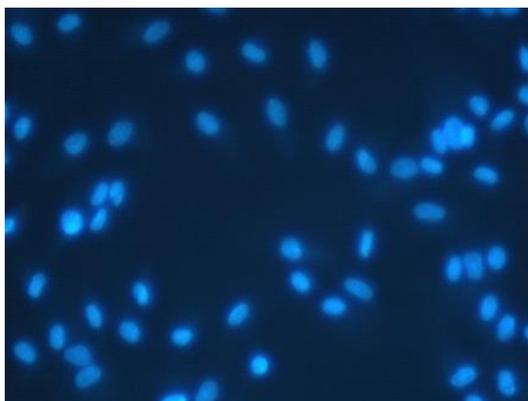


Figura 40. Exemplo de uma imagem das amostras avaliadas com núcleos de células tronco mesenquimais marcados com DAPI em uma área de $97.2 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$.

Quando comparamos o número de células aderidas no grupo controle com todos os outros grupos, as amostras PSU 30 ($p=0,947$), PSU120 ($p=0,189$) e PU 120 ($p=1,0$) não mostraram diferença estatística do grupo controle, ou seja, estas superfícies possuem uma adesão tão boa quanto o grupo controle. O que pode se observar quando se compara cada polímero não tratado com as amostras tratadas é que os tratamentos aumentaram significativamente a adesão de células às superfícies de todos os polímeros. Para PSU, que sem tratamento já apresenta uma boa adesão celular, houve um aumento da adesão com os tratamentos, embora não haja diferença estatística entre a amostra não tratada e a amostras tratadas por 120 min. Para os demais polímeros, PU e PHB há um impressionante aumento na adesão celular após os tratamentos.

Em relação aos testes de viabilidade celular, as células foram deixadas em contato com as superfícies poliméricas durante um, quatro e sete dias. Ao final de cada um desses períodos, o ensaio MTT forneceu o número de células vivas nas superfícies das amostras. Os resultados expressos em absorbância são relacionados com o número de células viáveis: quanto maior a absorbância, maior é o número de células viáveis. Nas figuras esse resultado está expresso em % de absorbância do controle. As Figuras 42, 43 e 44, mostram os ensaios de MTT corridos em 7 dias para cada linhagem de células utilizadas.

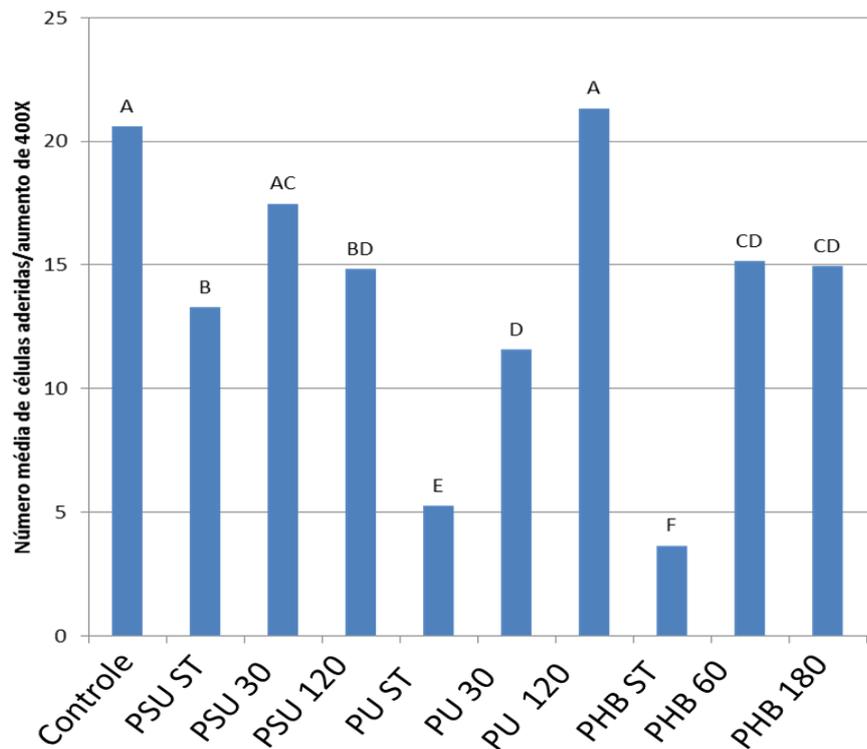


Figura 41. Gráfico do número médio de células aderidas após 6 horas de cultivo. As letras indicam amostras pertencentes ao mesmo grupo estatístico, ou seja que não há diferença estatística entre grupos de mesma letra.

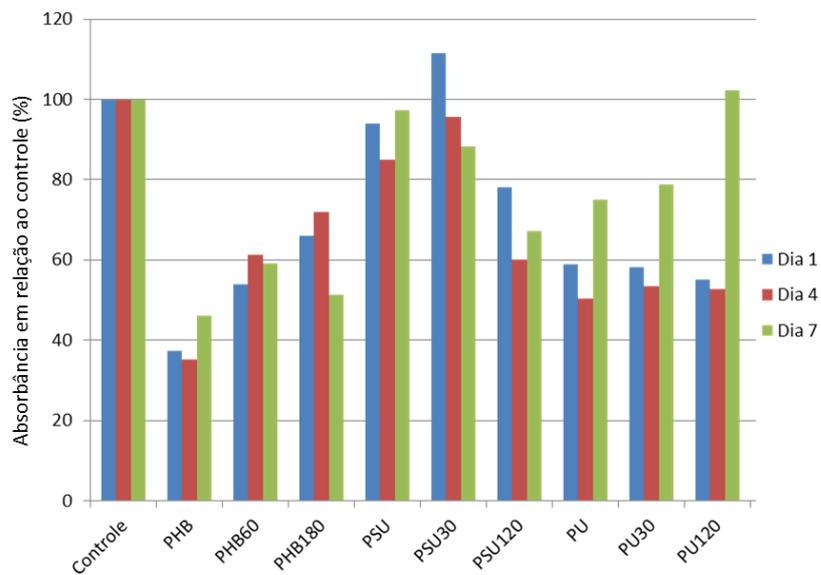


Figura 42. Resultados do ensaios de viabilidade celular pelo método MTT durante um, quatro e sete dias para linhagem de células tronco mezenquimais da linhagem 1310.

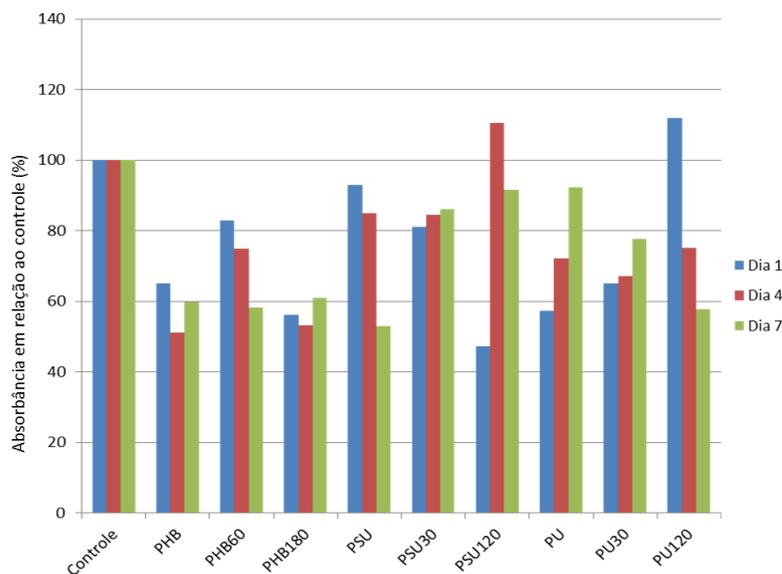


Figura 43. Resultados do ensaios de viabilidade celular pelo método MTT durante um, quatro e sete dias para linhagem de células tronco mezenquimais da linhagem 2710.

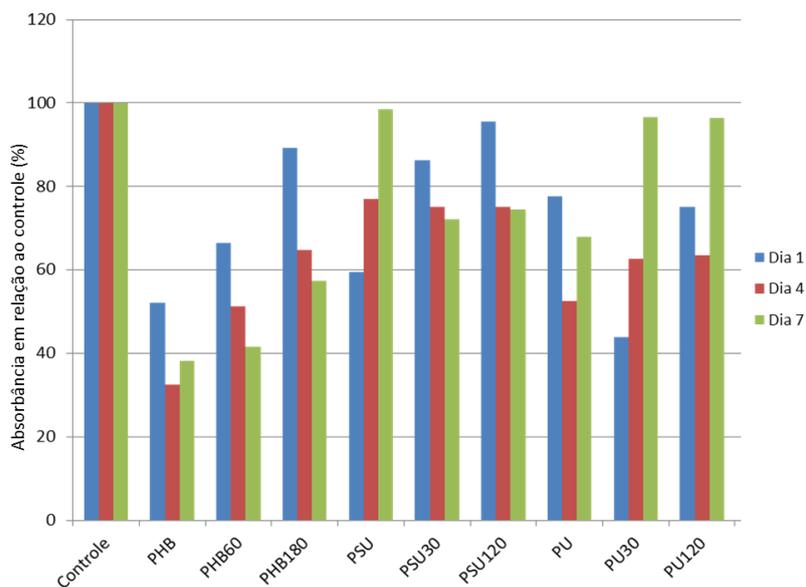


Figura 44. Resultados do ensaios de viabilidade celular pelo método MTT durante um, quatro e sete dias para linhagem de células tronco mezenquimais da linhagem 0311.

Em uma análise generalizada das Figuras 42, 43 e 44 pode-se dizer que embora haja alguns comportamento diferenciados, em geral os tratamentos indicaram uma melhora na viabilidade celular com algumas amostras chegando a valores superiores ao controle, o que significa um crescimento superior ao padrão utilizado neste tipo de teste que indica a biocompatibilidade. A Figura 45 traz as médias dos

resultados obtidos nos experimentos MTT.

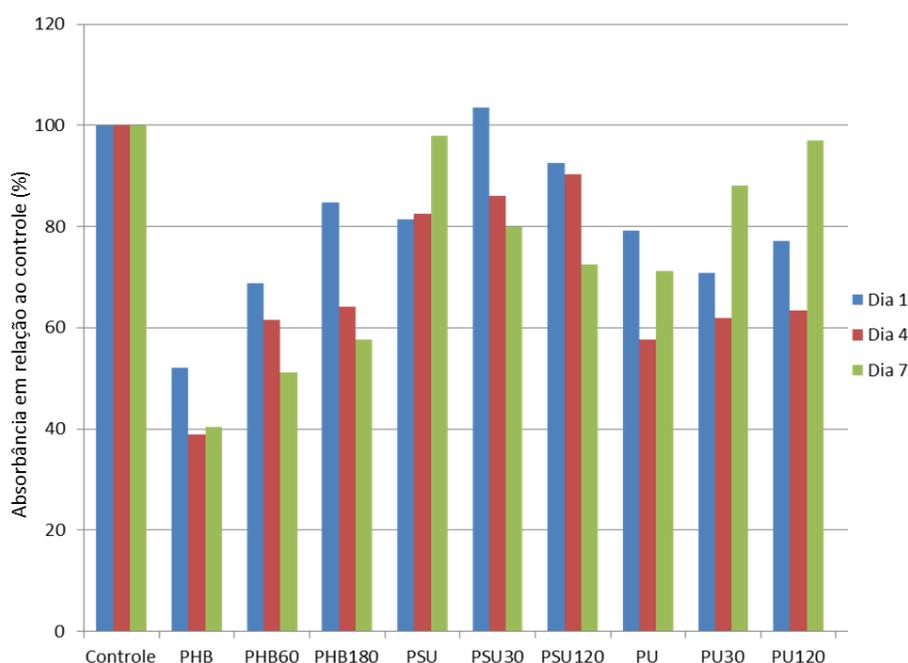


Figura 45. Média dos resultados dos ensaios de viabilidade celular pelo método MTT durante um, quatro e sete dias para todas as linhagens de células tronco mezenquimais.

A partir dos testes estatísticos realizados com os dados da Figura 45 não pode-se observar que, em termos de viabilidade celular, há diferença estatística ($p < 0.001$) com a evolução temporal do teste, ou seja considerando os sete dias de cultivo, as células proliferaram e aumentaram em número com o passar do tempo para todos os grupos. Isto quer dizer que, em todos os tratamentos, não há inibição de crescimento celular.

Quando observamos cada grupo separadamente podemos notar alguns pontos que merecem ser destacados. Para o grupo de PHB, há uma diferença estatística entre as amostras não tratadas e as amostras tratadas por 60 e 180 min e esta diferença se mantém após sete dias de cultivo. Para o grupo da PSU, até quatro dias de crescimento não há diferença estatística entre as amostras tratadas e não tratadas, porém após sete dias, há diferença estatística entre a amostra de PSU 120 e as amostras PSU 30 e PSU ST. No caminho contrário da PSU, as amostras de PU mostraram que após sete dias de cultivo as amostras tratadas (PU 30 e PU 120) possuem diferença estatística e ainda possuem uma melhor viabilidade celular em relação a PU sem tratamento.

A partir destes resultados pode-se dizer que os tratamentos aplicados nas amostras tem grande influência na adesão celular, onde, em todas as amostras

avaliadas, os filmes que foram tratados com radiação UV em presença de O₂ mostraram um grande número de células aderidas em comparação com os polímeros sem tratamento.

Em geral, funcionalidades hidrofílicas fornecem uma interface de baixa energia livre, resultando em uma redução na adsorção das proteínas plasmáticas, que permite a adesão celular, com a deposição de proteínas da membrana extracelular, como colágeno, fibronectina, laminina, e outras que interagem com o biomaterial^{111,177}. Nesse sentido, as superfícies hidrofílicas podem aumentar a adesão da célula e, conseqüentemente, as superfícies mais hidrofílicas mostraram-se mais propícias a adesão celular.

Considerando os testes de viabilidade celular nota-se que houve diferenças e o WCA das amostras não foi suficiente para atribuir linearidade ao crescimento celular. Embora haja melhoria na adesão, alguns filmes mostraram que uma superfície mais hidrofílica não necessariamente pode ser atribuída a uma superfície mais adequada as células. Resultados similares foram encontrados por Jacobs et al.²⁵ Em seu trabalho, uma diferença inicial em termos de adesão foi observada, mas após sete dias de análise não havia mais diferenciação no crescimento celular.

O diferente comportamento observado para cada polímero e seus tratamentos reflete-se na diversidade de superfícies obtidas com os tratamentos. Dependendo da química superficial obtida no final do processo, a resposta de crescimento celular poderá ser atrelada a essa superfície. Por exemplo, uma diferença básica entre os tratamentos da PSU e da PU é a presença de grupos nitrogenados, que, mesmo após os tratamentos permaneceram na superfície de PU, e como foi explorado anteriormente, o rearranjo Photo-Fries e o rompimento da cadeia polimérica poderiam tornar o grupo NH₂ mais exposto, ou seja, fora da cadeia polimérica. Esta mudança na conformação torna o grupo NH₂ mais disponível para interação. Alguns estudos¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ apontam que células proliferam melhor em substratos que contêm grupos N-H em suas estruturas. Outros autores⁵¹ ainda sugerem que uma moderada molhabilidade mostra-se mais efetiva no aumento da biocompatibilidade do que superfícies muito hidrofílicas.

Como discutido anteriormente, enquanto a PU possui um sítio de modificação na seção poliéter de sua estrutura e a sua modificação poderia levar a formação de grupos COO no segmento flexível da PU sem que os anéis aromáticos fosse afetados, no caso da PSU os anéis aromáticos são diretamente afetados, com a formação de maior ou menor quantidade grupos C=O e COO em virtude do tempo

de tratamento. Do mesmo modo, o PHB não possui qualquer grupo aromático em sua estrutura e já é considerado um poliéster biocompatível. Os resultados de crescimento celular mostram um grande acréscimo às amostras tratadas, na qual é evidente uma melhora no crescimento celular (Figura 45). No PHB as análises de superfície mostraram que há a formação de novos tipos de grupos COO que se tornariam mais disponíveis à interação proteica já que esses grupos não estariam na cadeia carbônica principal, ou seja, após a clivagem da ligação éster haveria a neutralização dos radicais formando grupos carboxílicos e mesmo, grupos éster por cruzamento de cadeias. Estes grupos mostram-se melhores para a interação da superfície com o meio biológico.

Nesse contexto, o efeito da funcionalidade superficial sobre a adsorção de proteínas foi extensivamente estudado nos recentes anos. Alguns desses trabalhos mostraram que a adsorção de água em superfícies modificadas com radicais hidroxilas é suficiente para competir com a adsorção de fibrinogênio.^{50,55,181,182} O fibrinogênio é capaz de interagir hidrofobicamente com superfícies funcionalizadas com grupos metílicos concordando com estudos prévios sobre a forte adsorção de fibrinogênio a superfícies hidrofóbicas.¹¹⁰ Ainda no mesmo estudo, pequenas mudanças na densidade de grupos amina na superfície influenciavam fortemente na adsorção de fibrinogênio.

Superfícies com grupos COOH possuem carga negativa na superfície do material. Normalmente contribuindo para o aumento da adesão e a biocompatibilidade. Porém, esse fenômeno é dependente da concentração de COOH na superfície.¹¹⁰ Superfícies que possuem uma quantidade considerável de grupos COOH mostram-se inibidoras de crescimento celular. Mesmo quase não havendo fibrinogênio nos testes realizados, várias outras proteínas plasmáticas estão presentes e podem exibir o mesmo comportamento e influenciar da mesma maneira.¹⁸³ Nos resultados apresentados aqui, pode-se observar que, para amostras que possuem maiores quantidades de grupos COOH (PSU120), em média, há uma menor proliferação celular.

Grupos hidroxila normalmente conferem uma superfície hidrofílica e neutra, o que sugere que haverá uma baixa afinidade de proteínas a este tipo de superfície, porém conferindo uma alta biocompatibilidade.¹¹⁰ As análises superficiais mostraram que há a presença de grupos hidroxilados nos polímeros tratados, especialmente nos filmes tratados de PU, enquanto nos polímeros sem tratamento não há a presença desse grupo. Nos polímeros com tempos mais longos de tratamento há

uma maior presença de grupos OH, porém pode-se assumir aqui, que nestes casos como o da PSU 120 há a presença de outros grupos na superfície que não necessariamente inibiriam o crescimento celular, mas poderiam interagir de forma diferenciada com as proteínas plasmáticas levando a um crescimento menos expressivo.

Os tratamentos envolvendo a radiação UV em presença de O₂ podem ser utilizados como um método rápido, simples, efetivo e de baixo custo para incorporar e adequar novas funcionalidades a superfícies de diferentes polímeros, aumentando sua adesão e em geral a proliferação celular de células tronco mezenquimais humanas. É evidente a influência dos tratamentos na adesão e viabilidade celular. As amostras tratadas mostraram um grande número de células aderidas comparadas com filmes não tratados. Adicionalmente, o número de células aderidas nesse caso são estatisticamente comparáveis ao número de células aderidas no grupo controle.

Os dados obtidos mostraram que a funcionalização da superfície polimérica resulta em diferentes comportamentos das células após sete dias de análise, porém, essas diferenças resultam do crescimento e não da morte celular. Os resultados mostram que a célula não possui uma dependência forte com o WCA da superfície, mas sim com as alterações da composição química da mesma que ocorrem após os tratamentos. Confirma-se também a que grupos que induzem a resultados melhores em termos de crescimento celular como: C=O, OH, -C-O-C e NH₂. A presença e maior concentração destes grupos nas amostras tratadas de PHB e PU mostrou os melhores resultados de viabilidade celular. Superfícies com concentrações mais elevadas de grupos -COOH acabam não elevando a viabilidade celular, assim como também a presença de grupos -CH₃ e C=C e C-C, como visto na amostra de PSU 120. A melhor adesão, proliferação e crescimento celular nos filmes poliméricos modificados indicam para a biocompatibilidade das superfícies obtidas, e revelam que o método de funcionalização é indicado para a obtenção de biomateriais com grande potencial de aplicação biomateriais para a engenharia de tecidos.

5.3 Biodegradabilidade

Segundo Shah et al. mudanças visuais nas superfícies como rugosidades, buracos, fissuras, fragmentação ou formação de biofilme não provam a biodegradação do ponto de vista metabólico, mas são o primeiro sinal de ataque de microrganismo.¹³⁷ As microscopias ópticas foram realizadas nas amostras antes da lavagem, de modo a ter uma ideia do crescimento e desenvolvimento do fungo, enquanto as microscopias eletrônicas de varredura foram realizadas após as lavagens das amostras descritas no item 3.4.4. Duas imagens representativas das amostras controle do PHB são mostradas na Figura 46. Não há alteração na superfície das amostras de todos os controles.

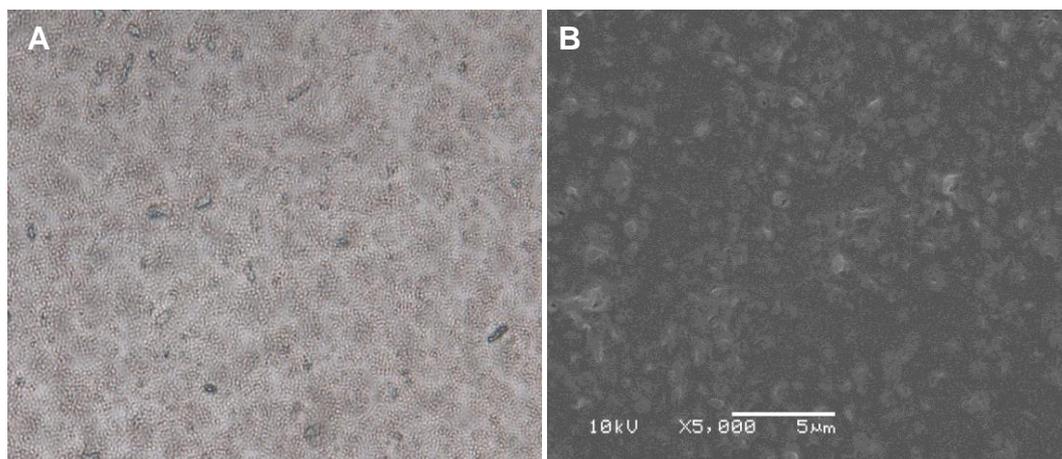


Figura 46. Imagens da amostra controle do PHB ST. A) Microscopia óptica (MO) – X40. B) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) – X5.000. Após o tempo de incubação de 10 dias.

A Figura 47 traz imagens de MO do crescimento do fungo sobre as amostras de PHB. Pode-se observar que para as amostras PHB ST cultivadas por 10 dias (Figura 47-A) e 20 dias (Figura 47-B) há uma boa proliferação do fungo juntamente com o desenvolvimento de hifas. Porém, pode-se notar também que quanto maior é o tempo de tratamento, maior é o crescimento aparente do fungo sobre a superfície das amostras, como pode-se observar para as amostras de PHB 60 cultivadas por 10 dias (Figura 47-C) e 20 dias (Figura 47-D), e para amostras de PHB 180 cultivadas por 10 dias (Figura 47-E) e 20 dias (Figura 47-F). É possível já observar nestas imagens que a superfície do filme não é uniforme e várias áreas exibem

buracos onde pode-se observar a homogeneidade da superfície do disco de vidro ao qual o polímero está suportado.

A superfície do PHB possui uma rugosidade característica pela presença de diversos grânulos. A Figura 48 mostra as imagens de MEV das superfícies das amostras de PHB após o cultivo para o PHB sem tratamento e PHB tratado durante 60 e 180 min. Pode-se observar em todas as imagens alguns sinais de ação do fungo como fissuras (Figura 48-A), rasgos (Figura 48-B), buracos (Figura 48-E), pedaços de filme (Figura 48-C), suavização das superfícies (Figura 48-D) áreas de granulação mais densa, como visto na Figura 48-E. Estes grânulos correspondem a áreas de cristalinidade elevada, pois o microrganismo tende a consumir primeiramente a parte amorfa do polímero e só então começa a degradar a parte mais cristalina. Pode-se notar também nas imagens que após 20 dias de cultivo tanto para PHB 60 (Figura 48-D) quanto para PHB 180 (Figura 48-F) a superfície da amostra está completamente homogênea, já que não restou filme do polímero. Esta superfície corresponde à superfície uniforme dos discos de vidro ao qual o polímero estava suportado.

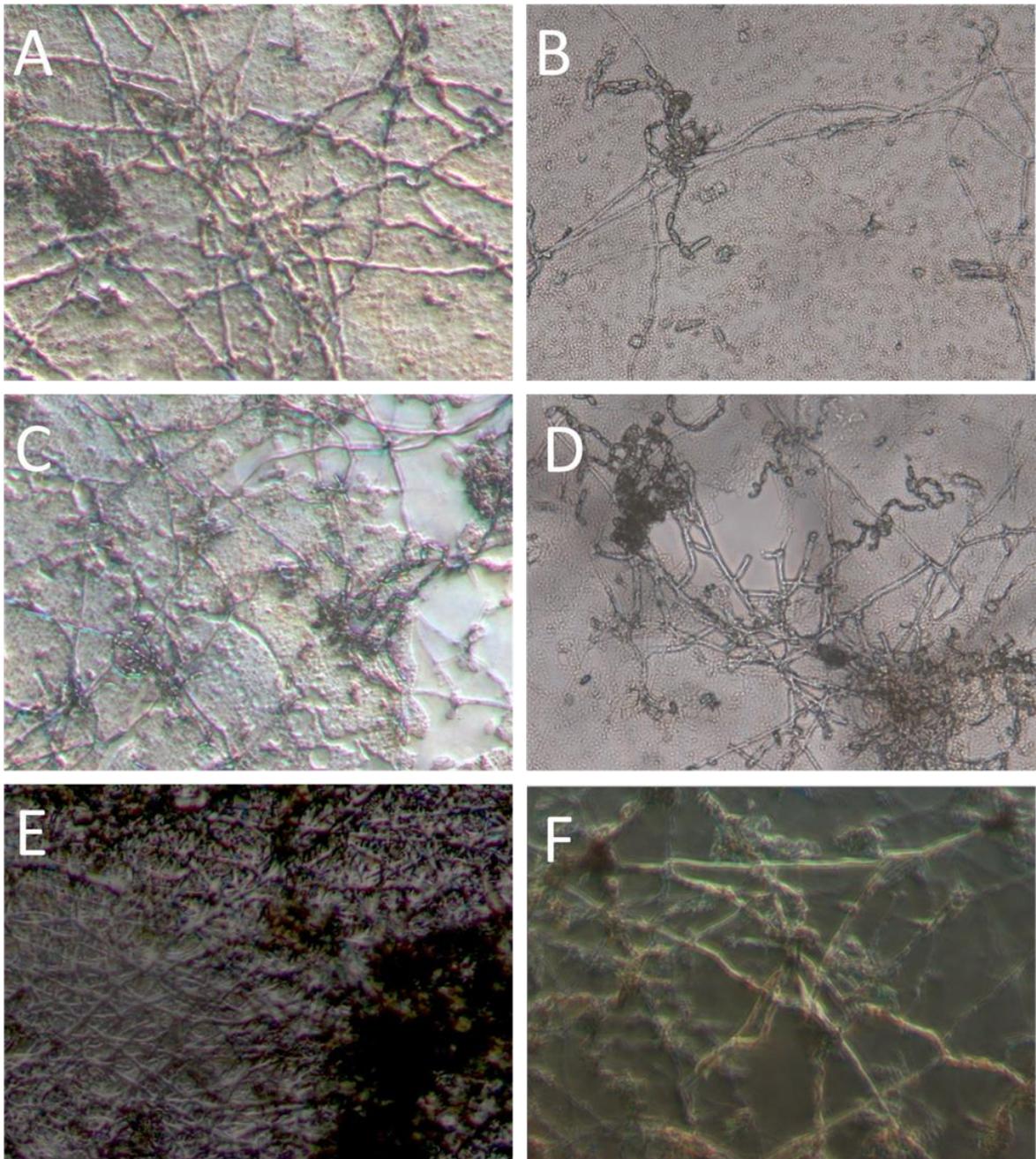


Figura 47. Imagens de MO do crescimento do fungo sobre amostras de PHB. A) PHB ST após 10 dias de incubação; B) PHB ST após 20 dias de incubação . C) PHB 60 após 10 dias de incubação; D) PHB 60 após 20 dias de incubação; E) PHB 180 após 10 dias de incubação; e F) PHB 180 após 20 dias de incubação.

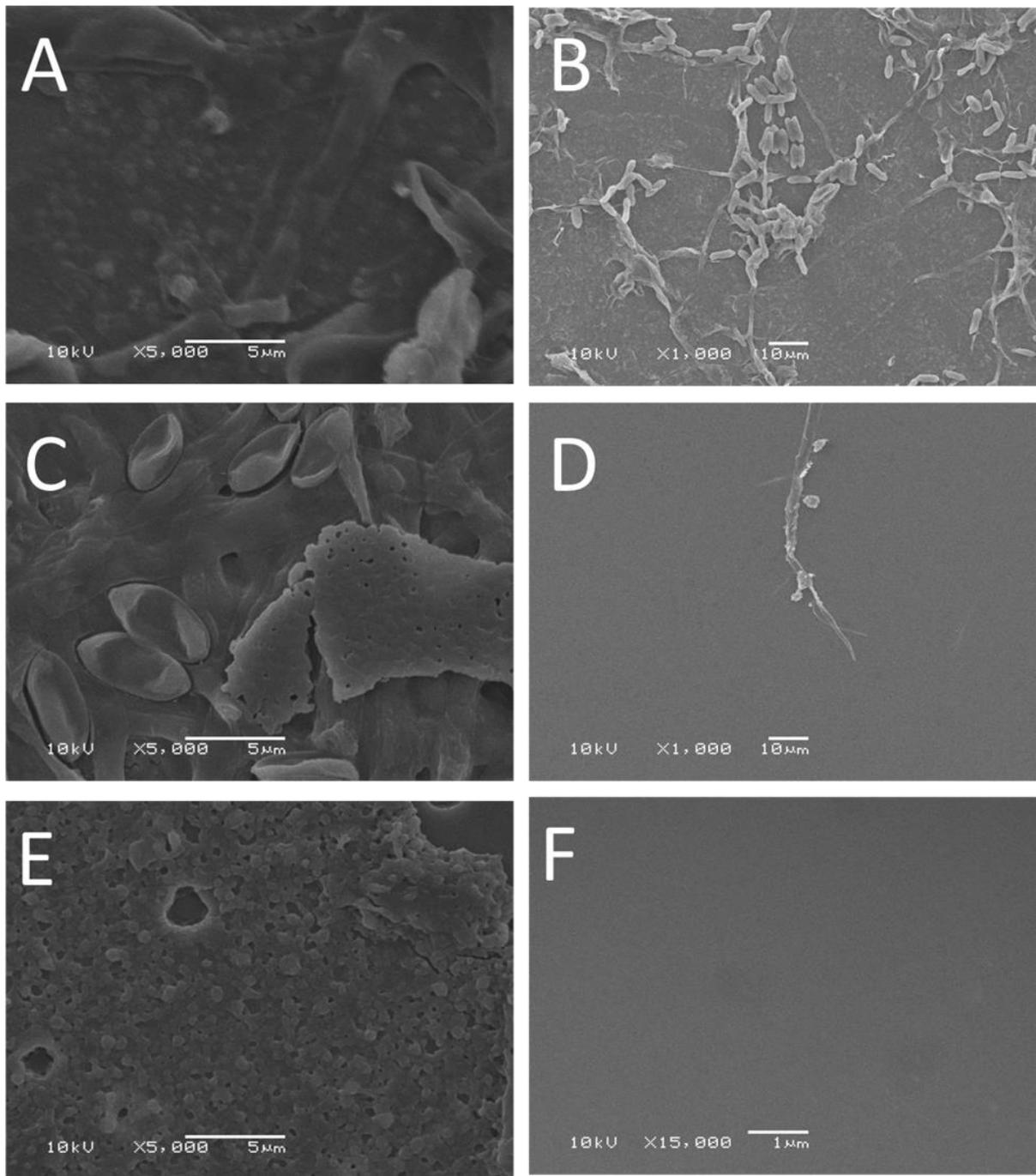


Figura 48. Imagens de MEV das superfícies das amostras de PHB após o cultivo do fungo. A) PHB ST após 10 dias de incubação; B) PHB ST após 20 dias de incubação . C) PHB 60 após 10 dias de incubação; D) PHB 60 após 20 dias de incubação; E) PHB 180 após 10 dias de incubação; e F) PHB 180 após 20 dias de incubação.

Polissulfona

A Figura 49 traz imagens de MO e MEV para filmes controle de PSU incubados por 30 dias. Pode-se observar que em ambas as imagens (A e B) não há qualquer marca, granulação ou buraco que possa indicar interferência dos meios e parâmetros de cultivo na superfície dos filmes.

As amostras sem tratamento de PSU (Figura 50-A e B) mostram um crescimento moderado de hifas em comparação as amostras tratadas. Já as amostras tratadas observa-se um leve aumento no crescimento de hifas para PSU 30 (Figura 50-C e D) e PSU120 (Figura 50-E e F). Este acréscimo no crescimento se deve a inserção de grupos oxigenados na superfície do polímero.

Considerando as imagens de MEV da Figura 51, para PSU ST (Figura 51-A e B) os esporos não parecem ter um desenvolvimento razoável, e a formação de marcas na superfície dos filmes de PSU não é muito evidente. A PSU é um polímero amorfo de superfície bem homogênea e mudanças nesta foram melhores observadas para PSU 30 cultivada por 60 dias (Figura 51-D) e PSU 120 cultivada por 60 dias (Figura 51-F) onde se pode notar além da formação de marcas mais escuras na imagem que lembram a disposição das hifas na superfície, também há a formação de buracos, crateras e granulações que são provenientes da atividade do microrganismo na superfície do polímero indicando um processo degradativo.

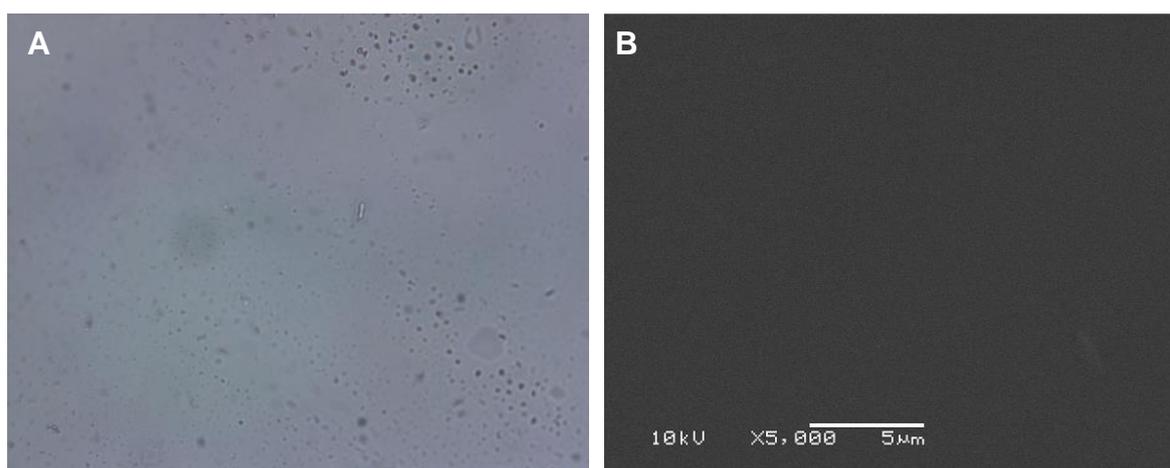


Figura 49. Imagens da amostra controle do PSU ST. A) Microscopia óptica – X40. B) Microscopia Eletrônica de Varredura – X5.000. Durante o tempo de incubação de 30 dias.

-

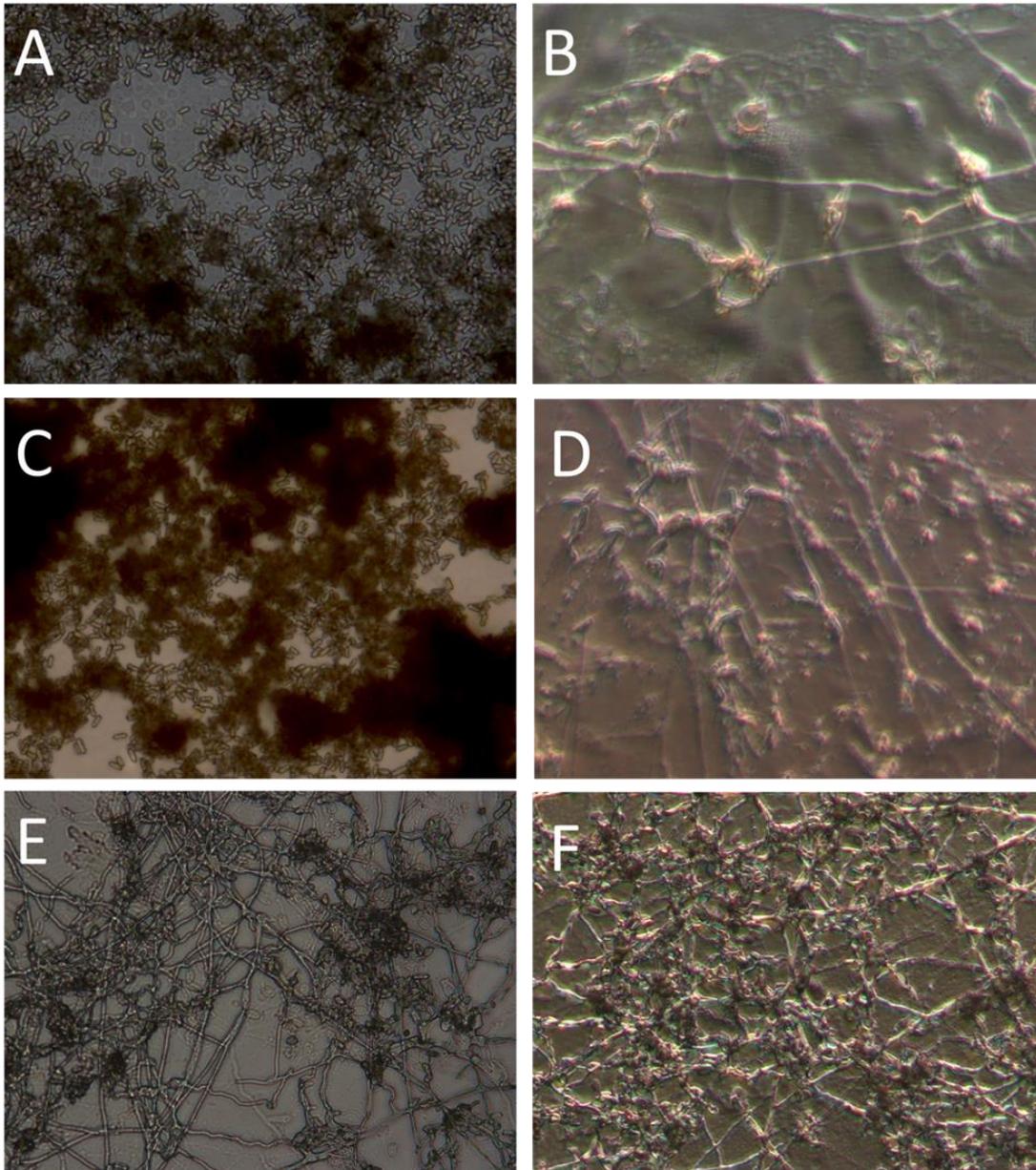


Figura 50. Imagens de MO do crescimento do fungo sobre amostras de PSU. A) PSU ST após 30 dias de incubação; B) PSU ST após 60 dias de incubação . C) PSU 30 após 30 dias de incubação; D) PSU 30 após 60 dias de incubação; E) PSU 120 após 30 dias de incubação; e F) PSU 120 após 60 dias de incubação.

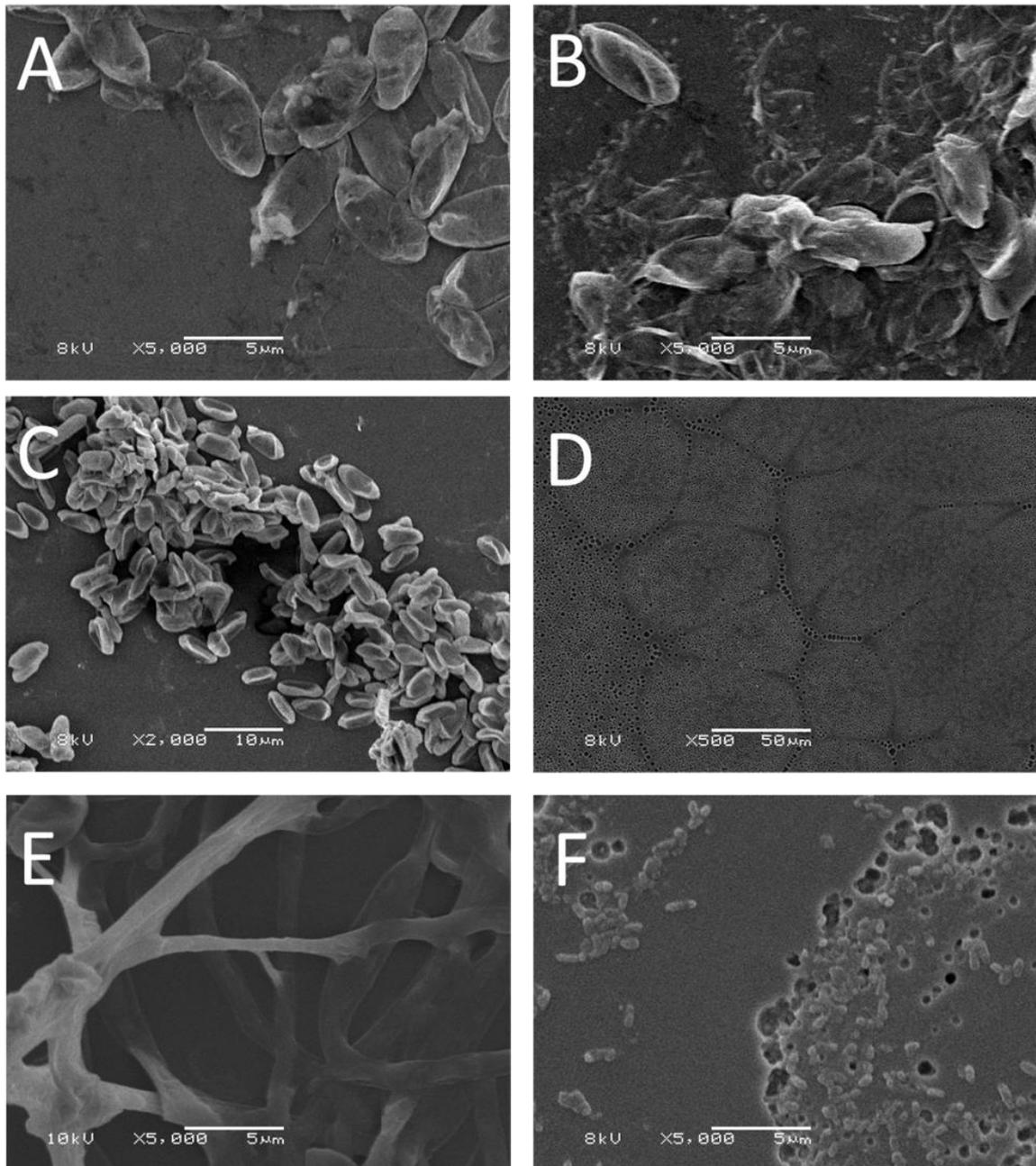


Figura 51. Imagens de MEV das superfícies das amostras de PSU após o cultivo do fungo. A) PSU ST após 30 dias de incubação; B) PSU ST após 60 dias de incubação . C) PSU 30 após 30 dias de incubação; D) PSU 30 após 60 dias de incubação; E) PSU 120 após 30 dias de incubação; e F) PSU 120 após 60 dias de incubação.

Poliuretana

A Figura 52 traz imagens de MO e MEV para filmes controle de PU incubados por 30 dias. Assim como nos demais polímeros pode-se observar que em ambas as imagens (A e B) não há qualquer marca, granulação ou buraco que possa indicar interferência dos meios e parâmetros de cultivo na superfície dos filmes das amostras controle.

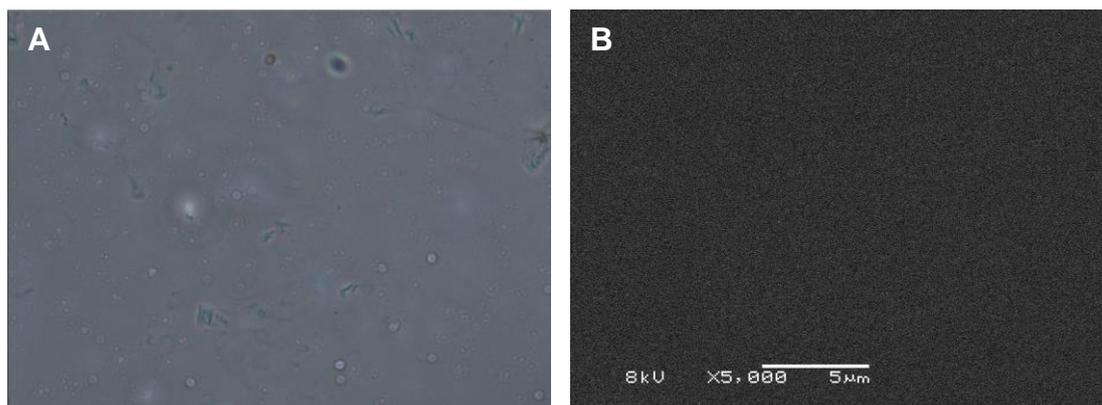


Figura 52. Imagens da amostra controle do PU ST. A) Microscopia óptica – X40. B) Microscopia Eletrônica de Varredura – X5.000. Durante o tempo de incubação de 30 dias.

Por ser um polímero cristalino, não suscetível à degradação já era esperado que não houvesse uma resposta positiva quanto a germinação dos esporos sobre o polímero sem tratamento superficial (Figura 53-A e B), porém, mesmo nesta condição, é possível observar uma pequena formação de hifas. Quando os testes foram realizados com os polímeros tratados por 30 min (Figura 53-C e D) e 120 min (Figura 53-E e F) esperava-se a formação de hifas, pois PUs que tem mais grupamentos hidrofílicos são propensas a serem menos cristalinas, sendo assim mais acessíveis para a biodegradação. Porém, isto não foi observado, exceto no cultivo PU 30, em que há uma leve diferença na formações de hifas.

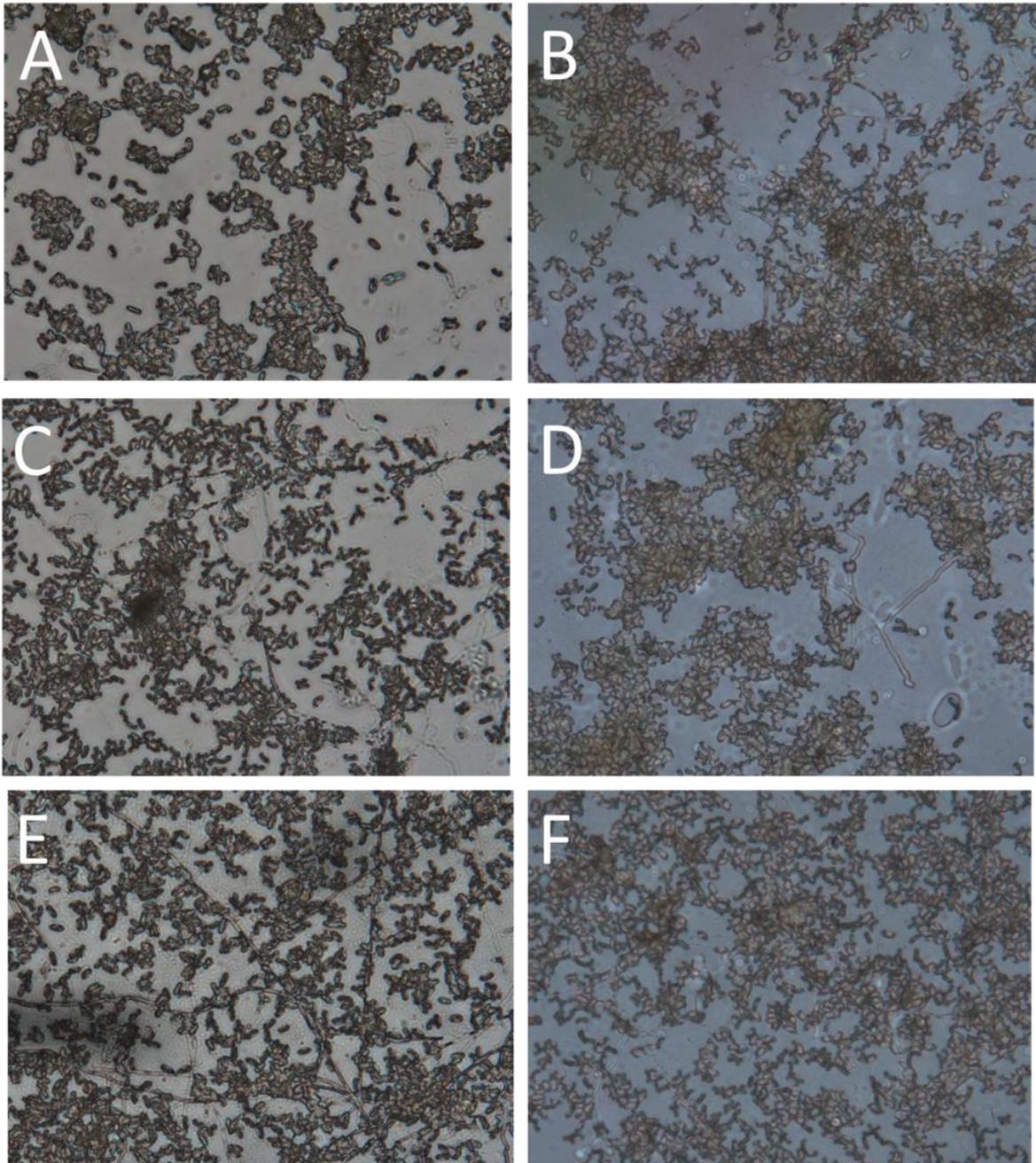


Figura 53. Imagens de MO do crescimento do fungo sobre amostras de PU. A) PU ST após 30 dias de incubação; B) PU ST após 60 dias de incubação . C) PU 30 após 30 dias de incubação; D) PU 30 após 60 dias de incubação; E) PU 120 após 30 dias de incubação; e F) PU 120 após 60 dias de incubação.

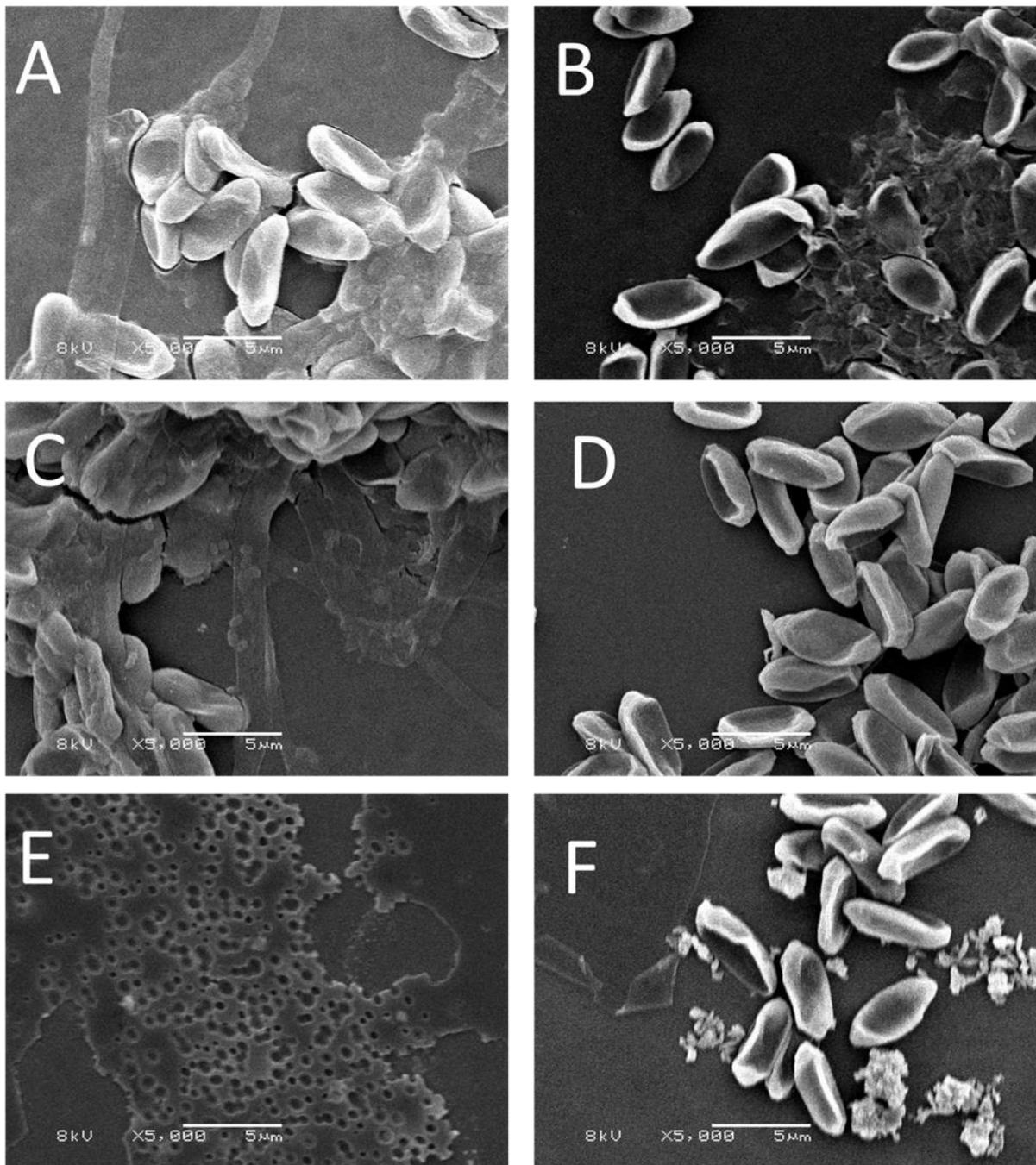


Figura 54. Imagens de MEV das superfícies das amostras de PU após o cultivo do fungo. A) PU ST após 30 dias de incubação; B) PU ST após 60 dias de incubação . C) PU 30 após 30 dias de incubação; D) PU 30 após 60 dias de incubação; E) PU 120 após 30 dias de incubação; e F) PU 120 após 60 dias de incubação.

As imagens de MEV (Figura 54), em geral, não apresentam condições que indique a atividade do fungo. Apesar de não terem sido observadas formações de micélio sobre a superfície de PU, mesmo quando tratada, foi possível observar a formação de “buracos” (Figura 54 e 55), os quais possuem estrutura semelhante a dos esporos. Isto poderia ser efeito apenas da presença deste microrganismo nesta superfície, uma vez que materiais metálicos ou não metálicos em ambientes

aquosos, sob condições de umidade são suscetíveis à incrustação biológica ou biodeterioração.¹⁸⁴ Este comportamento não foi observado nos demais polímeros (PHB e PSU), embora Hori *et al.* tenham relatado vários traços, cavidades e sulcos na superfície de filmes plásticos a base de amido, que demonstram que a degradação foi efeito combinado de uma colonização microbiana, incluindo fungos, na superfície do filme.¹⁸⁵

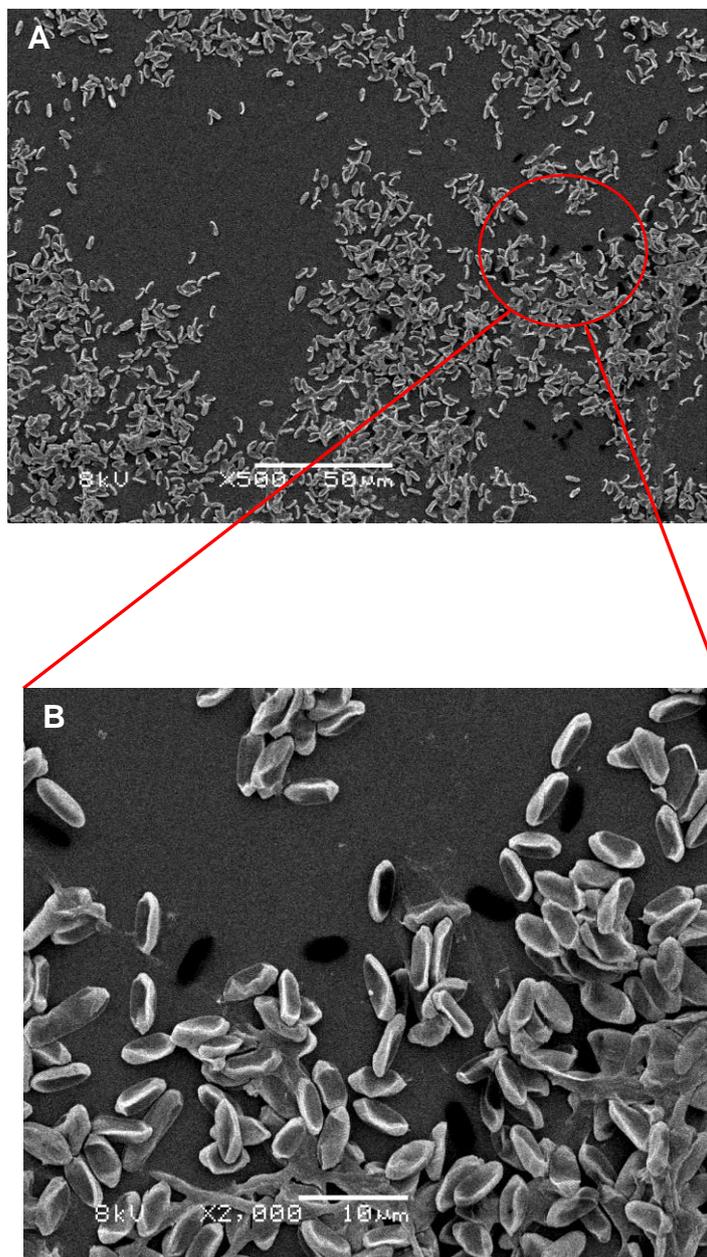


Figura 55. Microscopia Eletrônica de Varredura de PU. A) MEV – X500. B) Região ampliada de A. MEV – X2.000.

A análise gravimétrica é uma das análises mais utilizadas para a avaliação da degradação das amostras poliméricas em qualquer tipo de ensaio. Embora hajam muitas interferências neste tipo de análise, especialmente em se tratando do uso de material biológico, ainda é possível através dela observar tendências que indicam algum comportamento diferenciado do microrganismo em relação ao substrato disponível como fonte de carbono.

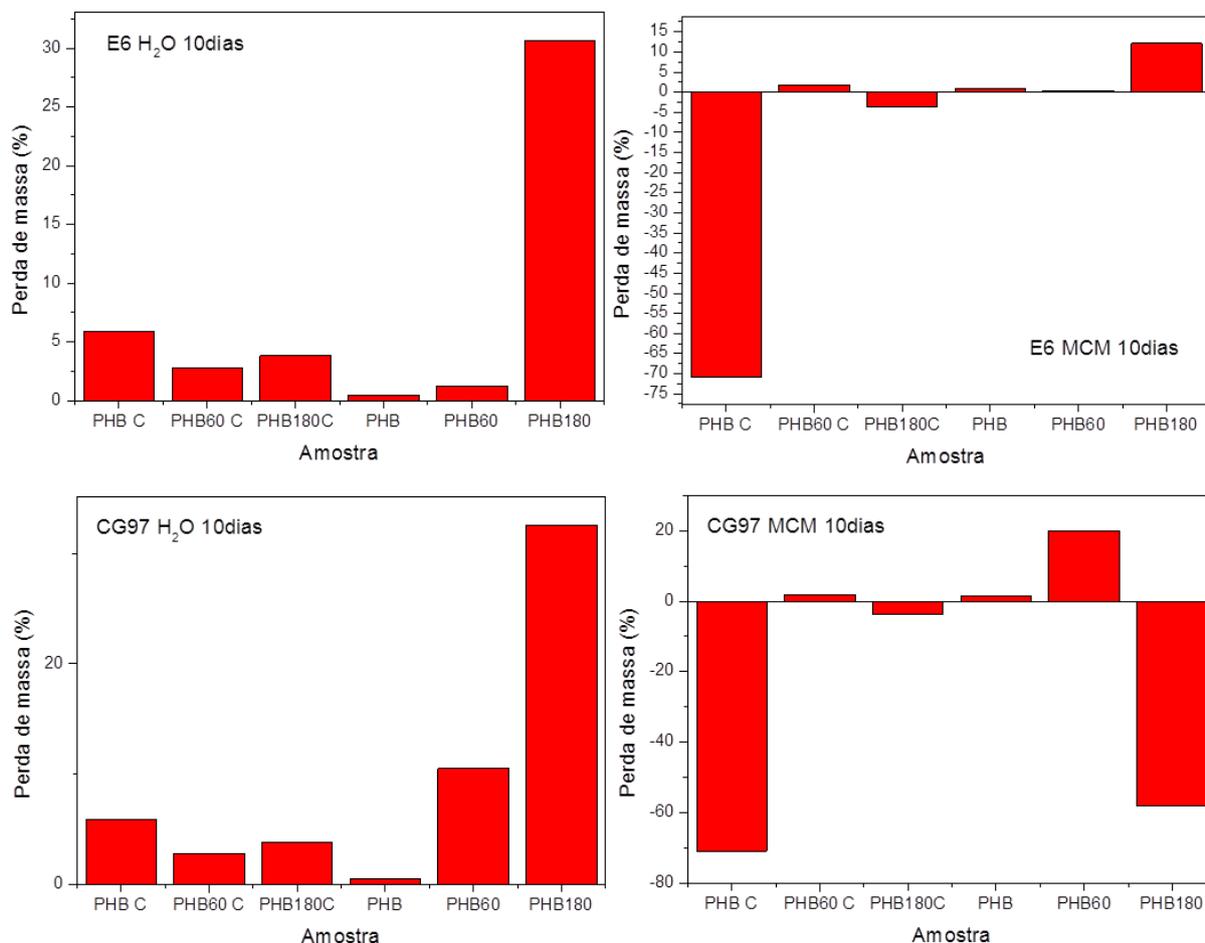


Figura 56. Dados de perda de massa das amostras de PHB controles (indicados pela letra C) e degradadas durante 10 dias com as linhagens em H₂O e MCM. O tempo de tratamento está indicado no nome da amostra, sendo PHB para polímeros não tratados, PHB60 para polímeros tratados com radiação UV em presença de O₂ por 60 min e PHB 180 para amostras tratadas por 180 min.

Embora fosse esperado encontrar perda de massa resultante do processo de degradação, em algumas amostras houve ganho de massa. Nos controles pode-se atribuir este ganho de massa a absorção de água e partes do meio de cultura, que pode ser relacionada com o aumento de hidrofiliicidade das amostras. Nas Figuras 56 a 61, nota-se que o aumento de massa nas amostras controle é sempre maior para as amostras tratadas. O aumento de massa nas amostras degradadas pode

ser devido à grande adesão deste microrganismo a superfície destes polímeros sendo muitas vezes difícil sua remoção sem dano ao material. Ainda pode-se afirmar como fonte de acréscimo de massa, a formação de metabólitos excretados pelo fungo, que dependendo de sua polaridade poderiam ser absorvidos para o interior da matriz polimérica contribuindo para o acréscimo de massa observados nos resultados. Em alguns casos como, por exemplo, PHB 180' x CG97 incubado por 10 e 20 dias (Figuras 56 e 57) observa-se um aumento de massa de 54% e 35% respectivamente.

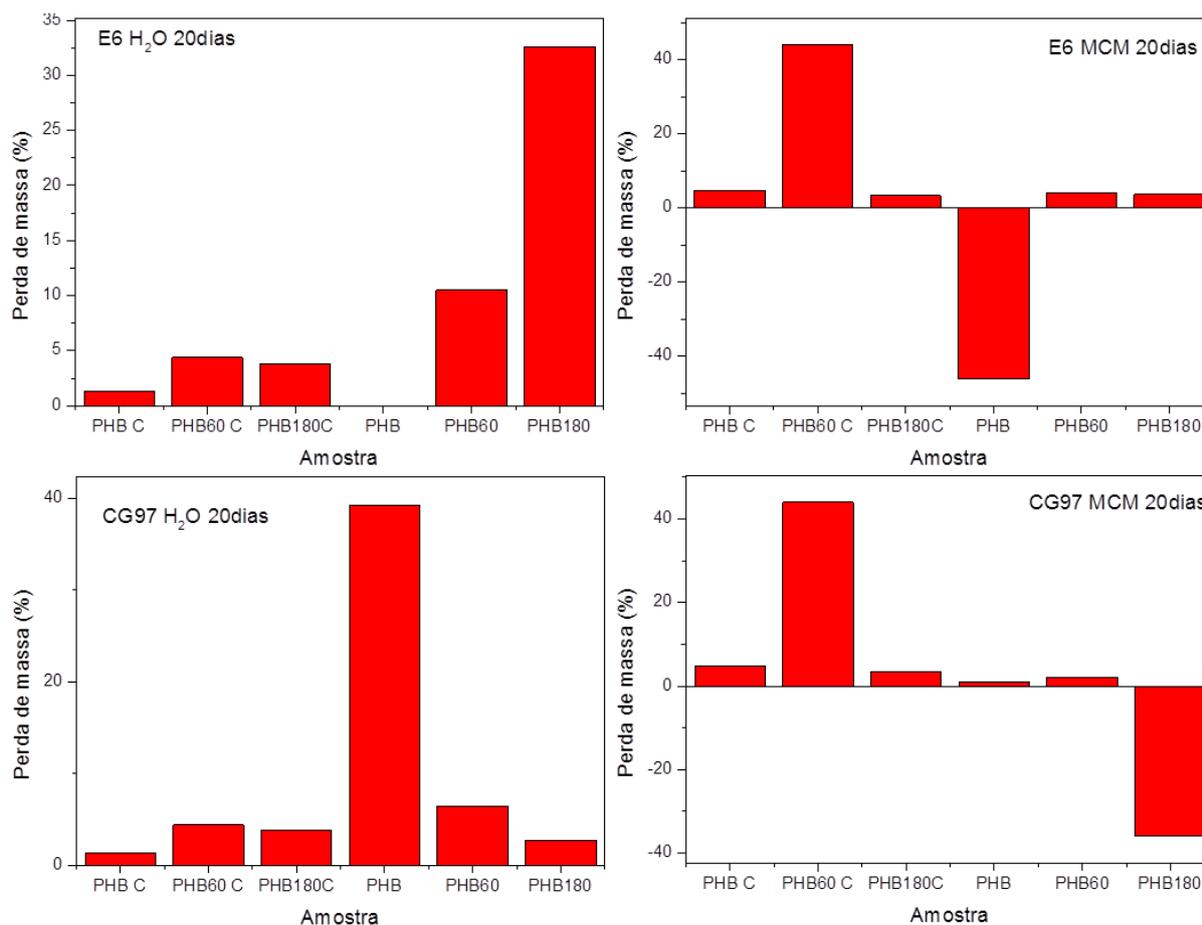


Figura 57. Dados de perda de massa das amostras de PHB controles (indicados pela letra C) e degradadas durante 20 dias com as linhagens E6 e CG97, e, em H₂O E MCM. O tempo de tratamento está indicado no nome da amostra, sendo PHB para polímeros não tratados, PHB60 para polímeros tratados com radiação UV em presença de O₂ por 60 min e PHB 180 para amostras tratadas por 180 min.

Alguns controles tiveram perda de massa, o que não era esperado, porém pode ser atribuída a evaporação de resíduos de solvente que estavam na matriz ou liberação de gases pelo próprio polímero. De uma maneira geral PHB em seus três

tratamentos exibe uma perda de massa que varia entre 0,4% a 40% e um ganho de massa que pode variar entre 37% e 55% para ambas as linhagens testadas.

A amostra de PHB 180 incubado por 10 dias com a linhagem E6 em H₂O (Figura 56) exibe uma perda de massa de 26% e quando incubado por 20 dias (Figura 57) essa taxa aumenta para 28%. Para as amostras de PHB incubados com a linhagem CG97 ao contrário das amostras de PHB incubado com a linhagem E6, observa-se dois polímeros distintos com as maiores perdas de massa, no PHB 60' incubado por 10 dias em MCM (Figura 56) houve uma perda de 20% de massa e para a amostra de PHB ST incubado por 20 dias em H₂O (Figura 57) houve uma perda de massa de 37%.

Doi *et al.*¹⁸⁶ relatam que polímeros de PHB foram submetidos a degradação hidrolítica por 58 dias a 55°C obtendo uma perda de massa entre 1 e 3%. Kim *et al.*¹⁸⁷, realizaram a degradação em diversos tipos de solo, a temperatura de 28°C em 25 dias e as taxas de perda de massa ficaram entre 5 e 68% dependendo o tipo de solo utilizado. Após o tempo de incubação foram identificados os fungos que atuaram nesta degradação, havendo um total de 6, sendo a maioria do gênero *Penicillium*. Neste trabalho foi utilizado apenas um fungo o obteve-se taxas de 37% de perda, o que mostra uma eficiência maior se comparada ao trabalho de Kim *et al.* uma vez que havia um total de 6 fungos agindo simultaneamente, e em solo a degradação tende a ser maior pois existem vários componentes atuando além dos microrganismos.

Ainda pode-se estender a comparação com alguns trabalhos que estudaram a biodegradação de polímeros naturais. Wu *et al.* obteve uma perda de massa de 68% quando utilizou bactérias para degradar um composto de poli-ácido-láctico (PLA) e fibra de côco verde, após 21 dias de incubação, porém quando utilizou somente o polímero PLA a perda de massa ficou abaixo de 20%.¹⁸⁸ Geweely *et al.* utilizaram *A. níger* para degradar polímeros a base de amido e obteve um rendimento de 72%¹⁸⁹, assim como no exemplo citado anteriormente os polímeros com ótimas taxas de degradação possuem componentes naturais em sua estrutura o que facilita a adesão e degradação de microrganismos. Neste trabalho, quando se utilizou o polímero natural PHB obteve-se uma perda de massa entre 20 e 30%, concordando com os dados obtidos por Wu *et al.*, porém em um tempo reduzido de cultivo. As amostras de PHB ST e PHB 180 mostraram uma maior perda de massa, o que mais adiante se justificam após as apresentações de dados de GPC.

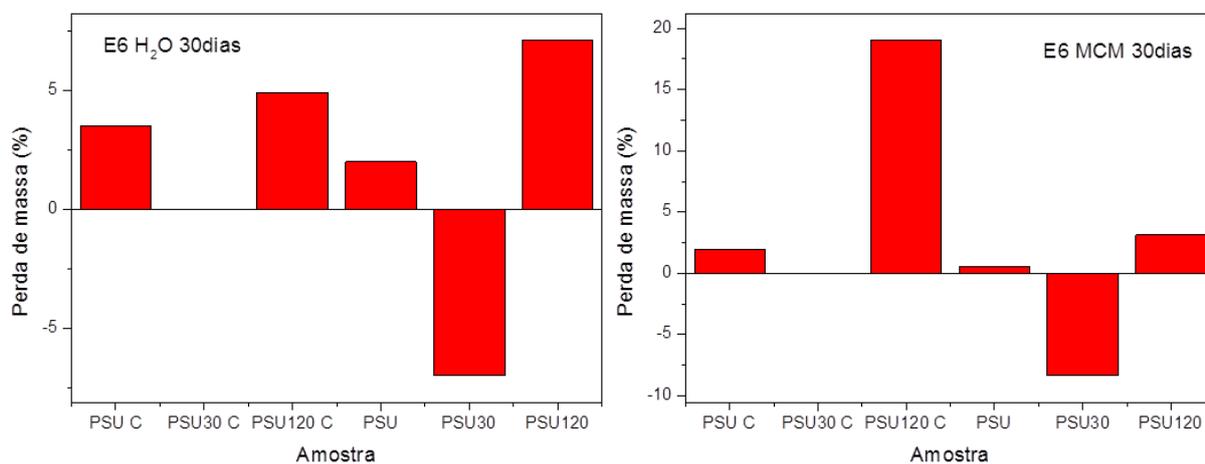


Figura 58. Dados de perda de massa das amostras de PSU controles (indicados pela letra C) e degradadas durante 30 dias com a linhagem E6, em dois meios de cultivo (H₂O ou MCM). O tempo de tratamento está indicado no nome da amostra, sendo PSU para polímeros não tratados, PSU30 para polímeros tratados com radiação UV em presença de O₂ por 30 min e PSU120 para amostras tratadas por 120 min.

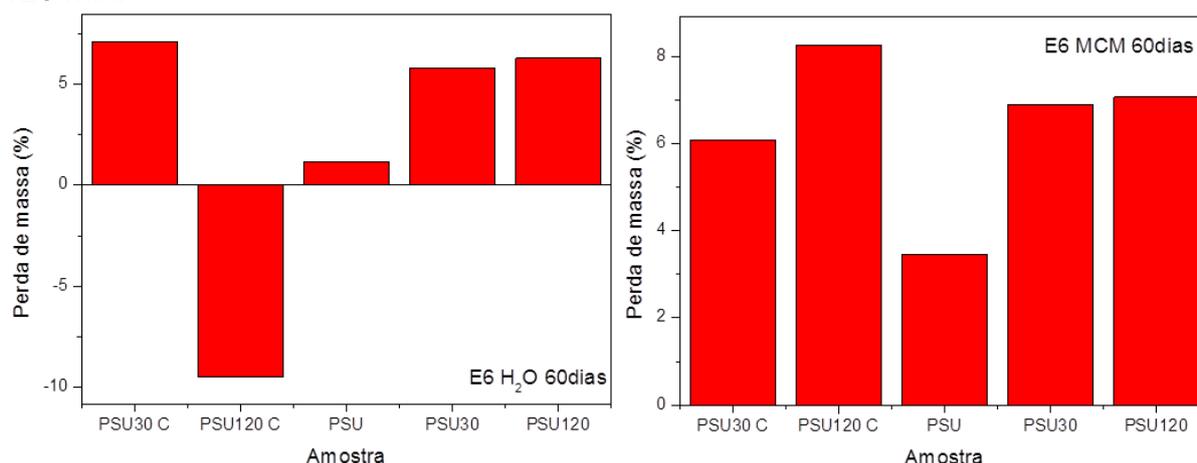


Figura 59. Dados de perda de massa das amostras de PSU controles (indicados pela letra C) e degradadas durante 60 dias com a linhagem E6, em dois meios de cultivo (H₂O ou MCM). O tempo de tratamento está indicado no nome da amostra, sendo PSU para polímeros não tratados, PSU30 para polímeros tratados com radiação UV em presença de O₂ por 30 min e PSU120 para amostras tratadas por 120 min.

Para as amostras de PSU (Figuras 58 e 59), não há também uma linearidade evidente e as perdas de massa foram relativamente pequenas comparadas ao PHB. Mas pode-se notar que os tratamentos induzem um efeito significativo nos dados de gravimetria. Onde há mudanças mais significativas em 30 e 60 dias de cultivo para as amostras tratadas. Pode-se observar principalmente que para PSU 120 incubada

em H₂O com a linhagem E6 por 30 e 60 dias demonstraram as maiores perda de massa 2,1% e 6,2% respectivamente.

Não foram encontrados na literatura estudos sobre biodegradação de PSU. Esse polímero é mais estudado quanto à degradação térmica por ser muito utilizado em materiais hospitalares que são submetidos à autoclave. Porém, vale ressaltar que, observando-se a grande estabilidade térmica e química da PSU, uma redução de 6% em massa para apenas dois meses de ação fúngica é um grande passo tendo em mente que seu tempo de total degradação em aterro é desconhecido. Além disso, pelas perdas relacionadas as amostras controle, pode-se especular que a perda real de massa pela atividade fúngica na PSU seja superior aos 6%, pois como pode-se verificar nas imagens de MEV discutidas anteriormente há muita massa microbiológica que as lavagens não conseguiram remover e esses vestígios podem estar influenciando as medidas mascarando a real perda de massa.

PSU e PC possuem estrutura molecular semelhante, e PSU é utilizado como material de substituição de PCs por ter um custo menos elevado. Artham e Doble trataram PC com radiação UV por 30 dias, e em seguida submeteram este polímero ao processo de biodegradação por fungos filamentosos, juntamente com o polímero não tratado e outro polímero tratado termicamente a 100 C. Esse ensaio foi realizado em meio de sal mineral, durante 12 meses, ao final deste período a perda de massa detectada foi de 5,5% para o polímero tratado com UV.¹⁹⁰ Novamente, foi obtida uma taxa de perda de massa mais elevada para as amostras tratadas com radiação UV em presença de O₂, e também o tempo de tratamento utilizado neste trabalho é bem inferior ao tempo utilizado no trabalho acima citado.

Do mesmo modo que foi observado para a PSU os dados de perda de massa das amostras PU (Figuras 59 e 60) mostram uma tendência que pode estimar o comportamento do fungo na superfície. Pode-se verificar para as amostras controle tanto da Figura 60 quanto da Figura 61 que, após 30 dias, há uma estabilização do peso das amostras, ou seja a fração de perda decorrente de saída de gases é alcançada com 30 dias, sendo possível observar que para os polímeros tratados há uma perda de massa por influência do modo de cultivo entre 0,5 e 3,0% enquanto a PU não tratada sofre um aumento de massa de aproximadamente 0,5%. Após os cultivos, as amostras de PU ST incubada em H₂O durante por 30 e 60 dias com a linhagem CG97 obtiveram uma perda de massa de 0,3% e 0,4% respectivamente. Para as amostras tratadas após o cultivos pode-se verificar uma similaridade na mudança da massa das amostras onde para PU ST e PU 120 há uma maior perda

ou ganho de massa do que para PU 30. Estas não linearidades de comportamento juntamente com o que foi observado nas imagens de MEV (onde não há um crescimento efetivo do fungo) necessitam de um olhar mais apurado sobre a superfície obtida com os tratamentos e como o microorganismo está reagindo a esta superfície. Esta discussão se dará com os resultados de análise de Tof-SIMS adiante no texto.

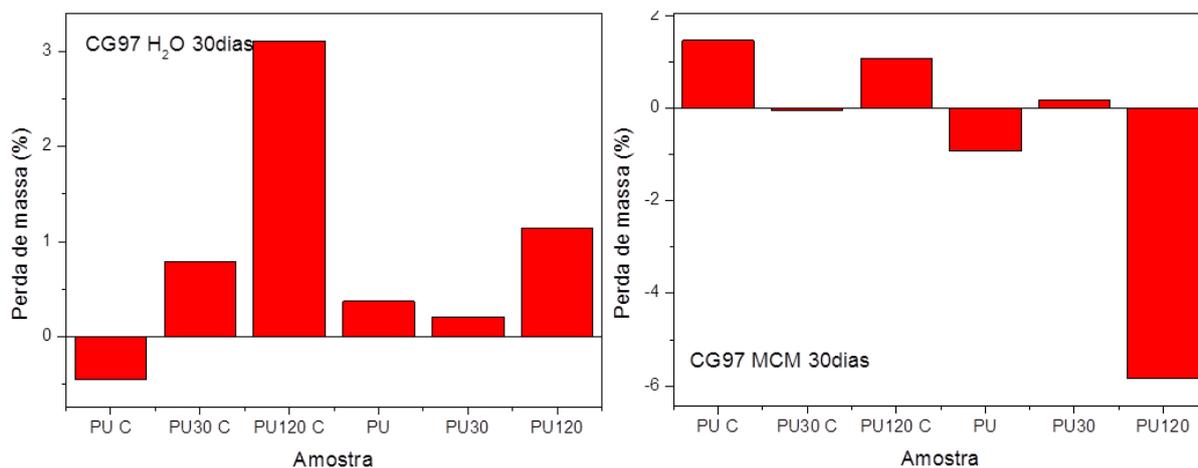


Figura 60. Dados de perda de massa das amostras de PU controles (indicados pela letra C) e degradadas durante 30 dias com a linhagem CG97, em dois meios de cultivo (H₂O ou MCM). O tempo de tratamento está indicado no nome da amostra, sendo PU para polímeros não tratados, PU30 para polímeros tratados com radiação UV em presença de O₂ por 30 min e PU120 para amostras tratadas por 120 min.

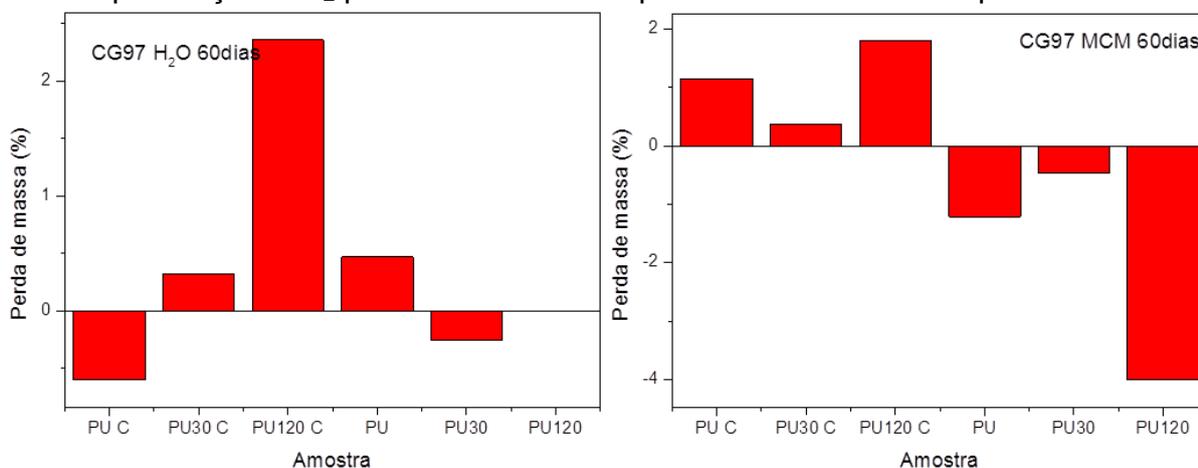


Figura 61. Dados de perda de massa das amostras de PU controles (indicados pela letra C) e degradadas durante 60 dias com a linhagem E6, e dois meios de cultivo (H₂O ou MCM). O tempo de tratamento está indicado no nome da amostra, sendo PSU para polímeros não tratados, PSU30 para polímeros tratados com radiação UV em presença de O₂ por 30 min e PSU120 para amostras tratadas por 120 min.

Como discutido anteriormente na introdução deste trabalho poliésteres de poliuretana são mais facilmente degradados enquanto poliéster-poliuretana é

relativamente resistente ao ataque microbiano. Pelos dados observados nas análises de caracterização das amostras anteriores a degradação, estima-se que as amostras tratadas com UV possuem maior quantidade de grupos éster do que as amostras sem tratamento, porém os dados observados até aqui após os ensaios de biodegradação ainda não podem confirmar a indução de biodegradação nos polímeros sintéticos, especialmente com relação aos dados de gravimetria que possuem várias interferências.

O que se pode observar de maneira geral é que polímeros incubados em H₂O demonstram uma perda de massa maior comparado aos incubados em MCM, exceto para PHB 60' X CG97. Isto deve estar relacionado à falta de nutrientes neste meio fazendo com que o fungo utilize o polímero como uma fonte de carbono para o seu desenvolvimento. Outra observação que pode ser feita é que polímeros com a superfície tratada tendem a perder mais massa do que polímeros sem tratamento. Confirmando a influência do tratamento na biodegradação dos polímeros.

As análises de FTIR-ATR foram realizadas com todas as amostras controle, cultivadas e não cultivadas. O que pode-se observar é que as mudanças encontradas nos espectros são bem similares entre séries de polímeros e são relativamente independentes da linhagem do fungo e do meio de cultivo utilizados. Como pode ser visualizado nas Figuras 62-70 os espectros foram todos normalizados e pode-se notar que muitas vezes a redução ou acréscimo de intensidade de bandas é dependente do tempo de cultivo.

Para as amostras de PHB ST, cultivadas por 10 e 20 dias (Figura 62), pode-se destacar o surgimento de banda de OH ($3600-3100\text{ cm}^{-1}$) o qual pode indicar a hidrólise do polímero e também a banda de C=C (1640 cm^{-1}) que surge após a quebra dos grupamentos carbonila (C=O), também por hidrólise. Há ainda alterações em bandas de C-H (1180 e 1309 cm^{-1}), C-O (1130 , 1055 e 1041 cm^{-1}). qualquer dano em qualquer região da molécula do polímero ocasiona alterações nestes grupamentos, pois uma vez que um átomo de oxigênio é extraído da cadeia polimérica a vacância deixada irá desencadear rearranjos moleculares que modificarão a disposição dos grupos moleculares. A redução destes grupos e o surgimento de grupos OH são sinais fortes da degradação do polímero.

Surgem duas bandas 3300 e 1525 cm^{-1} , as quais são características de grupamentos NH, que se referem a amins ou amidas e não a nitratos (presentes no meio de cultura), segundo ¹⁹¹ quanto maior o produto de degradação mais intensa será a banda na região de 3300 cm^{-1} . Embora existam bandas nessa faixa

também para fungos, na região 3300 cm^{-1} , o valor exato exibe um deslocamento do número de onda característico dos grupamentos existentes no fungo, já nas regiões 2849 , 2917 e 3008 cm^{-1} , que são características de lipídios, que estão presentes no espectro do fungo.^{192 193} A banda na região 1525 cm^{-1} , também não se refere a banda característica do fungo, sendo produto de degradação. As bandas presentes em fungos nesta região são: 1567 cm^{-1} e 1553 cm^{-1} que refere-se a amidas de proteínas e amidas II respectivamente^{191 193}.

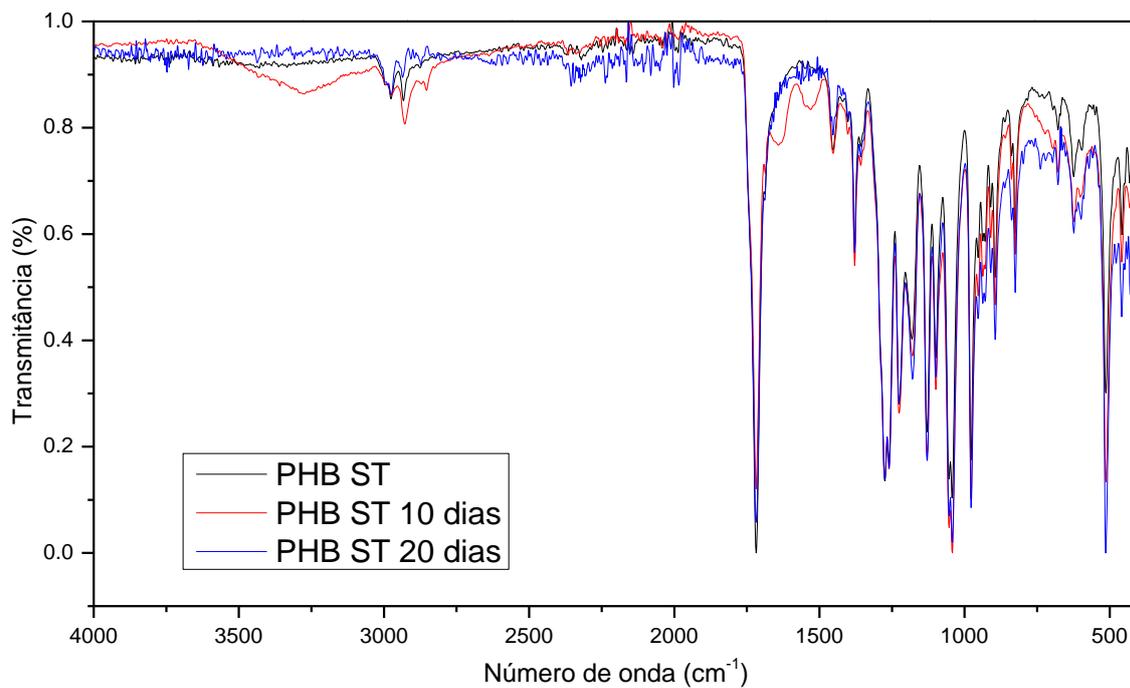


Figura 62. Espectros de FTIR-ATR representativos PHB ST, e PHB ST degradados por 10 e 20 dias.

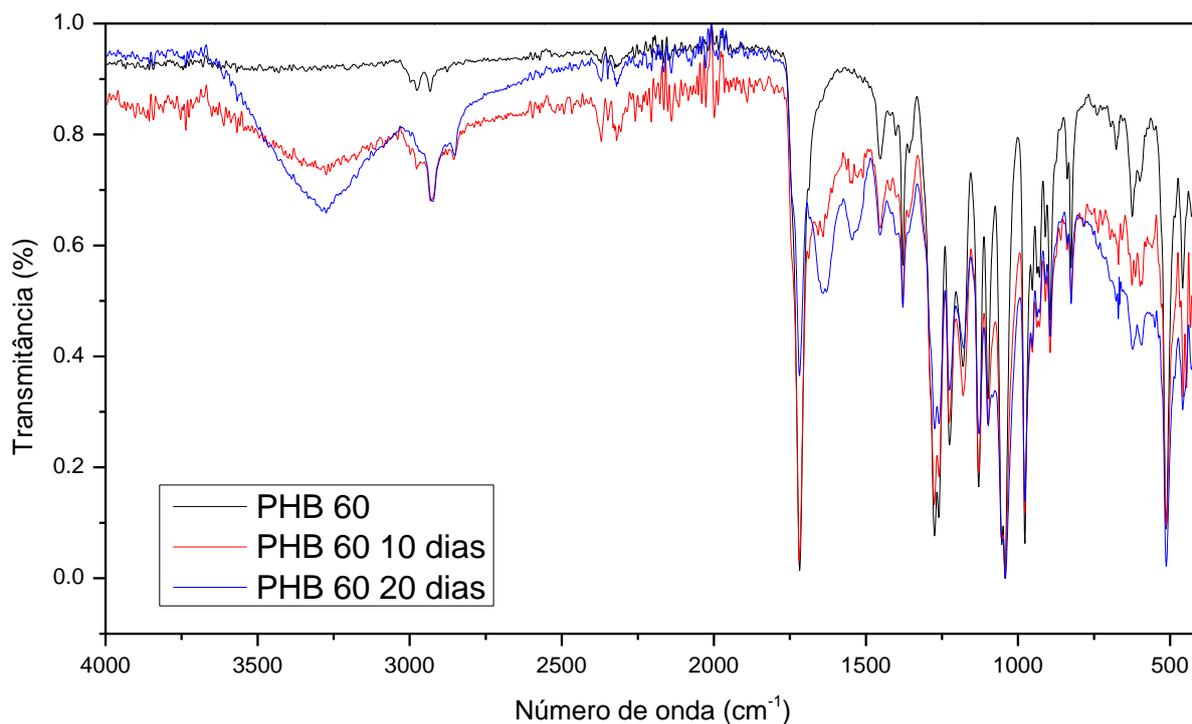


Figura 63. Espectros de FTIR-ATR representativos de PHB 60, e PHB 60 degradados por 10 e 20 dias.

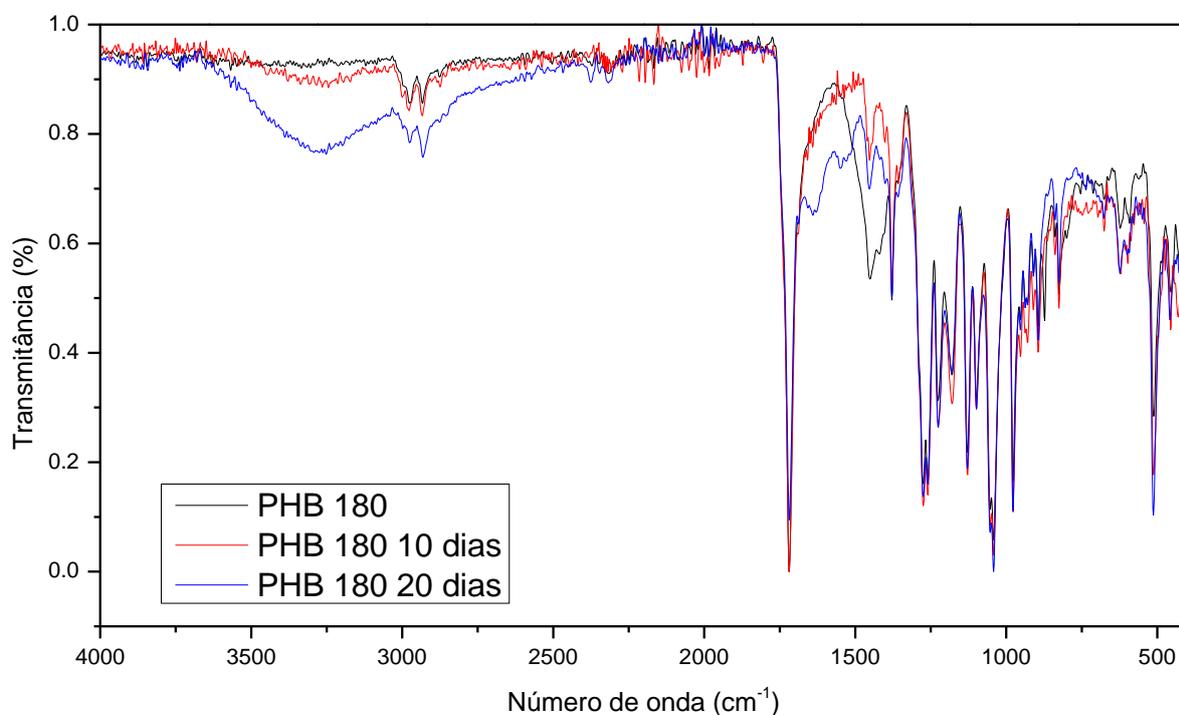


Figura 64. Espectros de FTIR-ATR representativos de PHB 180, e PHB 180 degradados por 10 e 20 dias.

Para as amostras de PHB 60 e PHB 180 mostradas nas Figuras 62 e 63 , as mesmas alterações descritas para o PHB ST são válidas e ainda vale ressaltar que as funcionalidades inseridas pelo tratamento também sofrem decréscimo de intensidade, reforçando a degradação do polímero.

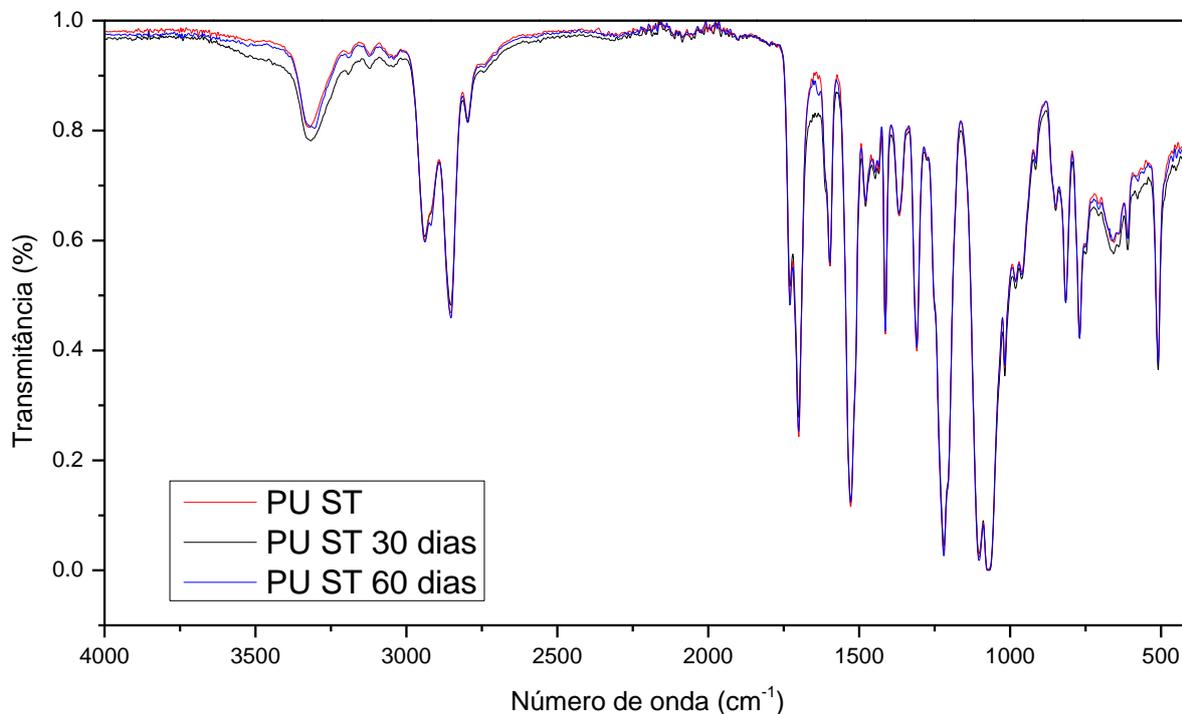


Figura 65. Espectros de FTIR-ATR representativos de PU ST, e PU ST degradados por 30 e 60 dias.

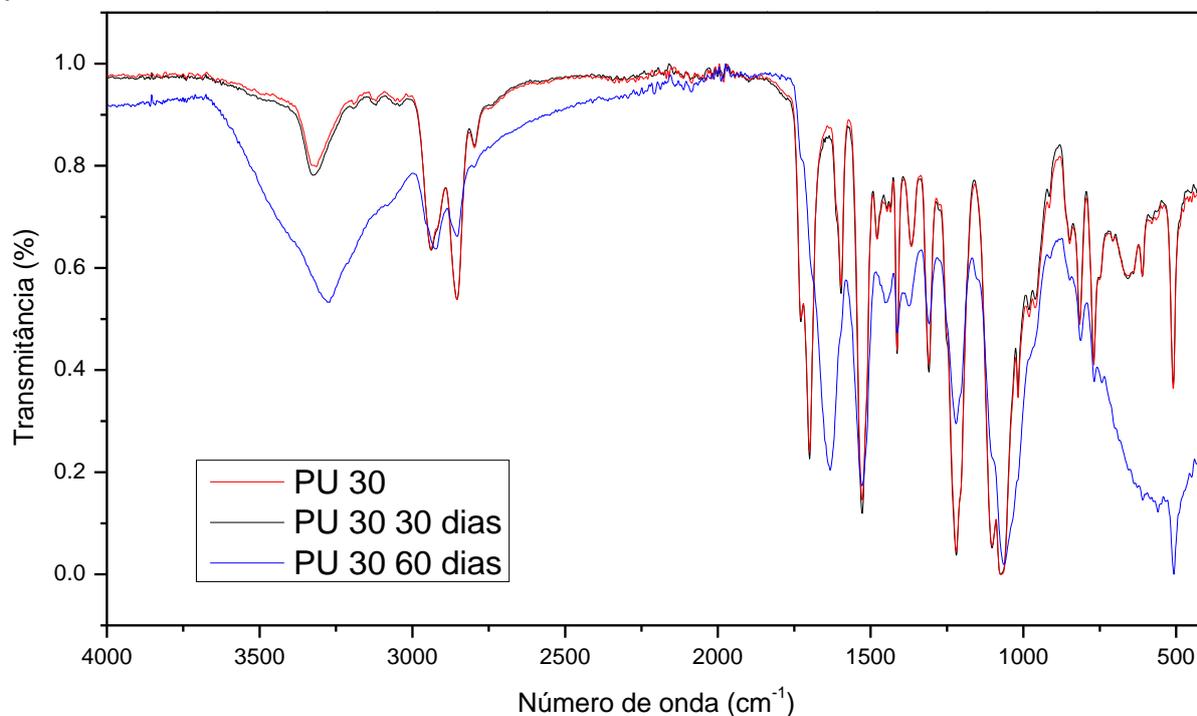


Figura 66. Espectros de FTIR-ATR representativos de PU 30, e PU 30 degradados por 30 e 60 dias.

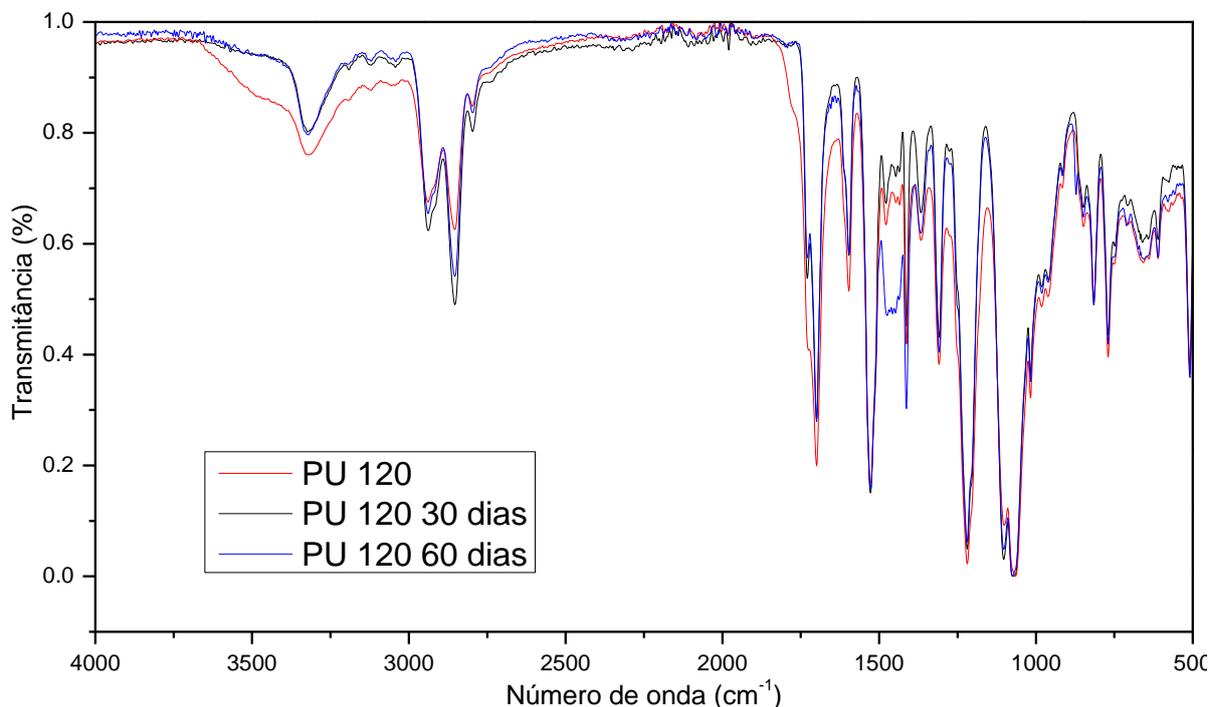


Figura 67. Espectros de FTIR-ATR representativos de PU 120, e PU 120 degradados por 30 e 60 dias.

Os espectros de FTIR-ATR para amostras de PU sem tratamento e tratadas são mostrados nas Figuras 65 a 67. Pode-se notar que as modificações nas bandas seguem as mesmas tendências que nos outros polímeros sendo que há um processo de degradação, apresentando bandas de hidrólise e grupamentos nitrogenados. Tendo em vista as análises de MO e MEV discutidos anteriormente, estes sinais de degradação não eram esperados, pois, como observado, não houve germinação dos esporos e nem crescimento significativo do fungo sobre a superfície. Isto pode ser explicado pelo fato de que mesmo na forma de esporo *Metarhizium* é capaz de secretar proteínas e estas podem estar interagindo com a superfície do polímero e causando danos a estrutura da cadeia.

Duas adesinas MAD1 e MAD2 (proteínas responsáveis pela adesão do fungo) são secretadas por *M. robertssi* no momento da adesão em inseto e plantas. A secreção destas proteínas é dependente do meio aonde este fungo irá se desenvolver, podendo ser superexpressa ou ter uma redução da sua expressão.¹⁹⁴ Após a incubação, observou que estas células estavam bem aderidas à superfície

polimérica não sendo possíveis serem removidas da superfície. Esse experimento concorda com os dados observados por microscopia neste trabalho e sugere-se que o mesmo esteja ocorrendo. Ao entrar em contato o esporo do fungo começa a secretar proteínas de adesão e também proteínas que possam estar atuando na degradação inicial do polímero, porém por algum motivo ainda não esclarecido o crescimento do fungo possui um ritmo bem reduzido aos demais polímeros.

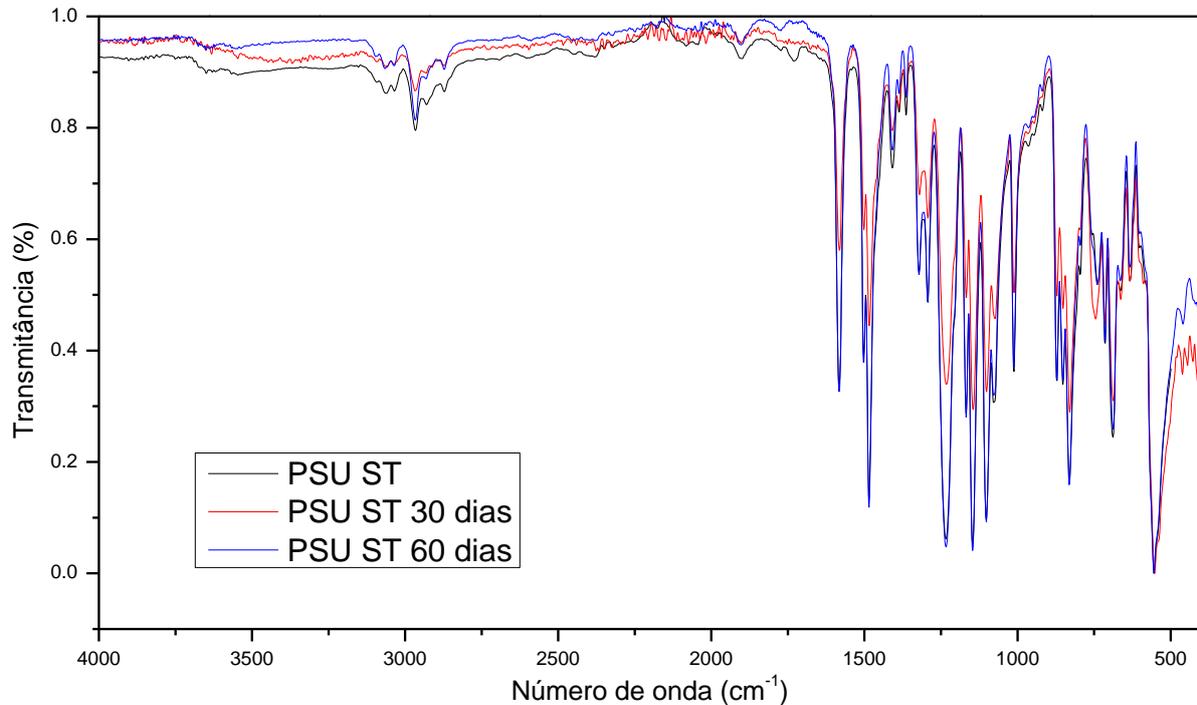


Figura 68. Espectros de FTIR-ATR representativos de PSU ST, e PSU ST degradados por 30 e 60 dias.

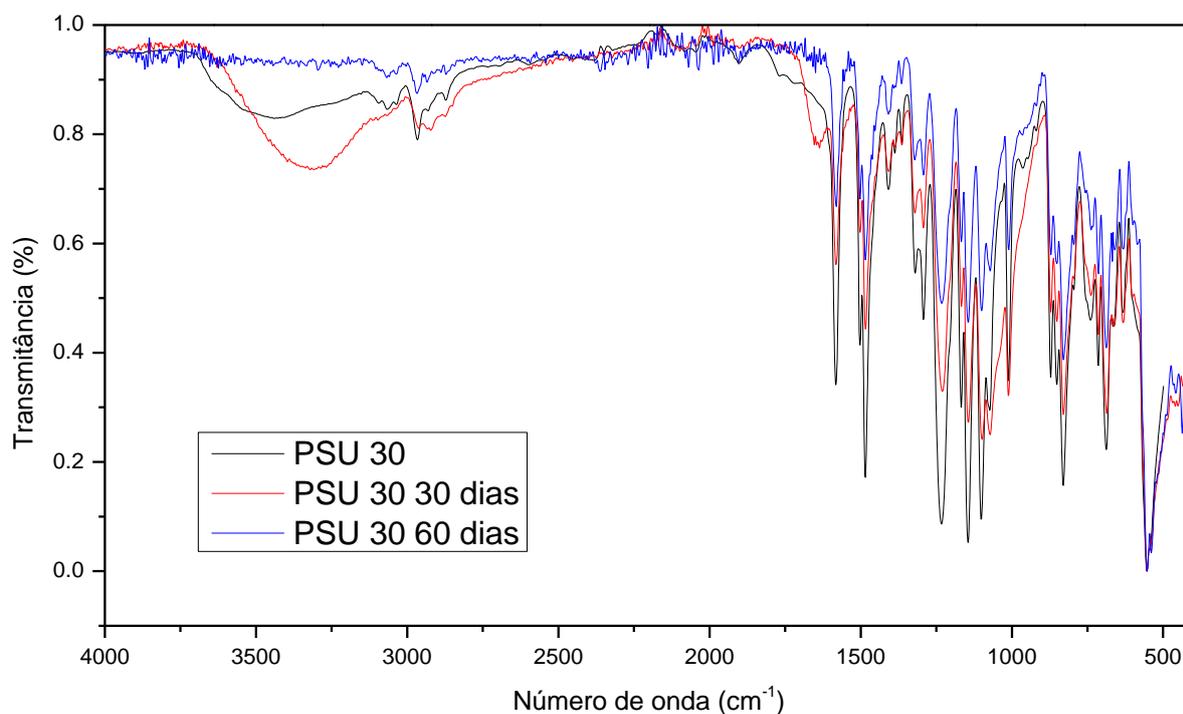


Figura 69. Espectros de FTIR-ATR representativos de PSU ST, e PSU ST degradados por 30 e 60 dias.

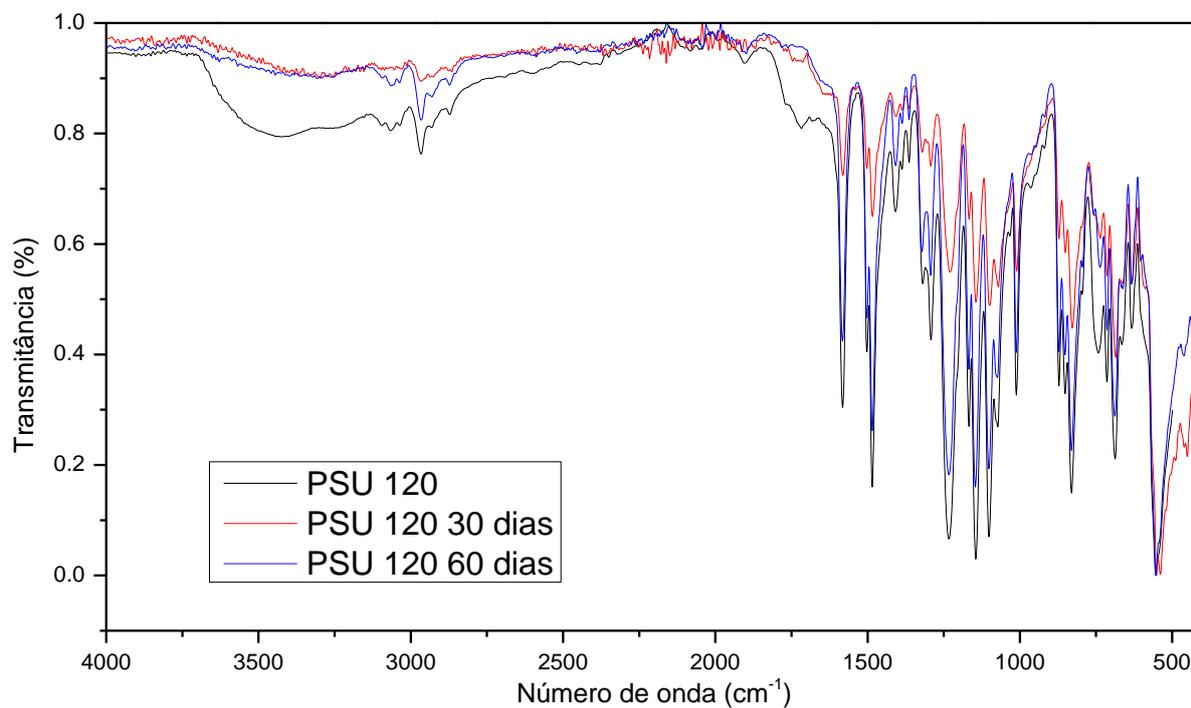


Figura 70. Espectros de FTIR-ATR representativos de PSU ST, e PSU ST degradados por 30 e 60 dias.

As Figuras 68 a 70 trazem os espectros de FTIR-ATR para as amostras de PSU ST, PSU 30 e PSU 120 submetidas a degradação durante 30 e 60 dias. Novamente

observa-se o surgimento da banda 3100-3600 cm^{-1} (OH) que juntamente com a banda 1736 cm^{-1} (C=O) indicam hidrólise deste polímero o que acaba ocasionando a aparecimento da banda 1640 cm^{-1} pela alteração estrutural da molécula. É observada também presença da banda 1145 cm^{-1} que se refere grupamentos nitrogenados provavelmente resultado de subprodutos de degradação.

O comportamento observado para PSU 30' e 120' (Figuras 69 e 70) segue o padrão observado para PSU ST. Porém nestes dois polímeros se tem um decréscimo na região 1720-1680 cm^{-1} que apresenta uma diminuição, e esta mesma região foi descrita com redução também por Zahra *et al.*¹²⁸ durante a degradação de polietileno de baixa densidade, o autor afirma que essa diminuição se deve a utilização do grupamento carbonila como substrato pelo fungo.

As análises de FTIR-ATR mostram que há sinais evidentes de degradação das superfícies poliméricas de todas as amostras estudadas pela redução de intensidade de grupos oxigenados no espectros, surgimento de novas bandas, previamente ausentes nos polímeros e ainda o acréscimos de bandas de OH que estão relacionadas diretamente com o mecanismo de hidrólise, principal meio de ataque de microrganismos a amostras poliméricas. Os dados apresentam concordância entre si e ainda mostram que há uma certa proporcionalidade de degradação dependente do tempo de incubação sendo que para maiores tempos de incubação, as modificações mostram-se mais evidentes. Ainda é possível afirmar que os novos grupos inseridos no polímero são consumidos após a degradação do fungo.

A Tabela 8 traz as análises de GPC para as amostras não tratadas e tratadas de PHB, PU e PSU. As amostras sem tratamento mostraram-se similares com a apresentada pela formulação de venda. Após os tratamentos, as amostras de PHB sofreram um aumento de massa molecular média (Mw) para 60 min de irradiação em presença de O₂ juntamente com o decréscimo do índice de polidispersividade (PDI). Normalmente este tipo de mudança indica a reticulação do polímero e está de acordo com as análises de química de superfície anteriores. Por outro lado para PHB 180 há um grande decréscimo de Mw, juntamente com o acréscimo de PDI. Este comportamento para este tipo de poliéster confirma a clivagem da cadeia, e está de acordo com as demais análises superficiais e já foi observado também em outros estudos na literatura.¹⁹⁵

Tabela 8. Massa molar média (Mw), número médio de unidade de massa molar (Mn) e o índice de polidispersividade (PDI) para amostras não tratadas de PHB, PU e PSU e após os tratamentos com radiação UV em presença de O₂.

| Amostra | Mw (g.mol ⁻¹) | Mn (g.mol ⁻¹) | PDI (Mw/Mn) |
|---------|------------------------------|------------------------------|----------------|
| PHB | 141301 | 72158 | 1,95 |
| PHB60 | 262955 | 149259 | 1,76 |
| PHB180 | 37245 | 11372 | 3,27 |
| PU | 225172 | 72462 | 3,10 |
| PU30 | 229062 | 94421 | 2,42 |
| PU120 | 204434 | 72845 | 2,80 |
| PSU | 49838 | 18967 | 2,62 |
| PSU30 | 43348 | 12180 | 3,55 |
| PSU120 | 36051 | 13580 | 2,65 |

Do mesmo modo um comportamento similar pode ser visto para as amostras de PU na Tabela 8. Para PU30 podemos ver que há um leve acréscimo no Mw e decréscimo para o PDI. Isto reflete um comportamento de reticulação. A inserção de oxigênio na cadeia polimérica e a formação de radicais pode levar a formação de ligações entre cadeias, elevando assim o Mw.^{196,197} Para PU120 observamos uma redução de Mw, juntamente com a elevação do PDI em comparação ao PU30. Como observado na caracterização das superfícies, estes dados mostram o que foi observado para os dados de Tof-SIMS, onde está ocorrendo a quebra da cadeia polimérica, refletindo no decréscimo do Mw. Para a PSU o comportamento dos dados de GPC diferenciam-se um pouco, sendo que logo com 30 min de tratamento há uma redução significativa de Mw, acompanhada de acréscimo de PDI acentuado. E após 120 min há uma maior redução de Mw e a recuperação do PDI. Este comportamento está relacionado provavelmente com o tipo de modificação, e como visto anteriormente é diferenciado em termos de sítio de excitação e funcionalização comparados ao PU e PHB.

A Tabela 9 traz os dados de GPC para os controles das amostras submetidas a degradação. Comparando os dados da Tabela 8 com os dados da Tabela 9 pode-se notar grandes diferenças entre os dados. Embora as análises de química de superfícies não indique modificação significativa na química superficial dos controles, os dados do GPC mostram que há grandes modificações em termos de

Mw e PDI. Para as amostras de PHB há uma variação maior que os demais polímeros e isso se reflete no tipo de modificação e na própria característica de cadeia do polímero. Com exceção da amostra de PHB 60, que mostrou-se pouco solúvel, todas as outras amostras obtiveram um aumento de Mw e mudanças significativas no PDI. Este tipo de resultado para as amostras controle já era esperado devido as características do cultivo. Por sua característica de controle, é fornecido a estas amostras as mesmas condições de cultivo das amostras a serem degradadas, porém sem a utilização de fungo. Ou seja, para estas amostras é fornecida temperatura constante (28°C) e umidade (provinda do meio de cultivo). Sabe-se que para amostras poliméricas esta combinação de fatores pode facilmente levar as mudanças observadas na Tabela 9 e são devidos à mecanismos de reticulação que são favorecidos pelas condições de temperatura e umidade.¹⁹⁸ Além do mais ao enxertar novos grupos está fornecendo energia ao sistema, que com o passar do tempo tende a minimizar esta energia. O oferecimento de leve aquecimento durante um período constante acelera este processo de minimização de energia, que consiste em rotação da cadeia polimérica por movimento de reptação e rearranjo de grupos químicos que podem levar a reticulação e conseqüentemente a elevação do Mw e modificação do PDI

Tabela 9. Massa molar média (Mw), número médio de unidade de massa molar (Mn) e o índice de polidispersividade (PDI) para os controles das amostras não tratadas de PHB, PU e PSU e após os tratamentos, analisadas após 10 e 20 dias de cultivo para PHB e 30 e 60 dias de cultivo para PU e PSU.

| Amostra | 10 dias \ 30 dias | | | 20 dias \ 60 dias | | |
|---------|------------------------------|------------------------------|----------------|------------------------------|------------------------------|----------------|
| | Mw (g.mol ⁻¹) | Mn (g.mol ⁻¹) | PDI (Mw/Mn) | Mw (g.mol ⁻¹) | Mn (g.mol ⁻¹) | PDI (Mw/Mn) |
| PHB | 263643 | 88563 | 2,97 | 200818 | 62046 | 3,23 |
| PHB60* | 3919 | 972 | 4,03 | 2118 | 687 | 3,08 |
| PHB180 | 45172 | 11669 | 3,87 | 39330 | 15039 | 2,61 |
| PU | 183402 | 33581 | 5,46 | -- | -- | -- |
| PU30 | 234435 | 94636 | 2,47 | -- | -- | -- |
| PU120 | 224890 | 64809 | 3,47 | 225705 | 80625 | 2,79 |
| PSU | 54534 | 27135 | 2,00 | 58673 | 30400 | 1,93 |
| PSU30 | -- | -- | -- | 53037 | 26284 | 2,01 |
| PSU120 | 57172 | 25540 | 2,23 | 61072 | 24306 | 2,51 |

* Amostra pouco solúvel

-- Amostra perdida por contaminação

A Tabela 10 apresenta os dados de GPC após a degradação fúngica durante o período de 10 e 20 dias para amostras de PHB e 30 e 60 dias para amostras de PSU e PU nos meios de cultivo indicados na tabela. Vale ressaltar aqui que para todas estas amostras houve, em geral, um alargamento de picos e a presença de picos em tempos de retenção maiores, o que em geral indica a formação de compostos de baixa massa molecular média, característicos de amostras degradadas.

Os dados expressos na Tabela 10 mostram as componentes majoritárias dos espectros, sendo que muitas vezes, e em especial nas amostras de PHB, havia a formação de ombros e picos adjacentes de intensidade significativa (dados não mostrados). A primeira vista, nos dados da Tabela 10, as amostras de PHB, tratadas e não tratadas, mostram um expressiva redução de Mw como tendência geral. Comparando os dados da Tabela 8 com os dados a Tabela 10, podemos observar dados interessantes. Há uma significativa redução de Mw para amostras de PHB sem tratamento em 10 dias de cultivo para as duas linhagens e em ambos meios de cultivo, porém após 20 dias, há uma menor redução da Mw.

Para as amostras de PHB tratadas, há uma diferenciação entre as linhagens utilizadas e os meios de cultivo. Na linhagem E6 há uma maior redução de Mw quando utilizado o meio MCM tanto para 10 dias quanto para 20 dias de cultivo. Enquanto que para as amostras utilizando o meio H₂O há uma maior redução de Mw em 10 dias de cultivo. Para a linhagem CG97 esta preferência pelo PHB sem tratamento é encontrada para 10 dias de cultivo, porém a 20 dias, há um grande acréscimo de Mw. Ainda nesta mesma linhagem, porém utilizando o meio de cultivo MCM a redução não é expressiva para ambos os períodos de cultivo.

Tabela 10. Massa molar média (Mw), número médio de unidade de massa molar (Mn) e o índice de polidispersividade (PDI) para as amostras degradadas de PHB, PU e PSU não tratadas e após os tratamentos, analisadas após 10 e 20 dias de cultivo para PHB e 30 e 60 dias de cultivo para PU e PSU.

| Amostra | 10 dias \ 30 dias | | | 20 dias \ 60 dias | | |
|---------------|------------------------------|------------------------------|----------------|------------------------------|------------------------------|----------------|
| | Mw (g.mol ⁻¹) | Mn (g.mol ⁻¹) | PDI (Mw/Mn) | Mw (g.mol ⁻¹) | Mn (g.mol ⁻¹) | PDI (Mw/Mn) |
| Linhagem E6 | | | | | | |
| PHB* | 37872 | 17686 | 2,14 | 86596 | 24966 | 3,46 |
| PHB60* | 29007 | 4304 | 6,73 | 35593 | 15168 | 2,34 |
| PHB180* | 3453 | 968 | 3,56 | 49692 | 21512 | 2,30 |
| PHB** | 1925 | 721 | 2,66 | 3925 | 1066 | 3,68 |
| PHB60** | 28043 | 6776 | 4,13 | 1892 | 731 | 2,58 |
| PHB180** | 2457 | 836 | 2,93 | 2477 | 837 | 2,95 |
| Linhagem CG97 | | | | | | |
| PHB* | 2720 | 804 | 3,38 | 291661 | 130315 | 2,23 |
| PHB60* | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| PHB180* | 1515 | 657 | 2,30 | 37355 | 8524 | 4,38 |
| PHB** | 73626 | 30700 | 2,39 | 2602 | 853 | 3,05 |
| PHB60** | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| PHB180** | 39884 | 8964 | 4,44 | 52278 | 20296 | 2,57 |
| Linhagem CG97 | | | | | | |
| PU* | 228354 | 89253 | 2,55 | 250018 | 96492 | 2,59 |
| PU30* | 352381 | 200471 | 1,75 | 252473 | 94630 | 2,66 |
| PU120* | 234640 | 88610 | 2,64 | 203539 | 56312 | 3,61 |
| PU** | 282448 | 105611 | 2,67 | 244749 | 96605 | 2,53 |
| PU30** | 245805 | 98210 | 2,50 | 227733 | 89913 | 2,53 |
| PU120** | 309260 | 129806 | 2,38 | 210353 | 79671 | 2,64 |
| Linhagem E6 | | | | | | |
| PSU* | 51206 | 25636 | 1,99 | 52576 | 25911 | 2,02 |
| PSU30* | -- | -- | -- | 58103 | 25113 | 2,31 |
| PSU120* | 55274 | 26462 | 2,08 | 56169 | 24959 | 2,25 |
| PSU** | 50940 | 24504 | 2,07 | 58716 | 28639 | 2,05 |
| PSU30** | -- | -- | -- | 63531 | 32215 | 1,97 |
| PSU120** | 54194 | 26991 | 2,00 | 49130 | 20980 | 2,34 |

* Indica amostras cultivadas em H₂O

**Indica amostras cultivadas em Cove

-- Amostra perdida por contaminação ou não solúvel (PHB 60).

As amostras de PU e PSU para ambas os meios de cultivo não parecem sofrer alterações significativas tanto para Mw quanto para PDI a não ser para as amostra PSU120 e PU120. Estes dados refletem o que foi observado nas análises de microscopias para PU, onde o crescimento não é significativo, e mesmo havendo algumas hifas, o fungo não consegue desenvolver-se da mesma forma que como no PHB. Porém, ainda é necessário considerar os dados de Tof-SIMS que serão apresentados a seguir.

Tof-SIMS

Os dados apresentados nesta seção referem-se aos espectros Tof-SIMS das amostras de PHB, PSU e PU após a degradação fúngica durante o período de incubação de 10 dias para as amostras de PHB e 30 dias para as amostras de PSU e PU, respectivamente.

PHB X CG97

O espectro Tof-SIMS positivo de PHB ST após a degradação (Figura 71) mostrou diversas diferenças dos espectros das amostras não degradadas. Pode-se dizer que ao comparar com o espectro Tof-SIMS antes da degradação a fragmentação majoritária foi drasticamente modificada.

Nas amostras antes da degradação, particularmente no intervalo de entre 10 e 100 m/z o pico majoritário era de 69 m/z, que corresponde ao monômero de PHB menos um átomo de hidrogênio. Já nos espectros de mesmo intervalo de m/z mostrado acima (Figura 71) podemos citar os fragmentos de 41 m/z, 55 m/z e ainda ver a presença de 70 m/z e 87 m/z. O fragmento de 55 m/z pode corresponder a parte não oxigenada do monômero de PHB, ou seja, basicamente a parte da molécula que corresponde a estrutura de carbonos e hidrogênios C_4H_7 . O fragmento 45 m/z pode ser atribuído como a fragmentação subsequente do íon 55 m/z e corresponde a estrutura C_3H_5 . 70 m/z e 87m/z aparecem originalmente no polímero sem tratamento, mas aqui aparecem em intensidade bem menor relativa aos fragmentos 55m/z e 41 m/z. Isto pode ser resultado da degradação do fungo.

Ao assimilar a parte oxigenada da molécula por hidrólise, os fragmentos remanescentes na molécula do polímero, irão conter principalmente carbono e hidrogênio, possivelmente fornecendo o tipo de fragmentação encontrada. Do mesmo modo, em intervalos de m/z maiores o consumo de oxigênio da molécula de polímero pode ser verificado pela diferença na fragmentação do espectro de massas. No intervalo de 100 a 200 m/z (Figura 71), para o polímero sem tratamento antes da degradação, podem-se observar os fragmentos 173 m/z, 155 m/z e 127 m/z, que correspondem a fragmentos de dímeros do polímero que contém oxigênios na sua estrutura, após a degradação estes fragmentos não só somem, como dão lugar a uma maior intensidade de fragmentos aos valores de m/z em : 111, 113, 125, e 143 m/z. Esses fragmentos justamente correlacionam-se com os primeiros

citados pela perda de um átomo de oxigênio e um átomo de carbono. As alterações observadas, podem ser fonte da ação metabólica do fungo. Essa mesma tendência pode ser observada nos espectros de íons positivos das amostras pós-degradação de PHB 60 e PHB 180 (Figuras 73 e 75).

No espectro Tof-SIMS negativo da amostra PHB ST (Figura 72) pós-degradação, houve uma grande diferenciação do espectro original. Primeiramente houve uma grande redução do íon 41 e 40 m/z. Estes fragmentos podem ser atribuídos aos grupos C_2O^- e C_2OH^- respectivamente. O íon 85 m/z atribuído ao monômero do PHB, sofreu grande redução e pode-se notar a intensidade de íons 42, 50, 79 e 97 m/z. Estes íons não são representativos de nenhum fragmento do PHB, mesmo não tratado e a literatura traz como íons que contém átomos de nitrogênio (42, 50 e 79 m/z) ou SO_3 (97 m/z), e estes elementos não são originais da estrutura do polímero. Ainda pode-se destacar a presença dos íons negativos 197, 184, 297, 311, 328, 339, 404 e 446 m/z, que também não pertencem a qualquer fragmento do polímero original.

A presença de compostos nitrogenados e sulfurados, fragmentações de relativa intensidade a valores de m/z maiores e a baixa intensidade de fragmentos relativos ao polímero sugerem que os espectros de íons negativos mostram uma superfície totalmente diferente da original, que pode ser resultado da degradação ou então do recobrimento de compostos de diferente características químicas do polímero, fornecendo espectros de massas com características totalmente diferente dos espectros de massas das amostras não submetidas a degradação.

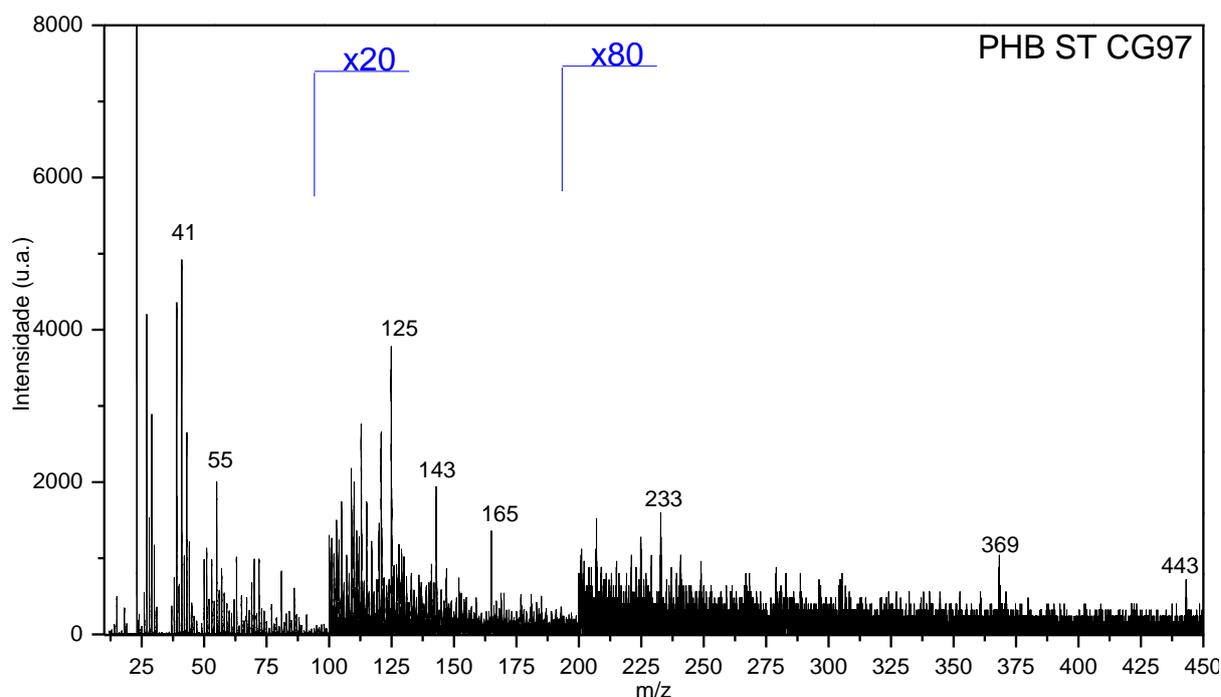


Figura 71. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PHB ST degradada por 10 dias pela linhagem CG97.

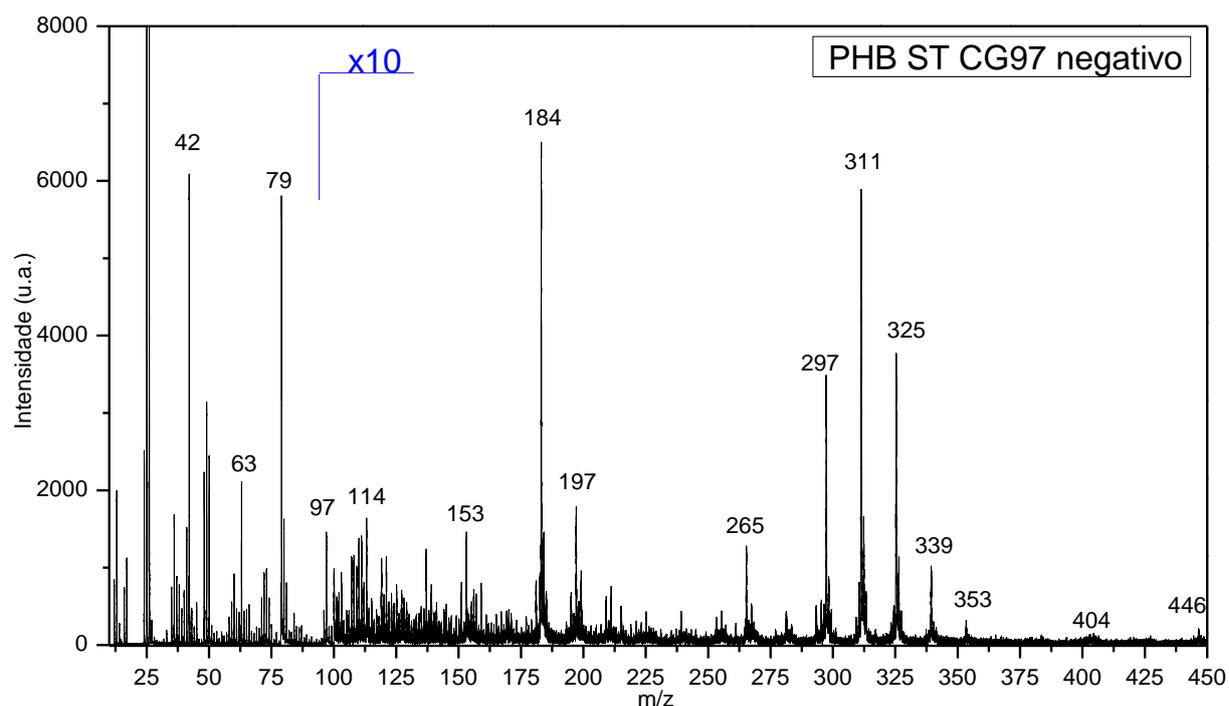


Figura 72. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PHB ST degradada por 10 dias pela linhagem CG97.

Estas mesmas características foram encontradas nos espectros Tof-SIMS negativos, das amostras de PHB 60 (Figura 74) e PHB 180 (Figura 76) submetida à degradação do CG97.

O espectro Tof-SIMS negativo da amostra de PHB 76 (Figura 58) submetida à degradação do CG97 demonstrou similar fragmentação nos intervalos de menor valor de m/z . Porém a valores maiores de m/z há importantes diferenças das demais amostras, como a menor intensidade de íons de valor de m/z acima de 300 e fragmentação similar ao polímero sem tratamento no intervalo de m/z entre 100 e 300. Porém, há baixa intensidade do fragmento em 171 m/z e 103 m/z que sugerem o mesmo comportamento observado para o polímero sem tratamento e tratado por 180 min (Figura 76).

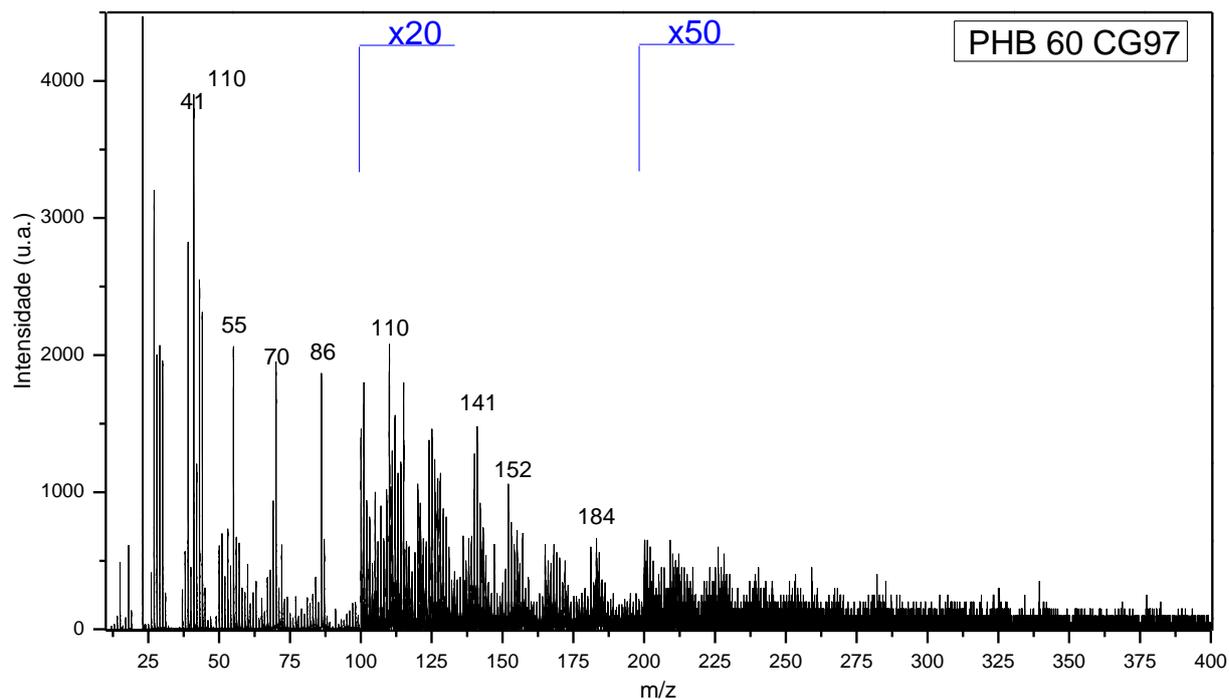


Figura 73. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PHB 60 degradada por 10 dias pela linhagem CG97.

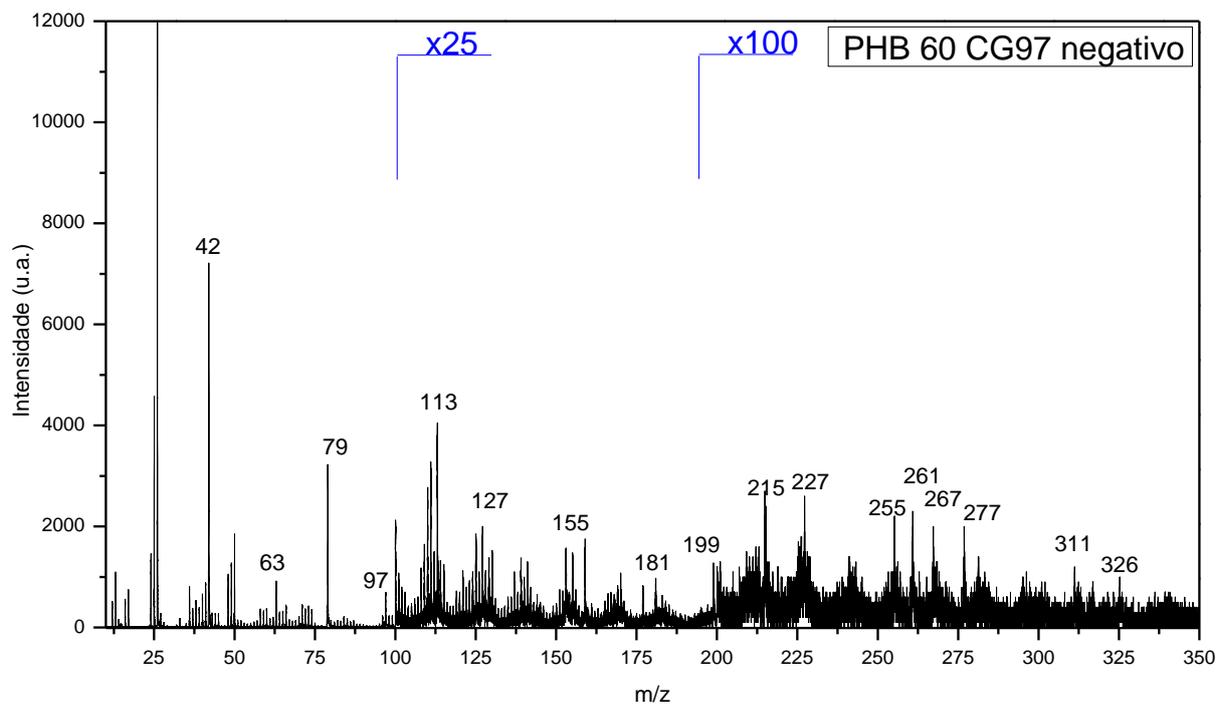


Figura 74. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PHB 60 degradada por 10 dias pela linhagem CG97.

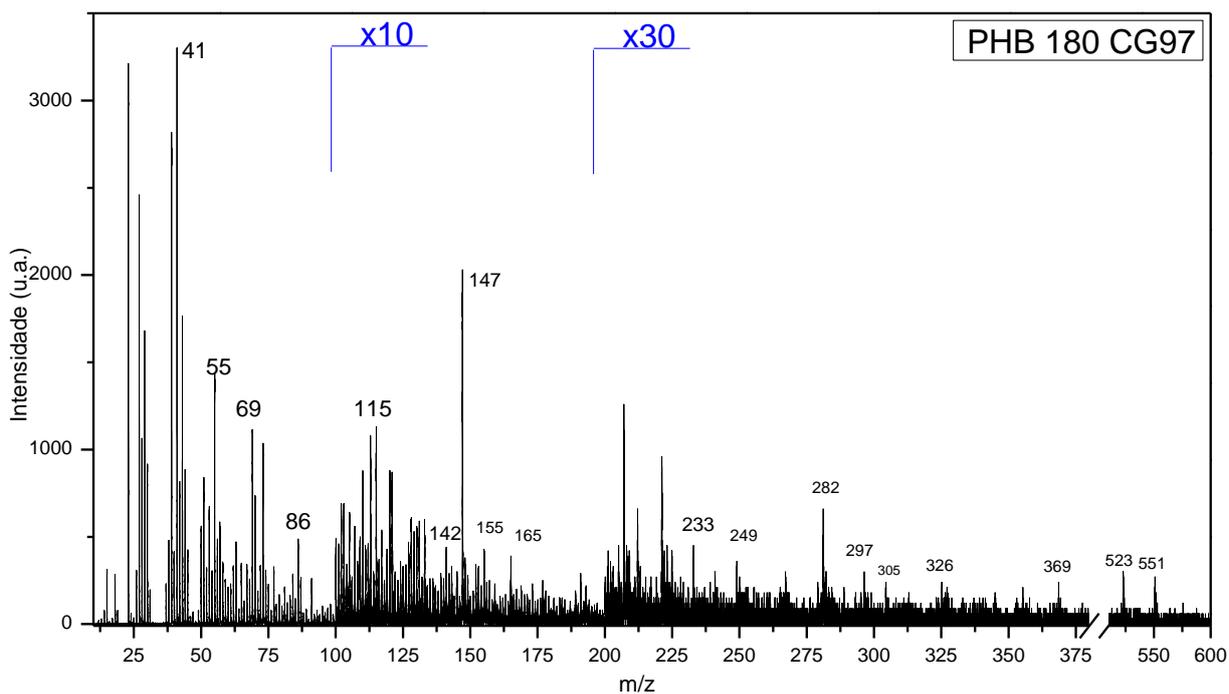


Figura 75. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PHB 180 degradada por 10 dias pela linhagem CG97.

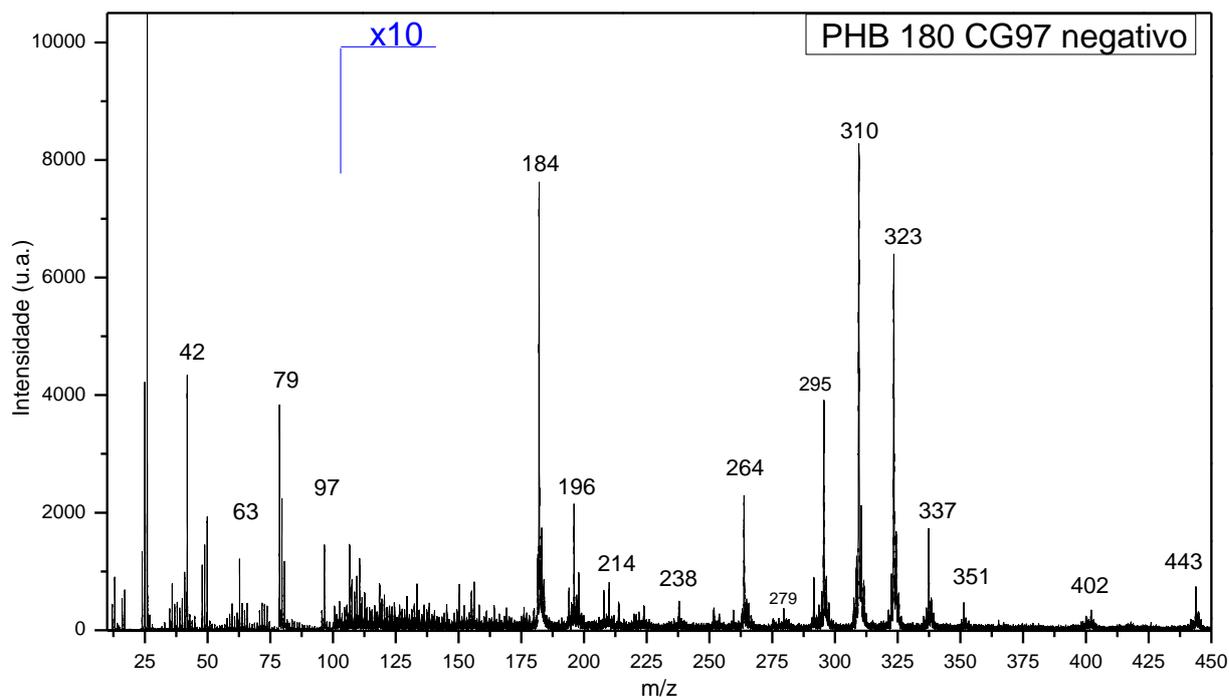


Figura 76. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PHB 180 degradada por 10 dias pela linhagem CG97.

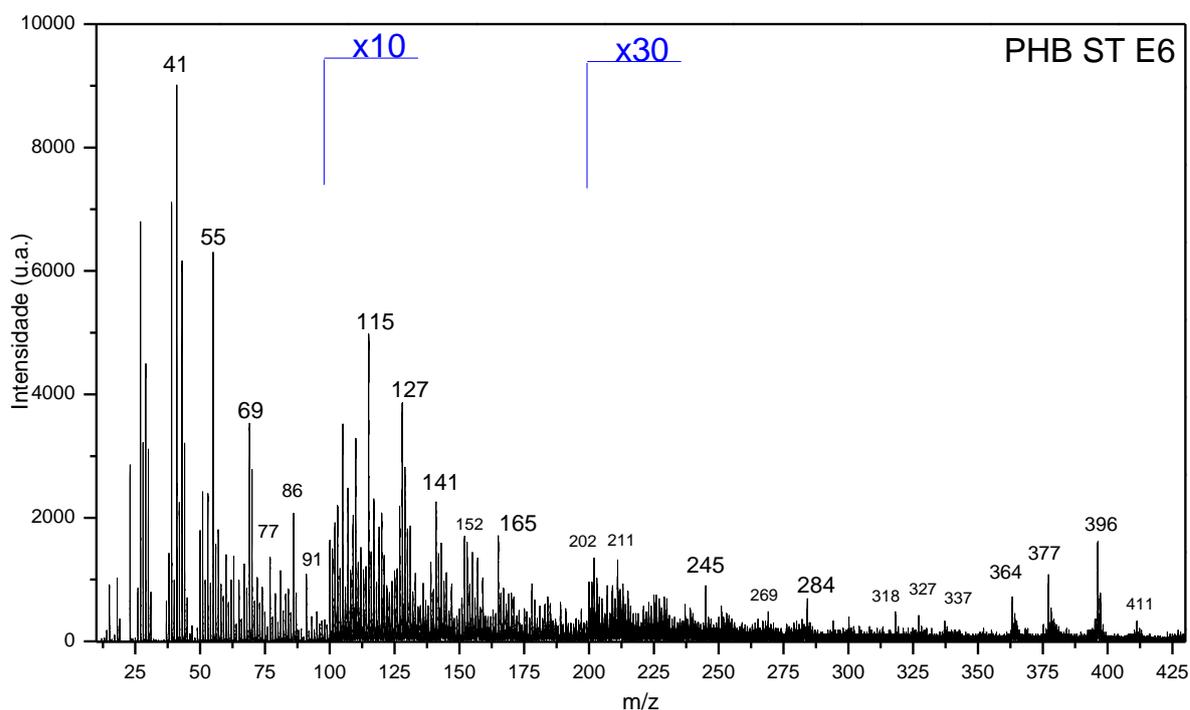


Figura 77. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PHB ST degradada por 10 dias pela linhagem E6.

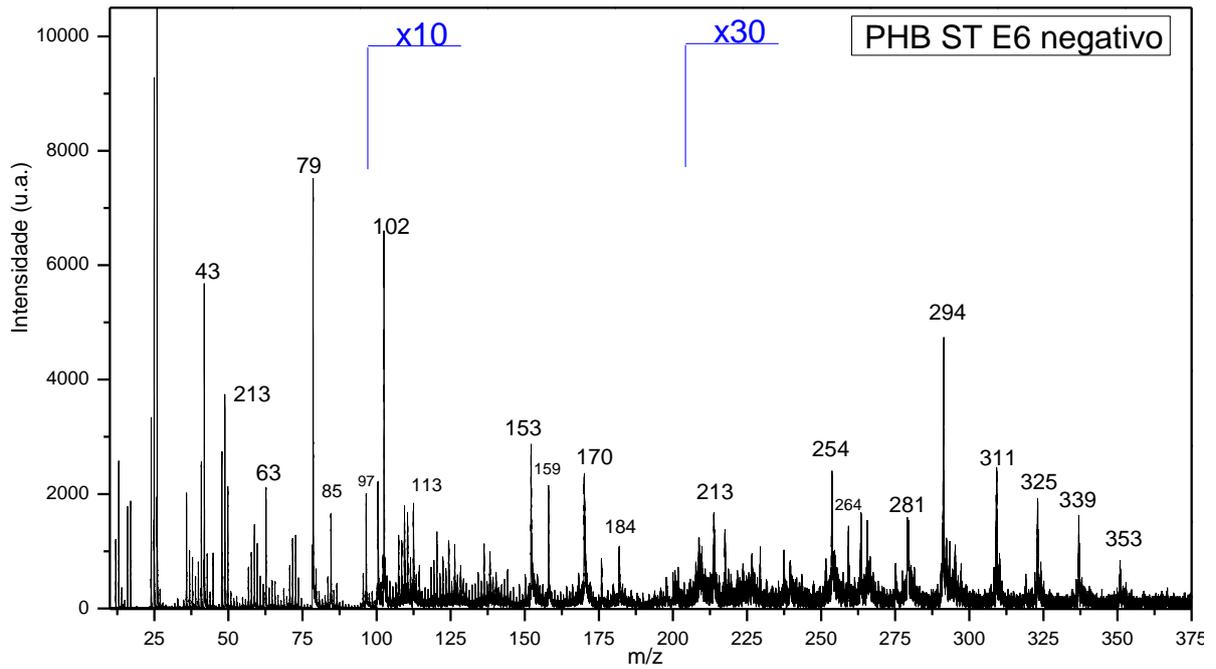


Figura 78. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PHB ST degradada por 10 dias pela linhagem E6.

PHB x E6

Para o espectro Tof-SIMS positivo da amostra de PHB sem tratamento degradada pela linhagem E6 (Figura 77), foi observado o mesmo comportamento de redução dos fragmentos de fragmentação das amostras submetidas à degradação pela linhagem CG97 (Figura 71). Há uma pequena diferença nas intensidades do fragmento de 69 m/z e 87 m/z, porém ainda assim os fragmentos majoritários no espectro positivo são os fragmentos 41 m/z e 55 m/z.

O mesmo pode-se dizer para intervalos de m/z maiores onde a fragmentação está presente do mesmo modo que as amostras degradadas por CG97, porém ainda podem-se notar alguns fragmentos de fragmentação originais do polímero em maior intensidade como os ressaltados em 155, 127 e 144 m/z. Os fragmentos em 211, 245, e 284 m/z diferem das amostras degradadas por CG97 e da amostra de PHB não tratado. Observa-se também uma significativa intensidade dos fragmentos acima de 300 m/z, como 318, 364, 377 e 411m/z. Novamente aqui fragmentos de valores de massa mais elevados podem indicar a presença de metabólitos deixados pelo fungo durante o processo de biodegradação.

O espectro Tof-SIMS negativo da amostra de PHB ST degradadas por E6 (Figura 78) seguem a mesma tendência mostrada antes nas amostras degradadas por CG97 (Figura 72), mas como visto anteriormente no espectro positivo (Figura 61), alguns fragmentos característicos da fragmentação do polímero permanecem, mesmo que em menor intensidade. Esta tendência segue para os demais fragmentos, onde vemos remanescentes de fragmentos do polímero original em menor intensidade, somados a fragmentos observados para o polímero degradado por CG97. Pode-se afirmar que as fragmentações encontradas nas amostras sem tratamentos submetidas à degradação de E6 são uma soma de fragmentações do polímero sem tratamento e os possíveis metabólitos também presentes na degradação do CG97.

O espectro Tof-SIMS positivo da amostra PHB 60 degradadas pela linhagem E6 (Figura 79) mostraram a mesma tendência que as amostras sem tratamento degradadas pela mesma linhagem. Há a presença dos mesmos fragmentos encontrados anteriormente, porém neste caso há uma maior contribuição da fragmentação do polímero sem tratamento. Os principais fragmentos da fragmentação do polímero podem ser vistos juntamente com os novos fragmentos

encontrados nas amostras que foram degradadas anteriormente, porém em maior intensidade.

Mesmo assim pode-se ressaltar que há um aumento de intensidade do fragmento 41 m/z em relação ao fragmento 69 m/z. Além da grande redução de intensidade do fragmento em 87 m/z. Esta tendência também é observada para os espectros de íons negativos para esta série de amostras (Figura 80).

Há a presença forte dos sinais de fragmentação do polímero como em 41, 49, 85, 101, 103, 121, 145, 171, 210, 221 e 241 m/z. Em menor intensidade os íons encontrados nos espectros degradados por CG97 aparecem nesta série como: 50, 63, 79, 183, 297, 283, 267, 255 m/z. Ainda mais interessante é que os fragmentos em m/z maiores que 300 (Figura 79), mantêm-se como se na amostra não houvesse degradação significativa. Os fragmentos em 311, 325 e 339 m/z, são comuns na amostra padrão de PHB 60, porém quando submetido à degradação por CG97 esses fragmentos quase não são mais detectados, ao contrário do que se observa para E6 onde esses fragmentos se mantêm. Isto pode indicar uma baixa degradabilidade do polímero pela linhagem E6.

Seguindo a mesma tendência da degradação com CG97, o espectro Tof-SIMS positivo (Figura 81) da amostra de PHB 180 degradada por E6 mostra um perfil de fragmentação bem diferenciada das amostras de PHB 180 não degradada. O fragmento em 69 m/z decresce fortemente de intensidade e este comportamento se estende a todos os fragmentos em que se atribui presença de oxigênio. Em contrapartida os fragmentos não oxigenados sofrem um acréscimo. Ainda pode-se observar que para os intervalo de 200-300 m/z onde a maior parte dos fragmentos correspondem a trímeros e tetrâmeros do polímero (com muitos oxigênios) praticamente não há detecção, restando apenas sinais de ruído. Ainda pode-se ressaltar o grande decréscimo de sinal em 155 m/z e o aparecimento de 184m/z e 165m/z.

O espectro Tof-SIMS negativo (Figura 82) para PHB 180 complementam os dados de espectro de íons positivos. Os sinais antes observados que se sugerem serem metabólitos ou mesmo resultado da degradação do polímero seguem aparecendo em maior intensidade do que nos espectros das amostras degradadas com CG97, com especial destaque para o intervalo de 200-300 m/z onde nota-se o aparecimento de alguns fragmentos diferenciados como 267, 261 e 255 m/z. Ainda cabe ressaltar que os fragmentos acima de 300 m/z mantem-se nos mesmos valores que o PHB 180 degradado por CG97, porém em intensidade muito menor.

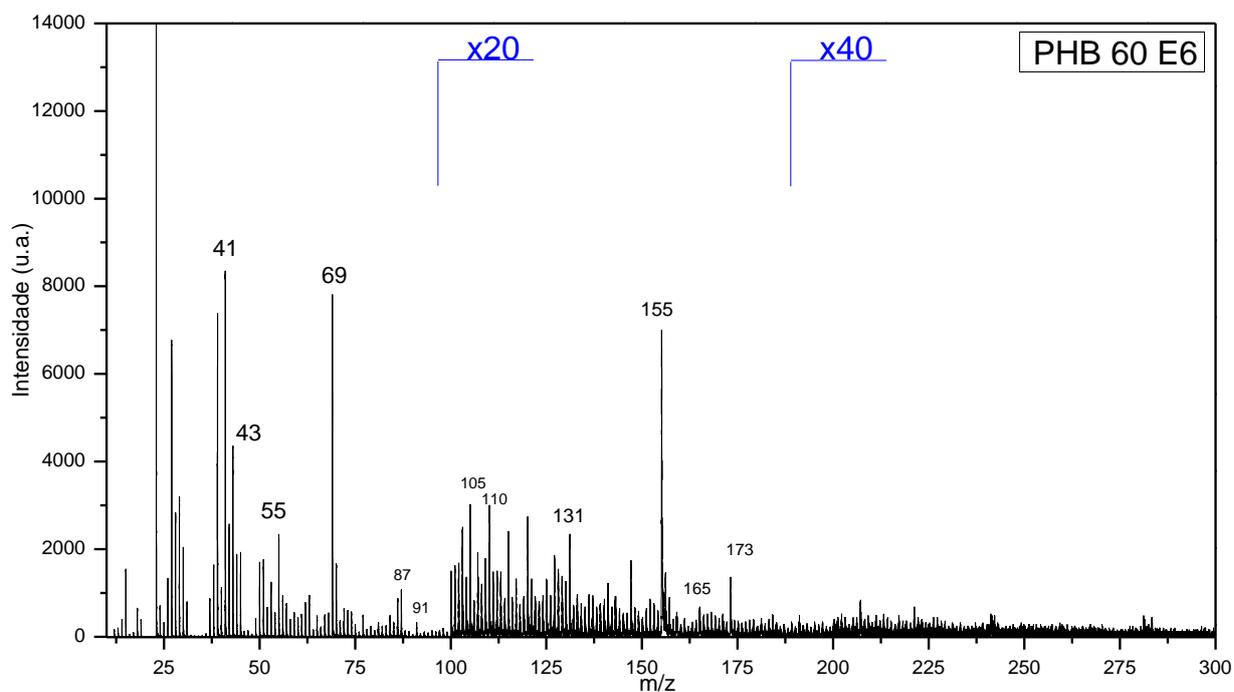


Figura 79. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PHB 60 degradada por 10 dias pela linhagem E6.

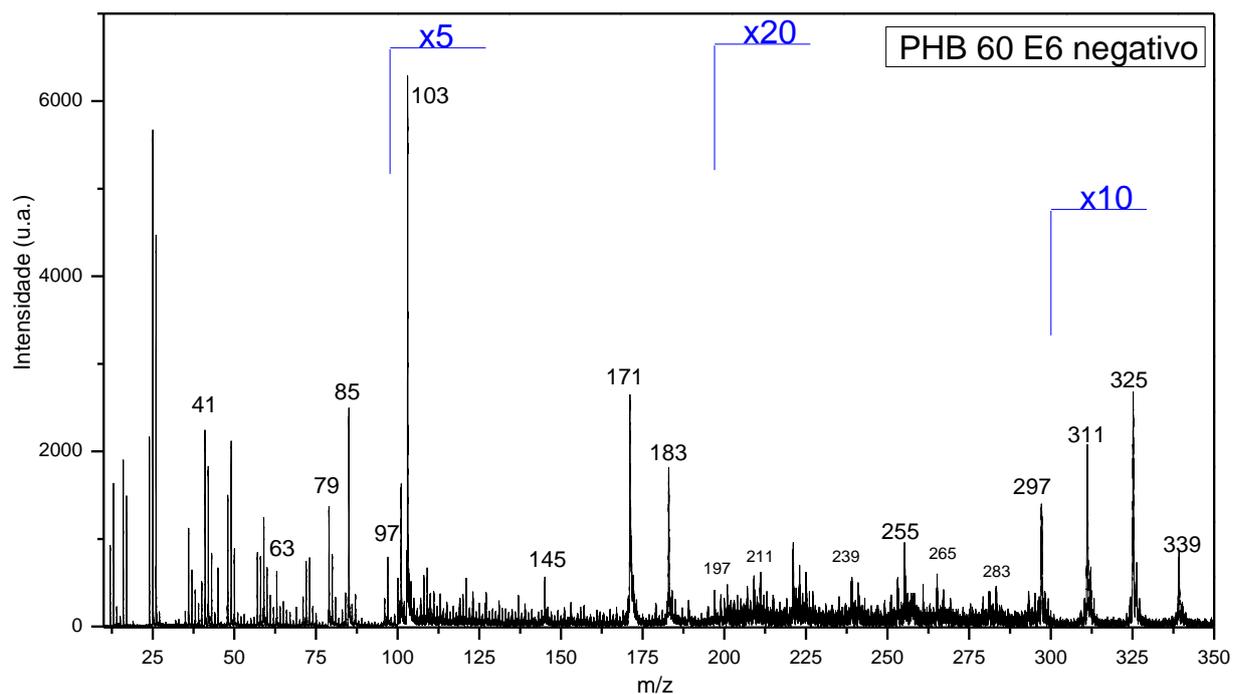


Figura 80. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PHB 60 degradada por 10 dias pela linhagem E6.

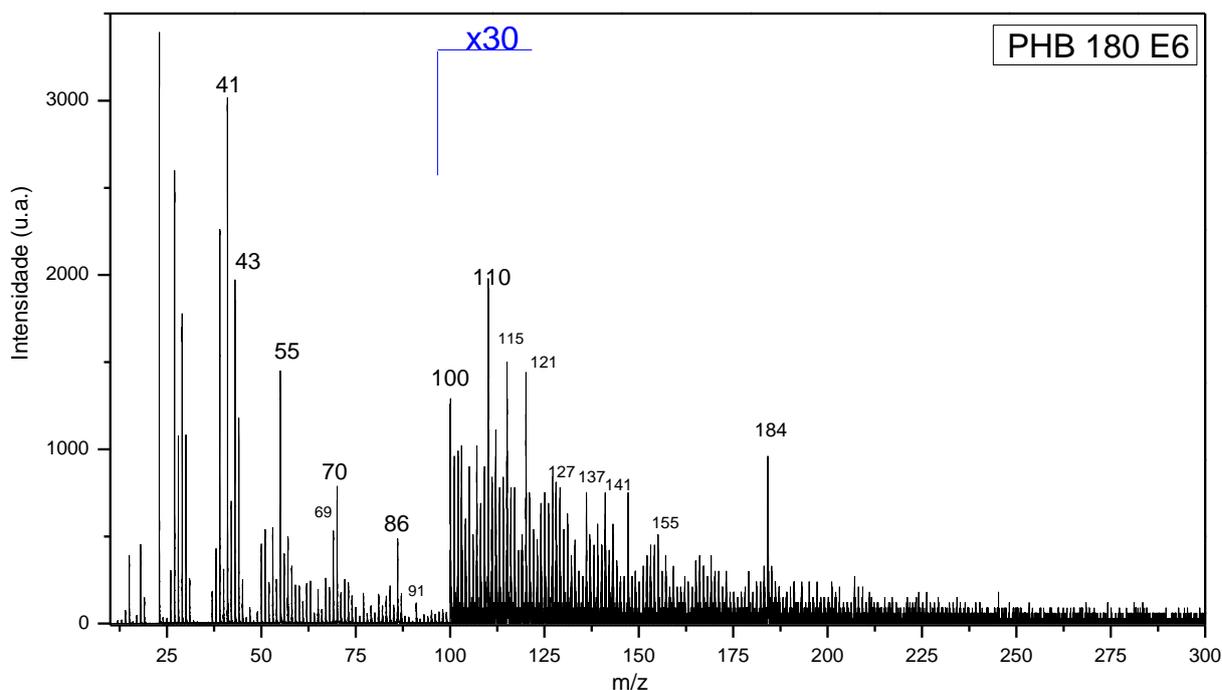


Figura 81. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PHB 180 degradada por 10 dias pela linhagem E6.

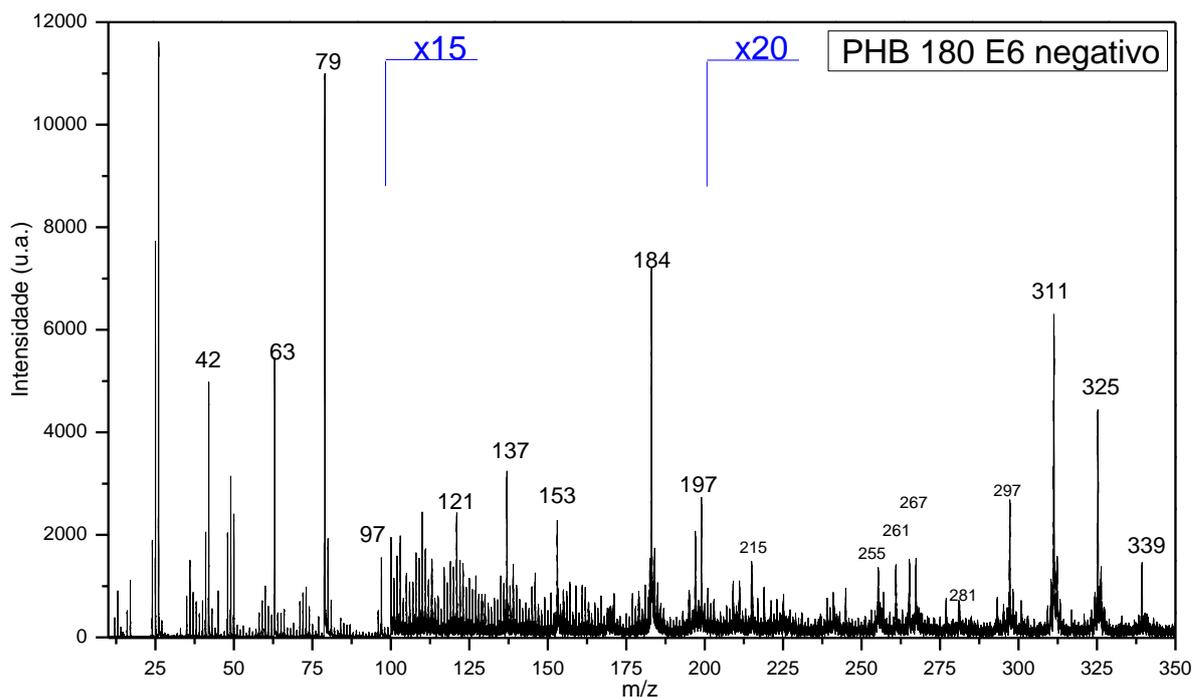


Figura 82. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PHB 180 degradada por 10 dias pela linhagem E6.

Como a técnica possui extremo controle e precisão, e o feixe de íons primários aplicado possui uma foca muito pequeno, é possível também avaliar os íons presentes na superfície dos polímeros através de imagens, optando por esta

configuração nos dados no momento da aquisição (Figura 83). Uma imagem é nada mais que uma composição de intensidade de cores localizada em um ponto no espaço bidimensional. Quando se possui o mesmo conceito, porém se ao invés de cores usarmos íons, quanto mais escuro é o tom da cor, menor é a quantidade do íon presente naquele ponto. De forma ilustrativa apresenta-se uma imagem de Tof-SIMS para a amostra de PHB 30 degradado por 10 dias (Figura 83).

Na imagem abaixo se pode descrever em (A) como a imagem de íons totais onde todos os íons que foram detectados estão representados, pode-se notar marcas no polímero as quais não podemos dizer nada mais do que estas marcas são resultado de uma menor intensidade de íons naquela área. No quadro (B), temos a imagem de apenas íons 69 m/z, que corresponde a fragmentação do monômero menos um átomo de oxigênio. Pode-se reparar que há uma menor intensidade (cores tendendo ao vermelho) de íons localizados próximos a estruturas que lembram hifas. Não há hifas presentes nesta imagem, a fragmentação da quitina, correspondente a parede celular do fungo, não foi encontrada. Essas estruturas são marcas na superfície polimérica, e pela menor intensidade de íons gerados, podemos dizer que há uma menor concentração destas espécies no polímero, ou seja que foram consumidas exatamente onde uma hifa do fungo estava aderida. O mesmo pode ser visto em (C), onde o íon 155 m/z corresponde ao dímero do polímero menos um átomo de oxigênio. As imagens (D) e (F) correspondem aos íons 215 m/z e 297 m/z que originalmente não são fragmentos do polímero em questão. Além de sua baixa concentração, pode-se observar que na sobreposição das imagens (C), (D) e (F), resultando na imagem (E), há a clara presença destes possíveis metabólitos nos caminhos de hifa.

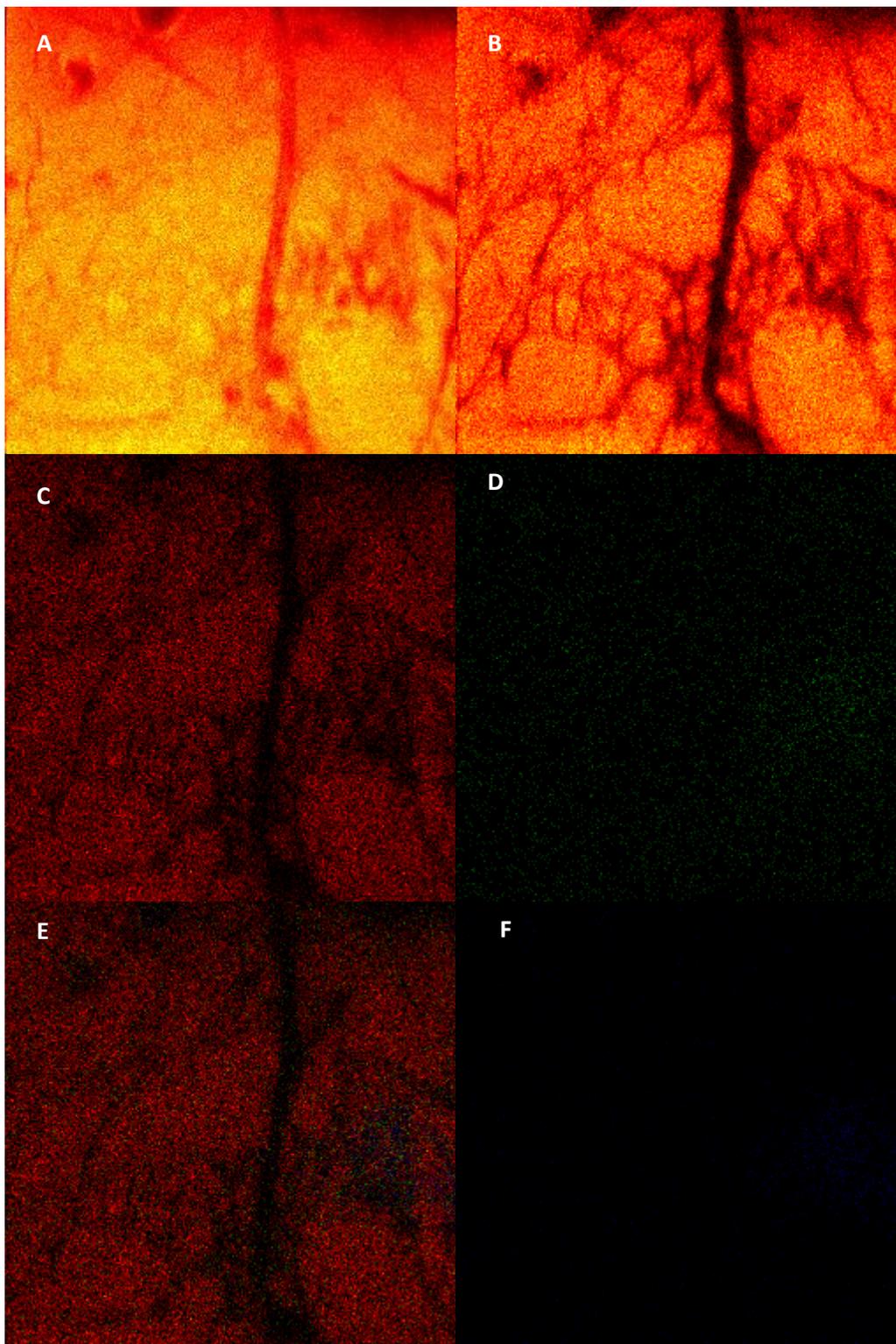


Figura 83. Imagem de ToF-SIMS de PHB 60' X E6. A) Ions totais. B) 69 m/z. C) 155 m/z. D) 215 m/z. E) 69+155+297 m/z. F) 297m/z.

A Figura 84 traz o espectro Tof-SIMS positivo da amostra de PSU ST submetidas a degradação da linhagem de CG97. Levando em conta a fragmentação do PSU sem tratamento (discutido na seção 4.1) pode-se ressaltar que após a degradação o espectro da PSU ST possui consideráveis diferenças. Analisando o intervalo de 10-100 m/z da Figura 84 pode-se observar que há um decréscimo dos fragmentos 41, 67, 77 e 91 m/z, que podem ser atribuídos aos íons, respectivamente, C_3H_5 , SO_2 , C_6H_5 e o íon tropílio. Fragmentos 43 e 44 m/z surgem no espectro e podem ser atribuídos a fragmentos nitrogenados como o C_2H_3N . Do mesmo modo surgem fragmentos em 18, 69, 70, e 86 m/z. Estes fragmentos podem corresponder a H_2O , C_5H_9 , e também possivelmente a fragmentos nitrogenados. Pode-se observar aqui que a PSU não possui nitrogênio em sua estrutura química e o aparecimento de fragmentos nitrogenados pode indicar a presença de metabólitos oriundos da bioatividade do fungo.

No intervalo de 100-200 m/z (Figura 84) pode-se destacar a presença majoritária dos fragmentos não oxigenados já existentes no polímero como os fragmentos 105, 110, 115 e 128 m/z q. O fragmento 141 m/z que corresponde a um fragmento da PSU sem tratamento contendo enxofre parece sofrer um acréscimo em comparação com os outros fragmentos e as demais fragmentações quase se extinguem no espectro. Ainda pode-se destacar para intervalos de m/z maiores que 200 m/z que há uma fragmentação pobre, tendo destaque para 202, 225 e 244 m/z. Sabe-se com base na fragmentação da PSU ST não degradada que o fragmento 225 m/z corresponde ao fragmento de anéis aromáticos ligados aos grupos $CH_3CH_2CH_3$, mais uma vez demonstrando que a superfície do polímero após a degradação mostra-se pobre em fragmentos contendo grupos oxigenados, mesmo para o polímero sem tratamento. Ainda na Figura 84 os três fragmentos: 363, 377, e 396 m/z, podem ser assinalados como possíveis fragmentos de metabólitos gerados pelo fungo. Estes fragmentos não estão presentes no espectro original da PSU ST, e dado os fragmentos nitrogenados sua correspondência a possíveis fragmentos de proteínas é factível.

O espectro Tof-SIMS negativo para a PSU ST depois da degradação com a linhagem CG97 (Figura 85) mostrou acompanhar a mesma tendência mostrada no espectro positivo. Há um decréscimo de fragmentos contendo oxigênio em sua

estrutura como os fragmentos 17, 108, 110, 121, e 183 m/z. Os fragmentos 153 e 159 m/z tornam-se majoritários no intervalo de 100-200 m/z, estes fragmentos podem ser assinalados como fragmentos contendo nitrogênio. Ainda vale ressaltar que acima de 200 m/z, os fragmentos 215 e 241 m/z mantêm-se em mesma intensidade comparado ao espectro da PSU ST antes da degradação. Estes grupos correspondem a fragmentos que contêm anéis aromáticos ligados ao grupo SO₂. Os fragmentos 267, 281 e 294 m/z sofrem decréscimo e novamente podemos assinalá-los como fragmentos que possuem oxigênio em sua estrutura. Acima de 300m/z todos os fragmentos sofrem decréscimo em suas intensidades.

O espectro Tof-SIMS positivo de PSU 30 após a degradação do fungo da linhagem CG97 é apresentado na Figura 86. Novamente observa-se o decréscimo de intensidades do fragmentos 69, 77 e 91 m/z similar ao ocorrido com a amostras de PSU ST após a degradação. O fragmento 95 m/z que com os tratamentos havia acrescido sua intensidade, após a degradação sofre grande decréscimo. Do mesmo modo o fragmento 86 m/z. Como comportamento geral há o decréscimo da intensidade de fragmentos referentes ao tratamento enquanto os fragmentos correspondentes a PSU sem tratamento começam a surgir no espectro ou aumentar sua intensidade aos fragmento já presentes no PSU 30. Na Figura 89 no intervalo de massa de 100-200 m/z, os fragmentos 103, 110 e 138 dominam o espectro. Esses fragmentos como mencionado anteriormente estão presentes em maior intensidade no PSU ST, e correspondem a fragmentos não oxigenados da molécula. Há ainda o aparecimento de fragmentos como 155, 175 e 184m/z que como no mesmo caso da PSU ST degradada sugerindo fragmentos de metabólitos resultantes do processo de degradação. O sinais da degradação da funcionalização são mais evidentes a maiores massas, onde fragmentos maiores que são somente visíveis na PSU ST começam a aparecer no espectro positivo do PSU 30. Na Figura 86 pode-se observar a dominância dos fragmentos 217, 238, 254, 261, 273, 275 e 295 m/z. Novamente os fragmentos 238, 254 e 295 m/z são originários do PSU ST. E ainda mais evidente no intervalo acima de 300m/z onde no polímero tratado não há presença de fragmentos, porém no espectro na Figura 86 podemos citar os fragmentos 311, 322, 341 e 354 m/z, facilmente identificáveis no espectro da PSU sem tratamento.

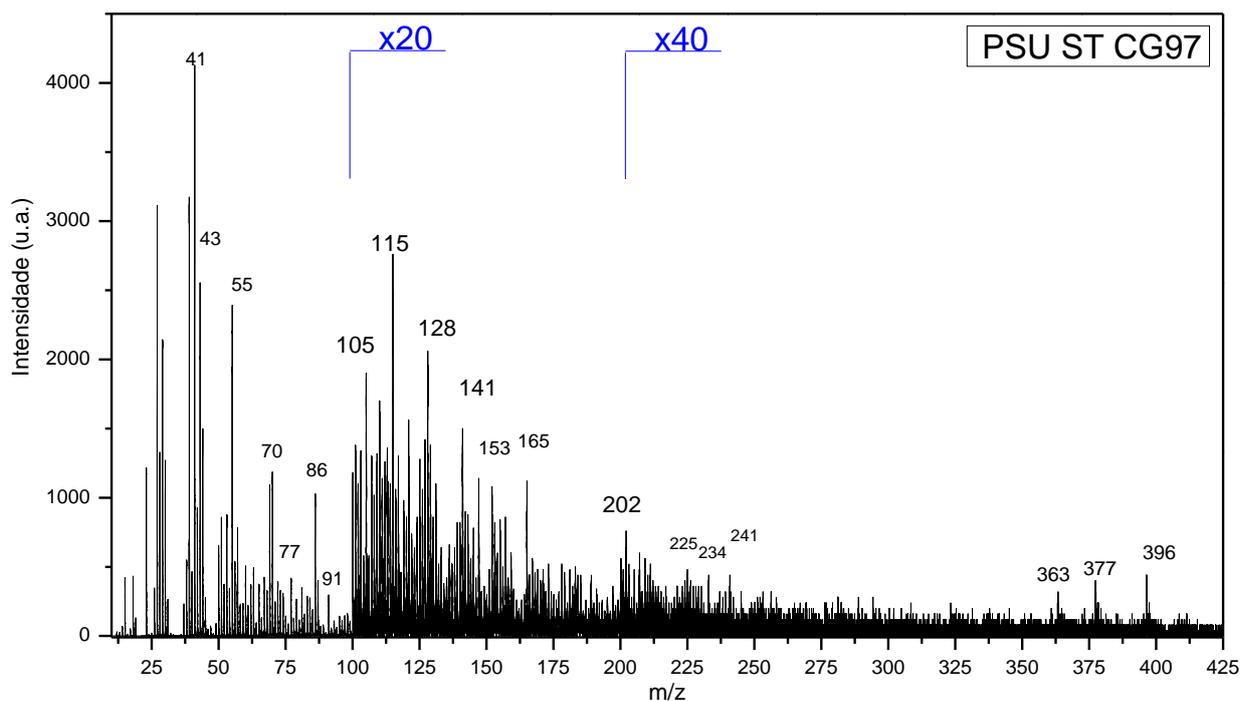


Figura 84. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PSU ST degradada por 30 dias pela linhagem CG97.

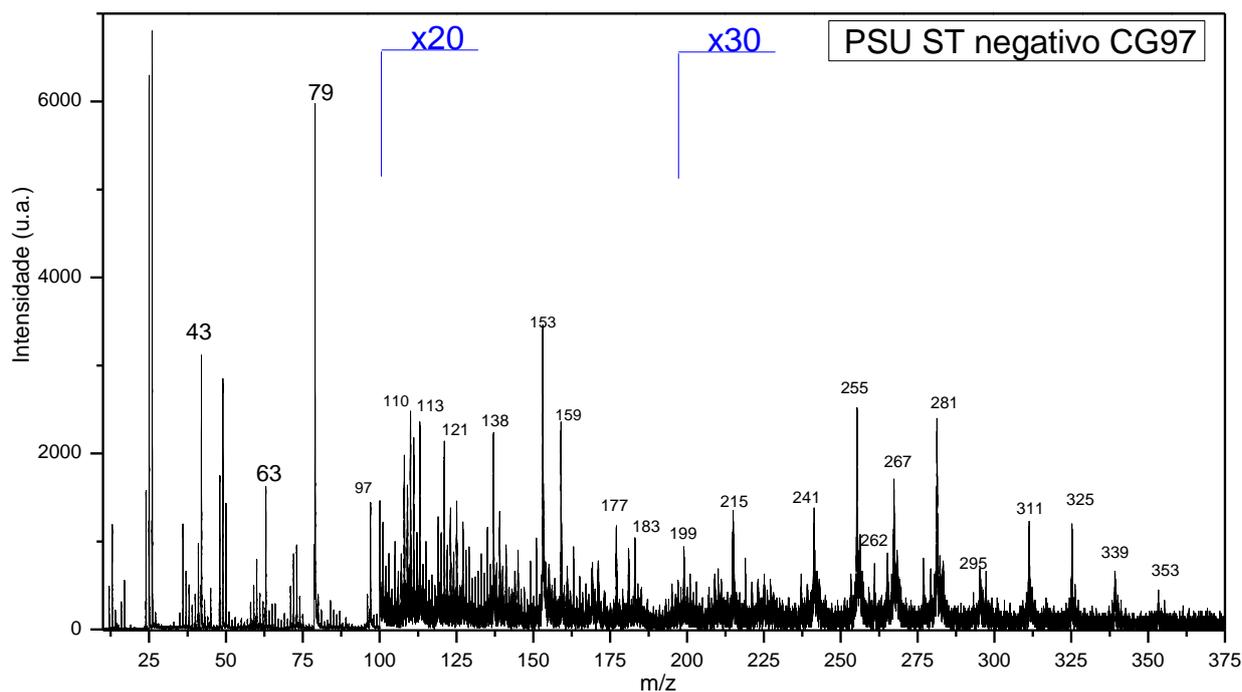


Figura 85. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PSU ST degradada por 30 dias pela linhagem CG97.

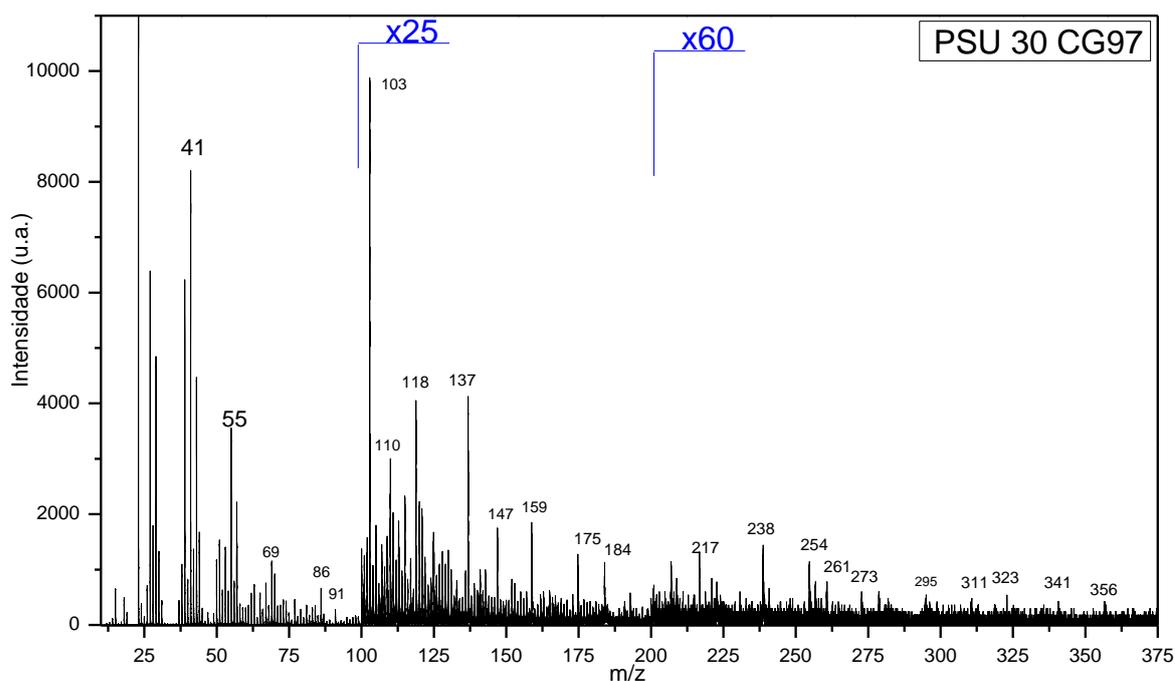


Figura 86. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PSU 30 degradada por 30 dias pela linhagem CG97.

O espectro Tof-SIMS negativo da amostra de PSU 30 após a degradação da linhagem CG97 (Figura 87) mostra a mesma tendência observada nos espectros positivos onde fragmentos de íons que são correspondentes a incorporação de oxigênio a superfície pelos tratamentos sofrem um decréscimo nas intensidades. Por exemplo os fragmentos em 17, 41, 49 e 84 m/z sofrem um grande decréscimo enquanto 42, 50, 63, 78 e 97 m/z aumentam de intensidade, sendo estes últimos característicos da PSU sem tratamento. O mesmo é observado para massas maiores onde os íons dominantes do espectro são do polímero não tratado, pode-se citar como exemplo os fragmentos 109, 121, 137, 145, 153, 197, 213, 221, 253, 265, 283, 314, 322, 338, 354 m/z que são característicos do PSU ST e aparecem como componentes majoritários no espectro Tof-SIMS negativo do PSU 30 após a degradação. Ainda pode-se ressaltar a presença de fragmentos observado anteriormente ao PSU ST que podem ser resultado da fragmentação de quitina ou outro metabólito do fungo, como os fragmentos 370, 387, e 394 m/z.

No espectro Tof-SIMS positivo das amostras de PSU 120 (Figura 88), praticamente todos os fragmentos da funcionalização decorrente do tratamento desaparecem do espectro, ficando com uma fragmentação muito próxima do polímero sem tratamento. Ainda é possível observar um *background* químico no

espectro, onde há várias fragmentações de menor intensidade se sobrepondo às fragmentações principais e isto se deve justamente a pela formação de fragmentos oriundos da própria degradação do fungo. Uma diferença importante no espectro mostrado na Figura 88 , é a ausência de fragmentos de PSU ST em massas superiores a 300m/z, onde há o aparecimento de fragmentos 362, 377 e 396, que como mencionado antes podem ser resultado de fragmentação de proteínas produzidas pelo fungo. No espectro Tof-SIMS negativo da amostra degradada para PSU 120 (Figura 89), observamos a mesma tendência observada nas amostras de PSU 30 (Figura 86), onde novamente o espectro Tof-SIMS negativo da PSU sem tratamento praticamente compõe o espectro da PSU 120 degradada.

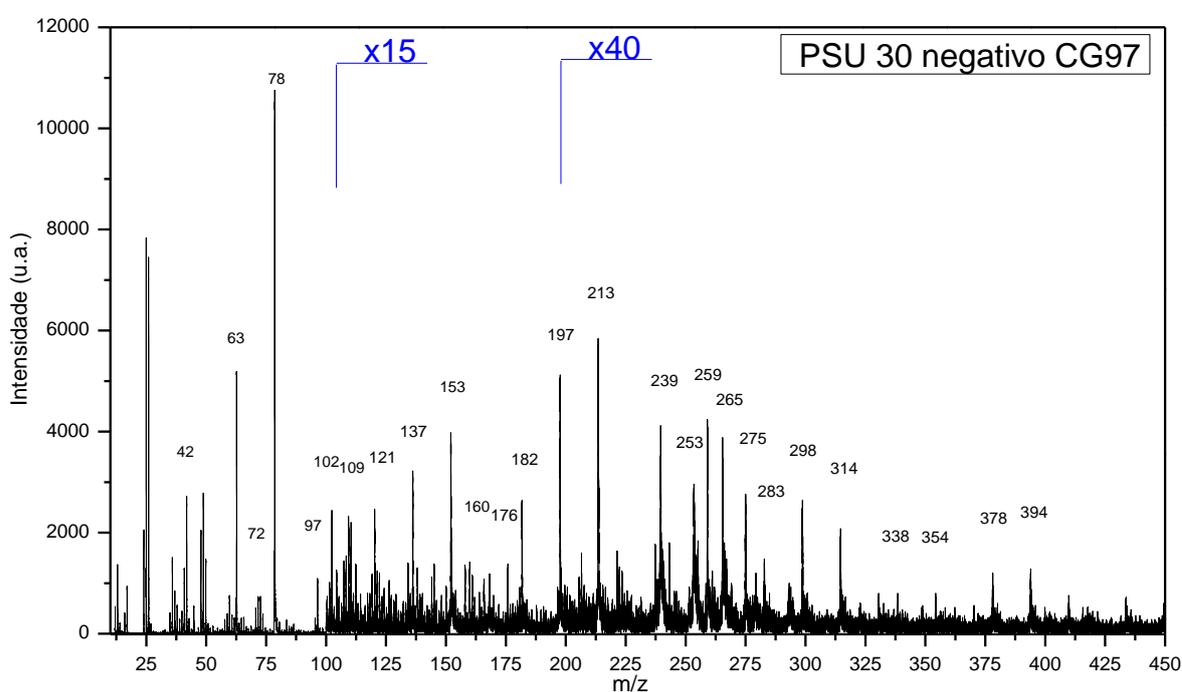


Figura 87. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PSU 30 degradada por 30 dias pela linhagem CG97.

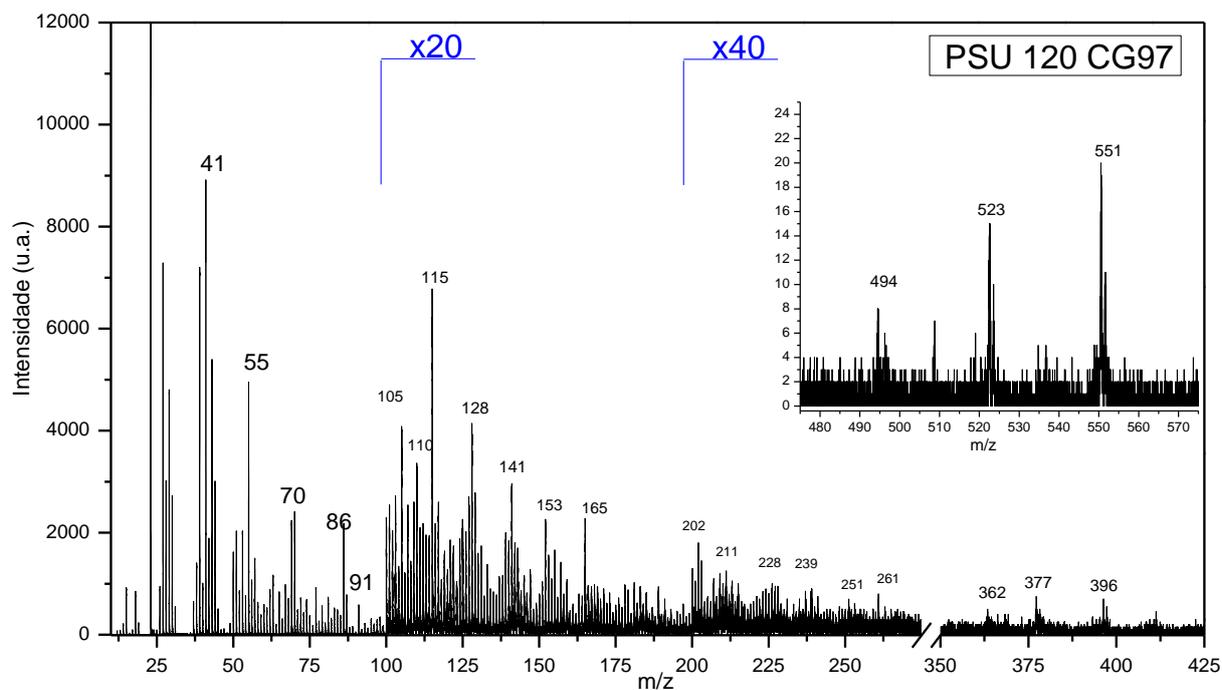


Figura 88. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PSU 120 degradada por 30 dias pela linhagem CG97.

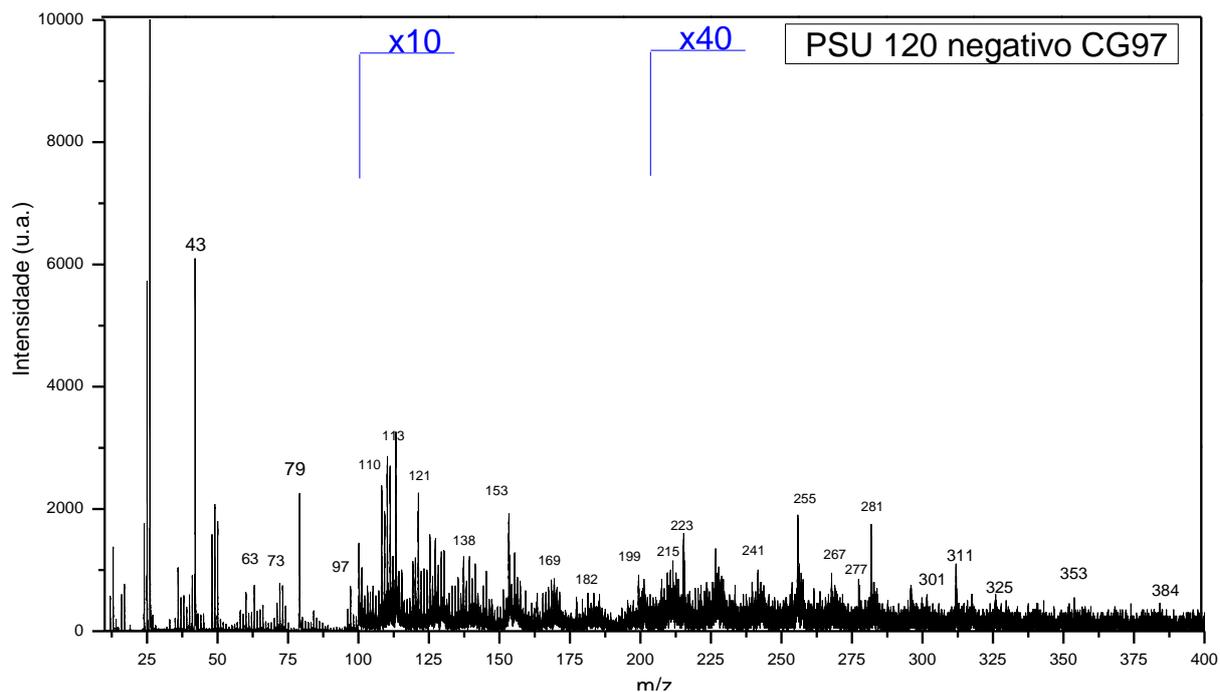


Figura 89. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PSU120 degradada por 30 dias pela linhagem CG97.

PSU x E6

Todos os espectros Tof-SIMS tanto no modo positivo, quanto negativo de todas as amostras de PSU cultivadas com a linhagem E6 não foram apresentados

aqui, porém vale ressaltar que em geral apresentaram as mesmas tendências observadas para as amostras de PSU cultivadas com a linhagem CG97. Em linhas gerais, para as amostras não tratadas de PSU após os cultivos há o decréscimo de intensidade de fragmentos que possuem oxigênio em sua estrutura e consequentemente os fragmentos não oxigenados tornam-se majoritários. Há o surgimento de fragmentos antes não encontrados na PSU ST, que pelo valor de m/z sugere-se que correspondam a fragmentos nitrogenados. Nas amostras tratadas de PSU 30 e PSU 120 o mesmo comportamento ocorre onde os fragmentos característicos dos tratamentos começam a decrescer em intensidade enquanto os fragmentos característicos do polímeros sem tratamento começam a se intensificar. Juntamente é claro com os possíveis grupos nitrogenados também presentes após a degradação da PSU ST.

Uma importante diferença no tipo de superfície formada após a degradação da linhagem E6, em comparação com a linhagem CG97, é o aparecimento de grupos de valor de m/z mais alto, como os fragmentos positivos: 443, 494, 522 e 550 m/z no para PSU ST; 405, 421, e 447 m/z para PSU 30; e 428, 527, 542 e 555 m/z para PSU 120. Esses fragmentos positivos não se encaixam em nenhuma fragmentação do PSU ou dimerização, e pode-se especular que assim como os fragmentos encontrados para a linhagem CG97 sejam metabólitos resultantes do processo de biodegradação, estes metabólitos poderiam ser específicos de cada linhagem de fungo sendo diferenciados para as duas linhagens testadas.

PU x CG97 e E6

Para a análise de PU podemos assumir como marcadores de degradação os fragmentos que contém oxigênio, pois com visto no caso do PHB e PSU, quando o fungo ataca estes fragmentos normalmente há a remoção do oxigênio. Para análise dos espectros de íons positivos do PU ST das linhagens CG97 e E6 (Figuras 90 e 91), os fragmentos 63, 71, 91, 103, 120, 133, 163 e 295 m/z foram selecionados. O decréscimo de intensidade destes fragmentos pode indicar sinal de degradação.

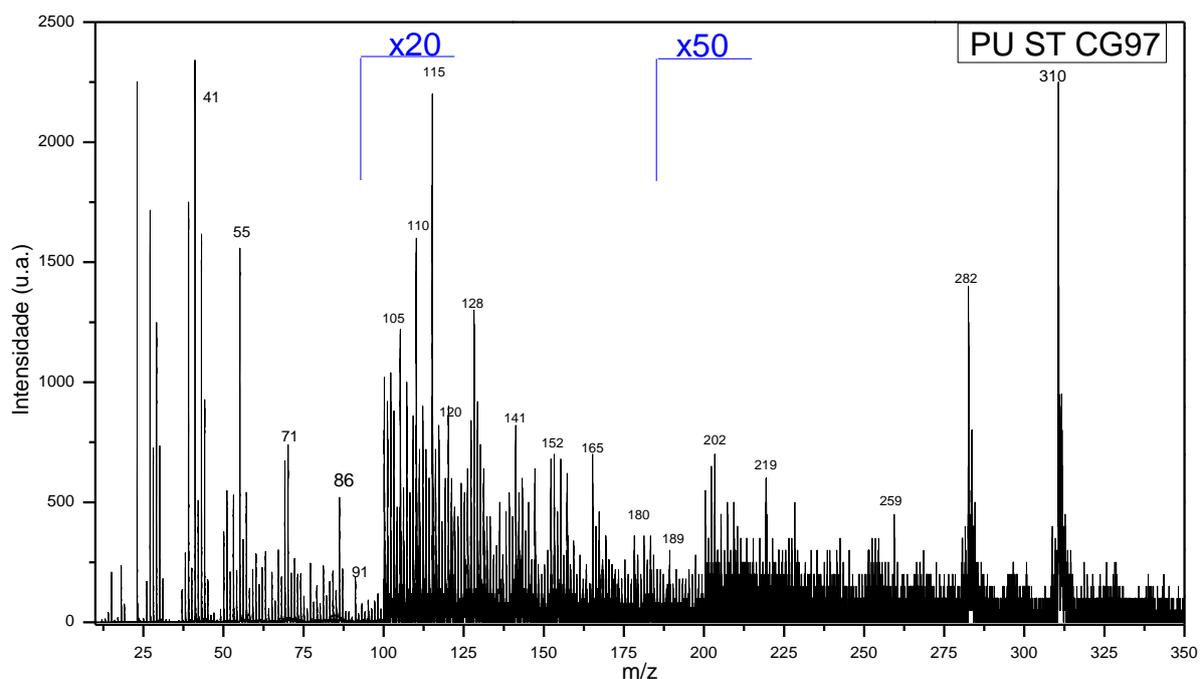


Figura 90. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PU ST incubada por 30 dias com a linhagem CG97.

A Figura 90 mostra o espectro de íons positivos da amostra de PU ST incubada por 30 dias com a linhagem CG97. Comparando este espectro com o espectro de íons positivos da amostra PU ST se pode afirmar com certeza que dos fragmentos indicadores de degradação, apenas o fragmento 133 m/z que sofre decréscimo significativo. Este dado é de extrema relevância pois confirma os dados de GPC, FTIR, e Gravimetria, onde não houve indicação evidente da degradação polimérica. Mesmo os dados de MEV e MO não apontam para um crescimento muito evidente em 30 dias. O mesmo é observado para PU ST quando incubada por 30 dias com a linhagem E6 (Figura 91). Somente o fragmento positivo 133 m/z sofre decréscimo efetivo. Não há um decréscimo efetivo de fragmentos que possuam oxigênio em sua estrutura para PU ST. Isto indica que não há biodegradação efetiva para PU ST.

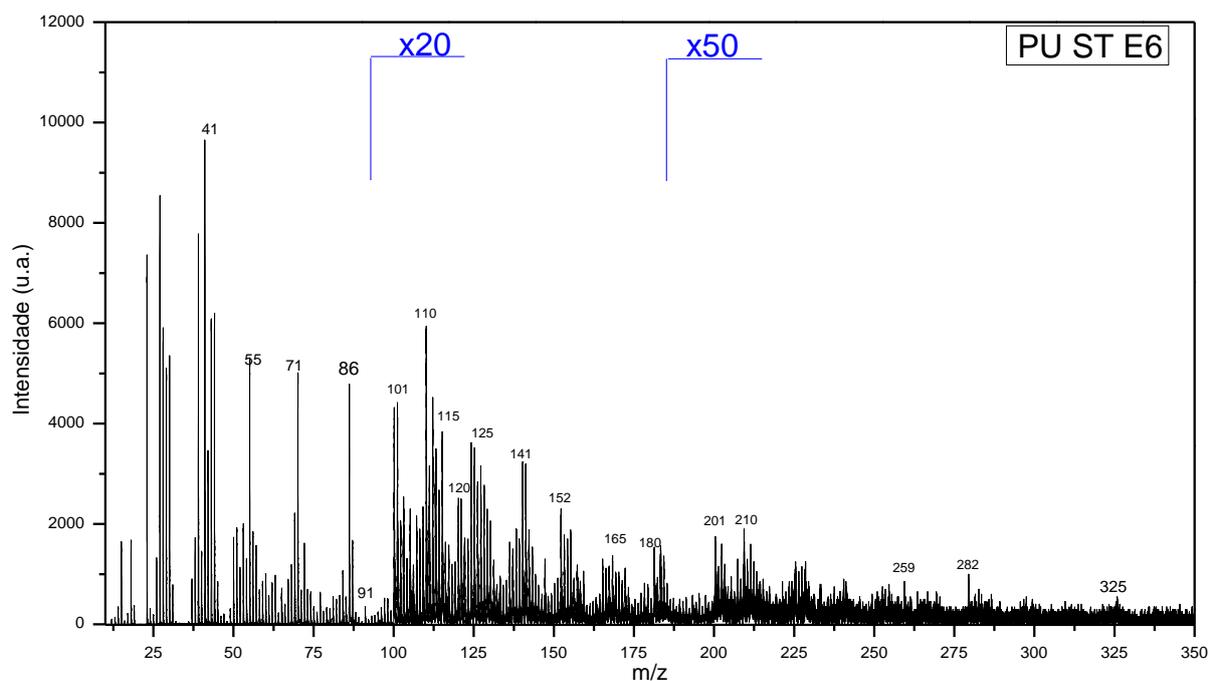


Figura 91. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PU ST incubada por 30 dias com a linhagem E6.

Para análise dos espectros de íons negativos do PU ST das linhagens CG97 e E6 (Figuras 92 e 93), os fragmentos 60, 72, 73, 90, 98, 121, 195, 206, e 221 m/z foram selecionados. O decréscimo de intensidade destes fragmentos pode indicar sinal de degradação.

A Figura 92 mostra o espectro de íons negativos da amostra de PU ST incubada por 30 dias com a linhagem CG97. Comparando este espectro com o espectro de íons negativos da amostra PU ST. Os fragmentos dos que apresentaram um decréscimo foram 60, 73, 121, 195 m/z, embora apresente certa redução, esta redução não é tão evidente quanto nos outros polímeros. Para a amostra cultivada com a linhagem E6, o espectro de íons negativo da Figura 93 mostra redução aparente nos fragmentos negativos 121, 195, 205, 221 m/z.

Os fragmentos 112, 127, 137 e 255 m/z, não são atribuídos a fragmentação da PU, e já foram identificados nos outros polímeros degradados, podendo ser algum resíduo metabólico da ação do microrganismo. Os fragmentos 311, 325, 339 e 353 m/z embora também presentes no espectro de íons negativo da PU ST e corresponderem à fragmentação da mesma, também aparecem com mesmas intensidades em alguns casos nos espectros dos outros polímeros degradados, ficando um incerteza na interpretação destes fragmentos.

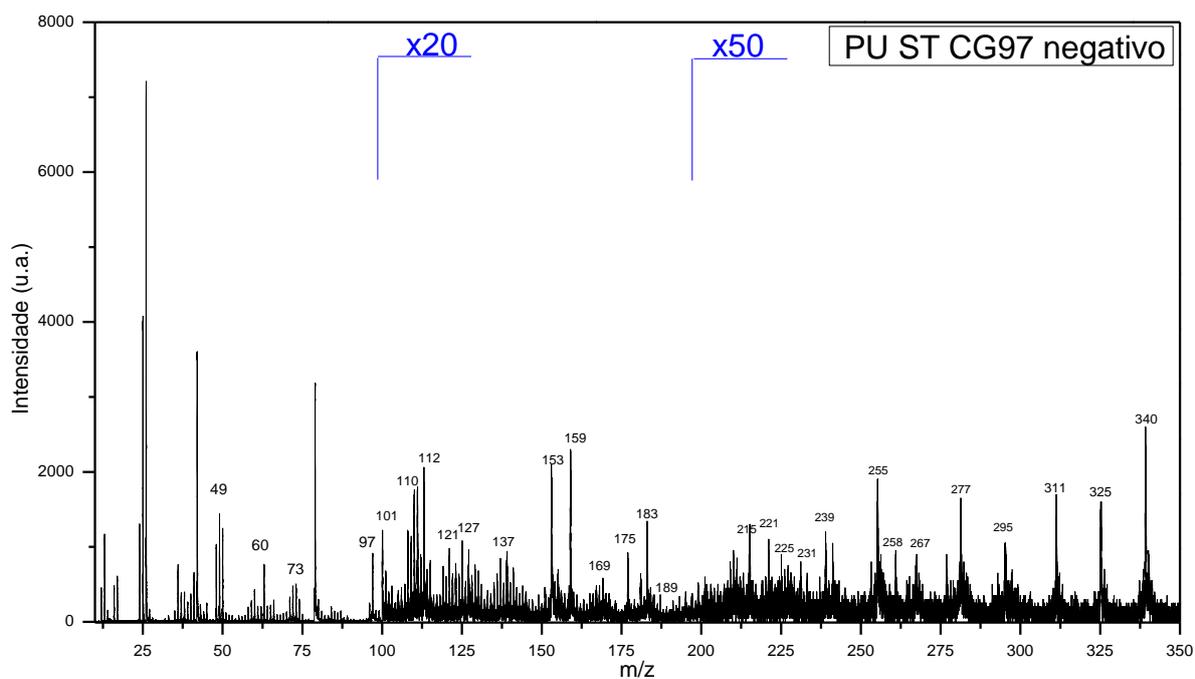


Figura 92. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PU ST incubada por 30 dias com a linhagem CG97.

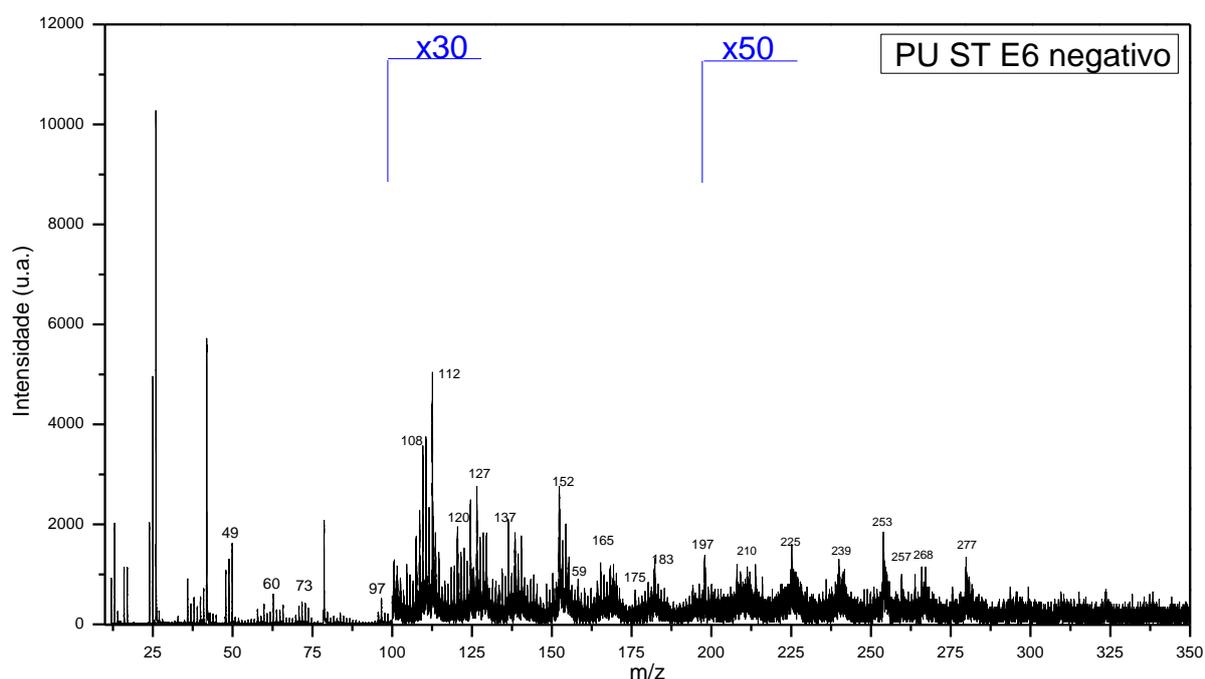


Figura 93. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PU ST incubada por 30 dias com a linhagem E6.

Do mesmo modo que antes podemos atribuir alguns fragmentos marcadores que facilitam a análise dos espectros de massa para as amostras de PU tratadas com radiação UV em presença de O₂. Para a análises dos espectros de íons

positivos das amostras de PU 30 e PU 120 (Figuras 94 e 95, 98 e 99) podemos observar se há decréscimo nos seguintes fragmentos positivos: 87, 91, 120, 146, 175, 282 e 301 m/z. Estes fragmentos correspondem às funcionalizações da molécula como foi discutido anteriormente.

A Figura 94 traz o espectro de íons positivos da amostra de PU 30 incubada por 30 dias com a linhagem CG97. Novamente apenas os fragmentos 63, 72 e 301 m/z sofrem um decréscimo aparente.

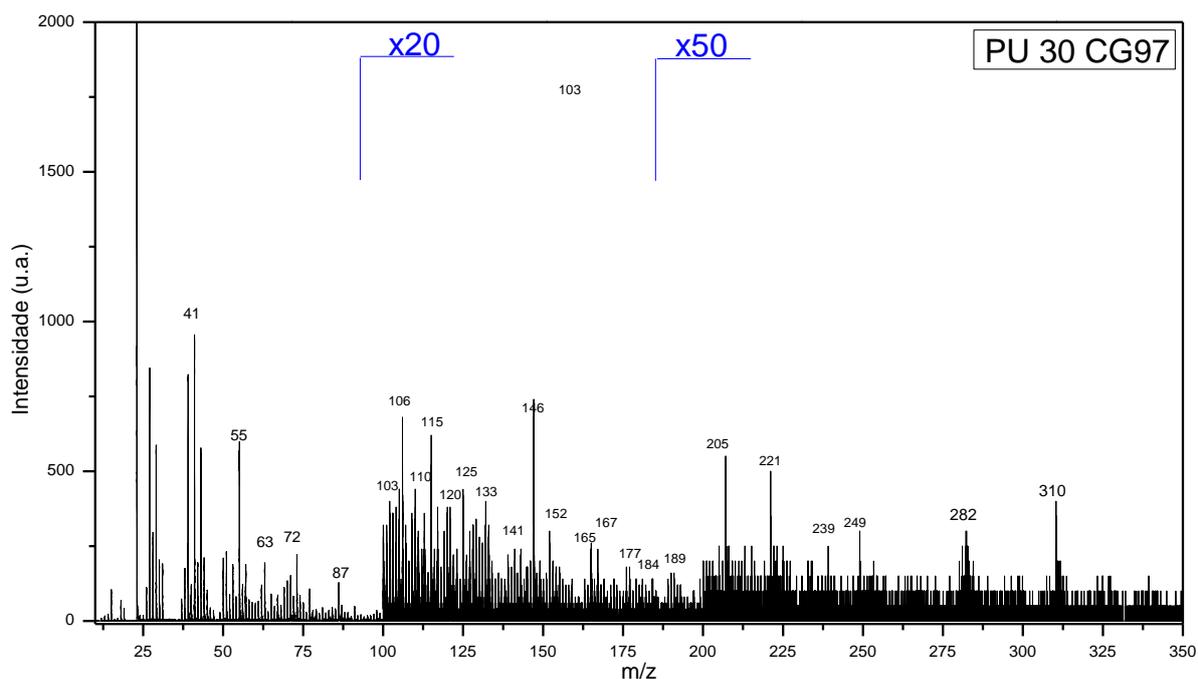


Figura 94. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PU 30 incubada por 30 dias com a linhagem CG97.

Na Figura 95 é apresentado o espectro de íons positivos da amostra de PU 30 incubada por 30 dias com a linhagem E6. Neste espectro, apenas os fragmentos acima de 200 m/z não apresentam-se no espectro, sendo que isto também pode estar correlacionado com a baixa intensidade do sinal de aquisição.

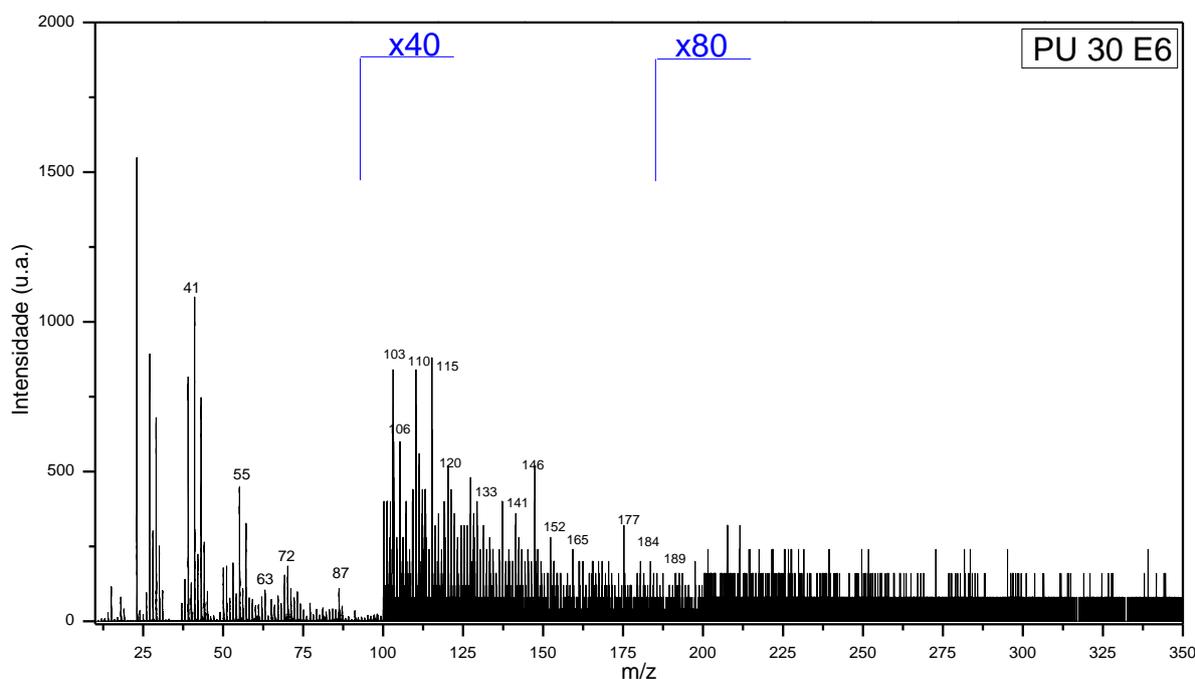


Figura 95. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PU 30 incubada por 30 dias com a linhagem CG97.

Para a interpretação dos espectros de íons negativos das amostras de PU 30 e PU 120 (figuras 96 e 97, 100 e 101) podemos assumir os seguintes fragmentos marcadores: 60, 73, 90, 210, 253 e 362 m/z. Como podemos observar na Figura 96, o espectro negativo para a amostra de PU 30 incubada por 30 dias com a linhagem CG97. Com exceção do fragmento 73 e 90 m/z, não pode-se afirmar que os demais fragmentos sofrem redução significativa, principalmente pelo grande intensidade dos fragmentos que não pertencem ao polímero, sendo resíduos da atividade do fungo, há uma falsa impressão de redução. Para a amostra de PU 30 incubada por 30 dias com a linhagem E6, o espectro de íons negativos é apresentado na Figura 97 e podemos observar em comparação ao espectro de íons negativos da PU30 não degradada que apenas os fragmentos 73, 90 e 210 m/z sofrem redução. Há a presença de outras fragmentações que são originais da PU ST e também da PU 30, porém não evidentes sinais de redução de fragmentos oxigenados que indicariam a degradação da cadeia. Além disso os fragmentos aromáticos permanecem quase inalterados, o que sugere que mesmo que ocorra uma primeira abstração de oxigênio por parte do fungo da superfície, o processo metabólico não tem continuidade.

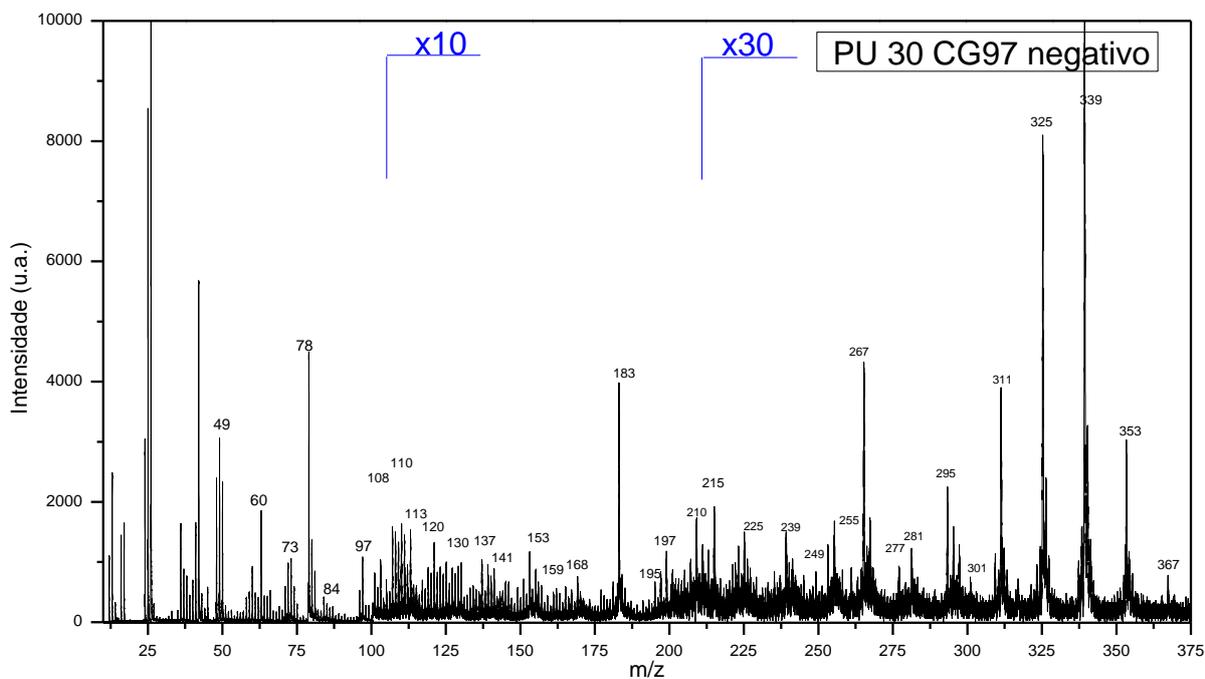


Figura 96. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PU 30 incubada por 30 dias com a linhagem CG97.

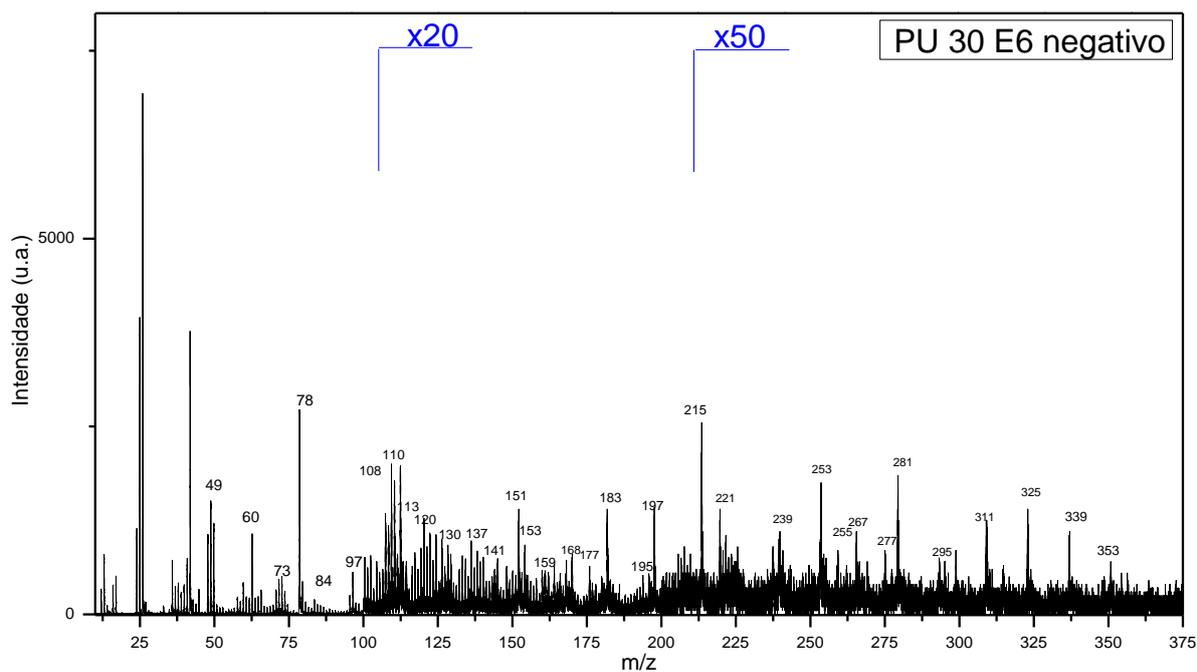


Figura 97. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PU 30 incubada por 30 dias com a linhagem E6.

As Figuras 98 e 99 trazem os espectros positivos das amostras de PU120 incubadas com as linhagens CG97 e E6 durante 30 dias. Podemos empregar o mesmo procedimento de análise para estes espectros que aplicado para a PU 30, porém dada a característica de funcionalização diferenciada podemos assumir

também como fragmentos passíveis de degradação, os fragmentos oxigenados da PU ST. Isto se justifica pela possibilidade de quebra de cadeia polimérica induzida pelo tratamento. Para a comparação com o espectro não degradado da PU120 podemos assumir os seguintes fragmentos positivos como passíveis de sofrer decréscimo pelo processo de biodegradação: 63, 72, 87, 91, 103, 120, 133, 146, 163, 177, 282, 295 e 301 m/z.

Observando a Figura 98, podemos dizer que aqui o comportamento da amostra de PU120 é totalmente diferente da PU 30. Os fragmentos 63, 72, e 87 m/z sofrem um grande decréscimo, 103 m/z altera-se significativamente e os fragmentos 120, 133 m/z quase desaparecem do espectro. 146 e 177 m/z também decrescem em intensidade. Os Fragmentos 282, 295 e 301 m/z aparecem no espectro, juntamente com fragmentos de grupos aromáticos da PU ST mostrando que a superfície funcionalizada pelos tratamentos provavelmente foi consumida no processo. Se pode afirmar o mesmo para amostras de PU120 incubadas com a linhagem E6 por 30 dias, onde no espectro de íons positivos (Figura 99) há o decréscimo expressivo dos fragmentos 63, 72, 87, 103, 133, 146 e 177 m/z, porém sem o aparecimento de fragmentos característicos da PU ST.

As Figuras 100 e 101 trazem os espectros negativos das amostras de PU120 incubadas com as linhagens CG97 e E6 durante 30 dias. Para a comparação com o espectro de íons negativos não degradado da PU120 podemos assumir os seguintes fragmentos negativos como passíveis de sofrerem decréscimo pelo processo de biodegradação: 60, 73, 87, 90, 98, 120, 195, 206, 210, 215, 221 e 253 m/z.

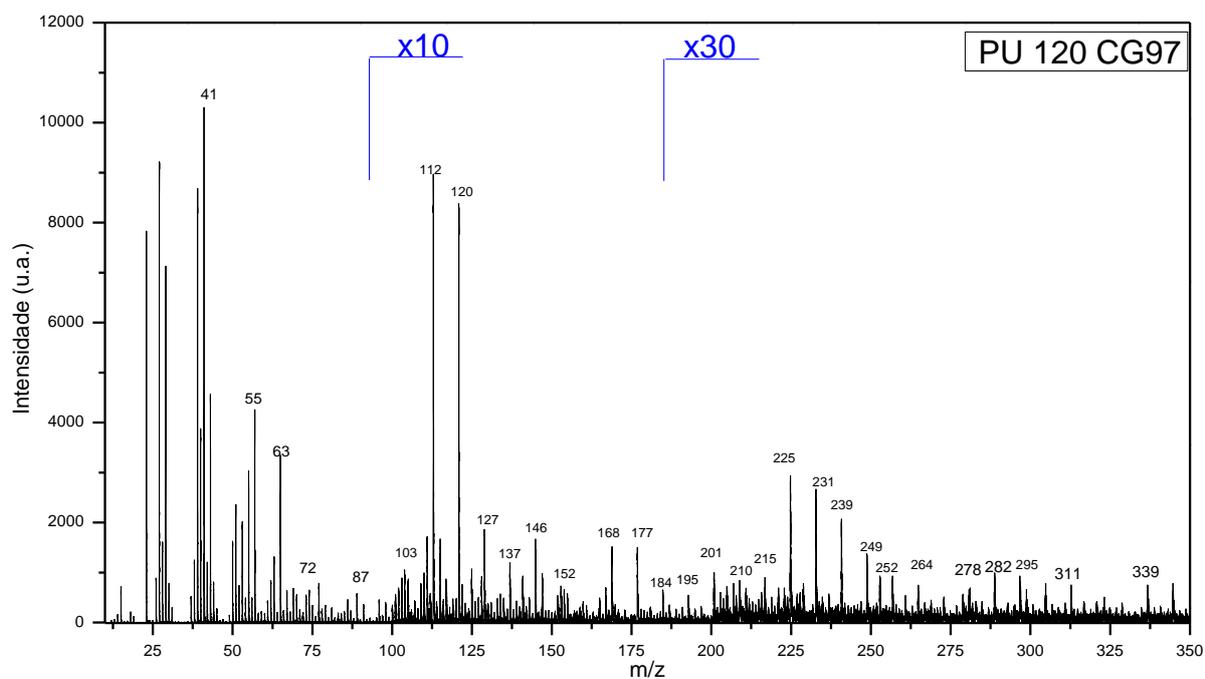


Figura 98. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PU120 incubada por 30 dias com a linhagem CG97.

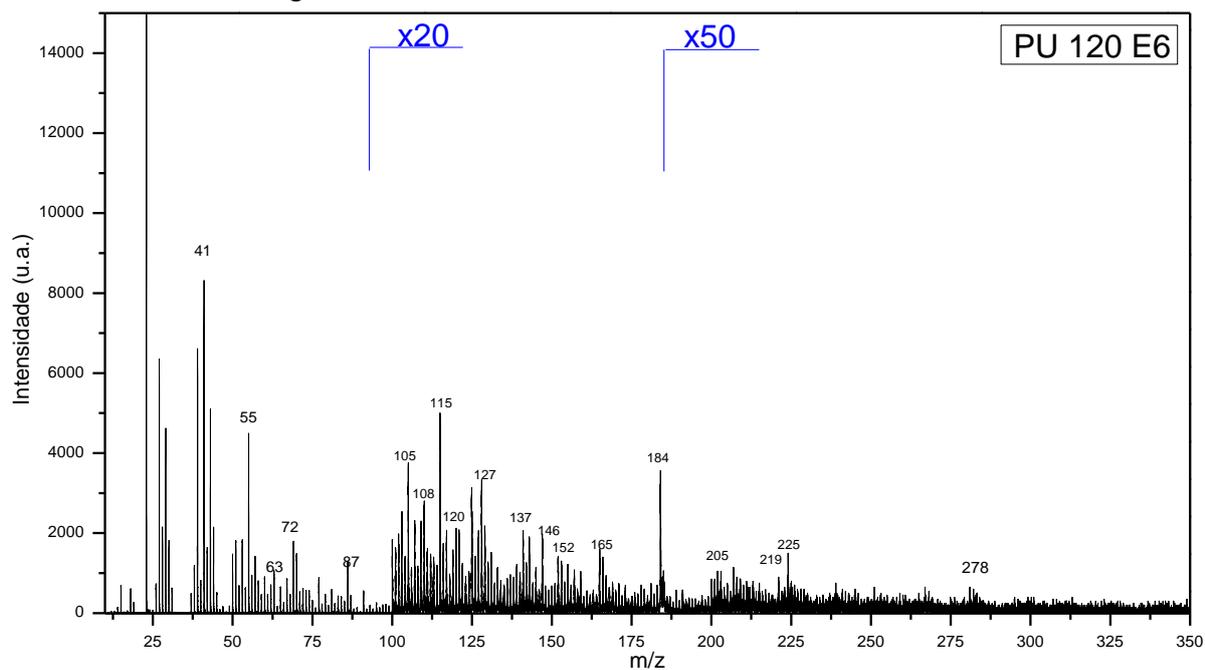


Figura 99. Espectro Tof-SIMS (modo positivo) da amostra de PU120 incubada por 30 dias com a linhagem E6.

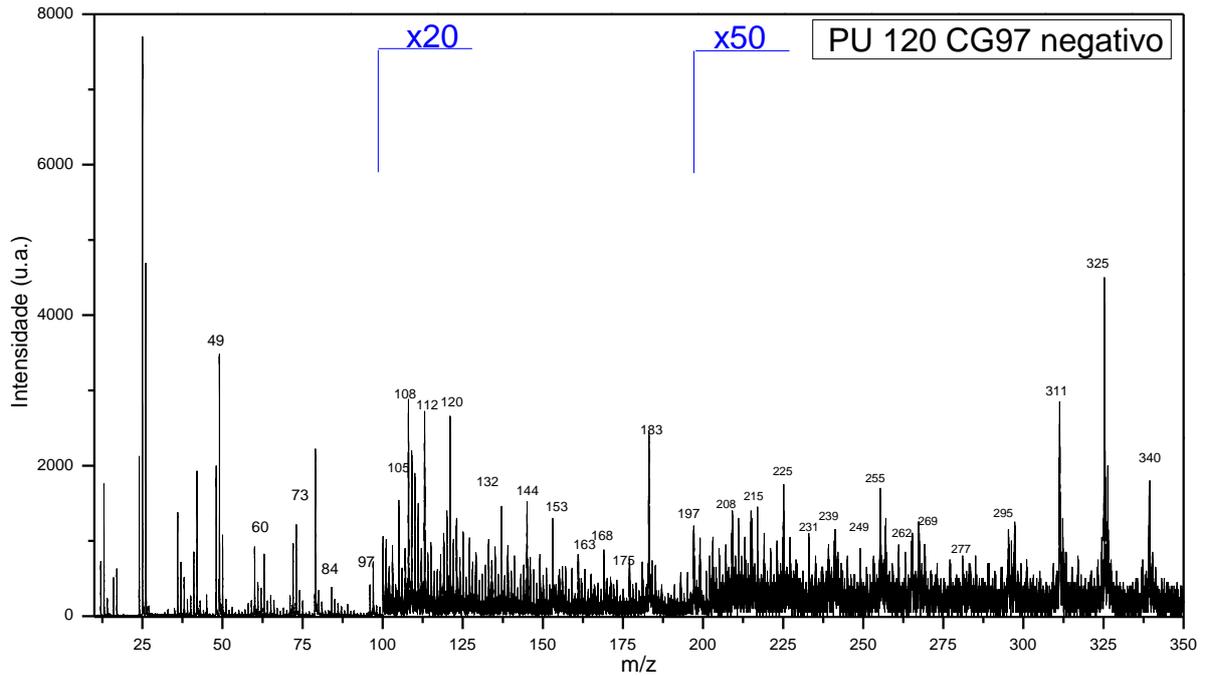


Figura 100. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PU120 incubada por 30 dias com a linhagem CG97.

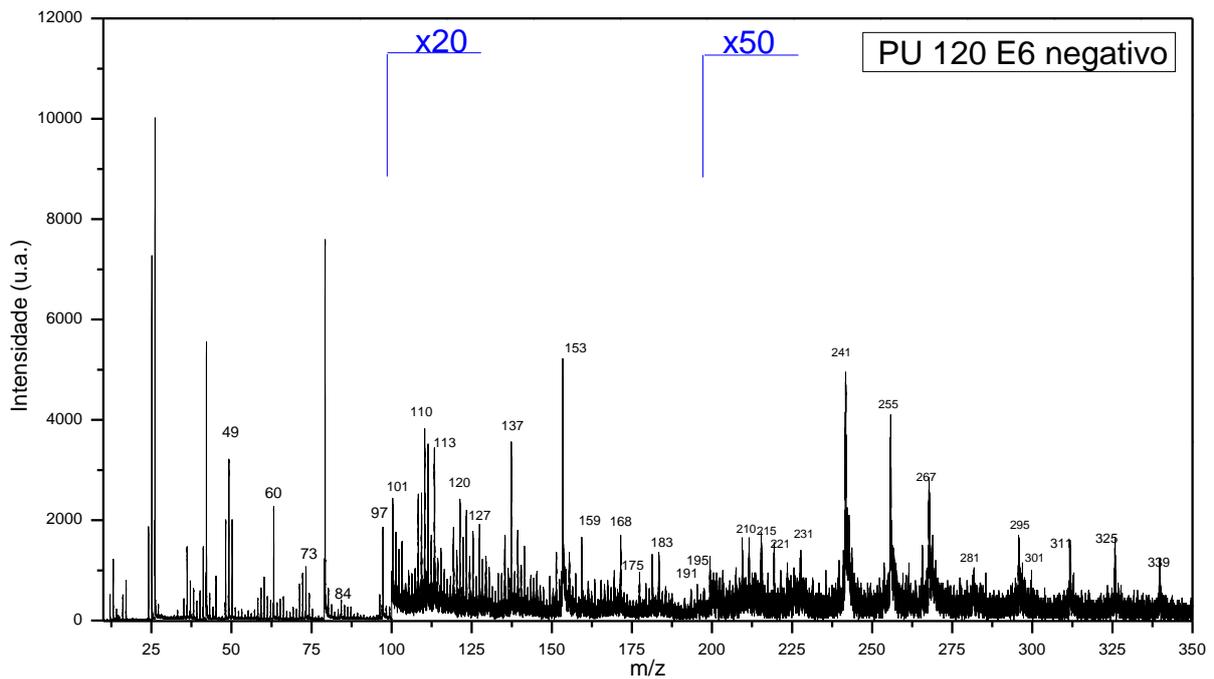


Figura 101. Espectro Tof-SIMS (modo negativo) da amostra de PU120 incubada por 30 dias com a linhagem E6.

Confirmando o que se verificou nos espectros de íons positivos da PU120 degradada, no espectro de íons negativo da PU120 incubada por 30 dias com a linhagem CG97 na Figura 100, podemos observar o decréscimo dos fragmentos

120, 195, 206, 215, 221 e 253 m/z. Ainda se pode observar nesse espectro a presença dos fragmentos discutidos anteriormente, que podem ser remanescentes de material deixado pelo fungo, e que se sobrepõe à fragmentação encontrada nos espectros de íons negativos da PU ST, como por exemplo os fragmentos 311, 325 e 340 m/z. A mesma tendência é observada no espectro de íons negativos da amostra de PU120 incubada por 30 dias com a linhagem E6 onde há significativa redução dos fragmentos negativos 73, 84, 120, 195, 206, 210 e 253 m/z.

Os resultados encontrados pelos dados da análise Tof-SIMS, além de extremamente importantes para o desenvolvimento do trabalho, confirmam os resultados das demais análises dos testes de biodegradação. Em suma podemos dizer que encontramos evidências de redução de fragmentos oxigenados apenas para as amostras de PU120, incubadas com ambas as linhagens. Nas análises de MEV, encontramos alguns sinais de biodegradação do filme polimérico e um maior crescimento de hifas nas amostras de PU120, também visualizados nas imagens de MO. Na análise gravimétrica, a amostra de PU120, é a amostra que apresenta maior alteração de massa e observando os dados de GPC, e também a maior alteração de PDI.

As análises de Tof-SIMS mostraram tanto para as amostras de PHB sem tratamento quanto para amostras de PHB tratadas com radiação UV em presença de O₂ para ambas as linhagens utilizadas que houve uma degradação significativa, principalmente baseada nas diferenças de fragmentação observadas em espectros negativos e positivos, comparando os espectros das amostras não tratadas e tratadas com espectros das amostras tratadas e não tratadas submetidas a degradação. O mesmo é válido para todas as amostras de PSU analisadas.

Os dados encontrados pela técnica Tof-SIMS concordam com as demais técnicas utilizadas para a caracterização das superfícies antes e após os tratamentos. A técnica também foi importante para definir com precisão os grupos presentes na superfície dos polímeros tratados e também estimar-se os mecanismos fotoquímicos envolvido no processo de obtenção de superfícies funcionalizadas com radiação UV.

6. Conclusões

Neste trabalho, filmes de PHB, PSU e PU foram caracterizados e funcionalizados com radiação UV em presença de uma atmosfera reativa (O_2). As superfícies obtidas foram caracterizadas por diversas técnicas de análise de superfícies. Após os tratamentos, foram detectados novos ambientes químicos sobre a superfície de polímeros. A atmosfera oxidante suprimiu reações de fotodegradação durante tratamentos, resultando em enxerto de oxigênio nas cadeias de polímeros através da oxidação dos radicais formados. Através dos dados de análises espectroscópicas e espectrométricas foi possível confirmar as reações fotoquímicas responsáveis pela modificação da química superficial dos polímeros. Reações dos Norrish Tipo I e II, e, reações abstração de hidrogênio foram as responsáveis pela formação de radicais na superfície dos polímeros tratados. Para os filmes de PU observou-se a reação Photo-Fries nos filmes tratados. A presença de O_2 durante os tratamentos possibilitou a enxertia de oxigênio nas cadeias poliméricas, principalmente nos tempos mais curtos de irradiação (30 e 60 min) enquanto para tempos mais longos é observado a clivagem na cadeia polimérica (120 e 180 min) para todos os polímeros.

A influência da fotofuncionalização superficial na resposta celular através de testes de adesão e viabilidade celular *in vitro* com células tronco mezenquimais foi avaliada. Os testes revelaram que a técnica é eficiente para aumentar a biocompatibilidade dos materiais estudados, e que algumas superfícies com grupos químicos específicos se sobressaem mais que outras. Todos os filmes tratados mostraram um maior número de células tronco mesenquimais aderidas em comparação com os filmes não tratados e o número de células aderidas foi comparável com o número de células aderidas no grupo de controle. Nos ensaios de viabilidade celular parece haver uma tendência de melhor crescimento celular para filmes de média hidrofiliabilidade, enquanto para a adesão celular, as superfícies mais hidrofílicas foram melhores. Os resultados demonstraram que a resposta de células não depende apenas da hidrofiliabilidade, mas também das alterações na química da superfície, que ocorrem como resultado do tratamento com radiação UV na presença de oxigênio. Em suma, superfícies que apresentam maior concentração de grupos C=O, NH_2 , C-O, e OH na superfície demonstram-se com melhor viabilidade *in vitro*. Estes resultados são muito importantes uma vez que a metodologia utilizada

permite adequar a química superficial de modo seletivo, encontrando a configuração melhor para cada tipo de célula.

Em outra via do estudo, empregando um microrganismo de grande potencial biodegradador (*Metharizhum anisopliae*), juntamente com a adequação da superfície para estimular o crescimento do mesmo, foi possível acelerar tempo de biodegradação das amostras testadas. Pode-se observar um grande crescimento de massa fúngica para os filmes de PHB tratados e não tratados, enquanto para PSU e PU tratados o crescimento mostrou-se menor em 30 e 60 dias de degradação se comparado ao PHB, porém sendo possível observar marcas de degradação na superfície dos filmes. As análises gravimétricas embora não apresentam um comportamento linear, os dados mostram uma tendência de modificação das massas das amostras tratadas, mas interferências características de amostras submetidas à degradação não permitem uma comparação quantitativa definitiva.

As análises de FTIR-ATR mostraram que o fungo causa mudanças químicas na superfície das amostras, principalmente quanto ao tratamento das amostras, em que as bandas tendem a desaparecer após as incubações. Os dados de GPC também mostram decréscimo da massa molecular média dos polímeros, mais significativos nos filmes de PHB tratados. Para PSU e PU, os filmes tratados por 120 min mostraram o decréscimo na massa molecular média, juntamente com o acréscimo do índice de polidispersividade. Os dados de ToF-SIMS mostraram correlação com as outras técnicas de análise e confirmaram a degradação das superfícies de PHB por meio do decréscimo de fragmentos de massa oxigenados na superfície das amostras. O mesmo foi encontrado para as amostras de PSU, em maior grau nas amostras tratadas. A análise das amostras de PU revelaram que apenas na amostra tratada por 120 min, há sinais de decréscimo dos fragmentos oxigenados na superfície da amostra, porém os fragmentos do seguimento rígido da molécula de PU não sofrem grande influência. Ainda é possível identificar no espectro de massa que há a presença de fragmentos de massas que poderiam ser resíduos de metabólicos do fungo. O inchamento da matriz por ação destas substâncias secretadas pelo fungo poderiam ser a causa das não linearidades dos dados de gravimetria. A fotofuncionalização superficial polimérica mostrou-se como um método simples, eficiente e de baixo custo para as ambas possíveis aplicações estudadas.

7. Referências

1. J. Pelletier and A. Anders *Plasma Science, IEEE Transactions on*, 2005, **33**, 1944-1959.
2. C. M. Alves, Y. Yang, D. L. Carnes, J. L. Ong, V. L. Sylvia, D. D. Dean, C. M. Agrawal and R. L. Reis *Biomaterials*, 2007, **28**, 307-315.
3. F. Awaja, M. Gilbert, G. Kelly, B. Fox and P. J. Pigram *Progress in Polymer Science*, 2009, **34**, 948-968.
4. A. Bhattacharya and B. N. Misra *Progress in Polymer Science*, 2004, **29**, 767-814.
5. A. Airoudj, G. Schrodj, M.-F. Vallat, P. Fioux and V. Roucoules *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 2011, **31**, 498-506.
6. J. Balart, V. Fombuena, J. M. España, L. Sánchez-Nácher and R. Balart *Materials & Design*, 2012, **33**, 1-10.
7. R. Schubert, T. Scherzer, M. Hinkefuss, B. Marquardt, J. Vogel and M. R. Buchmeiser *Surface and Coatings Technology*, 2009, **203**, 1844-1849.
8. E. J. Park, G. T. Carroll, N. J. Turro and J. T. Koberstein *Soft Matter*, 2009, **5**, 36-50.
9. D. He, H. Susanto and M. Ulbricht *Progress in Polymer Science*, 2009, **34**, 62-98.
10. R. Rajajeyaganthan, F. Kessler, P. H. de Mour Leal, S. Kühn and D. E. Weibel *Macromolecular Symposia*, 2011, **299-300**, 175-182.
11. D. E. Weibel, A. F. Michels, F. Horowitz, R. da Silva Cavalheiro and G. V. da Silva Mota *Thin Solid Films*, 2009, **517**, 5489-5495.
12. M. Dhayal, M. R. Alexander and J. W. Bradley *Applied Surface Science*, 2006, **252**, 7957-7963.
13. C. Huang, Y.-C. Chang and S.-Y. Wu *Thin Solid Films*, **518**, 3575-3580.
14. F. Truica-Marasescu, S. Pham and M. R. Wertheimer *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 2007, **265**, 31-36.
15. F. Kessler, Mota, G.V.S., and Weibel, D. E. or Weibel, D. Activity Report of Brazilian Synchrotron Light Laboratory, 2008.
16. F. Kessler, S. Kühn, C. Radtke and D. E. Weibel *Polymer International*, 2013, **62**, 310-318.
17. D. E. Weibel, F. Kessler and G. V. da Silva Mota *Polymer Chemistry*, 2010, **1**, 645-649.
18. F. Kessler. Funcionalização superficial de materiais poliméricos induzida por radiação eletromagnética em presença de gases e vapores reativos. Dissertation, PPGQ-UFRGS, 2010.
19. H. Chen, L. Yuan, W. Song, Z. Wu and D. Li *Progress in Polymer Science*, 2008, **33**, 1059-1087.
20. J. Deng, L. Wang, L. Liu and W. Yang *Progress in Polymer Science*, 2009, **34**, 156-193.
21. N. Nady, M. C. R. Franssen, H. Zuilhof, M. S. M. Eldin, R. Boom and K. Schroën *Desalination*, 2011, **275**, 1-9.
22. D. Briggs, D. G. Rance, C. R. Kendall and A. R. Blythe *Polymer*, 1980, **21**, 895-900.
23. S. A. Voronin, M. R. Alexander and J. W. Bradley *Surface and Coatings Technology*, 2006, **201**, 768-775.
24. H.-S. Choi, Y.-S. Kim, Y. Zhang, S. Tang, S.-W. Myung and B.-C. Shin *Surface and Coatings Technology*, 2004, **182**, 55-64.
25. T. Jacobs, H. Declercq, N. De Geyter, R. Cornelissen, P. Dubruel, C. Leys, A. Beaurain, E. Payen and R. Morent *J Mater Sci Mater Med*, 2013, **24**, 469-78.
26. R. A. D'Sa, P. J. Dickinson, J. Raj, B. K. Pierscionek and B. J. Meenan *Soft Matter*, 2011, **7**, 608-617.
27. R. P. Gandhiraman*, C. Volcke, V. Gubala, C. Doyle, L. Basabe-Desmonts, C. Dotzler, M. F. Toney, M. Iacono, R. I. Nooney, S. Daniels, B. James and D. E. Williams *Journal of Materials Chemistry*, 2010, **20**, 4116-4127.
28. E. Gérard, E. Bessy, C. Salvagnini, V. Rerat, M. Momtaz, G. Hénard, P. Marmey, T. Verpoort and J. Marchand-Brynaert *Polymer*, 2011, **52**, 1223-1233.
29. H. M. S. Iqbal, S. Bhowmik and R. Benedictus *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 2010, **30**, 418-424.
30. E. R. Amstalden van Hove, D. F. Smith and R. M. A. Heeren *Journal of Chromatography A*, 2011, **1217**, 3946-3954.

31. C. M. Chan, T. M. Ko and H. Hiraoka *Surface Science Reports*, 1996, **24**, 1-54.
32. K. H. Chen, W. Wu, B. H. Chu, C. Y. Chang, J. Lin, S. J. Pearton, D. P. Norton and F. Ren *Applied Surface Science*, 2009, **256**, 183-186.
33. A. Kurella and N. B. Dahotre *Journal of Biomaterials Applications*, 2005, **20**, 5-50.
34. M. Ozdemir and H. Sadikoglu *Trends in Food Science & Technology*, 1998, **9**, 159-167.
35. S. Golczak, A. Kancierzewska, J. J. Langer and M. Fahlman *Polymer Degradation and Stability*, 2009, **94**, 350-354.
36. S. G. Hu, C. H. Jou and M. C. Yang *Journal of Applied Polymer Science*, 2003, **88**, 2797-2803.
37. J. Jaramillo, P. M. Álvarez and V. Gómez-Serrano *Applied Surface Science*, 2010, **256**, 5232-5236.
38. J. Bai, Z. Shi and J. Yin *Polymer*, 2013, **54**, 2498-2505.
39. X.-D. Liu, D.-K. Sheng, X.-M. Gao, T.-B. Li and Y.-M. Yang *Applied Surface Science*, 2013, **264**, 61-69.
40. Z. Lu, M. Meng, Y. Jiang and J. Xie *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2014, **447**, 1-7.
41. M. Li, T. Deng, S. Liu, F. Zhang and G. Zhang *Applied Surface Science*, 2014, **297**, 147-152.
42. B. Kordoghli, R. Khiari, H. Dhaouadi, M. N. Belgacem, M. F. Mhenni and F. Sakli *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2014, **441**, 606-613.
43. Y. Arima and H. Iwata *Biomaterials*, 2007, **28**, 3074-3082.
44. J. P. Badey, E. Espuche, Y. Jugnet, B. Chabert and T. M. Duct *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 1996, **16**, 173-178.
45. L. De Bartolo, S. Morelli, A. Bader and E. Drioli *Biomaterials*, 2002, **23**, 2485-2497.
46. J. G. Detry, M. Sindic, M. J. Servais, Y. Adriaensen, S. Derclaye, C. Deroanne and P. G. Rouxhet *Journal of Colloid and Interface Science*, 2011, **355**, 210-221.
47. S. Ioan, R. M. Albu, E. Avram, I. Stoica and E. G. Ioanid *Journal of Applied Polymer Science*, 2011, **121**, 127-137.
48. M. S. Kim, G. Khang and H. B. Lee *Progress in Polymer Science*, 2008, **33**, 138-164.
49. Y.-J. Kim, Y. Taniguchi, K. Murase, Y. Taguchi and H. Sugimura *Applied Surface Science*, 2009, **255**, 3648-3654.
50. M. C. Martins, B. D. Ratner and M. A. Barbosa *Journal of biomedical materials research. Part A*, 2003, **67**, 158-71.
51. K. L. Menzies and L. Jones *Optometry & Vision Science*, 2010, **87**, 387-399
10.1097/OPX.0b013e3181da863e.
52. M. Pykönen, H. Sundqvist, J. Järnström, O.-V. Kaukoniemi, M. Tuominen, J. Lahti, J. Peltonen, P. Fardim and M. Toivakka *Applied Surface Science*, 2008, **255**, 3217-3229.
53. M. a. D. Romero-Sánchez, M. Mercedes Pastor-Blas and J. M. Martín-Martínez *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 2003, **23**, 49-57.
54. L. T. Allen, M. Tosetto, I. S. Miller, D. P. O'Connor, S. C. Penney, I. Lynch, A. K. Keenan, S. R. Pennington, K. A. Dawson and W. M. Gallagher *Biomaterials*, 2006, **27**, 3096-3108.
55. J. Benesch, S. Svedhem, S. C. Svensson, R. Valiokas, B. Liedberg and P. Tengvall *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 2001, **12**, 581-597.
56. P. Sharma, S. F. Basir and P. Nahar *Journal of Colloid and Interface Science*, **342**, 202-204.
57. R. Agnès *Polymer Degradation and Stability*, 1995, **49**, 163-179.
58. F. Bénard, B. Mailhot, J. Mallécol and J. L. Gardette *Polymer Degradation and Stability*, 2008, **93**, 1122-1130.
59. T. Kijchavengkul, R. Auras, M. Rubino, E. Alvarado, J. R. Camacho Montero and J. M. Rosales *Polymer Degradation and Stability*, 2010, **95**, 99-107.
60. T. Kijchavengkul, R. Auras, M. Rubino, S. Selke, M. Ngouajio and R. T. Fernandez *Polymer Degradation and Stability*, 2011, **96**, 1919-1926.
61. S.-i. Kuroda, I. Mita, K. Obata and S. Tanaka *Polymer Degradation and Stability*, 1990, **27**, 257-270.
62. S.-i. Kuroda, A. Nagura, K. Horie and I. Mita *European Polymer Journal*, 1989, **25**, 621-627.

63. K. Norrman, P. Kingshott, B. Kaeselev and A. Ghanbari-Siahkali *Surface and Interface Analysis*, 2004, **36**, 1533-1541.
64. K. Norrman and F. C. Krebs *Surface and Interface Analysis*, 2004, **36**, 1542-1549.
65. A. Rivaton and J. L. Gardette *Polymer Degradation and Stability*, 1999, **66**, 385-403.
66. R. K. Sadi, G. J. M. Fechine and N. R. Demarquette *Polymer Degradation and Stability*, 2010, **95**, 2318-2327.
67. N. B. Shukla, N. Daraboina and G. Madras *Polymer Degradation and Stability*, 2009, **94**, 1238-1244.
68. H. Tsuji, Y. Echizen and Y. Nishimura *Polymer Degradation and Stability*, 2006, **91**, 1128-1137.
69. T. Yamashita, H. Tomitaka, T. Kudo, K. Horie and I. Mita *Polymer Degradation and Stability*, 1993, **39**, 47-54.
70. P. Stloukal, V. Verney, S. Commereuc, J. Rychly, L. Matisova-Rychlá, V. Pis and M. Koutny *Chemosphere*, 2012, **88**, 1214-1219.
71. B. Singh and N. Sharma *Polymer Degradation and Stability*, 2008, **93**, 561-584.
72. M. a. Markets "Biomaterials Market Global Forecasts to 2017," marketsandmarkets.com, 2013.
73. M. a. Markets; marketsandmarkets.com web, 2012.
74. M. M. Stevens and J. H. George *Science*, 2005, **310**, 1135-1138.
75. L. S. Nair and C. T. Laurencin *Progress in Polymer Science*, 2007, **32**, 762-798.
76. Y. Ikada *Biomaterials*, 1994, **15**, 725-736.
77. A. Higuchi, K. Sugiyama, B. O. Yoon, M. Sakurai, M. Hara, M. Sumita, S.-i. Sugawara and T. Shirai *Biomaterials*, 2003, **24**, 3235-3245.
78. D. G. Castner and B. D. Ratner *Surface Science*, 2002, **500**, 28-60.
79. J. R. Keogh, M. F. Wolf, M. E. Overend, L. Tang and J. W. Eaton *Biomaterials*, 1996, **17**, 1987-1994.
80. X. Xue, J. Wang, Y. Zhu, Q. Tu and N. Huang *Applied Surface Science*, 2010, **256**, 3866-3873.
81. M. E. Furth, A. Atala and M. E. Van Dyke *Biomaterials*, 2007, **28**, 5068-5073.
82. F. J. O'Brien *Materials Today*, 2011, **14**, 88-95.
83. A. I. Suvorova, I. S. Tyukova and E. I. Trufanova *Russian Chemical Reviews*, 2000, **69**, 451-459.
84. Y. Tokiwa, H. Fan, Y. Hiraguri, R. Kurane, M. Kitagawa, S. Shibatani and Y. Maekawa *Macromolecules*, 2000, **33**, 1636-1639.
85. X. Zhang, Y. Gozukara, P. Sangwan, D. Gao and S. Bateman *Polymer Degradation and Stability*, 2010, **95**, 2309-2317.
86. A. Stoica-Guzun, L. Jecu, A. Gheorghe, I. Raut, M. Stroescu, M. Ghiurea, M. Danila, I. Jipa and V. Fruth *J Polym Environ*, 2011, **19**, 69-79.
87. E. Renard, G. Vergnol and V. Langlois *IRBM*, 2011, **32**, 214-220.
88. G. Adamus, W. Sikorska, H. Janeczek, M. Kwiecień, M. Sobota and M. Kowalczyk *European Polymer Journal*, 2012, **48**, 621-631.
89. D. B. Hazer, E. Kılıçay and B. Hazer *Materials Science and Engineering: C*, 2012, **32**, 637-647.
90. C. Ye, P. Hu, M.-X. Ma, Y. Xiang, R.-G. Liu and X.-W. Shang *Biomaterials*, 2009, **30**, 4401-4406.
91. T. Pompe, K. Keller, G. Mothes, M. Nitschke, M. Teese, R. Zimmermann and C. Werner *Biomaterials*, 2007, **28**, 28-37.
92. X.-T. Li, Y. Zhang and G.-Q. Chen *Biomaterials*, 2008, **29**, 3720-3728.
93. Z.-W. Dai, X.-H. Zou and G.-Q. Chen *Biomaterials*, 2009, **30**, 3075-3083.
94. T. F. Mueller, M. Seitz, I. Eckle, H. Lange and G. Kolb *Nephron*, 1998, **78**, 139-142.
95. K. M. Sivaraman, C. Kellenberger, S. Pane, O. Ergeneman, T. Luhmann, N. A. Luechinger, H. Hall, W. J. Stark and B. J. Nelson *Biomedical Microdevices*, 2012, **14**, 603-612.
96. J. Attia, F. Legendre, Q. T. Nguyen, C. Bauge, K. Boumediene and J. P. Pujol *Tissue Engineering Part A*, 2008, **14**, 1687-1697.
97. D. Mangindaan, I. Yared, H. Kurniawan, J. R. Sheu and M. J. Wang *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2012, **100A**, 3177-3188.
98. M. Hayama, K. Yamamoto, F. Kohori and K. Sakai *Journal of Membrane Science*, 2004, **234**, 41-49.
99. T. Hasegawa, Y. Iwasaki and K. Ishihara *Biomaterials*, 2001, **22**, 243-251.

100. M. Matsui, L. Ono and L. Akcelrud *Polymer Testing*, 2012, **31**, 191-196.
101. J. C. M. Teo, R. R. G. Ng, C. P. Ng and A. W. H. Lin *Acta Biomaterialia*, 2011, **7**, 2060-2069.
102. J. P. Santerre, K. Woodhouse, G. Laroche and R. S. Labow *Biomaterials*, 2005, **26**, 7457-7470.
103. A. Oloffs, C. Grosse-Siestrup, S. Bisson, M. Rinck, R. Rudolph and U. Gross *Biomaterials*, 1994, **15**, 753-758.
104. D.-T. Lin, T.-H. Young and Y. Fang *Biomaterials*, 2001, **22**, 1521-1529.
105. S. A. Guelcher, A. Srinivasan, J. E. Dumas, J. E. Didier, S. McBride and J. O. Hollinger *Biomaterials*, 2008, **29**, 1762-1775.
106. P. Sangsanoh, O. Suwanton, A. Neamnark, P. Cheepsunthorn, P. Pavasant and P. Supaphol *European Polymer Journal*, 2010, **46**, 428-440.
107. M. Zelzer, M. R. Alexander and N. A. Russell *Acta Biomaterialia*, 2011, **7**, 4120-4130.
108. M. Zelzer, R. Majani, J. W. Bradley, F. R. A. J. Rose, M. C. Davies and M. R. Alexander *Biomaterials*, 2008, **29**, 172-184.
109. G. Zanatta, M. Rudisile, M. Camassola, J. Wendorff, N. Nardi, C. Gottfried, P. Pranke and C. A. Netto *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2012, **8**, 211-218.
110. P. Thevenot, W. Hu and L. Tang *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2008, **8**, 270-280.
111. Y. Inoue, T. Nakanishi and K. Ishihara *Reactive and Functional Polymers*, 2011, **71**, 350-355.
112. G. Ciapetti, E. Cenni, L. Pratelli and A. Pizzoferrato *Biomaterials*, 1993, **14**, 359-364.
113. R. J. Deans and A. B. Moseley *Experimental Hematology*, 2000, **28**, 875-884.
114. T. J. Wannemuehler, M. C. Manukyan, B. D. Brewster, J. Rouch, J. A. Poynter, Y. Wang and D. R. Meldrum *The Journal of surgical research*, 2012, **173**, 113-126.
115. D. E. Weibel *Polymer Assisted Surface Modification by Photons*; Nova Science Publishers Inc.: New York, 2011; Vol. 1.
116. D. E. Weibel, C. Vilani, A. C. Habert and C. A. Achete *Journal of Membrane Science*, 2007, **293**, 124-132.
117. D. E. Weibel, C. Vilani, A. C. Habert and C. A. Achete *Surface and Coatings Technology*, 2006, **201**, 4190-4194.
118. P. Europe "Plastics – the Facts 2012," Plastics Europe, 2012.
119. Plastivida; Instituto Socio-Ambiental de Plásticos, 2011.
120. H. Bhardwaj, R. Gupta and A. Tiwari *J Polym Environ*, 2013, **21**, 575-579.
121. J. Pospíšil, Z. Horák, Z. Kruliš and S. Nešpůrek *Macromolecular Symposia*, 1998, **135**, 247-263.
122. ASTM; ASTM International, 2002; Vol. D5488.
123. D. M. Zhang, F. Z. Cui, Z. S. Luo, Y. B. Lin, K. Zhao and G. Q. Chen *Surface and Coatings Technology*, 2000, **131**, 350-354.
124. F. Shen, E. Zhang and Z. Wei *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2009, **73**, 302-307.
125. R. T. Darby and A. M. Kaplan *Appl Microbiol*, 1968, **16**, 900-5.
126. M. C. S. Corrêa, M. L. Rezende, D. S. Rosa, J. A. M. Agnelli and P. A. P. Nascente *Polymer Testing*, 2008, **27**, 447-452.
127. T. W. Federle, M. A. Barlaz, C. A. Pettigrew, K. M. Kerr, J. J. Kemper, B. A. Nuck and L. A. Schechtman *Biomacromolecules*, 2002, **3**, 813-822.
128. S. Zahra, S. S. Abbas, M.-T. Mahsa and N. Mohsen *Waste Management*, 2010, **30**, 396-401.
129. O. Milstein, R. Gersonde, A. Huttermann, M. J. Chen and J. J. Meister *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, **58**, 3225-3232.
130. P. K. Roy, M. Hakkarainen, I. K. Varma and A.-C. Albertsson *Environmental Science & Technology*, 2011, **45**, 4217-4227.
131. L. Cosgrove, P. L. McGeechan, P. S. Handley and G. D. Robson *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, **76**, 810-819.
132. J. P. Eubeler, S. Zok, M. Bernhard and T. P. Knepper *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2009, **28**, 1057-1072.
133. P. Rychter, R. Biczak, B. Herman, A. Smyłta, P. Kurcok, G. Adamus and M. Kowalczyk *Biomacromolecules*, 2006, **7**, 3125-3131.

134. T. G. Volova, A. N. Boyandin, A. D. Vasiliev, V. A. Karpov, S. V. Prudnikova, O. V. Mishukova, U. A. Boyarskikh, M. L. Filipenko, V. P. Rudnev, B. Bá Xuân, V. Việt Dũng and I. I. Gitelson *Polymer Degradation and Stability*, 2010, **95**, 2350-2359.
135. Y.-Y. Shanguan, Y.-W. Wang, Q. Wu and G.-Q. Chen *Biomaterials*, 2006, **27**, 2349-2357.
136. M. Shimao *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, **12**, 242-247.
137. A. A. Shah, F. Hasan, A. Hameed and S. Ahmed *Biotechnology Advances*, 2008, **26**, 246-265.
138. Z. Yi Liu, Z. Q. Liang, A. J. S. Whalley, Y. J. Yao and A. Y. Liu *Journal of Invertebrate Pathology*, 2001, **78**, 178-182.
139. W. O. B. Silva, L. Santi, M. Berger, A. F. M. Pinto, J. A. Guimarães, A. Schrank and M. H. Vainstein *Process Biochemistry*, 2009, **44**, 829-834.
140. D. W. Roberts and R. J. St Leger *Adv Appl Microbiol*, 2004, **54**, 1-70.
141. J. L. Pereira, E. F. Noronha, R. N. G. Miller and O. L. Franco *Letters in Applied Microbiology*, 2007, **44**, 573-581.
142. A. Schrank and M. H. Vainstein *Toxicon*, 2010, **56**, 1267-1274.
143. F. Gugumus *Polymer Degradation and Stability*, 1993, **39**, 117-135.
144. A. L. Andradý *Advances in Polymer Science*, 1997, **128**, 49-94.
145. F. Cataldo *Polymer Degradation and Stability*, 2001, **72**, 287-296.
146. G. Kämpf, K. Sommer and E. Zirngiebl *Progress in Organic Coatings*, 1991, **19**, 69-77.
147. A. Leszczyńska, J. Njuguna, K. Pielichowski and J. R. Banerjee *Thermochimica Acta*, 2007, **453**, 75-96.
148. T. Kuroki, T. Sawaguchi, S. Niikuni and T. Ikemura *Macromolecules*, 1982, **15**, 1460-1464.
149. F. Kessler, S. Kühn, C. Radtke and D. E. Weibel *Polymer International*, 2012, n/a-n/a.
150. T. Tyliczszak; Hamilton, Ed.: Ontario, Canadá 1994.
151. E. Bormashenko, S. Balter, A. Malkin and D. Aurbach *Macromolecular Materials and Engineering*, 2013, no prelo.
152. D. Steffens, M. Lersch, A. Rosa, C. Scher, T. Crestani, M. G. Morais, J. A. V. Costa and P. Pranke *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2013, **9**, 710-718.
153. L. Bernardi, S. B. Luisi, R. Fernandes, T. P. Dalberto, L. Valentim, J. A. Bogo Chies, A. C. Medeiros Fossati and P. Pranke *J Endod*, 2011, **37**, 973-9.
154. Y.-X. Weng, Y. Wang, X.-L. Wang and Y.-Z. Wang *Polymer Testing*, 2010, **29**, 579-587.
155. F. Kessler, L. Marconatto, R. d. S. B. Rodrigues, G. A. Lando, A. Schrank, M. H. Vainstein and D. E. Weibel *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2014, **130**, 57-67.
156. H. Ade, B. Watts, S. Swaraj, C. McNeill, L. Thomsen, W. Belcher and P. C. Dastoor In *9th International Conference on X-Ray Microscopy*; David, C., Nolting, F., Quitmann, C., Stampanoni, M., Pfeiffer, F., Eds.; Iop Publishing Ltd: Bristol, 2009; Vol. 186.
157. S. G. Urquhart and H. Ade *The Journal of Physical Chemistry B*, 2002, **106**, 8531-8538.
158. O. Dhez, H. Ade and S. G. Urquhart *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 2003, **128**, 85-96.
159. I. Ishii and A. P. Hitchcock *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 1988, **46**, 55-84.
160. C. Wochnowski, M. A. Shams Eldin and S. Metev *Polymer Degradation and Stability*, 2005, **89**, 252-264.
161. L. Zhang, C. Xiong and X. Deng *Polymer*, 1996, **37**, 235-241.
162. S. Swaraj, U. Oran, A. Lippitz, J. F. Friedrich and W. E. S. Unger *Surface and Coatings Technology*, 2005, **200**, 494-497.
163. F. Koosha, R. H. Muller, S. S. Davis and M. C. Davies *Journal of Controlled Release*, 1989, **9**, 149-157.
164. M. C. Davies, R. D. Short, M. A. Khan, J. F. Watts, A. Brown, A. J. Eccles, P. Humphrey, J. C. Vickerman and M. Vert *Surface and Interface Analysis*, 1989, **14**, 115-120.
165. S. T. Ellison, A. P. Gies, D. M. Hercules and S. L. Morgan *Macromolecules*, 2009, **42**, 5526-5533.
166. F. Kokai, H. Niino and A. Yabe *Appl Phys A*, 1998, **67**, 607-612.

167. S. T. Ellison, A. P. Gies, D. M. Hercules and S. L. Morgan *Macromolecules*, 2009, **42**, 3005-3013.
168. M. J. Hearn, D. Briggs, S. C. Yoon and B. D. Ratner *Surface and Interface Analysis*, 1987, **10**, 384-391.
169. M. J. Hearn, B. D. Ratner and D. Briggs *Macromolecules*, 1988, **21**, 2950-2959.
170. I. V. Bletsos, D. M. Hercules, D. VanLeyen, A. Benninghoven, C. G. Karakatsanis and J. N. Rieck *Macromolecules*, 1990, **23**, 4157-4163.
171. I. V. Bletsos, D. M. Hercules, D. VanLeyen, A. Benninghoven, C. G. Karakatsanis and J. N. Rieck *Analytical Chemistry*, 1989, **61**, 2142-2149.
172. L. Wu, X. Chen, D. Hu and L. Zou *Surface and Interface Analysis*, 2001, **31**, 1094-1099.
173. B. D. Ratner *Biosensors and Bioelectronics*, 1995, **10**, 797-804.
174. F. I. Simonovsky, S. C. Porter and B. D. Ratner *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2005, **16**, 267-284.
175. C. E. Hoyle, K. S. Ezzell, Y. G. No, K. Malone and S. F. Thames *Polymer Degradation and Stability*, 1989, **25**, 325-343.
176. E. Fujimoto; K. Nakamura. *KOBUNSHI Ronbunshu*, 1994, **51**, 612-618.
177. W. P. Daley, S. B. Peters and M. Larsen *Journal of Cell Science*, 2008, **121**, 255-264.
178. S.-W. Choi, Y. Zhang, Y.-C. Yeh, A. Lake Wooten and Y. Xia *Journal of Materials Chemistry*, 2012.
179. K. N. Chua, C. Chai, P. C. Lee, S. Ramakrishna, K. W. Leong and H. Q. Mao *Exp Hematol*, 2007, **35**, 771-81.
180. K. N. Chua, C. Chai, P. C. Lee, Y. N. Tang, S. Ramakrishna, K. W. Leong and H. Q. Mao *Biomaterials*, 2006, **27**, 6043-51.
181. K. M. Evans-Nguyen, L. R. Tolles, O. V. Gorkun, S. T. Lord and M. H. Schoenfisch *Biochemistry*, 2005, **44**, 15561-15568.
182. V. A. Tegoulia, W. Rao, A. T. Kalambur, J. F. Rabolt and S. L. Cooper *Langmuir*, 2001, **17**, 4396-4404.
183. J. Yang, Y. Mei, A. L. Hook, M. Taylor, A. J. Urquhart, S. R. Bogatyrev, R. Langer, D. G. Anderson, M. C. Davies and M. R. Alexander *Biomaterials*, 2010, **31**, 8827-8838.
184. J.-D. Gu *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2003, **52**, 69-91.
185. B. I. Sang, K. Hori, Y. Tanji and H. Unno *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **58**, 241-7.
186. Y. Doi, Y. Kanesawa, M. Kunioka and T. Saito *Macromolecules*, 1990, **23**, 26-31.
187. M.-N. Kim, A.-R. Lee, J.-S. Yoon and I.-J. Chin *European Polymer Journal*, 2000, **36**, 1677-1685.
188. C.-S. Wu *Polymer Degradation and Stability*, 2009, **94**, 1076-1084.
189. O. S. A. Geweely N.S., Eldesoky M.A., Eladly A.A *Arch. Microbiol.*, 2006, 1-9.
190. T. Artham and M. Doble *Biomacromolecules*, 2009, **11**, 20-28.
191. B. Stuart *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications.*, 2004.
192. A. Salman, L. Tsrer, A. Pomerantz, R. Moreh, S. Mordechai and M. Huleihel *Spectroscopy: An International Journal*, 2010, **24**, 261-267.
193. A. Salman, I. Lapidot, A. Pomerantz, L. Tsrer, Z. Hammody, R. Moreh, M. Huleihel and S. Mordechai *Spectroscopy: An International Journal*, 2012, **27**.
194. C. Wang and R. J. St Leger *Eukaryotic cell*, 2007, **6**, 808-16.
195. R.-C. Alejandra, C.-M. Margarita and M.-C. María Soledad *Polymer Degradation and Stability*, 2012, **97**, 2473-2476.
196. B. Ravat, M. Grivet, Y. Grohens and A. Chambaudet *Radiation Measurements*, 2001, **34**, 31-36.
197. L. Zhou, D. Liang, X. He, J. Li, H. Tan, J. Li, Q. Fu and Q. Gu *Biomaterials*, 2012, **33**, 2734-2745.
198. J. R. Frautschi, J. A. Chinn, R. E. Phillips Jr, Q. H. Zhao, J. M. Anderson, R. Joshi and R. J. Levy *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1993, **1**, 305-313.