

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE
MESTRADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

Sara Elisa Moreira Catoni

**Biossíntese e obtenção de PHB e PHBV plastificados com PEG visando
aplicação em liberação controlada de fármacos**

JOINVILLE

2011

SARA ELISA MOREIRA CATONI

Biossíntese e obtenção de PHB e PHBV plastificados com PEG visando aplicação em liberação controlada de fármacos

Trabalho apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos na Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE.

Professora Orientadora: Ana Paula Testa Pezzin
Professora co-Orientadora: Andréa Lima dos Santos Schneider

JOINVILLE

2011

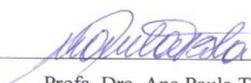
Termo de Aprovação

“Biossíntese e obtenção de PHB e PHBV plastificados com PEG visando aplicação em liberação controlada de fármacos”

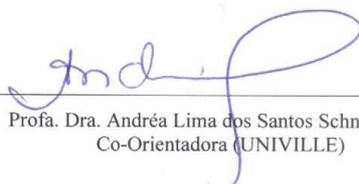
por

Sara Elisa Moreira Catoni

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos, área de concentração Engenharia de Processos e Tecnologias Limpas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Engenharia de Processos.



Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
Co-Orientadora (UNIVILLE)

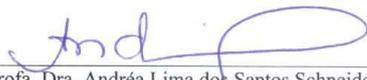


Prof. Dra. Elisabeth Wisbeck
Coordenadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Processos (UNIVILLE)

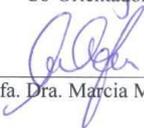
Banca Examinadora:



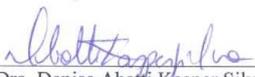
Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
Co-Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dra. Marcia Margarete Meier
(UDESC)



Prof. Dra. Denise Abatti Kasper Silva
(UNIVILLE)

Joinville, 11 de novembro de 2011.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram, dando forças e ajudando no que fosse possível, para que eu concluísse mais esta etapa de minha vida, em especial à Deus.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me deu forças para que eu pudesse subir mais um degrau na escada da vida.

Ao meu esposo, Jeferson, por toda a paciência, compreensão e ajuda durante este período de nossas vidas.

Ao meu filho, Davi, que chegou no final deste trabalho e deu início a uma nova etapa de minha vida, trazendo ainda mais alegria pra eu continuar sempre.

Aos meus pais, Paulino e Marli, pelo apoio incondicional que me deram para que eu realizasse mais este sonho.

À Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin, pela oportunidade, conhecimento e incansáveis horas de orientação.

À Prof. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider, pelo apoio concedido.

Aos amigos do laboratório, Ketlyn, Michelle, Luciana, Bruna, Caio, pelo trabalho em conjunto.

Ao Prof. Theodoro, pelas análises que realizou.

À UDESC pelas análises de MEV, FTIR e DRX.

À Unicamp pelas análises de SEC e RMN de ^1H .

Ao Prof. Dr. Valdir Soldi (UFSC) pela iniciativa deste projeto.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado.

A todos os professores que de alguma maneira contribuíram para o meu conhecimento.

E finalmente, aos meus irmãos, amigos, parentes, meu sobrinho (Israel), pela amizade e compreensão nos momentos em que não pude dar a atenção que talvez esperassem de mim.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES.....	iv
LISTA DE SÍMBOLOS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
INTRODUÇÃO.....	1
1. OBJETIVOS.....	4
1.1 OBJETIVO GERAL.....	4
1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	4
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 BIOPOLÍMEROS.....	5
2.2 BIOMATERIAIS.....	6
2.3 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs).....	6
2.3.1 Síntese de PHAs.....	8
2.4 POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) (PHB).....	10
2.5 POLI (3-HIDROXIBUTIRATO-co-3-HIDROXIVALERATO) (PHBV).....	11
2.5.1 Biossíntese de PHBV	12
2.5.2 Estratégias de Alimentação.....	13
2.6 POLI(ETILENO GLICOL) (PEG).....	14
2.6.1 Produção de PEG.....	15
2.7 PLASTIFICANTES.....	15
2.8 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE POLÍMEROS.....	16
2.8.1 Difração de Raios-X (DRX).....	16
2.8.2 Análises Térmicas.....	16
2.8.2.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	17
2.8.2.2 Análise Termogravimétrica (TGA).....	18
2.8.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	19
2.8.4 Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC).....	20
2.8.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	21

2.8.6 Métodos Espectroscópicos (Infravermelho).....	21
2.9 ESTADO DA ARTE.....	23
3. METODOLOGIA.....	26
3.1 SÍNTESE DE PHAS EM BIORREATOR ATRAVÉS DA BACTÉRIA <i>CUPRIAVIDUS NECATOR</i>	26
3.1.1 Condições de Cultivo.....	27
3.1.2 Estratégias de Alimentação.....	28
3.1.3 Métodos Analíticos.....	29
3.1.3.1 Determinação da Concentração de Biomassa.....	29
3.1.3.2 Determinação da Concentração de PHA (metanólise).....	30
3.1.3.3 Determinação da Concentração de Substrato.....	31
3.1.3.4 Determinação da Concentração de Nitrogênio.....	31
3.2 RECUPERAÇÃO DE PHA PRODUZIDO.....	33
3.2.1 Extração	33
3.2.2 Purificação (Recristalização).....	33
3.3 PREPARAÇÃO DOS FILMES DE PHB E PHBV COM PEG POR EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE A PARTIR DE PHAS DE ALTA E BAIXA MASSA MOLAR.....	34
3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE PHB E PHBV COM PEG.....	35
3.4.1 Difractometria de Raios - X (DRX).....	35
3.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	35
3.4.3 Análise Termogravimétrica (TGA).....	36
3.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	36
3.4.5 Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC).....	37
3.4.6 Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN ¹ H).....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE PHB E PHBV COM PEG.....	38
4.1.1 Difractometria de Raios-X (DRX).....	38
4.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	42
4.1.3 Análise Termogravimétrica (TGA).....	46
4.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	49
4.1.5 Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC).....	51
5. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE PHB COM ÁCIDO OLEICO E PHBV SINTETIZADOS.....	55
5.1 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTONS (RMN ¹ H).....	55

5.2 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO (SEC).....	58
5.3 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	60
CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXO I	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química geral para os PHAs.....	6
Figura 2. Biociclo de polihidroxialcanoatos.....	7
Figura 3. Micrografias eletrônicas de transmissão da bactéria <i>C. necator</i> (a) na fase de crescimento e (b) na fase de produção.....	9
Figura 4. Esquema demonstrando como se dá a produção de PHA pela bactéria...10	
Figura 5. Estrutura química do PHB.....	11
Figura 6. Estrutura do copolímero PHBV.....	12
Figura 7. Via de produção de PHB e PHBV a partir de glicose e propionato apresentada por DOI (1990).....	13
Figura 8. Estrutura química do PEG.....	14
Figura 9. Apresentação de uma curva típica de DSC.....	18
Figura 10. Exemplo de curvas termogravimétricas.....	19
Figura 11. Representação gráfica do princípio de cromatografia por exclusão.....	20
Figura 12. Biorreator utilizado no processo de cultivo de <i>Cupriavidus necator</i>	28
Figura 13. Fluxograma do processamento das amostras para os ensaios conduzidos em biorreator.....	29
Figura 14. Cuba de vidro para a formação do filme por evaporação lenta do solvente.....	34
Figura 15. Difração de raios-X dos filmes de PHB/PEG.....	39
Figura 16. Difração de raios-X dos filmes de PHBV/PEG.....	40
Figura 17. Influência do percentual de PEG no grau de cristalinidade dos filmes de PHB/PEG.....	41
Figura 18. Influência do percentual de PEG no grau de cristalinidade dos filmes de PHBV/PEG.....	42
Figura 19. Curvas de DSC para filmes de a) PHB/PEG; b) PHBV/PEG obtidas do segundo aquecimento.....	43
Figura 20. TGA dos filmes de a) PHB/PEG e b) PHBV/PEG.....	48
Figura 21. Micrografias de MEV da superfície superior dos filmes de PHB/PEG.....	50
Figura 22. Micrografias de MEV da superfície superior dos filmes de PHBV/PEG...51	
Figura 23. SEC dos filmes de a)PHB/PEG e b)PHBV/PEG.....	52
Figura 24. SEC do PHB puro sintetizado por <i>Cupriavidus necator</i>	54

Figura 25. RMN ^1H do PHB Industrial (a) e Sintetizado (b).....	56
Figura 26. RMN ^1H do PHBV Industrial (a) e Sintetizado (b).....	57
Figura 27. SEC do a)PHB Industrial, Sintetizado e com Ácido Oleico e b)PHBV Industrial e PHBV Sintetizado.....	59
Figura 28. DSC para o PHBV Industrial e Sintetizado.....	60
ANEXO I	
Figura A - FTIR dos filmes de 1)PHB/PEG e 2)PHBV/PEG.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades do PHBV com diferentes quantidades molares de 3HV.....	12
Tabela 2. Composição do meio mineral (MM).....	27
Tabela 3. Composição da solução de oligoelementos.....	27
Tabela 4. Volumes de água, amostra e reagentes utilizados na dosagem de nitrogênio.....	32
Tabela 5. Dados da temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade ($\alpha_c(\%)$) para filmes de PHB/PEG e PHBV/PEG obtidos por DSC.....	45
Tabela 6. Dados de T_{onset} ($^{\circ}C$), perda de massa (%) e $T_{m\acute{a}x}$ ($^{\circ}C$) dos filmes de PHB/PEG e PHBV/PEG	47
Tabela 7. Dados da temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade (α_c (%)) para filmes de PHB/PEG e PHBV/PEG obtidas por DSC.....	60
Tabela 8. Dados do Grau de cristalinidade e do percentual de HV nos polímeros listados.....	61
ANEXO I	
Tabela A - Relação das principais bandas determinadas experimentalmente para os polímeros puros.....	71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

DRX – difratometria de raios-X

DSC – calorimetria exploratória diferencial

FTIR – espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

MEV – microscopia eletrônica de varredura

PEG – polietileno glicol

PHA – poli(hidroxicanoatos)

P(3HB) – poli(3-hidroxiacetato)

P(3HB-co-3HV) – poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato)

RMN ¹H – ressonância magnética nuclear de prótons

SEC – cromatografia de exclusão por tamanho

TGA – análise termogravimetria

Acetil CoA – Acetilcoenzima A

LISTA DE SIMBOLOS

α_c – Grau de cristalinidade

ΔH_m – Entalpia de fusão

ΔH_{m1} – Entalpia de fusão do PEG

ΔH_{m2} - Entalpia de fusão do PHB e PHBV

ΔH_m° – Entalpia de fusão padrão

T_{m1} – Temperatura de fusão do PEG

T_{m2} – Temperatura de fusão do PHB e PHBV

$T_{m\acute{a}x}$ – Temperatura onde a velocidade de degradação é máxima

T_{onset} – Temperatura de início de perda de massa ou degradação térmica

$W_{P(3HB)}$ – Porcentagem em massa de P(3HB)

RESUMO

Nas últimas duas décadas, os polihidroxicanoatos (PHAs) tem sido o foco de pesquisas extensivas considerando suas potenciais aplicações como termoplásticos biocompatíveis e biodegradáveis, devido a sua hidrofiliabilidade no corpo humano bem como em circunstâncias naturais. Visando a aplicação em liberação controlada de fármacos, polímeros industriais tais como poli(3-hidroxiobutirato), P(3HB) e poli(3-hidroxiobutirato-co-3-hidroxi valerato), P(3HB-co-3HV) plastificados com polietilenoglicol (PEG) foram preparados por “*casting*” evaporação de solvente. O comportamento térmico, a morfologia, a cristalinidade e massa molar destes filmes foram estudados pelas seguintes técnicas: calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TGA), microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios-X (DRX), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), cromatografia de exclusão por tamanho (SEC). Também foram sintetizados PHB e PHBV por via microbiana e caracterizados por ressonância magnética nuclear de prótons (RMN ^1H), cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). Os polímeros industriais plastificados (PHB/PEG e PHBV/PEG) apresentaram um elevado grau de cristalinidade, calculado por DRX, com valores variando entre 60 e 95%, de acordo com a concentração de PEG. A temperatura de fusão do PHB e PHBV diminuiu com o aumento da adição de plastificante (PEG) na mistura. PHB e PHBV apresentaram perfis de perda de massa muito parecidos devido ao PHBV ter somente 3,6% de HV no copolímero. Os resultados de MEV mostraram que as misturas foram uniformes, com exceção da composição 50/50 que mostrou-se heterogênea, evidenciado pela presença de duas fases. Para o PHB sintetizado, obteve-se uma massa molar elevada ($M_w=571.000 \text{ g.mol}^{-1}$), quando comparado ao PHB produzido industrialmente ($M_w=312.000 \text{ g.mol}^{-1}$). PHB com adição de ácido oléico apresentou alta massa molar, similar ao PHB Industrial. A análise de RMN ^1H mostrou que o percentual de HV no PHBV ficou em torno de 22%, isto diminuiu o grau de cristalinidade do copolímero para 6,1%, melhorando as propriedades de degradação do polímero.

Palavras-chave: P(3HB), P(3HB-co-3HV), PEG, polímeros biodegradáveis.

ABSTRACT

In the last two decades, polyhydroxyalkanoates (PHAs) has been the focus of extensive research considering its potential applications as biocompatible and biodegradable thermoplastic due to its hydrophilicity in the human body as well as in natural circumstances. Aiming at application in controlled release drug industrial polymers such as poly (3-hydroxybutyrate), P (3HB) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), P (3HB- co-3HV) plasticized with polyethylene glycol (PEG) were prepared by "casting" solvent evaporation. The thermal behavior, morphology, crystallinity and molecular weight of these films were studied by the following techniques: differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA), scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), spectroscopy Fourier transform infrared (FTIR), size exclusion chromatography (SEC). Were also synthesized PHB and PHBV by microbial and characterized by proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR), size exclusion chromatography (SEC) and differential scanning calorimetry (DSC). The industrial plasticized polymers (PHB / PEG and PHBV / PEG) showed a high degree of crystallinity, calculated by XRD, with values ranging between 60 and 95%, according to the concentration of PEG. The melting temperature of PHB and PHBV decreased with increasing addition of plasticizer (PEG) in the mixture. PHB and PHBV showed profiles very similar mass loss due to PHBV have only 3.6% of HV in the copolymer. The SEM results showed that the mixtures were uniform, except for the 50/50 composition which proved to be heterogeneous, as evidenced by the presence of two phases. For the PHB synthesized, we obtained a high molecular weight ($M_w = 571,000 \text{ g mol}^{-1}$), when compared to industrially produced PHB ($M_w = 312,000 \text{ g mol}^{-1}$). PHB with the addition of oleic acid had a high molar mass, similar to PHB Industrial. The ^1H NMR analysis showed that the percentage of HV in PHBV was around 22%, it decreased the degree of crystallinity of the copolymer to 6.1%, improving the properties of polymer degradation.

Keywords: P(3HB), P(3HB-co-3HV), PEG, biodegradable polymers.

INTRODUÇÃO

A utilização de sistemas de liberação controlada de fármacos oferece inúmeras vantagens de emprego, quando comparadas às formas farmacêuticas convencionais. Tais sistemas são caracterizados por apresentarem uma estrutura matricial compacta, de reservatório na forma de cápsulas ou vesicular, diferindo no seu tamanho, que varia de alguns nanômetros a algumas centenas de micrômetros. Espera-se que novos sistemas de liberação de fármacos possam imprimir uma contribuição significativa no mercado farmacêutico nacional. Nesse sentido, esforços têm sido realizados com o objetivo de obter sistemas de liberação mais efetivos com um melhor desempenho, com base nos seguintes princípios: (i) melhoria do desempenho e redução dos custos de produtos existentes, (ii) revitalização de fármacos conhecidos por meio de sua formulação em novas formas farmacêuticas, (iii) utilização dos recursos naturais como fontes de novos fármacos para desenho de sistemas de liberação e (iv) intensificação da proteção dos inventos por meio de patentes.

Vários materiais têm sido empregados no desenvolvimento de sistemas de liberação. Entretanto, além da biodegradabilidade e biocompatibilidade serem requisitos desejáveis, aspectos de segurança como: baixa toxicidade do polímero e seus produtos de degradação devem ser considerados (WHATELEY, 1993). O material encapsulante é selecionado em função das propriedades físicas e químicas do agente ativo, da aplicação pretendida e do método utilizado para formar as microestruturas (SUAVE *et al.*, 2006).

Entre os materiais poliméricos, os polihidroxialcanoatos (PHAs) têm representado um imenso potencial para aplicação em sistemas de liberação, uma vez que oferecem uma alternativa de baixo custo. Os PHAs mais reportados na literatura são o poli(3-hidroxiбутирато) – PHB e o copolímero poli(3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxiуалерато) – PHBV, que após a degradação levam a formação de ácido 3-hidroxiбутírico, um constituinte normal do sangue. Esses polímeros são sintetizados por bactérias a partir de fontes de carbono renováveis, sendo a síntese conduzida em duas etapas, a primeira objetivando a geração de biomassa, e a segunda, com limitação de nutrientes favorecendo o acúmulo de polímero de acordo com a fonte de carbono oferecida (DOI *et al.*, 1992). A massa molar do polímero varia em função do substrato oferecido e das condições de cultivo (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Entretanto, matrizes constituídas de PHB apresentam uma taxa de liberação muito lenta quando comparado a outros polímeros, como o poli(ácido láctico-co-glicólico) – PLGA. O alto grau de cristalinidade do PHB, que geralmente varia de 30 a 90% é uma das razões que justificam sua lenta degradação, tornando o ataque das enzimas degradadoras mais difícil (BIDONE *et al.*, 2009). Além do grau de cristalinidade, a taxa de liberação do fármaco é determinada também por outras propriedades estruturais do polímero, tais como, tamanho dos esferulitos e massa molecular (IZA *et al.*, 1998).

A incorporação de 3-hidroxi valerato (3HV) na produção de copolímero de poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) - PHBV, resulta na formação de um polímero com as características mais interessantes do ponto de vista industrial (ARAUJO, 2005), (MARANGONI, 2000).

Enquanto homopolímero PHB tem uma temperatura de fusão (T_m) em torno de 173 - 180 °C e uma temperatura de transição vítrea (T_g) de cerca de -5 a 5 °C, a adição de 3HV reduz a temperatura de fusão dos cristais (variando de 75 a 170 °C), a resistência à tração e módulo e, ao mesmo tempo, aumenta a flexibilidade, resistência ao impacto e ductilidade. Isto é particularmente benéfico, pois com a diminuição da temperatura de fusão, o copolímero pode ser processado em temperaturas mais baixas, reduzindo significativamente a degradação térmica. A cristalinidade do PHBV é de cerca de 39-69%, dependendo da percentagem dos monômeros correspondentes. A alta porcentagem de 3HV diminui a cristalinidade, tornando o polímero mais flexível (GARCIA, 2006).

Adicionalmente, várias estratégias podem ser adotadas com o intuito de obter sistemas de liberação apropriados para uma dada aplicação terapêutica. No que tange ao prolongamento da liberação, a utilização de blends de polímeros com outros materiais têm-se mostrado uma importante estratégia para a modulação do perfil de liberação de fármacos e degradação das micropartículas, pois modifica as propriedades físico-químicas das microesferas, tais como porosidade e taxa de erosão. Por outro lado, as nanoestruturas, além de permitirem a encapsulação e o controle da liberação de fármacos, podem ainda apresentar a superfície modificada com polímeros hidrofílicos, como, por exemplo, o poli(etileno glicol) (PEG) ou funcionalizada com unidades de oligo- e polissacarídeos para fins de reconhecimento celular ou que sejam aptos a responder a estímulos externos. Esta grande variedade de materiais e estruturas oferece um amplo espectro de

possibilidades no desenvolvimento de sistemas de liberação (MOGHIMI & HUNTER, 2001).

O PEG tem sido bastante explorado com o intuito de obter partículas que escapam do reconhecimento e captura pelas células fagocitárias, após administração *in vivo*, permanecendo por um maior tempo na circulação sistêmica. A estratégia que tem sido mais bem sucedida para obter sistemas de liberação “furtivos” consiste em preparar nanoestruturas a partir de copolímeros sintéticos em bloco do tipo PLA-PEG ou PLAGA-PEG, cuja capacidade de escapar do sistema imune está relacionada com a proporção e a densidade do PEG na superfície da partícula (MOGHIMI & HUNTER, 2001).

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral sintetizar, preparar e caracterizar polímeros (PHB e PHBV) e plastificá-los com PEG, visando a liberação controlada de fármacos.

As misturas de polímeros/plastificantes (PHB/PEG e PHBV/PEG) foram preparadas nas composições 100/0; 98/2; 95/5; 90/10; 80/20; 50/50; 20/80 a 5% m/v por “*casting*” e caracterizadas quanto à cristalinidade, propriedades térmicas, morfologia e massa molar.

1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Os objetivos específicos deste trabalho foram sintetizar PHB com o intuito de se obter baixa massa molar a partir de cultivo microbiano, bem como sintetizar o copolímero PHBV com maior percentual de (3HV) visando obter um polímero com grau de cristalinidade mais baixo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BIOPOLÍMEROS

Os polímeros biodegradáveis são freqüentemente divididos em duas categorias com base no processo de polimerização: sintéticos ou biológicos. Os polímeros sintéticos são representados por materiais que possuem grupos susceptíveis ao ataque enzimático. Os polímeros sintéticos mais facilmente biodegradados são os poliésteres alifáticos, tais como o poli(ácido glicólico) (PGA); o poli(álcool vinílico) (PVA); o poli(óxido de etileno) (PEO) o poli(ácido lático) (PLA) e a poli(ϵ -caprolactona) (PCL). Os polímeros biodegradáveis biológicos são obtidos de fontes vegetais ou bacterianas, sendo uma das mais importantes, a família dos (PHAs) (VERHOOGT *et al.*, 1999 *apud* WESSLER, 2007)

Os poliésteres alifáticos são polímeros que contém grupos funcionais ésteres em sua estrutura, onde estas ligações sofrem hidrólise, promovendo a degradação desses polímeros (CHANDRA & RUSTGI, 1998).

Os polímeros biodegradáveis vêm despertando grande interesse em pesquisadores, por serem degradados no solo pela ação de microrganismos em poucos meses, sendo transformados em água e gás carbônico em condições aeróbias (FORMOLO *et al.*, 2003).

Entende-se por degradação uma alteração na estrutura química de um polímero que leva à perda das propriedades de uso do material, enquanto a biodegradação de um polímero é a degradação causada por atividade biológica de ocorrência natural por ação enzimática. A biodegradação pode ocorrer na presença ou ausência de oxigênio. Desta forma, biodegradação aeróbia ocorre em presença de oxigênio, produzindo principalmente dióxido de carbono e matéria orgânica estabilizada (ABNT 15448/2006).

Por outro lado, a biodegradação anaeróbia, que ocorre na ausência de oxigênio ou em ambiente com baixa disponibilidade de oxigênio, produz principalmente metano, matéria orgânica estabilizada e dióxido de carbono (ABNT 15448/2006).

2.2 BIOMATERIAIS

Biomaterial é qualquer substância ou combinação de substâncias, que não drogas, de natureza natural ou sintética, que pode ser usado por qualquer período de tempo, como um todo ou parte do sistema, para aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo. A definição adotada na *Concensus Conference of the European Society for Biomaterials*, mais simplificada, é a de que biomaterial é todo material não vivo usado em dispositivo médico (ou biomédico), objetivando interação com o sistema biológico [WILLIAMS, 1987]. Para que um biomaterial possa ser implantado no corpo humano, ele deve satisfazer uma série de exigências. Além de biocompatível e biofuncional, deve ser atóxico, fácil de esterilizar e apresentar propriedades mecânicas adequadas, dependendo do propósito da aplicação [VERT et al., 1992]. Um material que apresente ótima biocompatibilidade não resulta em reações teciduais adversas. De um modo geral, um material biocompatível não deve provocar reação inflamatória crônica ou aguda do tecido e não deve apresentar diferenças significativas entre o material implantado e o material circunvizinho.

2.3 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)

Os PHAs são sintetizados por vários tipos de bactérias grampositivas e gram-negativas, a partir de pelo menos 75 diferentes gêneros (DOI *et al.*; 2002). Mais de 150 unidades monoméricas diferentes foram identificadas como constituintes do armazenamento de PHAs. Isto cria a possibilidade de obter uma extensa variedade de polímeros com diferentes propriedades (GOMES E BUENO NETTO; 1997). A fórmula estrutural geral dos PHAs está representada na Figura 1.

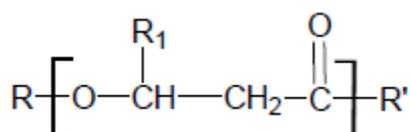


Figura 1. Estrutura química geral para os PHAs.

Os PHAs são termoplásticos biodegradáveis, insolúveis em água, enantioméricos puros, não tóxico, biocompatíveis, piezoelétricos e apresentam alto

índice de polimerização. De acordo com essas características, esses biopolímeros podem ser aplicados em diferentes áreas (HOCKING e MARCHESSAULT, 1994).

Devido sua biodegradabilidade, os PHAs podem ser utilizados na liberação controlada de fármacos, hormônios, inseticidas e herbicidas. Em virtude de sua biocompatibilidade, podem ser empregados no desenvolvimento de materiais osteossintéticos, suturas cirúrgicas e reparos de vasos sanguíneos (WANG e BAKKEN, 1998).

A Figura 2 representa o biociclo completo de produção e degradação de PHAs. Neste ciclo através da fotossíntese, as plantas fazem uso da luz solar e convertem dióxido de carbono e água em carboidratos (1-2). Estes na forma de açúcares simples fornecem matéria-prima para a produção de PHAs (3). Um microrganismo específico é utilizado no processo fermentativo para converter carboidratos em polímeros (4). Depois de acumular cerca de 80% de sua massa seca em forma de PHAs, o polímero é purificado (5) e pode ser manufaturado (6). Após seu uso, PHAs podem ser depositados em ambientes microbianos ativos (7) e a biodegradação deste polímero fornecerá água e gás carbônico (8). Por fim, uma rota direta através de plantas que produzem PHAs pode ser obtida (9). (MARANGONI, 2000).

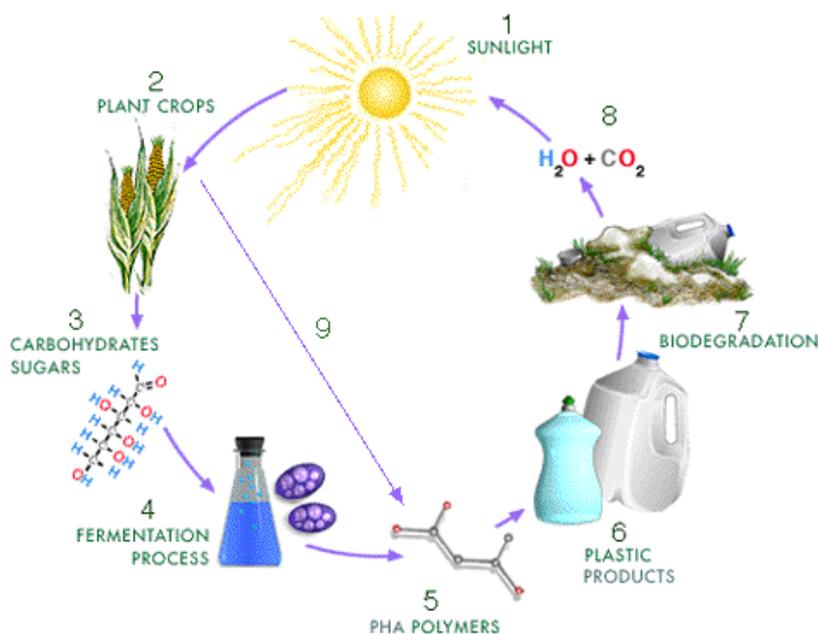


Figura 2 - Biociclo de Polihidroxicanoatos. (Fonte: MARANGONI, 2000)

A família dos poliésteres microbiológicos, denominada de PHAs apresenta como polímeros mais pesquisados o poli(3-hidroxiacetato) - PHB e o copolímero poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiisovalerato) – PHBV. Estes polímeros possuem propriedades mecânicas semelhantes às dos polímeros termoplásticos derivados do petróleo, o que possibilitaria a substituição desses em diversas aplicações, principalmente em substituição aos plásticos que são descartados rapidamente (DUARTE, 2004).

2.3.1 Síntese de PHAs

Os PHAs são sintetizados por uma variedade de microrganismos como forma de reserva de carbono e energia quando estes se encontram em um meio rico em carbono e deficiente em algum outro nutriente como: nitrogênio, fósforo, potássio e oxigênio (DAWES e SENIOR, 1973).

O tipo de PHA produzido depende da espécie da bactéria, das condições de cultura e da fonte de carbono (BYROM, 1987).

Geralmente, o substrato para produção de PHAs é acetil-CoA. Tomando como exemplo a *Cupriavidus necator*, em condições normais de crescimento, essa bactéria cataboliza os carboidratos a piruvato, o qual é desidrogenado e convertido a acetil-CoA. Acetil-CoA entra no ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA) e segue-se normalmente o catabolismo para produção de energia. Na limitação de algum nutriente, a entrada de acetil-CoA no ciclo dos ácidos tricarbóxicos tende a diminuir e esta é utilizada como substrato para produção de PHAs (BRAUNEGG *et al.*, 1998).

Cupriavidus necator, é um microrganismo procariótico, do tipo gram-negativo, quimiolitotrófico facultativo encontrado naturalmente no solo e água. Possui células na forma de bastonete com dimensões de 0,5 por 1,8 a 2,6 μm . É móvel, possuindo de 1 a 4 flagelos peritríquios. Na fase de acúmulo de polímero, as células podem se tornar esféricas (MARANGONI, 2000). A Figura 3 apresenta a bactéria em fase de crescimento (a) e em fase de acúmulo de polímero (b) (SQUIO, 2003).

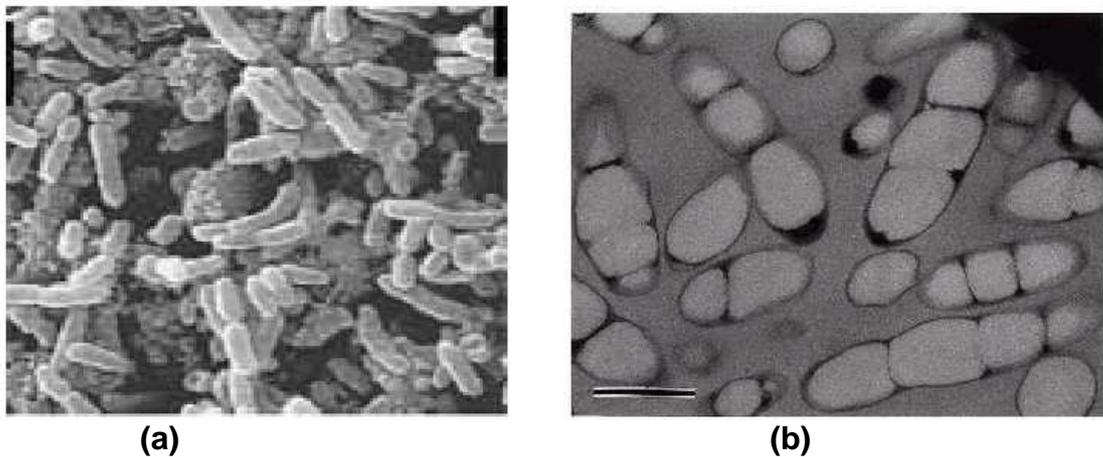


Figura 3: Micrografias eletrônicas de transmissão da bactéria *C. necator*. (a) na fase de crescimento (AMPE, 1995) e (b) na fase de produção (SUDESH *et al.*, 2000).

O PHA é acumulado nas células na forma de grânulos discretos, sendo que o tamanho e o número por célula podem variar dependendo da espécie. Em *C. necator* foram observados de 8 a 13 grânulos por célula, com diâmetro de 0,2 a 0,5 μm (LEE, 1996a *apud* SQUIO, 2003).

C. necator é capaz de crescer em condições de quimiolitotrofia ou heterotrofia (REUTZ *et al.*, 1982). A quimiolitotrofia é a capacidade dos microrganismos utilizarem os compostos inorgânicos como doadores de elétrons e o dióxido de carbono como fonte de carbono, enquanto a heterotrofia é a capacidade de utilizar compostos orgânicos como fonte de carbono e energia (DOELLE, 1975). A *C. necator* também pode crescer autotroficamente em atmosfera de gases H_2 , O_2 e CO_2 (TANAKA *et al.*, 1994).

Os PHAs sintetizados pela *Cupriavidus necator* incluem monômeros de 3-hidroxicaproato (3HV), 3-hidroxiisobutirato (3HB), 4-hidroxiisobutirato (4HB), 5-hidroxicaproato (5HV) quando ácido valérico ou propiônico são fornecidos (REE *et al.*, 1992).

Como mencionado anteriormente, o acúmulo de PHA geralmente ocorre quando existe excesso de fonte de carbono e limitação de algum nutriente essencial à multiplicação das bactérias. No caso da bactéria *Cupriavidus necator*, a síntese ocorre em duas etapas, sendo que na primeira procura-se favorecer ao máximo o crescimento celular e assegurar, ao mesmo tempo, que a síntese do polímero seja a menor possível. Inversamente, na segunda etapa, interrompe-se o crescimento

celular e estimula-se ao máximo o acúmulo de polímero nas células (GOMEZ & BUENO NETTO,1997) (Figura 4).

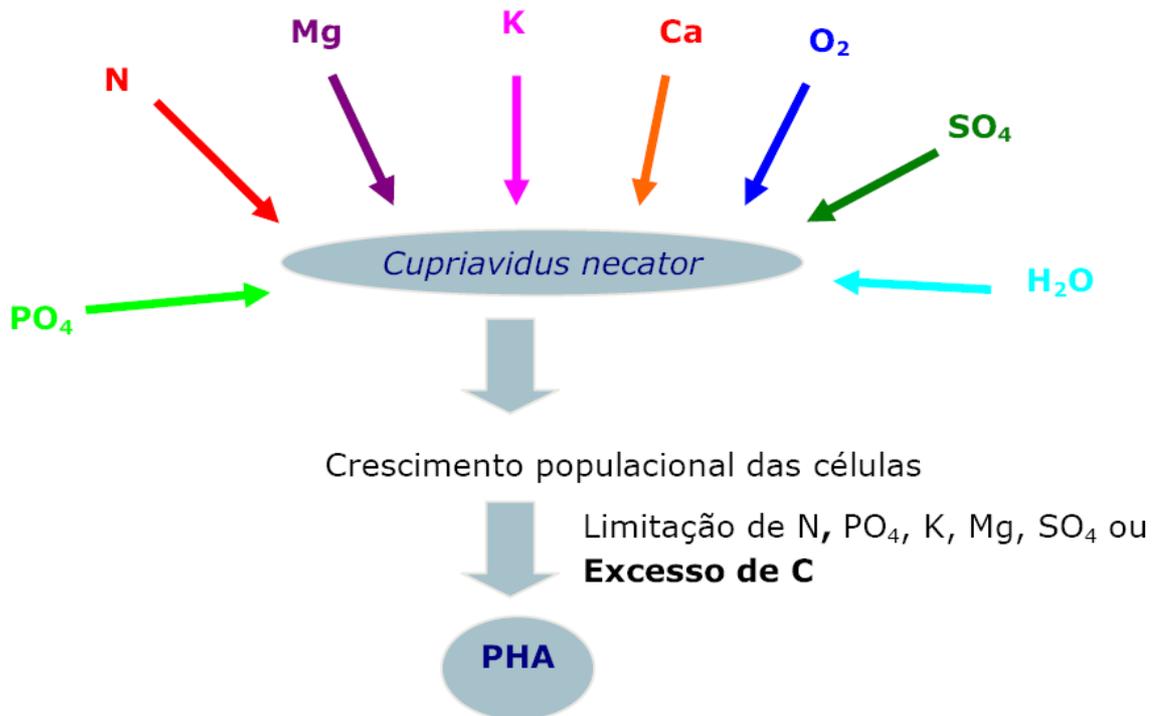


Figura 4: Esquema demonstrando como se dá a produção de PHA pela bactéria (Fonte: FORMOLO, 2003).

O maior problema para a aplicação comercial do PHB é seu alto custo de produção, sendo o substrato um dos fatores que contribui significativamente com este custo. Muitas bactérias são capazes de utilizar resíduos de sistemas produtivos como fonte de carbono, combinando as vantagens da redução do custo da disposição final dos resíduos com a produção de produtos com valor agregado (LEE *et al.*, 1999).

2.4 POLI (3-HIDROXIBUTIRATO) – PHB

O PHB é um poliéster alifático composto por unidades repetitivas de 3-hidroxi-butirato (3HB), resultando em uma longa molécula de elevada massa molar. O polímero biossintetizado apresenta centro quiral com configuração R, sendo assim 100% isotático, devido à estereoespecificidade da enzima que é responsável pela polimerização do monômero, a PHB polimerase (BRAUNEGG *et al.*, 1998). É um dos polímeros biodegradáveis mais pesquisados em substituição aos plásticos

convencionais, quando se trata de materiais que são de descartabilidade rápida. O PHB é insolúvel em água, ou seja, hidrofóbico, podendo ser degradado por uma variedade de microrganismos (JENDROSSEK *et al.*, 1996). É um material altamente cristalino, com densidades de fase cristalina e amorfa em cerca de 1,26 e 1,18 g/cm³, respectivamente.

Devido a este fato é bastante rígido e frágil. Seu módulo de elasticidade pode chegar próximo a 3,5 GPa e sua tensão máxima por volta de 43 MPa (DOI *et al.*; 2000). A Figura 5 ilustra a estrutura química do PHB.

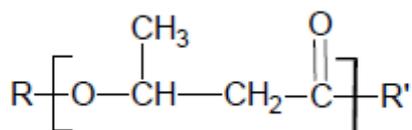


Figura 5. Estrutura química do PHB.

O PHB é um poliéster natural produzido e acumulado como reserva de energia por muitos microrganismos, com predomínio no uso da bactéria *Cupriavidus necator*. Esse polímero tem atraído muita atenção devido a sua biocompatibilidade, termoplasticidade, piezoelectricidade e também pela vantagem de ser degradado pela ação de microrganismos de ocorrência natural, sofrendo redução da massa molar, transformando-se em CO₂ e H₂O (RODRIGUES, 2005).

Tecnicamente, o PHB possui propriedades mecânicas semelhantes ao polipropileno, é resistente à água, tem boa estabilidade à radiação ultravioleta e barreira à permeabilidade dos gases. Quanto à biodegradabilidade, ele se decompõe em uma diversidade de meios, liberando apenas água e gás carbônico. O elevado grau de cristalinidade e sua fragilidade limitam as aplicações do PHB (RODRIGUES, 2005).

2.5 POLI (3-HIDROXIBUTIRATO-co-3-HIDROXIVALERATO) – PHBV

O copolímero industrial PHBV, cuja estrutura está mostrada na Figura 6, possui melhores propriedades mecânicas de processabilidade, em relação ao polímero PHB, em função do aumento da resistência ao impacto, da maciez e da flexibilidade. Esse copolímero tem sido obtido pela incorporação de unidades de 3HV na cadeia polimérica. As propriedades físicas e térmicas desses copolímeros

são fortemente dependentes da composição de 3HV, de modo que a temperatura de fusão decresce significativamente com o aumento da fração de 3HV no copolímero, sem, contudo, afetar a temperatura de degradação, permitindo melhores condições de processabilidade (POIRIER *et al.*, 1995).

A alta porcentagem de 3HV diminui a cristalinidade do polímero, fazendo com que ele fique mais flexível (GARCIA, 2006).

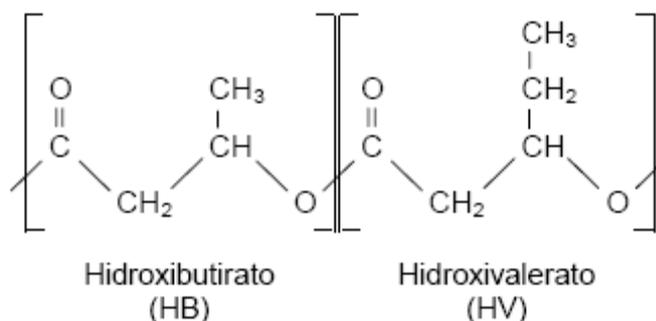


Figura 6. Estrutura do copolímero PHBV

A Tabela 1 apresenta algumas propriedades mecânicas e térmicas para alguns copolímeros PHBV de acordo com variações na quantidade molar de 3HV.

Tabela 1. Propriedades do PHBV com diferentes quantidades molares de 3HV.

Quantidade molar de 3HV (%)	Tm (°C)	Tg (°C)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de Elasticidade (GPa)
0-P(3HB)	175	9	45	4	3,8
11	157	2	38	5	3,7
20	114	-5	26	27	1,9
28	102	-8	21	700	1,5
34	97	-9	18	970	1,2
PP isotático	174	-17	30	10	1,5

*Propriedades mecânicas tomadas a 25°C, sem citação sobre massas molares e/ou polidispersão dos polímeros. FONTE: AVELLA *et al.* [2000].

2.5.1 Biossíntese de PHBV

A produção de PHBV por *C. necator* é muito discutida e estudada a partir de inúmeras fontes de carbono (SHIOYA *et al.*, 1988; STEINBÜCHEL & PIEPER, 1992).

Esta bactéria acumula PHBV unicamente na presença de substratos como propionato e valerato, precursores deste polímero. Estas fontes de carbono são degradadas a propionil-CoA ou 3-hidroxicetil-CoA. Estes substratos devem ser utilizados na presença de outros como frutose e glicose (STEINBÜCHEL E PIEPER, 1992). A via de produção do copolímero a partir de glicose e propionato é ilustrada na Figura 7. As reações são catalisadas pelas mesmas enzimas que na produção de PHB.

O copolímero apresenta uma distribuição aleatória de unidades de 3HB e 3HV. A via de síntese deste copolímero é estudada por DOI *et al.* (1987) que tem mostrado que a partir de propionato, as unidades de 3HB e 3HV são produzidas e uma parte de propionato é convertida em acetil-CoA e PHB. O restante é convertido a propionil-CoA chegando a 3HV. Os estudos demonstraram que a fração molar de 3HV no copolímero restringe-se a 50% em razão do rápido metabolismo de propionil-CoA em acetil-CoA na célula. Copoliésteres contendo 90% molar de 3HV são produzidos a partir de ácido pentanóico como fonte de carbono (DOI *et al.*, 1988).

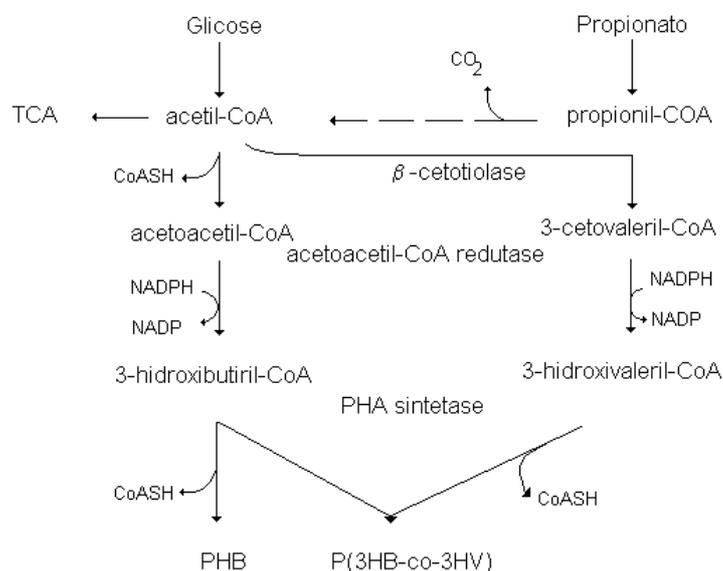


Figura 7: Via de produção de PHB e PHBV a partir de glicose e propionato apresentada por DOI (1990)

2.5.2 Estratégias para produção de PHBV

Como foi descrito anteriormente, para biossíntese do copolímero, se faz necessário à utilização de um precursor, como o ácido propiônico. Contudo, grande

parte do ácido propiônico adicionado ao meio é utilizada para a produção de energia. Por esta razão, estratégias metabólicas são utilizadas com a finalidade de desviar o fluxo do ácido propiônico proporcionando uma maior incorporação desse ácido ao polímero na forma de valerato. Dentre as estratégias metabólicas mais empregadas está a utilização de suplementos no meio, como ácido oleico e acético (BERG *et al.*, 2002).

2.6 POLI (ETILENO GLICOL) - (PEG)

PEG tem excelentes propriedades, inclusive boa solubilidade em água e em solventes orgânicos, tem propriedades essenciais para formulações de fármacos. Além disso, PEG é hidrofílico, ou seja, tem afinidade com a água e não é biodegradável. (PARRA, 2005).

O PEG é um poliéter diol linear, cuja estrutura química esta representada na figura 8. PEG é comumente usado em uma ampla gama de formulações intravenosa humana e farmacêutica veterinária, sendo considerado imunologicamente seguro, pois é eliminado do corpo intacto pelos rins. Mais recentemente, o PEG foi identificado como um agente terapêutico por ter uma variedade de configurações experimentais e terapêutica veterinária (MOGHIMI e HUNTER, 2008).



Figura 8. Estrutura química do PEG.

O PEG é um polímero estável quimicamente, sendo considerado inerte tanto em meio ácido como em meio básico. Devido ao grande número de oxigênios na cadeia polimérica, o PEG tem grande propensão à formação de complexos, podendo inclusive associar-se a eletrólitos em soluções diluídas.

O PEG é uma substância atóxica, por ser quimicamente inerte, e também apresenta poucos riscos ambientais, podendo ser descartado sem tratamento prévio. É empregado regularmente em cosméticos e como carga em produtos farmacêuticos, por ser expelido pelo corpo sem ser metabolizado (LOH, 1999).

2.6.1 Produção do PEG

O PEG é produzido pelo método de polimerização catalítica heterogênea, a partir de monômeros de óxido de etileno. Vários catalisadores são descritos na literatura, tais como: carbonatos e óxidos de metais alcalinos terrosos, compostos de alquil-zinco, alquil e alcoóxidos de alumínio, hidratos de cloreto, brometo e acetato férrico, alcoóxidos de zinco, magnésio, cálcio, e misturas desses materiais com vários sais inorgânicos. A massa molar dos polímeros depende do tipo de catalisador utilizado, bem como das condições de polimerização. Os polímeros de alta massa molar são obtidos como sólidos brancos, enquanto os de menor massa molar (< 1000) são líquidos à temperatura ambiente (LOH, 1999).

O principal controle na produção de PEG é sobre a massa molar do polímero. A Union Carbide, maior produtora mundial de PEG, utiliza o método de viscosidade da solução aquosa para a determinação da massa molar. A cromatografia por permeação em gel ainda é pouco utilizada, devido a problemas de decomposição do polímero na coluna de SEC. O método viscosimétrico também apresenta problemas, como a oxidação do PEG na solução. Para esse tipo de determinação, a resina é primeiramente encharcada com 125 mL de álcool isopropílico, e depois dissolvida em água com agitação lenta (LOH, 1999).

2.7 PLASTIFICANTES

Os plastificantes são compostos, não voláteis, de alto ponto de fusão e de moderado a baixo peso molecular, que aumentam a flexibilidade e o escoamento e, conseqüentemente, a processabilidade dos polímeros. A adição de plastificantes reduz as forças intermoleculares e aumenta o volume livre do polímero. Esses aditivos possuem três funções básicas: diminuir a temperatura de processamento do polímero para valores menores do que sua temperatura de decomposição, modificar as propriedades do produto final (flexibilidade) e alterar as propriedades de processamento. A disponibilidade, permanência, baixa volatilidade, compatibilidade e miscibilidade com o polímero são requisitos essenciais de um plastificante, enquanto que baixo custo, ausência de cor, ser inodor e atóxico, não migrar, não ser inflamável, resistência ao calor e à luz, fácil dispersão são características desejadas a esses aditivos (MANO, 2004).

Um dos polímeros que mais utiliza plastificantes é o PVC. De acordo com o tipo e quantidade de plastificante empregada, obtém-se PVCs com diferentes características. A rigidez dos polímeros também pode ser diminuída através de copolimerização (plastificação interna). A presença de grupamentos laterais no polímero aumenta sua flexibilidade e o movimento segmental. (CANEVAROLO, 2001).

2.8 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE POLÍMEROS

De acordo com CAMPBELL & WHITE (1989), há muitos motivos para se caracterizar um material polimérico, como identificação de um material, *design* a nível molecular, microestrutural e de processo e controle de análises.

2.8.1 Difração de Raios-X (DRX)

O método de DRX é amplamente utilizado como ferramenta para investigar o arranjo ordenado de átomos ou moléculas através da interação da radiação eletromagnética que fornece efeitos de interferência com estruturas compatíveis em tamanho com o comprimento de onda da radiação (BILLMEYER, 1984).

A DRX é um método tradicional para determinação da estrutura cristalográfica em polímeros cristalinos. É o método mais simples para determinação das porções cristalinas, mas também fornece dados a respeito da estrutura completa do polímero, incluindo a posição de grupos ou átomos pendentes (como por exemplo, átomos de hidrogênio nos cristais de polietileno). Outras informações que podem ainda ser obtidas por esta técnica incluem o tamanho e perfeição dos cristais (CAMPBELL & WHITE, 1989).

2.8.2 Análises Térmicas

As análises térmicas envolvem todos os métodos em que as propriedades medidas são obtidas a partir de mudanças na temperatura. Alguns métodos, como a análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria diferencial exploratória (DSC) são especificamente designados para medidas das propriedades térmicas do material a

ser examinado, como por exemplo, mudanças de entropia ou entalpia (CAMPBELL & WHITE, 1989).

A utilização de técnicas de análises térmica, como DSC e análise termogravimétrica (TGA), auxiliam na observação das alterações nas propriedades do material antes e depois da degradação. A determinação das propriedades térmicas, tais como, o grau de cristalinidade obtido por meio da entalpia de fusão (ΔH_m), a temperatura de fusão (T_m) e a T_g dos polímeros, são obtidas por DSC. O TGA fornece as temperaturas de degradação (T_{onset}) e temperatura máxima de degradação (T_{max}), obtida a partir da primeira derivada, tornando possível avaliar a degradação térmica e a porcentagem de perda de massa dos polímeros (SPIER, 2005).

2.8.2.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O DSC é uma técnica utilizada para determinar as entalpias dos processos de fusão e cristalização (endo e exotérmicos) por comparação com uma referência inerte. O equipamento geralmente varre linearmente uma faixa de temperatura a uma determinada taxa de aquecimento. No DSC do tipo fluxo de calor, a amostra e a referência são aquecidas pela mesma fonte de calor e a diferença de temperatura entre ambas é monitorada em função da temperatura ou do tempo (WENDLANDT & GALLAGHER, 1981).

A cada momento em que a amostra passa por uma transição de estado térmico, um sinal é produzido e plotado em um gráfico, como demonstra a figura 9 (BILLMEYER, 1984).

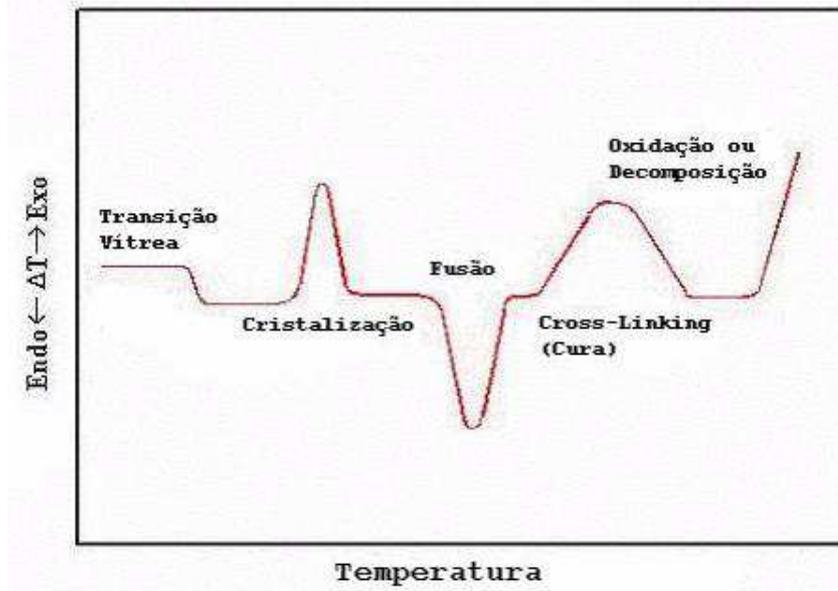


Figura 9 – Apresentação de uma curva típica de DSC.

O DSC é uma ferramenta poderosa que permite determinar as temperaturas de transição vítrea (T_g), fusão (T_m) e cristalização (T_c), bem como as entalpias de fusão (ΔH_m) e cristalização (ΔH_c), além do grau de cristalinidade (α_c) dos polímeros, determinado segundo a equação 01. Com o DSC pode-se também avaliar a influência de aditivos sobre as propriedades dos materiais resultantes (cargas, plastificantes, entre outros), medir o calor específico, estudar reações de polimerização e de cura e ainda avaliar a degradação térmica e oxidativa (SPIER, 2005).

$$\alpha_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \cdot 100\% \quad (\text{equação 01})$$

onde α_c = grau de cristalinidade (%); ΔH_m = entalpia de fusão da amostra ($J \cdot g^{-1}$) e ΔH_m^0 = entalpia de fusão considerando polímero 100% ($J \cdot g^{-1}$).

2.8.2.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica é definida como o estudo da mudança na massa em função da temperatura, tempo e/ou atmosfera. Para medir a mudança de massa o equipamento dispõe de uma balança sensível (SPIER, 2005).

A termogravimetria é uma técnica muito utilizada na caracterização do perfil de degradação de polímeros e outros materiais. A exposição à temperatura elevada pode, algumas vezes, alterar a estrutura química e, por conseqüência, as propriedades físicas dos materiais. Portanto, a curva de degradação térmica, em condições não isotérmicas, mostra o perfil da resistência ou estabilidade térmica que o material apresenta quando submetido a uma varredura de temperatura (Figura 10).

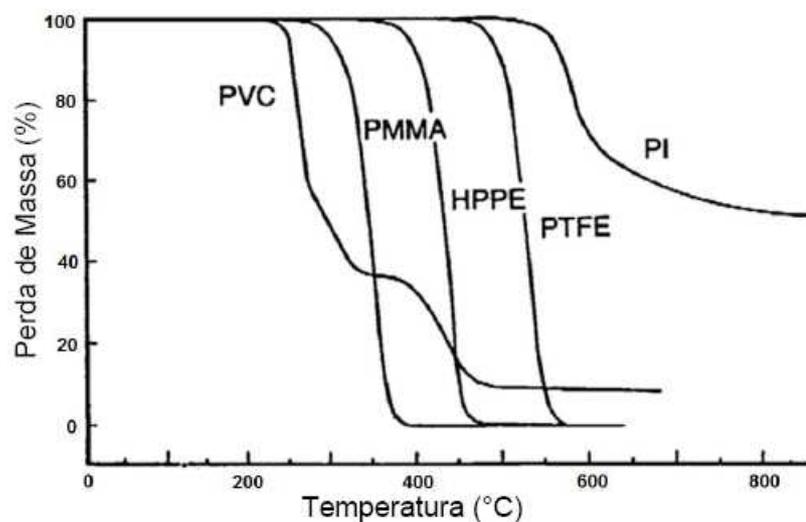


Figura 10 – Exemplo de curvas termogravimétricas.

A estabilidade térmica é definida como a capacidade da substância em manter suas propriedades o mais próximo possível de suas características iniciais, considerando o ambiente imposto ao material e as funções que ele deve executar (SPIER, 2005).

2.8.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O MEV é uma ferramenta muito importante na caracterização da morfologia dos materiais, pois é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação e resolução da superfície ou fraturas de materiais, auxiliando na avaliação da degradação, sendo que dependendo do material pode-se atingir um aumento de até 900.000 vezes, porém normalmente o aumento é da ordem de até 10.000 vezes (COSTA, 2001; MALISKA, 2004).

2.8.4 Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC)

A cromatografia de permeação em gel, também conhecida como cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) ou cromatografia por filtração de tamanho, é um dos métodos mais populares de separação e análise de materiais poliméricos. Este método promove uma distribuição seletiva e dinâmica das moléculas do soluto entre duas fases líquidas separadas, dependentes de uma estrutura estacionária contendo poros de tamanho controlado (SPIER, 2005).

Neste caso, uma solução com o polímero a ser analisado é bombeada através de uma coluna recheada com um gel poroso. Ao penetrarem nos poros, as cadeias menores percorrem um caminho maior que as cadeias maiores, sendo atrasadas em relação a estas (Figura 11). Ao final da coluna de separação, as cadeias de massa molar maior serão eluídas primeiro, sendo seguidas pelas menores (CANEVAROLO, 2002).

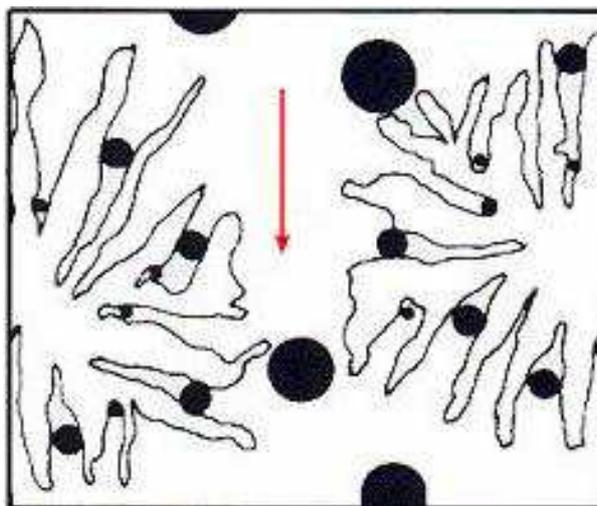


Figura 11 – Representação gráfica do princípio de cromatografia por exclusão. (Fonte: SPIER, 2005)

Conforme as substâncias presentes na amostras chegam ao final da coluna, os tempos de retenção e a concentração destas são determinados através de um sistema de detecção. Existem vários tipos de detectores, entre eles o de absorção no ultravioleta e visível, absorção no infravermelho, fluorescência e índice de refração (SPIER, 2005).

2.8.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O núcleo de certos elementos e isótopos comportam-se como se fossem ímãs girando em torno de um eixo. Têm esta propriedade alguns núcleos como o do hidrogênio comum e o do carbono 13. Quando se coloca um composto contendo átomos de ^1H ou de ^{13}C num campo magnético muito forte e simultaneamente se irradia o composto com energia eletromagnética, os núcleos podem absorver energia num processo denominado *ressonância magnética*. A radiação utilizada no espectrômetro de RMN ^1H é a radiofrequência (rf), de comprimento de onda altíssimo (da ordem de metros) e baixa energia (da ordem de 10^{-6} kcal/mol). A absorção desta radiação pelos núcleos desses elementos é quantizada e produz um espectro característico. Esta absorção não ocorre a menos que a frequência da radiação e a intensidade do campo magnético tenham valores bem definidos. Os espectrômetros permitem ainda aos químicos medir a absorção de energia pelos núcleos de ^1H e de ^{13}C .

Os aparelhos de RMN ^1H em geral utilizam ímãs supercondutores com campos magnéticos muito intensos e pulsos curtos de radiação de radiofrequência, que provocam a absorção de energia pelos núcleos de ^1H , todos ao mesmo tempo, e ocorre ressonância. A excitação dos núcleos provoca um fluxo de pequena corrente elétrica numa bobina receptora que envolve a amostra. O instrumento então amplifica a corrente e exibe o sinal (um pico ou uma série de picos) no computador, que então efetua a promediação dos sinais e depois um cálculo matemático (transformada de Fourier), exibindo um espectro legível.

O espectro de RMN ^1H necessita apenas algumas miligramas de amostra, e a faixa de absorção magnética dos prótons varia de 0 a 14 ppm (SILVERSTEIN, 1994).

2.8.6 Métodos Espectroscópicos (Infravermelho)

Muitas técnicas de caracterização têm o termo “espectroscopia” em seu nome, o qual especifica a medida da intensidade de absorção ou emissão de radiação eletromagnética, por uma amostra polimérica a ser analisada. Como por exemplo, a absorção do ultravioleta visível (UV visível) que atravessa um polímero: diferentes porções do espectro de radiação eletromagnética são absorvidos em

diferentes graus dependendo da estrutura molecular da amostra. As medidas de absorção de comprimento de onda podem ser interpretadas em termos de estrutura molecular (CAMPBELL & WHITE, 1989).

Na espectroscopia na região do infravermelho, a emissão ou absorção do espectro inicia quando as moléculas são submetidas a transições entre estados quânticos que correspondem a dois diferentes estados de energia interna. A diferença ΔE entre estes estados está relacionada com a frequência da radiação emitida ou absorvida por um quantum. Os comprimentos de onda da frequência de infravermelho são de 1-50 μm e são associados à vibração molecular e espectro de vibração de rotação (BILLMEYER, 1984).

O espectro de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) é hoje um dos métodos mais rápidos para caracterizar os grupamentos funcionais de um composto químico. O método se aplica tanto à análise qualitativa quanto à quantitativa, de sólidos, líquidos ou gases. As quantidades de analito usadas são muito pequenas (da ordem de mg ou fração); a amostra não é destruída no ensaio e pode, portanto, ser recuperada após a medida do espectro (COSTA NETO, 2004 *apud* SPIER, 2005).

A absorção do espectro de infravermelho em polímeros é diferente para a fase cristalina e a fase amorfa, isto pode ser devido ao fato de existirem conformações específicas em cada fase (BILLMEYER, 1984). As características mais importantes de um espectro no infravermelho são os valores das frequências de absorção da molécula (bandas), parâmetro fundamental para sua identificação ou para a interpretação do espectro, visando à caracterização de grupamentos funcionais nele presentes. O espectro de uma mistura será como uma mistura dos espectros dos compostos em separados (COSTA NETO, 2004 *apud* SPIER, 2005).

2.9 ESTADO DA ARTE

Vários materiais têm sido empregados no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. Entretanto, além da biodegradabilidade ser um requisito desejável, os aspectos de segurança, baixa toxicidade do polímero e seus produtos de degradação também devem ser considerados (WHATELEY, 1993). O material encapsulante é selecionado em função das propriedades físicas e químicas do agente ativo, da aplicação pretendida e do método utilizado para formar as nano- e microestruturas. O encapsulante ideal deve apresentar baixa viscosidade em concentrações elevadas e ser de fácil manipulação durante o processo; ter baixa higroscopicidade, para facilitar a manipulação e evitar aglomeração; não ser reativo com o material a ser encapsulado; deve possuir habilidade de selar e segurar o material ativo dentro da estrutura da cápsula; liberar completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulação; proporcionar máxima proteção ao material ativo contra condições adversas como luz, pH, oxigênio e ingredientes reativos; ter solubilidade em solventes comumente utilizados; possuir as propriedades desejadas de liberação do material ativo; não possuir sabor desagradável no caso de consumo oral e finalmente, ser econômico (SUAVE *et al.*, 2006).

Dentre os materiais poliméricos, os poliésteres alifáticos como poli(D,L-ácido láctico) (PDLA) e seu copolímero com ácido glicólico (PDLA-co-PGA) são freqüentemente usados na preparação de nano e microestruturas. Estes polímeros sofrem hidrólise das ligações ésteres no meio aquoso dos fluídos biológicos, formando produtos de degradação que são metabolizados a dióxido de carbono e água, via ciclo de Krebs, ou que são excretados pelos rins (ANDERSON & SHIVE, 1997). Outra família de poliésteres microbiológicos classificada como PHAs tem representado um imenso potencial para aplicação em sistemas de liberação, uma vez que oferecem uma alternativa de baixo custo como matéria-prima para obtenção de sistemas de liberação biodegradáveis. Os PHAs constituem uma classe geral de polímeros produzidos e acumulados como reserva de carbono e energia por inúmeros microrganismos a partir de matérias-primas naturais. A biossíntese de PHB, e de seu copolímero PHBV, normalmente ocorre quando há excesso de fonte de carbono e energia disponível e limitação de, pelo menos um nutriente necessário à multiplicação das células bacterianas (N, P, Mg, Fe). A capacidade máxima de

armazenamento dos PHAs e a taxa de produção depende do substrato utilizado e das estratégias de síntese. Aliado a isto, a pesquisa de novas aplicações industriais, contribui para o aumento da produção do polímero, tornando seu custo final mais competitivo (GARCIA *et al.*, 2003). Além das propriedades termoplásticas, que lhes permitem serem moldados ou transformados em filmes para aplicações diversas, os PHAs também são biocompatíveis, tornando-se importantes materiais para a aplicação médica e farmacêutica (POUTON & ANTKAR, 1996, ZINN *et al.*, 2001). A degradação do PHB *in vitro* leva à formação do monômero 3-hidroxi-butírico. Este ácido é um constituinte normal do sangue e, em comum com o acetoacetato e a acetona, é uma das três cetonas corporais produzidas endogenamente por um processo conhecido por cetogênese. Além disso, PHAs de baixa massa molar complexados com outras macromoléculas encontram-se amplamente distribuídos nas células biológicas. A complexação modifica as suas propriedades físicas e químicas, fazendo com que ele seja encontrado no citoplasma e fluidos intracelulares, bem como nas membranas e lipoproteínas. Com estas descobertas, têm-se admitido que o PHB, seus oligômeros e monômeros não sejam tóxicos às células (CHEN & YU, 2005).

Várias estratégias podem ser adotadas com o intuito de obter sistemas de liberação apropriados para uma dada aplicação terapêutica. No que tange o controle da liberação de fármacos, a utilização de blendas de polímeros com outros materiais têm-se mostrado uma importante estratégia no desenvolvimento de sistemas microestruturados. As blendas são efetivas em alterar as propriedades físicas e mecânicas dos materiais, permitindo alterar a permeabilidade das partículas de modo sistemático, além de fornecer um meio de modular a velocidade de liberação do fármaco e de degradação do polímero (CHA & PITT, 1990, MI *et al.*, 2002). Por outro lado, as nanopartículas além de permitir a encapsulação e o controle da liberação de fármacos, podem ainda apresentar a superfície modificada com polímeros hidrofílicos, ou funcionalizada com unidades de oligo- e polissacarídeos. Dentre os materiais empregados para o revestimento das nanoestruturas, polímeros hidrofílicos como o PEG têm sido bastante explorados com o intuito de obter partículas que escapam do reconhecimento e captura pelas células fagocitárias, após administração *in vivo*, permanecendo por um maior tempo na circulação sistêmica. A estratégia que tem sido mais bem sucedida para obter sistemas de liberação “furtivos” consiste em preparar nanoestruturas a partir de copolímeros

sintéticos em bloco do tipo PLA-PEG ou PLAGA-PEG, cuja capacidade de escapar do sistema imune está relacionada com a proporção e densidade do PEG na superfície da partícula (MOGHIMI & HUNTER, 2001).

Outra estratégia original para a obtenção de sistemas nanoestruturados vetorizáveis consiste em introduzir unidades de oligo- e polissacarídeos funcionalizados na superfície das partículas por meio de interações eletrostáticas (oligossacarídeos de carga oposta àquela da superfície) ou por meio de ligações químicas do tipo «*click-chemistry*». A introdução de estruturas sacarídicas específicas na superfície de nanoestruturas tem sido realizado por cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen. Esta reação é altamente régio- e quimioseletiva, visto que é catalisada por sais de cobre, e se tornou nos últimos anos, em um método formidável de ligação particularmente adaptável às biomoléculas como as proteínas, o ADN, os açúcares e mesmo os lipossomas, devido a sua grande eficácia em meio aquoso (ROSTOVTSEV *et al.*, 2002). Nanopartículas obtidas pela auto-agregação em água, na forma de micelas do copolímero em blocos PCL (núcleo hidrofóbico)-PAA (casca hidrofílica carregada negativamente), demonstraram responder a estímulos externos como pH e força iônica. A introdução de ácidos *N*-acetilneuramínicos terminais na superfície das nanoestruturas aumenta sua duração de vida, evitando a eliminação por certos órgãos (GABIZON & PAPAHADJOPOULOS, 1988). Estruturas manosiladas, galactosiladas ou ramnosiladas interagem com receptores específicos dos pulmões, fígado ou células da epiderme, liberando controladamente os fármacos encapsulados nestes locais (IKEHARA *et al.*, 2006). Estes constituem exemplos bem sucedidos no transporte e vetorização de fármacos em sítios específicos, por sistemas nanoestruturados apresentando sua superfície modificada.

Por outro lado, o desenvolvimento de sistemas de liberação dos polissacarídeos ao organismo e, em particular, às células tumorais é de vital importância para a obtenção do efeito terapêutico. Estes aspectos levaram a propor a encapsulação dos compostos polifenólicos e polissacarídeos de fungos do gênero *Pleurotus* em sistemas de liberação. Tais sistemas se caracterizam pela capacidade em carrear compostos ativos, protegendo-os da degradação após administração, fazendo com que maiores concentrações do fármaco alcancem o sítio de ação, além de permitir o controle da liberação e a redução dos efeitos colaterais indesejáveis (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998).

3. METODOLOGIA

3.1 SÍNTESE DE PHAS EM BIORREATOR ATRAVÉS DA BACTÉRIA *CUPRIAVIDUS NECATOR*

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a bactéria mutante *Cupriavidus necator*, cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Essa cultura foi mantida a 30 °C durante 48 horas, e a seguir armazenada em refrigerador a 4 °C. A composição do meio ágar nutriente utilizado é de 5,0 g.L⁻¹ de peptona de carne, 3,0 g.L⁻¹ de extrato de carne e 1,5 g.L⁻¹ de Agar, sendo este considerado pré-inóculo para as culturas e utilizado a uma taxa de 10% (v/v).

O meio de cultivo utilizado para as culturas foi o mesmo utilizado por ARAGÃO (1996), denominado meio mineral (MM), sendo sua composição demonstrada nas Tabelas 2 e 3. Cada uma das substâncias da Tabela 2 foi pesada separadamente, preparando-se frascos contendo a solução estoque, coluna A, sendo depois acondicionado em refrigerador a 4 °C. Para a preparação do meio de cultivo utilizaram-se os dados da coluna B. Foram preparadas 3 soluções separadamente. O pH da solução 1 foi ajustado a 7,0 com NaOH 7,5 M e HCl 11 M. As soluções 1, 2 e 3 foram autoclavadas separadamente, a 121 °C por 20 min.

Tabela 2 – Composição do Meio Mineral (MM)

	ELEMENTO	A CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE (g.L ⁻¹)	B VOLUME (mL.L ⁻¹) ^a	C CONCENTRAÇÃO FINAL (g.L ⁻¹)
SOLUÇÃO 1	Ácido nitriloacético (NTA)	19,1	10	0,19
	Citrato férrico de amônia	10	6	0,06
	MgSO ₄ .7H ₂ O	50	10	0,5
	CaCl ₂ .2H ₂ O	5	2	0,01
	NH ₄ SO ₄	200	25	5 ^e
	Solução de Oligoelementos ^b		1	(1mL.L ⁻¹)
	Água destilada ^c			
SOLUÇÃO 2	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	223,8	40	8,95
	KH ₂ PO ₄	37,5	40	1,5
SOLUÇÃO 3	Fonte de Carbono ^d			30

^a Volume retirado da solução estoque para o meio de cultivo.

^b A composição da solução de oligoelementos é demonstrada na Tabela 3.

^c O volume de água é calculado em função das concentrações das soluções da coluna B.

^d A fonte de carbono é adicionada diretamente ao meio, não sendo armazenada solução estoque.

^e A concentração da fonte de nitrogênio citada neste caso é para ensaios sem limitação de nitrogênio.

Tabela 3 – Composição da Solução de Oligoelementos.

ELEMENTO	CONCENTRAÇÃO	ELEMENTO	CONCENTRAÇÃO
H ₃ BO ₃	0,3	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,03
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,2	NiCl ₂ .6H ₂ O	0,02
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,03		

Fonte: Aragão (1996)

3.1.1 Condições de Cultivo

As células de *Cupriavidus necator* foram cultivadas em biorreator (Figura 12) utilizando a composição do MM conforme descrito na Tabela 2. O biorreator utilizado (MD – Braun) com cuba 5 L (volume útil igual a 4 L) foi autoclavado por 20 min a 121 °C, contendo a solução 1 (Tabela 2). Após o processo de esterilização, foram adicionadas as soluções 2 e 3, previamente esterilizadas, de forma a atender às concentrações previstas na Tabela 2, exceto para a substância sulfato de amônio, cuja concentração foi de 2,3 g.L⁻¹ para condições com limitação em nitrogênio.

O inóculo foi adicionado observando a taxa de 10 % (v/v) ao meio do biorreator. Os parâmetros para condução do processo foram: 30 °C, pH 7,0 (controlado com NaOH 7,5 M, ou HCl 11 M).

As condições de agitação e aeração variaram de 400 min⁻¹ a 780 min⁻¹ e 0,12 vvm a 1 vvm, respectivamente, de forma que a pressão parcial de oxigênio dissolvido (pO₂) não ficasse abaixo de 20 %. Como antiespumante foi utilizado polipropilenoglicol 2000 (Fluka).

A limitação do nitrogênio ocorre naturalmente nas culturas em decorrência do crescimento celular. Assim, a determinação da fase de crescimento foi feita com base na dosagem do nitrogênio (item 3.1.3.4). O final da fase de crescimento e, portanto, início da fase de produção do polímero, foi definido no momento em que houve exaustão de nitrogênio.



Figura 12: Biorreator utilizado no processo de cultivo de *Cupriavidus necator*.

3.1.2 Estratégias de Alimentação

a) *Alimentação em açúcar*: Sempre que a concentração de substrato se aproximava de 10 g.L⁻¹, era realizado um pulso a partir de uma solução a 500 g.L⁻¹, de forma a permitir que a concentração de açúcar no meio retornasse ao valor inicial, igual a 30 g.L⁻¹. O consumo de substrato foi monitorado por meio do método de DNS (item 3.1.3.3).

b) *Pulso de ácido propiônico*: Para a síntese de PHBV, foi dado um pulso de ácido propiônico na concentração não superior a 1 g.L^{-1} no momento da limitação em nitrogênio (item 3.1.3.4).

c) *Pulso de ácido oleico*: Para a síntese de PHB + ácido oléico, foi adicionado $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido oleico no momento da limitação de nitrogênio (item 3.1.3.4).

3.1.3 Métodos Analíticos

Durante o cultivo foram retiradas alíquotas de 2 mL para os frascos agitados e 20 mL para o experimento em biorreator, em intervalos de 2 horas para acompanhar a cinética de crescimento (Figura 13).

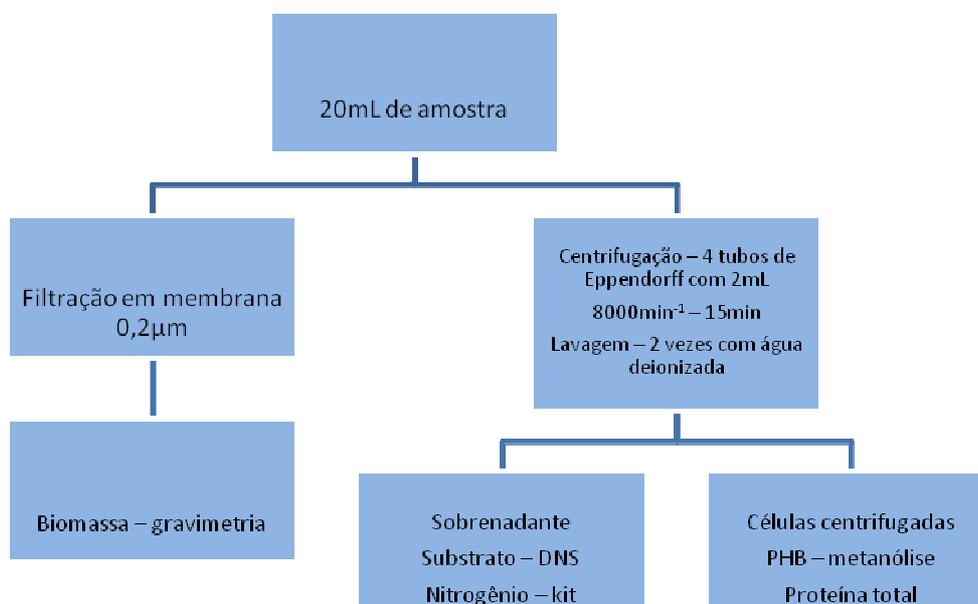


Figura 13 - Fluxograma do processamento das amostras para os ensaios conduzidos em biorreator.

3.1.3.1 Determinação da Concentração de Biomassa

A biomassa foi medida por gravimetria (ensaios conduzidos em biorreator). Leituras de absorbância das suspensões de células provenientes dos cultivos foram realizadas em um espectrofotômetro (LKB Biochron – Novaspec II), a 600 nm, e convertidas em concentração celular (g.L^{-1}) por meio de uma curva de correlação. A aplicação da curva de correlação só é possível para células que se encontravam na fase exponencial de crescimento, em função de alteração morfológica.

Para a construção da curva de correlação entre a absorvância e a concentração celular, células de *Ralstonia eutropha* DSM 545 foram cultivadas em meio mineral (MM). Após atingir uma absorvância de aproximadamente 2, a suspensão sofreu várias diluições. Cerca de 7 mL da suspensão de células provenientes do mesmo cultivo foram filtrados a vácuo, em membranas de poliamida (0,2 µm) previamente secas e pesadas. Após a filtração, as membranas foram novamente secas até peso constante (24 h a 90 °C). A massa resultante da diferença de peso das membranas com e sem células foi dividida pelo volume filtrado e a curva foi construída correlacionando-se a absorvância com a concentração celular (g.L⁻¹). A equação matemática obtida (2) utilizada apresenta um coeficiente de correlação (R²) igual a 0,9939:

$$X = \frac{(abs - 0,1255)}{1,85} \quad (\text{equação 2})$$

Onde:

X = concentração de células (g.L⁻¹)

Abs = absorvância da suspensão

3.1.3.2 Determinação da Concentração de PHAs (Metanólise)

Um volume de 2 mL de meio foi centrifugado e as células lavadas duas vezes com água deionizada, sendo depois congeladas e posteriormente submetidas à metanólise, conforme o método baseado em BRAUNEGG *et al.* (1988), com as modificações propostas por BRANDL *et al.* (1988). Em seguida, o PHB foi dosado por cromatografia gasosa.

Para elaboração da curva padrão, o polímero puro (Aldrich) foi pesado de forma a se obter massas entre 0,001 e 0,05 g. Os padrões foram submetidos à etapa de metanólise, bem como as amostras.

Metanólise

Foram acrescentados 2 mL de metanol acidificado e 2 mL de clorofórmio sobre as células; os tubos foram muito bem fechados (utilizou-se fita veda-rosca) e novamente suspensos no vórtex. Em seguida, os tubos foram levados ao banho termostático, com tampa, a 100 °C, durante 1 hora.

Decorrido esse tempo, os tubos foram retirados um a um e agitados no vórtex, voltando ao banho por mais 1h 20 min. Finalmente, os tubos foram retirados do banho quente e levados a um banho de gelo.

Após o abaixamento da temperatura até a temperatura ambiente, acrescentou-se 1mL de água destilada agitando-se novamente no vórtex por 30 segundos para a formação de duas fases. Com uma pipeta Pasteur, retirou-se a fase inferior (clorofórmio mais polímero) passando-a aos *vials* para a análise por cromatografia gasosa.

Cromatografia gasosa

A coluna utilizada para a dosagem de PHBV é de sílica fundida (\emptyset 0.53mm/30m) modelo Supercowax 10. O cromatógrafo é um CG–System 6890 marca Agilent equipado com um detector de ionização de chama (FID – hidrogênio e oxigênio). O gás de arraste utilizado foi hélio com fluxo constante de 3,5 mL.min⁻¹; as temperaturas de injeção e detecção foram de 250 °C com temperatura da coluna aumentando em rampa, de 80 °C a 200 °C (20 °C.min⁻¹).

3.1.3.3 Determinação da Concentração de Substrato

A determinação da concentração de substrato foi realizada com base no método do ácido 3-5-dinitrossalicílico DNS (MILLER, 1959). As amostras coletadas foram diluídas adequadamente de forma que a concentração de substrato se situasse entre os valores da curva padrão, cujas concentrações variaram de 0 a 2g/L de glicose e frutose. A 1 mL dessa suspensão foi acrescentado 1 mL de reagente de DNS e ela foi submetida a um tratamento térmico em banho de água a 100 °C por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados em banho de gelo e acrescidos de 10 mL de água deionizada. A absorbância foi lida a 540 nm em espectrofotômetro LKB Biochron – Novaspec II.

3.1.3.4 Determinação do Teor de Nitrogênio

Para verificação do consumo de nitrogênio foi utilizado o *kit* Uréia ES, baseado no método enzimático-colorimétrico Berthelot, para determinar a uréia no soro, no plasma e na urina.

Nesse método, a uréia é transformada em carbonato de amônio na presença de urease. O íon amônio, na presença de salicilato, hipoclorito e nitroprussiato (NP), forma azul de indofenol, conforme esquema a seguir, produto cuja intensidade da cor formada é diretamente proporcional à concentração de uréia na amostra.

Uréia -----urease-----> $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$

NH_4^+ + salicilato + hipoclorito -----NP-----> azul de indofenol

Reativos do kit

- Reativo 1: 100 mL de solução-tampão fosfato 0,1M, salicilato 0,3M, nitroprussiato de sódio 17 mM e EDTA 7 mM
- Reativo 2: 17 mL de hipoclorito de sódio 0,32M em NaOH 4,0M
- Reativo 3: 20 mL de solução de urease em tampão fosfato
- Reativo 4: solução padrão – 5 mL de solução aquosa de uréia 60 mg/dL
- Reativo 1 A: mistura de 5 partes do reativo 1 com 0,2 parte de reativo 3

O preparo das amostras (devidamente diluídas), assim como das soluções padrão e branco, foi realizado de acordo com a tabela 4.

Tabela 4. Volumes de água, amostra e reagentes utilizados na dosagem de nitrogênio

	Branco	Padrão	Amostra
Padrão	---	10 µL	---
Amostra	---	---	10 µL
Reativo 1A	1 mL	1 mL	1 mL
Misturar. Incubar exatamente 5 min a 37 °C. Adicionar:			
Reativo 2	1mL	1mL	1mL
Misturar. Incubar exatamente 5 min a 37 °C.			

A leitura da absorbância foi realizada a 600 nm em espectrofotômetro LKB Biochron – Novaspec II, zerando-se o aparelho com o branco. A reação é estável por até duas horas e a concentração de uréia foi calculada da seguinte forma:

$$Ur\acute{e}ia(mg / dL) = \frac{amostra}{padr\tilde{a}o} \times 60$$

(equação 3)

3.2 RECUPERAÇÃO DE PHA PRODUZIDO

3.2.1 Extração

A extração foi realizada usando-se um novo método adaptado por FORMOLO *et al.* (2005), com base em SCHNEIDER *et al.* (2001). Ao término de cada ensaio, cerca de 150 mL do meio foi congelado em frascos apropriados.

No momento da extração, o meio foi descongelado e homogeneizado, sendo retiradas alíquotas de 2 mL, que foram transferidas para tubos de Eppendorff e centrifugadas a 8.000 min⁻¹ por 15 min. O sobrenadante foi descartado; as células foram lavadas duas vezes com água destilada e centrifugadas conforme mencionado.

Em seguida foram adicionados 1 mL de clorofórmio e 1,25 g de pérolas de vidro com 0,75 mm de diâmetro. Os tubos de Eppendorff foram fechados, vedados com auxílio de fita crepe e levados ao moinho (Retsch) por 20 minutos em rotação máxima, para quebra das paredes celulares. Os tubos de Eppendorff foram novamente centrifugados a 8.000 min⁻¹ por 15 min. Houve formação de três camadas: a inferior composta pelas pérolas de vidro; a intermediária contendo clorofórmio e polímero dissolvido e a superior formada pelos rejeitos (*debris*) celulares. Com auxílio de uma pipeta automática, retirou-se a fase intermediária, que foi vertida em placas de Petri, as quais foram deixadas para secagem à temperatura ambiente.

3.2.2 Purificação (Recristalização)

Como o filme formado por esse processo ainda contem muitas impurezas, foi necessário um processo de purificação em n-hexano.

O polímero foi dissolvido em clorofórmio na razão de 1% m/V em recipiente fechado, sendo aquecido (máximo de 80 C) sob agitação magnética. Após a total dissolução, verteu-se essa solução em n-hexano na proporção de 1:2 (v:v), sem aquecimento, mas sob constante agitação. Imediatamente foram formados cristais

poliméricos, recuperados por filtração a vácuo. O produto seco retido na membrana foi pesado novamente e dissolvido em clorofórmio na concentração de 0,1g/L, vertido sobre uma placa de Petri e deixado evaporar para formação do filme em uma cuba de vidro onde o solvente foi eliminado em atmosfera saturada de clorofórmio para evitar a separação de fases que deve ocorrer por ação da umidade (Figura 14).

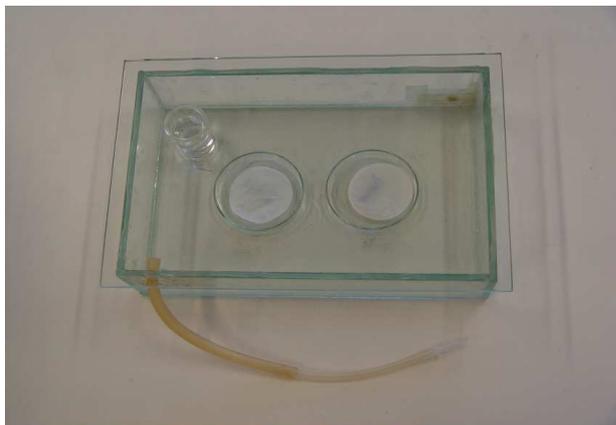


Figura 14: Cuba de vidro para formação do filme por evaporação lenta de solvente.

3.3 PREPARAÇÃO DOS FILMES DE PHB/PEG E PHBV/PEG POR EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE (CASTING)

O PHB utilizado nesta pesquisa foi fornecido pela PHB Industrial S.A. e apresenta massa molar numérica média de $3,0 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, obtida por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC).

O PHBV, também fornecido pela PHB Industrial S.A., apresenta 3,6 % de unidades 3HV em sua composição, com massa molar igual a $2,0 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$.

O PEG utilizado para preparar as misturas apresenta massa molar numérica média de 1.350 e 1.650 g.mol^{-1} e foi fornecido pela empresa Cromato Produtos Químicos Ltda.

Os filmes de PHB/PEG e PHBV/PEG foram preparados nas proporções de 100/0; 98/2; 95/5; 90/10; 80/20; 50/50; 20/80 a 5% m/V, e caracterizados por FTIR para comprovação das bandas, em um equipamento Perkin Elmer Spectrum One B, com número de onda variando entre $4000\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$. Utilizando o método ATR (Anexo I).

PHB/PEG e PHBV/PEG foram dissolvidos em clorofórmio a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação constante. O PEG também foi dissolvido em clorofórmio, porém a uma temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação. Após a completa solubilização dos polímeros, as

soluções foram misturadas, vertidas em placas de Petri com 10 cm de diâmetro e dispostas em uma cuba de vidro com atmosfera saturada de clorofórmio praticamente isenta de umidade, que foi controlada pela adição de sílica-gel no interior da cuba. Após secagem dos filmes nas cubas de vidro, os filmes foram levados para estufa a vácuo por 24 horas à 30 °C, com 500 mmHg, para retirada do excesso de clorofórmio.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE PHB/PEG E PHBV/PEG

Os polímeros foram caracterizados por difratometria de raios-X (DRX), calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TGA), microscopia eletrônica de varredura (MEV), Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

3.4.1 Difratometria de Raios-X (DRX)

Os difratogramas de raios-X das amostras foram obtidos em um difratômetro de raios-X da marca SHIMADZU, modelo XRD 6000, com fonte de radiação $\text{CuK}\alpha$, sendo a análise feita com ângulo 2θ variando de 4 a 40°. O comprimento de onda utilizado foi de $\lambda=1,54060 \text{ \AA}$, voltagem de 40,0 kV e corrente de 30,0 mA. A análise de DRX será utilizada para identificação de picos de difração em 2θ , utilizada juntamente com a análise de FT-IR para identificação do material em estudo.

3.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise de DSC foi utilizada com o objetivo de identificar a temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m) e grau de cristalinidade (α_c).

O grau de cristalinidade (α_c) para as misturas de PHB com PEG foi calculado pela razão entre a variação do calor de fusão das misturas pela variação do calor de fusão dos polímeros 100% cristalinos. Tsuji & Ikada (1996) estabeleceram que o ΔH_m^0 para o PHB 100% cristalino é igual a 142 J.g^{-1} e mais recentemente Gunaratne *et al.* (2005) adotou o valor de ΔH_m^0 igual a 146 J.g^{-1} , referência adotada neste trabalho. Foi calculado o α_c para as amostras de PHB com PEG utilizando o valor

do calor de reação ($\Delta H_m(\text{J.g}^{-1})$) obtidos a partir do segundo aquecimento das amostras.

$$\alpha_c = ((\Delta H_m * w_{P(3HB)}) / (\Delta H_m^0)) * 100 \quad (\text{equação 4})$$

Em que:

α_c = grau de cristalinidade da amostra (%)

ΔH_m = variação da entalpia de fusão da amostra (J.g^{-1}), obtido por DSC

ΔH_m^0 = variação da entalpia de fusão para o PHB (J.g^{-1}), 100% cristalino.

$w_{P(3HB)}$ = porcentagem em massa do PHB

As medidas no DSC foram realizadas num equipamento da TA Instruments. As amostras foram seladas em painéis de alumínio e aquecidas, em atmosfera de nitrogênio, de 25 a 200 °C com taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C.min}^{-1}$, seguida de resfriamento de 200 a -90 °C a $10^\circ\text{C.min}^{-1}$ e segundo aquecimento de -90 a 200 °C a $10^\circ\text{C.min}^{-1}$.

3.4.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise de TGA foi efetuada com o objetivo de se verificar a estabilidade térmica dos polímeros obtidos. Foram determinadas a temperatura de onset (T_{onset}) e temperatura máxima de degradação (T_{max}), visando determinar a degradação térmica e porcentagem de perda de massa.

As análises de TGA foram realizadas em um equipamento da TA Instruments. As amostras foram aquecidas de 25 a 600 °C a uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C.min}^{-1}$, sob atmosfera de argônio.

3.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os fragmentos dos filmes fraturados foram fixados em um suporte metálico e recobertos com uma fina camada de ouro, utilizando-se um metalizador de amostras BAL-TEC SCD 050 e foram observados ao microscópio eletrônico de varredura

(MEV), em um equipamento Zeiss DSM 940A, sob tensão de 20 kV, com aumentos de 200 e 1000 X.

3.4.5 Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC)

Foram utilizadas análises de SEC para caracterizar propriedades físicas como a faixa de distribuição de massa molar das amostras com diferentes proporções e ainda, observar o nível de degradação das amostras de PHB.

O primeiro passo nas análises de cromatografia de exclusão por tamanho é a calibração do sistema. Foram utilizados padrões de poliestireno (PS) de faixa estreita de massa molar.

As análises foram feitas em um HPLC modelo D-7000IF, da Merck Hitachi, com detector RID 71 (índice de refração).

As condições de fluxo foram: isocrático com fluxo de clorofórmio 1mL/min, a temperatura do forno 40 °C e volume de injeção 10uL.

As amostras foram dissolvidas em clorofórmio a 40 °C por 30 min, sendo 20 mg da blenda para 10 mL de clorofórmio sob agitação.

3.4.6 Ressonância Magnética Nuclear de prótons (RMN ^1H)

A obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foi realizada a temperatura ambiente, utilizando clorofórmio deuterado como solvente. As amostras foram dissolvidas em clorofórmio após 24 horas (não consecutivas) de agitação. No entanto, os espectros foram obtidos após filtração das soluções dessas amostras. O Equipamento utilizado foi Bruker – 250 MHz.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE PHB E PHBV COM PEG

4.1.1 DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X (DRX)

O perfil de difração para os homopolímeros puros (PHB e PHBV) e as misturas estão mostrados nas Figuras 15 e 16, respectivamente. Observaram-se os seguintes valores de 2θ para o PHB, correspondentes aos respectivos planos cristalinos: $13,66^\circ$ (reflexão 020); $16,98^\circ$ (reflexão 110); $20,15^\circ$ (reflexão 021); $21,7^\circ$ (reflexão 101); $25,48^\circ$ (reflexão 121); $27,80^\circ$ (reflexão 070) e $30,35^\circ$ (reflexão 002). Perfis de difração similares foram encontrados por Conti (2006) e Garcia (2006).

Para o PHBV observaram-se os seguintes valores de 2θ correspondentes aos respectivos planos cristalinos: $13,5^\circ$; $16,9^\circ$; 20° ; 22° ; $25,5^\circ$; 27° e 30° (WESSLER, 2007).

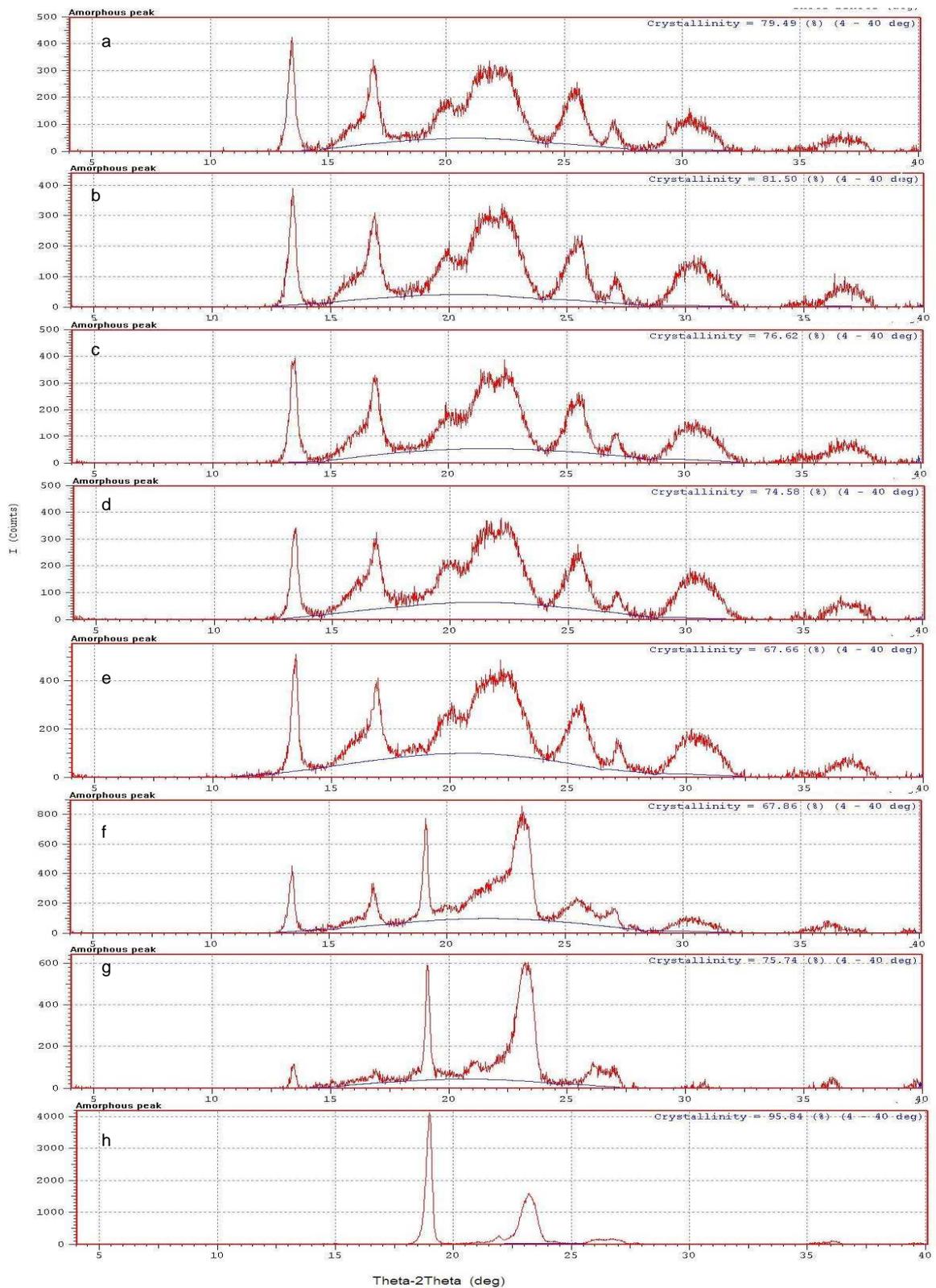


Figura 15 – Difração de raios-X das misturas de PHB/PEG : a) 100/0, b) 98/02, c) 95/05, d) 90/10, e) 80/20, f) 50/50, g) 20/80 e h) 0/100.

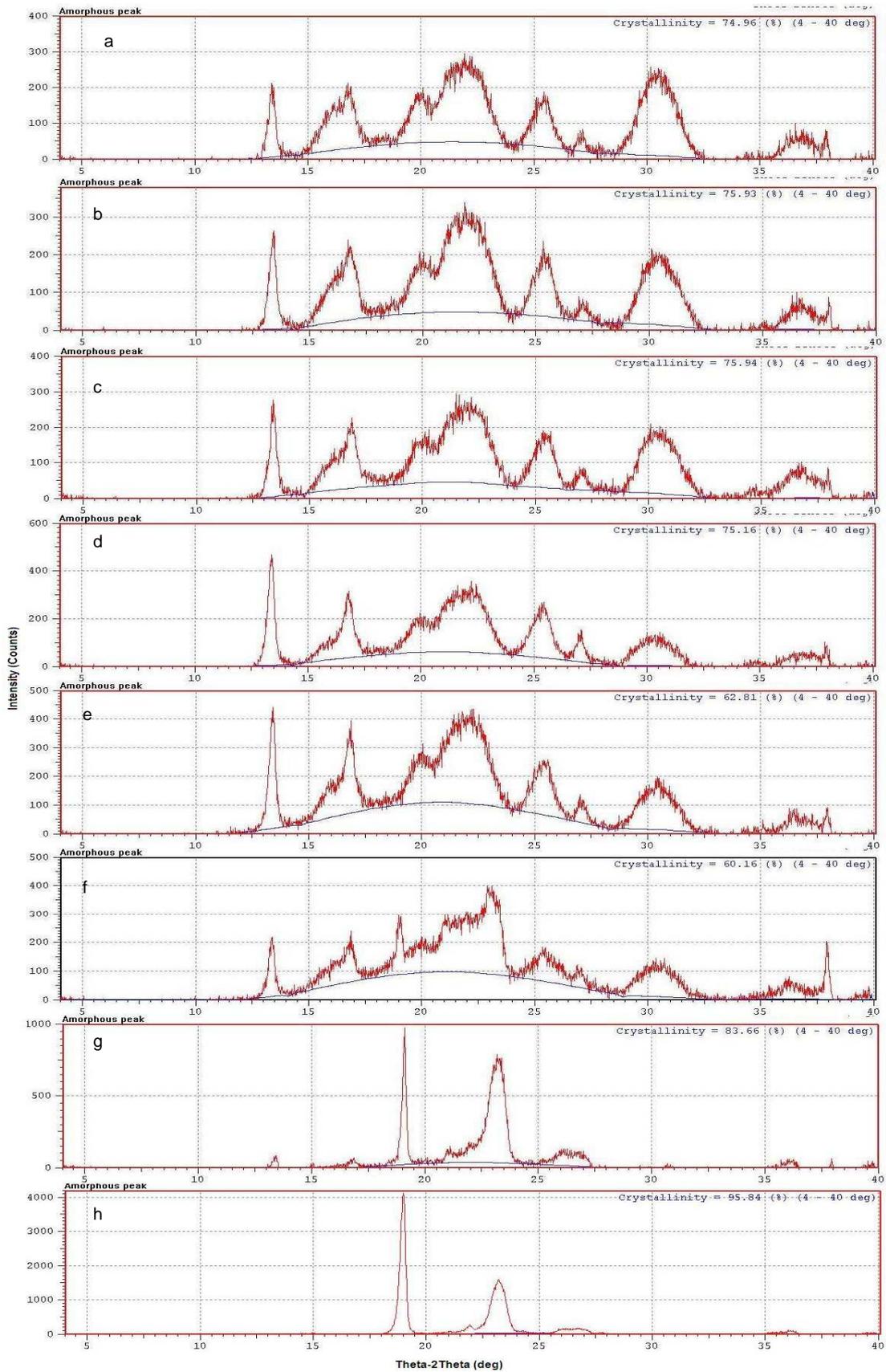


Figura 16 - Difração de raios-X das misturas de PHBV/PEG: a) 100/0, b) 98/02, c) 95/05, d) 90/10, e) 80/20, f) 50/50, g) 20/80 e h) 0/100.

Para os filmes de PHB/PEG, observa-se na Figura 17 que o grau de cristalinidade calculado por DRX, variou de 67 a 95 %. Com adição de até 10 % de PEG, a cristalinidade permaneceu constante por volta de 75 %, similar ao PHB puro. Entre 20 e 50 % de PEG, observou-se uma diminuição do grau de cristalinidade para valores de cerca de 67 %. Adicionando-se 80 % de PEG, a cristalinidade aumentou para 90 %, em função da alta porcentagem do polímero mais cristalino.

Na Figura 18 observa-se que o grau de cristalinidade das misturas de PHBV/PEG calculado por DRX variou de 60 % a 90 %. Até 10 % de PEG na mistura, a cristalinidade do polímero manteve-se em cerca de 75 %, semelhante ao PHBV puro. Entre 20 e 50% de PEG na mistura, foi observada uma diminuição no grau de cristalinidade com valores em torno de 60 %. Adicionando 80 % de PEG, a cristalinidade aumentou para cerca de 90 %. Este perfil pode ser explicado devido à alta cristalinidade do PEG.

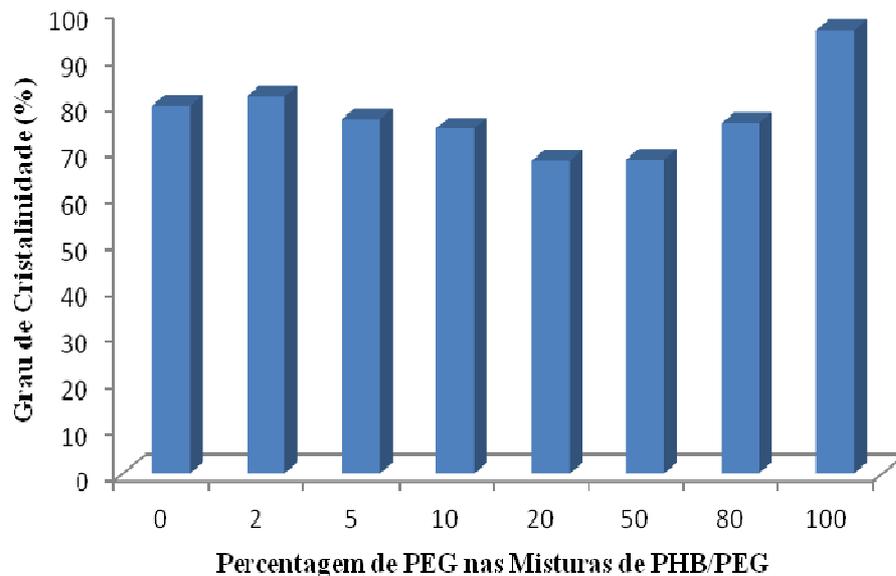


Figura 17: Influência do percentual de PEG no grau de cristalinidade dos filmes de PHB/PEG.

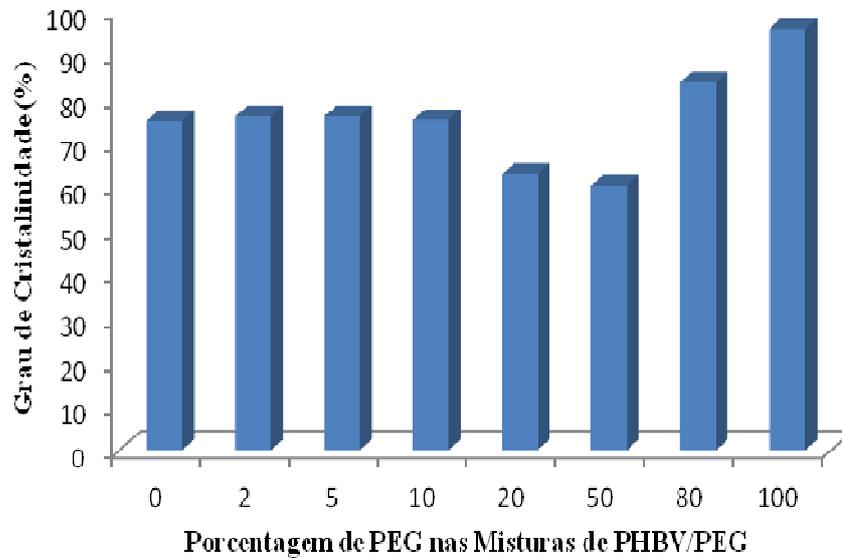
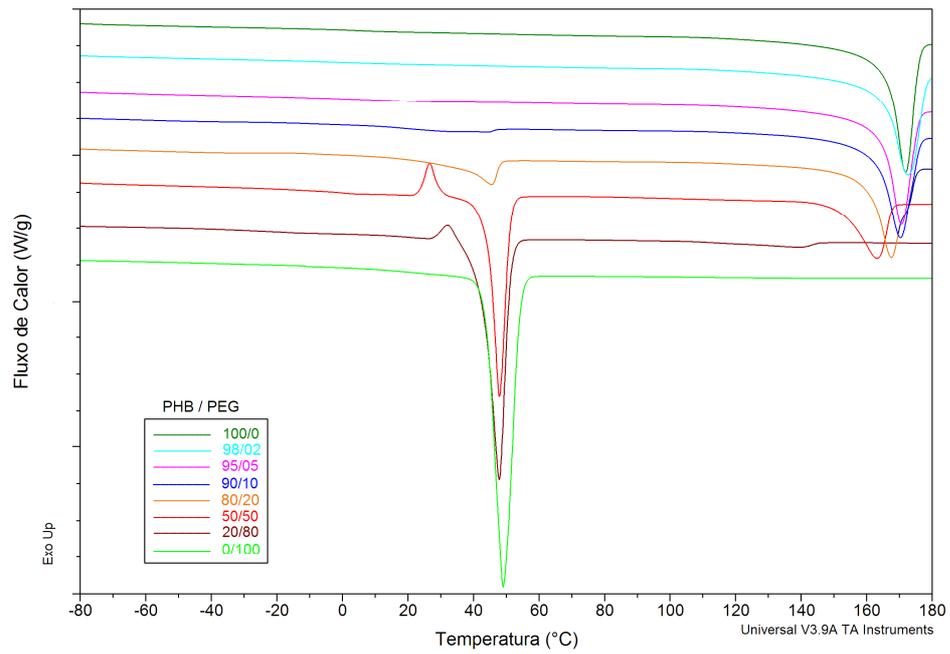


Figura 18: Influência do percentual de PEG no grau de cristalinidade dos filmes de PHBV/PEG .

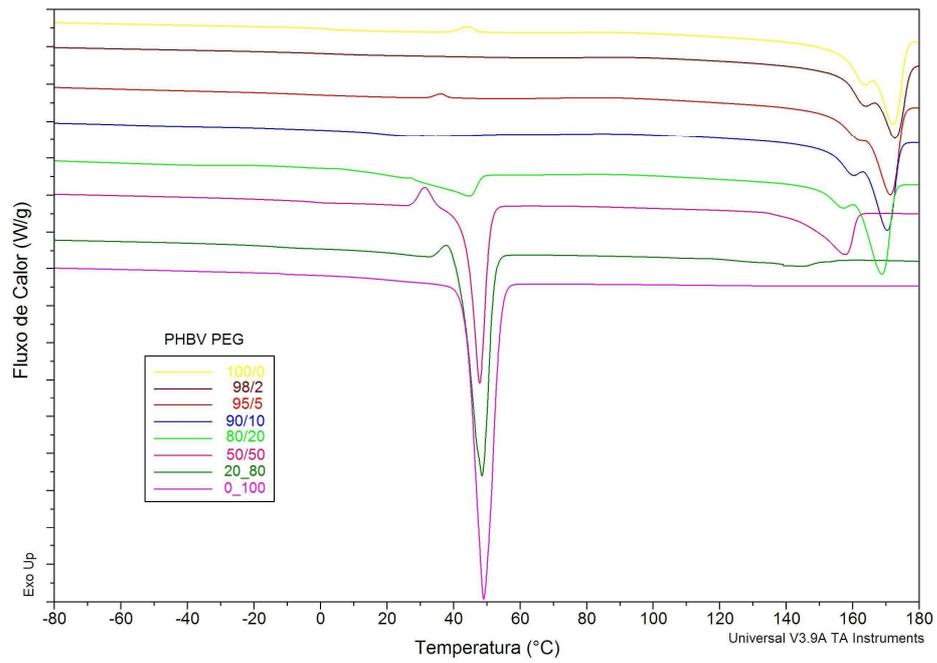
4.1.2 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

Os termogramas de DSC para os filmes de PHB/PEG e PHBV/PEG obtidos do segundo aquecimento são mostrados na Figura 19a e 19b, respectivamente. O PHB puro apresentou um pico endotérmico correspondente à temperatura de fusão ($T_m = 172$ °C). A T_m do PHB manteve-se constante com a adição de até 10 % de PEG. Para a amostra de 20 % de PEG a T_m do PHB diminuiu para 167 °C. Com 50 e 80 % de PEG, a T_m diminuiu ainda mais, passando para 163 e 140 °C, respectivamente.

O PHBV puro mostrou um pico endotérmico correspondente a um ponto de fusão em 172 °C, um segundo pico na temperatura mais baixa (163 °C). Os picos de fusão dupla de PHBV são característicos deste polímero no segundo aquecimento. A T_m do PHBV manteve-se constante com a adição de até 10 % de PEG. Para a amostra com 20 % de PEG a T_m de PHBV diminuiu 3 °C de 172 °C a 169 °C. Com 50 e 80 % de PEG, a T_m de PHBV diminuiu de 14 e 27 °C, respectivamente.



a)



b)

Figura 19 – Curvas de DSC para os filmes de a) PHB/PEG; b)PHBV/PEG obtidos do segundo aquecimento.

O grau de cristalinidade para as misturas de PHB e PHBV com PEG também podem ser calculados pela razão entre a variação do calor de fusão das misturas pela variação do calor de fusão dos polímeros 100 % cristalinos. Foi calculado o α_c para as amostras de PHB com PEG utilizando o valor da entalpia de fusão ($\Delta H_m(\text{J.g}^{-1})$) obtidos a partir do segundo aquecimento das amostras. Observou-se diminuição do α_c para o PHB em função do aumento de PEG na mistura, decrescendo de 60,8 para PHB puro para 0,5 % para a mistura PHB/PEG 20/80. Um decréscimo do grau de cristalinidade também foi observado para o PHBV nas misturas de PHBV/PEG. Entretanto, estes valores são diferentes daqueles determinados por DRX, pois foram calculados em função do percentual de PHB na mistura, enquanto o resultado do DRX fornece o valor do α_c da mistura. Para o cálculo do α_c das misturas de PHBV/PEG, foi utilizado o mesmo valor de ΔH_m^0 do PHB, devido ao fato do percentual de PHV do copolímero ser muito baixo.

Os valores de temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade (α_c (%)) obtidos do segundo aquecimento das curvas de DSC, para as misturas de PHB/PEG e PHBV/PEG estão sumarizados na Tabela 5.

Tabela 5: Dados da temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade (α_c (%)) para filmes de PHB/PEG e PHBV/PEG obtidas por DSC.

Amostra PHB/PEG	T_{m1} (°C)	* ΔH_{m1} (J.g ⁻¹)	T_{m2} (°C)	** ΔH_{m2} (J.g ⁻¹)	ΔH_{m2} (J.g ⁻¹) W PHB	α_c (%) PHB**
100/0	-----	-----	172	89	89	60,8
98/2	-----	-----	173	86	84	57,5
95/5	-----	-----	171	80	76	52,0
90/10	34	8	170	79	71	48,8
80/20	46	21	167	72	58	39,6
50/50	48	77	163	45	23	15,5
20/80	48	122	140	3	1	0,5
0/100	49	171	-----	-----	-----	-----
Amostra PHBV/PEG	T_{m1} (°C)	* ΔH_{m1} (J.g ⁻¹)	T_{m2} (°C)	** ΔH_{m2} (J.g ⁻¹)	ΔH_{m2} (J.g ⁻¹) W PHBV	α_c (%) PHBV**
100/0	-----	-----	163 172	90	90	61,4
98/2	-----	-----	163 173	85	83	57,2
95/5	-----	-----	161 171	89	84	57,7
90/10	27	1	160 170	85	76	52,4
80/20	45	7	156 169	78	62	42,5
50/50	48	35	158	40	20	13,8
20/80	49	88	145	8	2	1,1
0/100	49	171	-----	-----	-----	-----

T_{m1} – Temperatura de fusão do PEG

T_{m2} – Temperatura de fusão do PHB e PHBV

* Calculado em função do percentual de PEG nas misturas

** Calculado em função do percentual de PHB e PHBV nas misturas

A T_m dos filmes de PHB/PEG diminuiu com o aumento da adição do plastificante (PEG). De acordo com Parra *et al.* (2006), o PEG provavelmente enfraquece as forças intermoleculares entre as cadeias adjacentes do polímero, e conseqüentemente altera o volume livre, reduzindo a temperatura de fusão. Isto ocorre devido ao aumento do movimento entre cadeias (CONTI *et al.*, 2006).

O mesmo comportamento da T_m pode-se observar para as misturas de PHBV/PEG, porém para PHBV, o uso de plastificantes tem um efeito similar ao aumento da concentração molar de 3HV, ou seja, há uma diminuição da T_g que pode ser explicada pelo uso de plastificantes (PEG), isso ocorre devido à maior circulação das correntes, porque o plastificante reduz a gravidade das forças intermoleculares.

No entanto, a T_g não pode ser determinada devido à alta cristalinidade dos polímeros.

4.1.3 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

Os resultados de perda de massa, T_{onset} e T_{max} das misturas de PHB/PEG e PHBV/PEG são apresentados na tabela 7.

Para a mistura de PHB/PEG observa-se que o PEG apresenta um estágio de perda de massa com 88 %, T_{onset} de 392 °C e T_{max} de 410°C. Enquanto que o PHB apresentou um estágio de perda de massa com 98 %, T_{onset} de 288°C e T_{max} de 303°C.

Para a mistura de PHBV/PEG observa-se que o PHBV apresentou um estágio de perda de massa com 97 %, T_{onset} de 288 °C e T_{max} de 303 °C, valores muito similares ao PHB puro. Isto pode ser explicado devido ao PHBV ter apenas 3,6% de 3HV no copolímero.

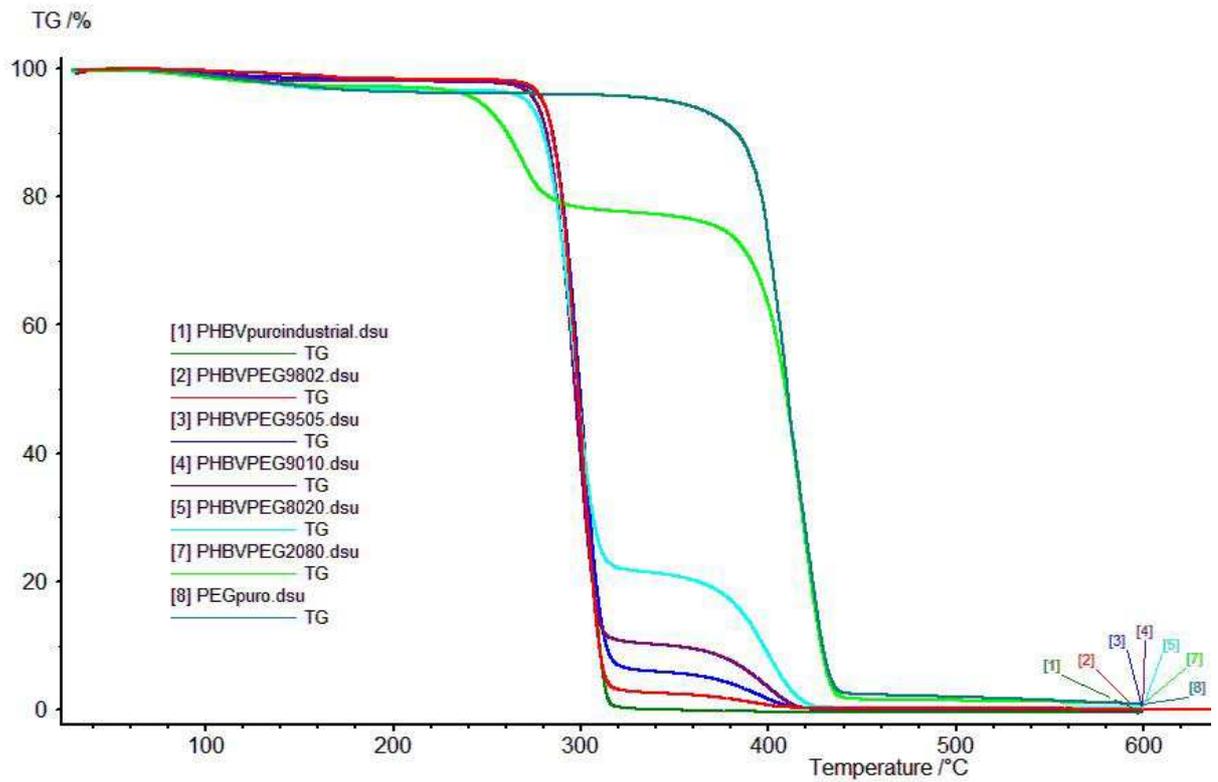
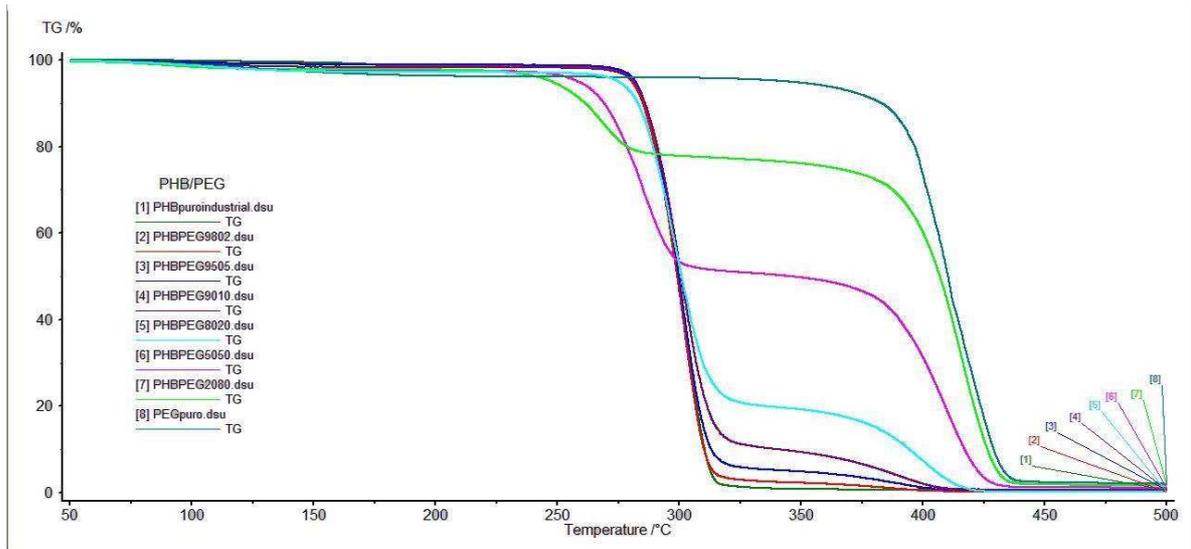
Tabela 6: Dados de T_{onset} (°C), perda de massa (%), e T_{max} (°C) dos filmes de PHB/PEG e PHBV/PEG.

PHB/PEG	T_{onset1} (°C)	Perda de massa 1 (%)	T_{max1} (°C)	T_{onset2} (°C)	Perda de massa 2 (%)	T_{max2} (°C)
100/0	288	98	303	-	-	-
98/02	288	94	302	370	1	388
95/05	288	90	301	367	3	392
90/10	287	82	302	368	6	390
80/20	284	71	299	379	16	401
50/50	268	41	285	388	44	410
20/80	252	16	269	397	68	416
0/100	-	-	-	392	88	410
PHBV/PEG	T_{onset1} (°C)	Perda de massa 1 (%)	T_{max1} (°C)	T_{onset2} (°C)	Perda de massa 2 (%)	T_{max2} (°C)
100/0	288	97	303	-	-	-
98/02	287	94	301	371	1	391
95/05	287	89	302	373	4	396
90/10	284	84	298	376	8	400
80/20	283	70	298	380	18	401
50/50	-	-	-	-	-	-
20/80	250	15	269	399	71	416
0/100	-	-	-	392	88	410

Nas figuras 20a e 20b observa-se que a T_{onset} do PEG é maior que a do PHB e PHBV puros, isto mostra que o PEG é mais estável termicamente que o PHB e PHBV. As misturas de PHB/PEG com composição 50/50 e 20/80 apresentaram dois picos de T_{onset} , uma característica do PHB e outra característica do PEG. Nas misturas de PHBV/PEG pode-se verificar o mesmo comportamento térmico para as composições.

Observa-se também que com o aumento da fração de PEG na mistura há um aumento na estabilidade do polímero em função da temperatura de início de degradação do PHB.

a)



b)

Figura 20 – TGA dos filmes de a) PHB/PEG e b) PHBV/PEG.

4.1.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A morfologia da superfície superior dos filmes de PHB/PEG e PHBV/PEG é mostrada nas figuras 21 e 22, respectivamente. As micrografias de superfície revelaram que a morfologia do PHB é diferente do PHB/PEG 20/80, com os domínios do PHB menores que os da mistura com maior teor de PEG. Para as outras misturas, não é possível distinguir a presença de duas fases distintas, observando-se uma morfologia homogênea, com exceção das composições 50/50 e 20/80, na qual podem ser observadas claramente duas fases nestas composições.

Para esta composição, a fase mais escura foi atribuída ao PHB, enquanto a fase mais clara ao PEG, devido à similaridade da fase mais clara com a amostra 20/80, contendo maior teor de PEG.

Cabe destacar que não foi possível obter um filme de PEG puro, porque o PEG é muito plastificante e não forma filme. Por isso, não foi realizado MEV deste polímero.

Para o PHBV/PEG, o mesmo comportamento foi observado, ou seja, a presença de duas fases para as composições 50/50 e 20/80.

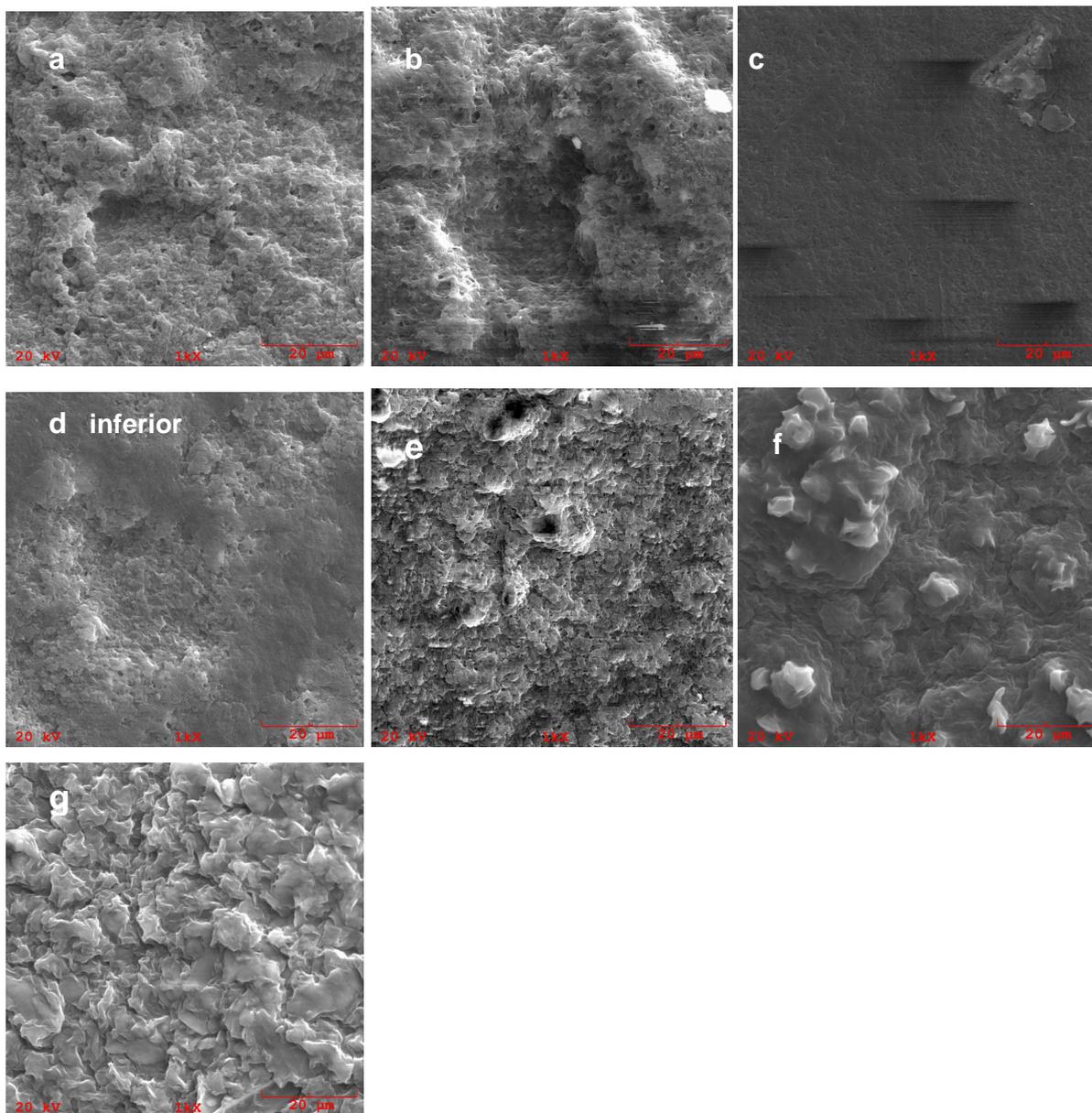


Figura 21 – Micrografias de MEV da superfície superior dos filmes de PHB/PEG. 1000X: a) 100/0, b) 98/02, c) 95/05, d) 90/10, e) 80/20, f) 50/50, g) 20/80.

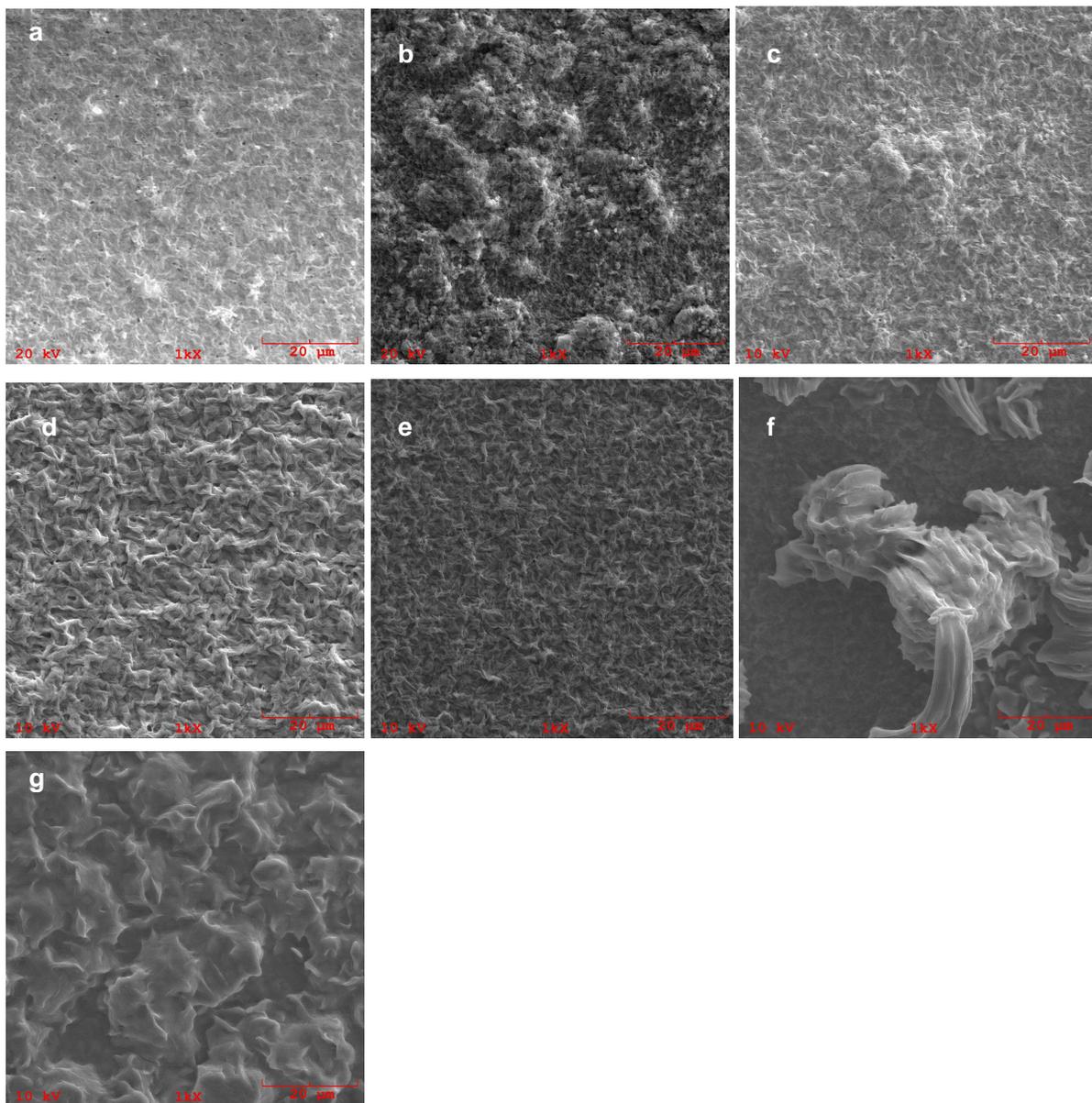


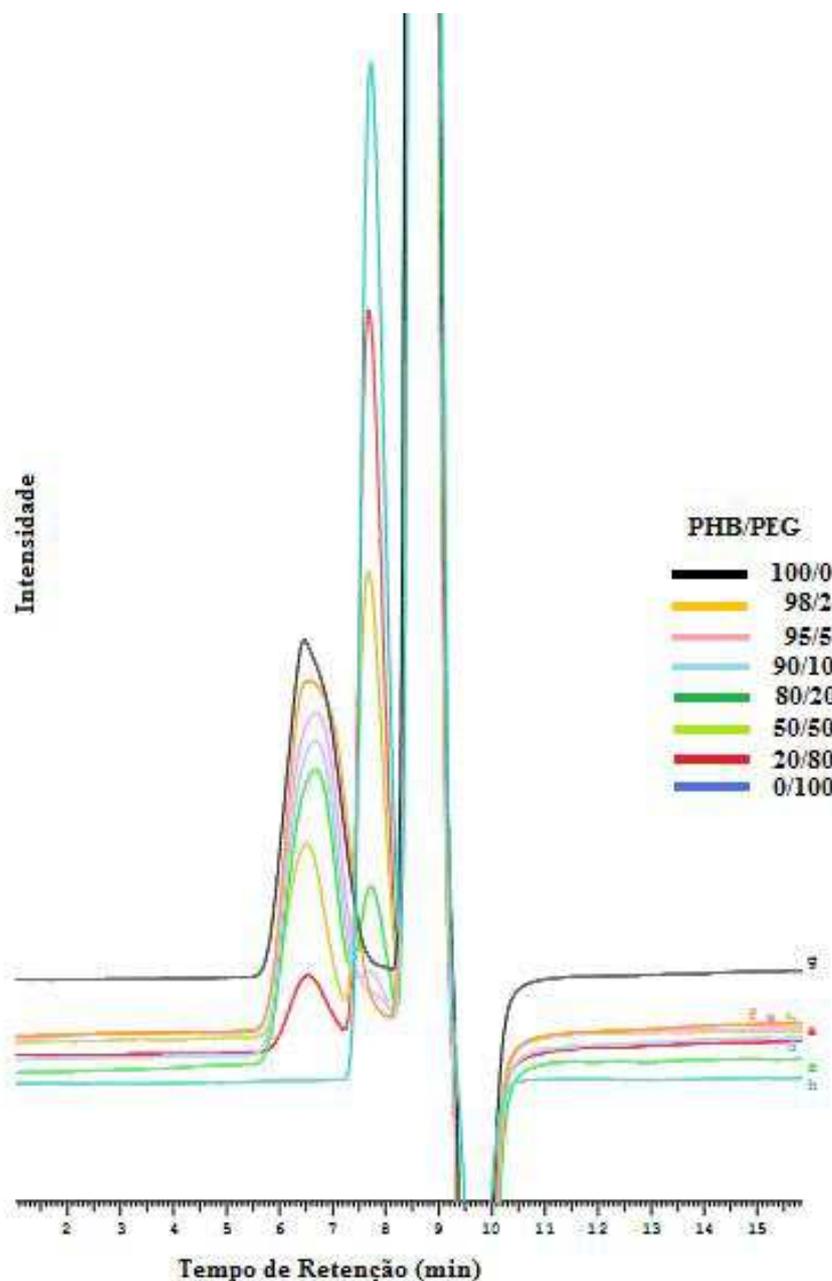
Figura 22 – Micrografias de MEV da superfície superior dos filmes de PHBV/PEG. 1000X: a) 100/0, b) 98/02, c) 95/05, d) 90/10, e) 80/20, f) 50/50, g) 20/80.

4.1.5 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO (SEC)

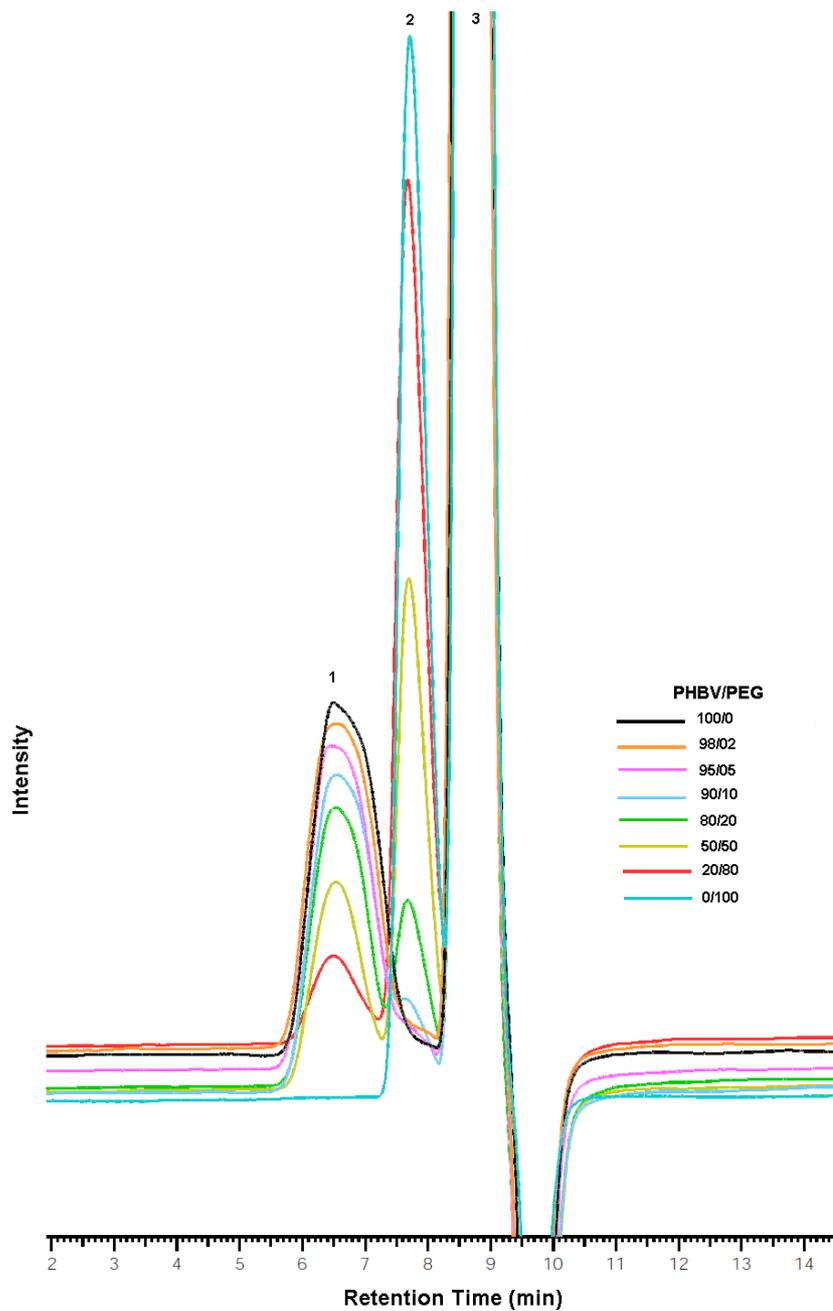
As curvas de SEC das misturas de PHB/PEG e PHBV/PEG são mostradas nas Figuras 23a e 23b, respectivamente. O PHB apresentou $M_w = 312.000 \text{ g.mol}^{-1}$ e o PHBV apresentou $M_w = 207.000 \text{ g.mol}^{-1}$, enquanto que o PEG tem $M_w = 1.350 - 1.650$ (Cromato Química). No entanto, misturas de PHB/PEG mostraram dois picos de eluição bem resolvidos, respectivamente. Um pico com maior tempo de retenção

foi designado ao PEG, enquanto outro pico de eluição com menor tempo de retenção foi designado ao PHB, no qual tem uma maior massa molecular quando comparado ao PEG puro. Como pode ser observado, o pico de eluição do PHB diminui de intensidade com o aumento do teor de PEG, que tem uma massa molecular menor, proporcionando picos mais elevados devido ao tempo de retenção da amostra ser maior.

As misturas de PHBV/PEG mostraram o mesmo comportamento observado para os filmes de PHB/PEG.



a)



b)

Figura 23 – SEC dos filmes de a) PHB/PEG e b) PHBV/PEG .

Na Figura 24 observa-se o gráfico de SEC para o PHB puro sintetizado através da bactéria *Cupriavidus necator*. Com os dados da curva de SEC para este polímero, verifica-se que a massa molar do polímero sintetizado é de $M_w = 571.000 \text{ g.mol}^{-1}$, o que significa uma alta massa molar.

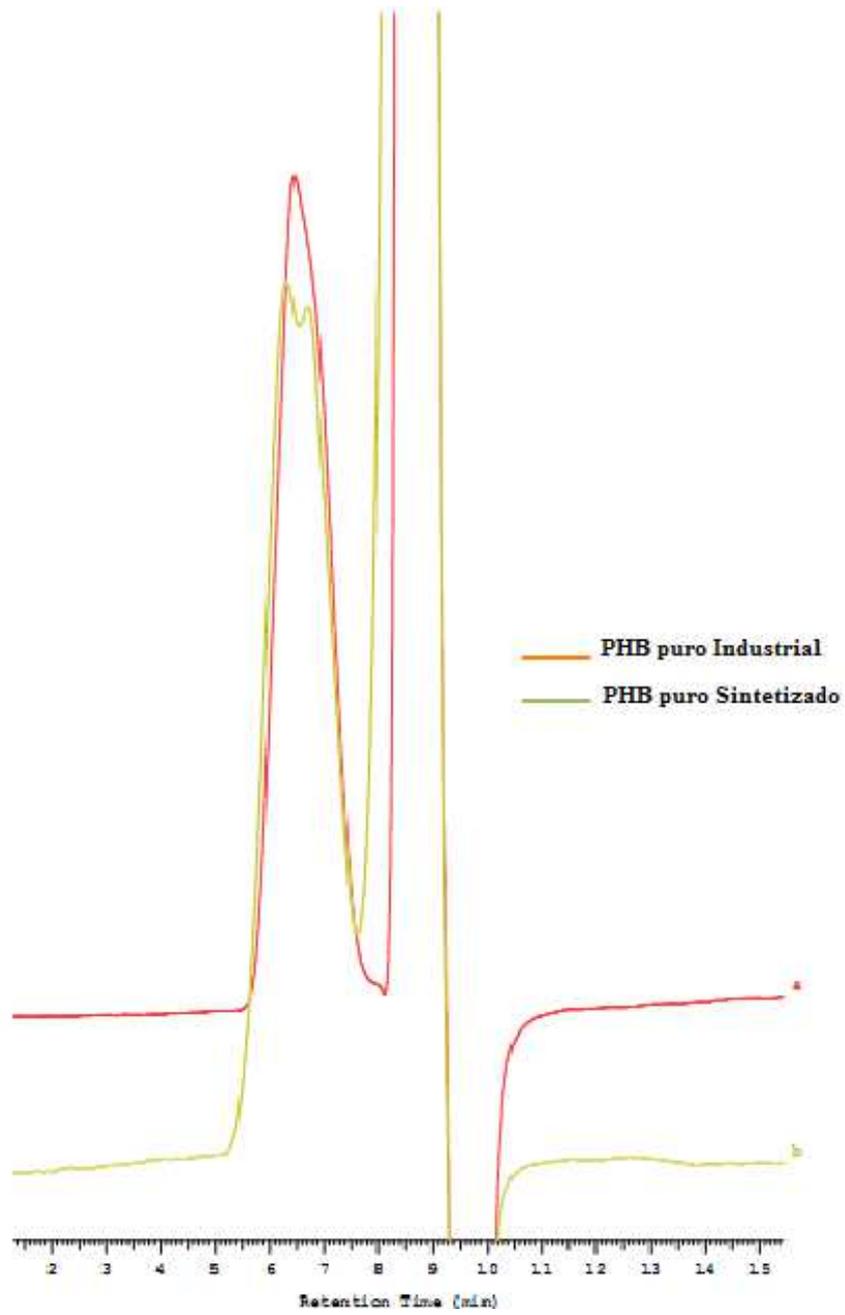


Figura 24 – SEC do PHB puro sintetizado por *Cupriavidus necator*.

5. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE PHB COM ÁCIDO OLEICO E PHBV SINTETIZADOS

5.1 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTONS (RMN ^1H)

Para confirmar a produção do PHB na síntese foram feitas análises de RMN ^1H com o PHB Industrial e sintetizado, conforme segue nas figuras 25a e 25b, respectivamente. Os deslocamentos dos picos de ressonância observados para o espectro de RMN ^1H do PHB (Figura 25a e b) estão de acordo com aquele publicado por SIMON-COLIN *et al.*, (2008), são atribuídos como se segue : a $\delta = 5,22$ ppm referente aos prótons metino HB (3b); a região em cerca de 2,56 ppm atribuída aos prótons metileno HB(4b) e um dublete a 1,28 ppm referente aos prótons metil HB (1b).

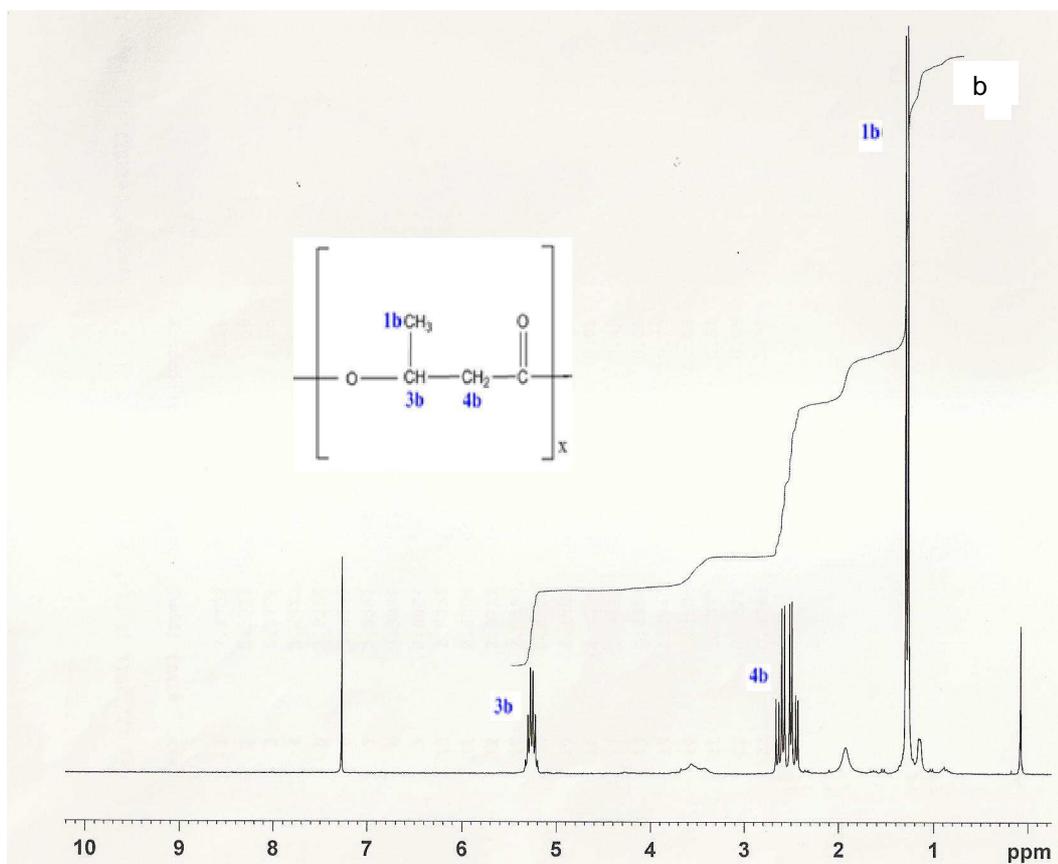
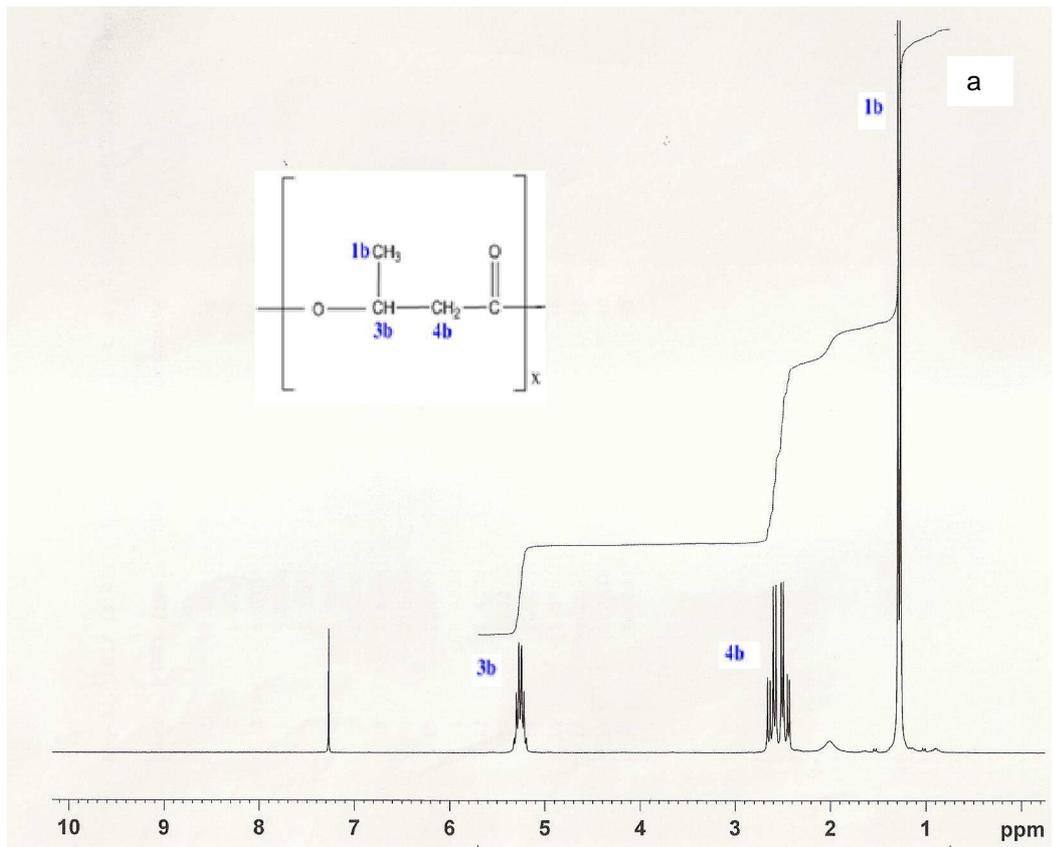


Figura 25 –RMN ^1H do PHB Industrial (a) e Sintetizado (b).

A partir da análise de RMN ^1H pode-se verificar o percentual de HV no PHBV. Os espectros de RMN ^1H do PHBV industrial e sintetizado são mostrados nas figuras 26a e 26b, respectivamente.

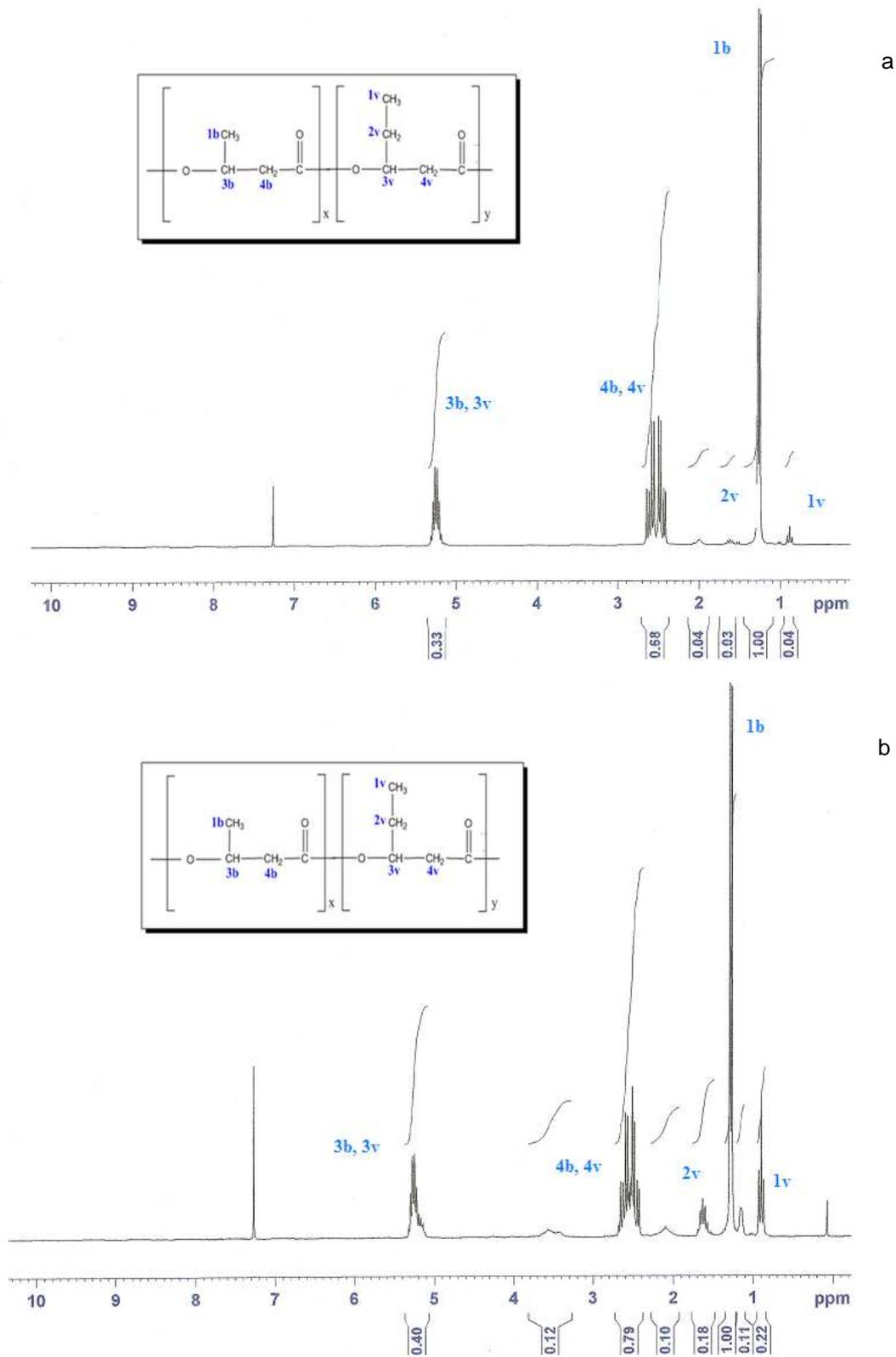


Figura 26 – RMN ^1H do PHBV Industrial (a) e Sintetizado (b).

Os deslocamentos dos picos de ressonância observados para o espectro de RMN ^1H do PHBV (Figura 26a e 26b) estão de acordo com aquele publicado SIMON-COLIN *et al.*, (2008), e são atribuídos como se segue : à $\delta = 5,22$ ppm, protons metino HB e HV (3b) (3v); a região em cerca de 2,56 ppm, protons metileno HB e HV (4b) (4v) ; à 1,65 ppm multiplete, protons metileno HV (2v); à 1,28 ppm dublete, protons metil HB (1b), et à 0,89 ppm (triplete), protons metil HV (1v). A fração molar de HV no PHBV foi determinada integrando-se o pico referente ao HB (1b) em 1,5 ppm e calculado em relação ao pico do HV (1v) que foi de 22%.

Isto mostra que o percentual de HV no PHBV sintetizado aumentou muito em relação ao PHBV industrial, sendo ótimo para a aplicação desejada, pois diminui a cristalinidade do polímero, acelerando sua degradação.

5.2 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO (SEC)

As curvas de SEC para PHB e PHBV são mostradas nas Figuras 27a e 27b, respectivamente. As curvas de SEC para o PHB sintetizado com ácido oleico (PHB AO), PHB sintetizado sem AO e PHB industrial, apresentaram tempo de retenção similares, mostrando que a faixa de massa molar também é similar, na ordem de 300.000 a 600.000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Com esses resultados, observa-se que PHB AO não atingiu o objetivo desejado neste trabalho, sugerindo-se assim, que posteriormente seja feito um trabalho estudando diferentes estratégias de fermentação, a fim de se conseguir um polímero com baixa massa molar.

O PHBV sintetizado apresentou um tempo de retenção ligeiramente superior em relação ao PHBV industrial, sendo assim a massa molar do PHBV sintetizado é menor que o industrial, alcançando assim um dos objetivos desejados.

No entanto, sugere-se que posteriormente, seja feito um trabalho na síntese microbiana, com diferentes estratégias de cultivo, garantindo um polímero com melhores propriedades de massa molar.

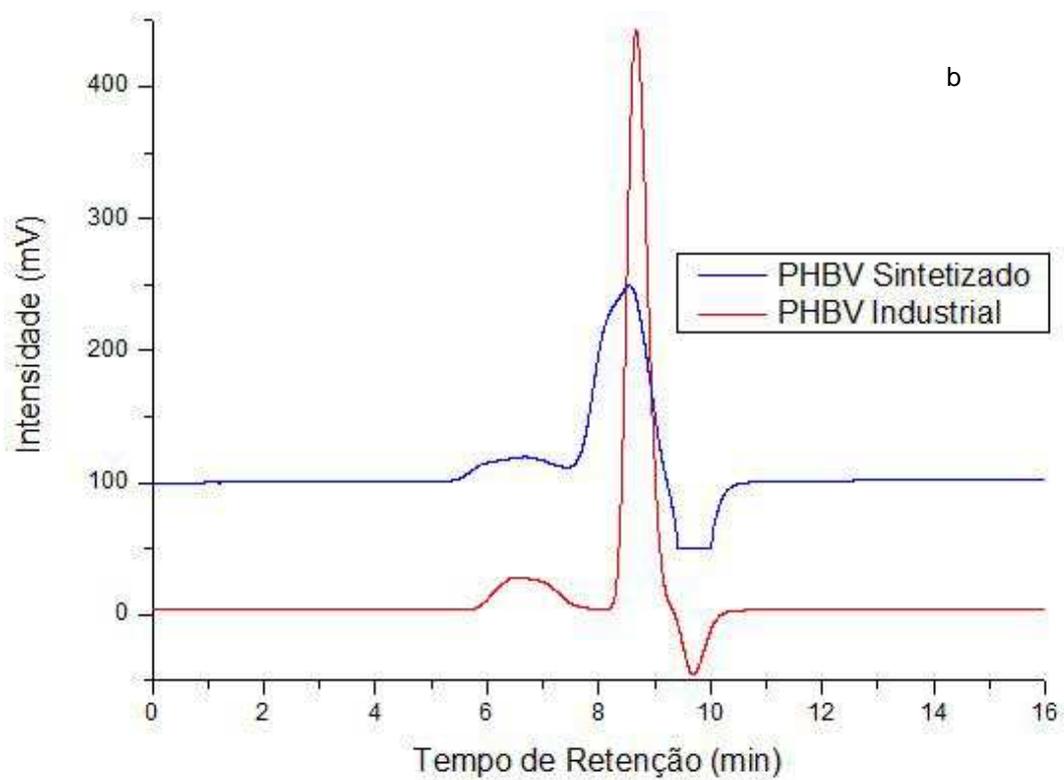
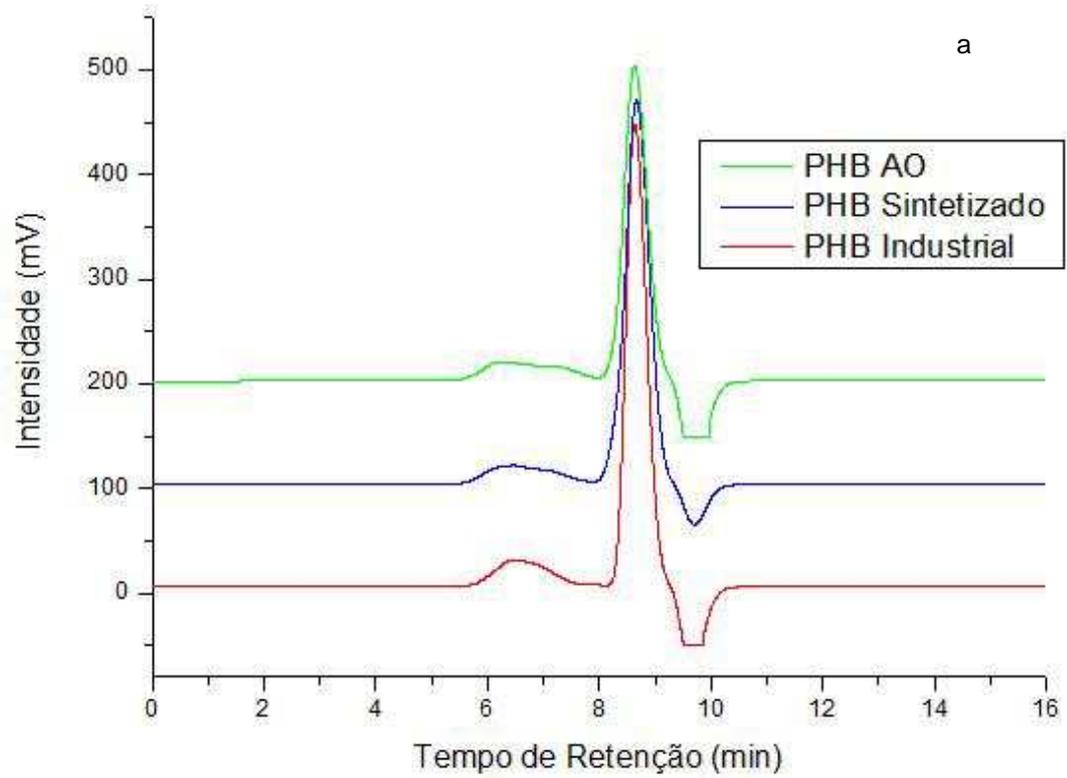


Figura 27 - SEC do a) PHB Industrial, Sintetizado e com Ácido Oleico e b) PHBV Industrial e PHBV Sintetizado.

5.3 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

O grau de cristalinidade do PHBV sintetizado foi calculado através da análise de DSC, para comparação com o polímero industrial e também para confirmação da análise de RMN ^1H em relação ao percentual de HV.

Os termogramas de DSC para PHBV Industrial e sintetizado obtidos do segundo aquecimento são mostrados na Figura 28.

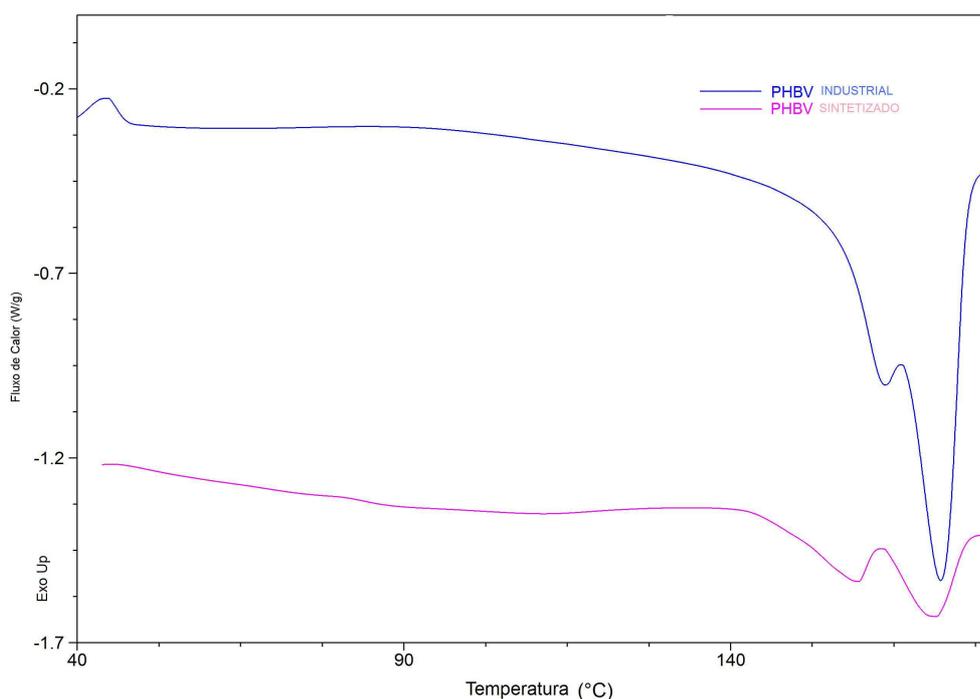


Figura 28: DSC para o PHBV Industrial e Sintetizado

Os valores de temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade (α_c (%)) obtidos do segundo aquecimento das curvas de DSC, para os polímeros industrial e sintetizados estão sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7: Dados da temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade (α_c (%)) para misturas de PHB/PEG e PHBV/PEG obtidas por DSC.

Amostra	T_{m1} (°C)	* ΔH_{m1} (J/g)	T_{m2} (°C)	** ΔH_{m2} (J/g)	ΔH_{m2} (J/g) W P(3HB)	α_c (%) PHB**
PHBV Industrial	-----	-----	163,2 172,2	89,62	89,62	61,38
PHBV Sintetizado	158,77	5,599	171,50	8,902	8,902	6,1

Na tabela 8 é feita uma comparação entre a cristalinidade e o percentual de HV dos polímeros.

Tabela 8: Dados do Grau de Cristalinidade e percentual de HV nos polímeros listados.

POLÍMERO	Grau de Cristalinidade (%) - DSC	% HV
PHBV Industrial	61,4	3,6
PHBV Sintetizado	6,1	22

Com esses resultados do grau de cristalinidade (α_c (%)), observa-se que o PHBV sintetizado apresentou uma baixa cristalinidade (6,1%). Isto confirma a análise RMN ^1H , onde mostra que o polímero sintetizado possui um alto percentual de HV (22%).

CONCLUSÕES

Para a liberação modulada de fármacos, objetivo pelo qual os polímeros foram preparados, duas características são fundamentais: baixa cristalinidade e baixa massa molar.

A fim de alcançar essas características, os polímeros (PHB e PHBV Industrial) foram plastificados com PEG em diferentes composições, bem como PHB e PHBV foram obtidos por síntese microbiana em escala de laboratório.

Os polímeros industriais plastificados (PHB/PEG e PHBV/PEG) apresentaram um elevado grau de cristalinidade, calculado por DRX, com valores variando entre 60 e 95%, de acordo com a concentração de PEG.

A T_m do PHB e PHBV diminuiu com o aumento da adição de plastificante (PEG) na mistura.

PHB e PHBV apresentaram perfis de degradação térmica muito parecidos devido ao PHBV ter somente 3,6% de HV no copolímero.

Os resultados de MEV mostraram que as misturas foram uniformes, com exceção das composições 50/50 e 20/80 que mostraram-se heterogênea, evidenciado pela presença de duas fases.

Para o PHB sintetizado, obteve-se uma massa molar elevada ($M_w=571.000 \text{ g.mol}^{-1}$), quando comparado ao PHB produzido industrialmente ($M_w=312.000 \text{ g.mol}^{-1}$).

Com base nos resultados obtidos, foi feita a síntese do PHB com ácido oléico (AO), a fim de obter um polímero com menor massa molar. Porém, os resultados de SEC não foram satisfatórios, pois o PHB AO apresentou uma massa molar similar ao PHB Industrial, ou seja, alta massa molar.

Também foi sintetizado PHBV, buscando um elevado percentual de HV, a análise de RMN ^1H mostrou que este percentual ficou em torno de 22%, isto diminuiu o grau de cristalinidade do copolímero para 6,1%, melhorando as propriedades de degradação do polímero.

Sugere-se que posteriormente seja feito um trabalho na síntese microbiana, para melhorar as propriedades de massa molar e dar seqüência ao trabalho de incorporação e liberação do fármaco.

REFERÊNCIAS

AMPE, F. **Métabolism du benzoate chez *Alcaligenes eutrophus*: quels mécanismes physiologiques régulent la biodégradation des composés aromatiques?**. These (Doctorat spécialité: Microbiologie – Biotechnologie) – L'Institut National des Sciences appliquées de Toulouse, Toulouse. 1995.

ANDERSON, J.M.; SHIVE, M.S. **Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres**. Adv. Drug Del. Rev. v. 28, p. 5-24, 1997.

ARAGÃO, G.M.F. **Production de poly- β -hydroxyalkanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise en oeuvre des cultures**. Toulouse. These du Doctorale (Sciences de la Vie), L'Institut National des Sciences appliquées de Toulouse. 1996.

ARAÚJO, D.G. **Produção de poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) por *Escherichia coli* recombinante a partir de glicose e ácido propiônico**. Florianópolis. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). UFSC, 2005.

AVELLA, M.; MARTUSCELLI, E. **Polymer**, v. 29, 2000.

BIDONE J. , MELO A. P. P. , BAZZO G. C. , CARMIGNAN F., SOLDI M. S., PIRES A. T. N. , Lemos-Senna E. **Preparation and characterization of ibuprofen-loaded microspheres consisting of poly (3-hydroxybutyrate) and methoxy poly (ethylene glycol)-b-poly (D,L-lactide) blends or poly(3-hydroxybutyrate) and gelatin composites for controlled drug release**. Materials Science and Engineering C. p. 588–593, 2009.

BILLMEYER Jr, F. W. **Textbook of polymer science**. 3 ed. New York: John Wiley & Sons, 1984.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. **Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects**. Journal of Biotechnology, v. 65, p. 127-161, 1998.

BYRON, D. **Polymer synthesis by microorganisms; technology and economics**. Trends Biotechnol., v. 5; p. 246-250, 1987.

CAMPBELL, D.; WHITE, J. R. **Polymer Characterization**. London: Chapman & Hall, 1989.

CANEVAROLO Jr, S.V. **Ciência dos Polímeros**. Editora Artiber: 2001.

CHANDRA, R.R. **Biodegradable Polymers**. Program of Polymer Science, v.23, p. 1273-1335, 1998.

CHAT, Y.; PITT, C.G. **The biodegradability of polyesters blends**. Biomaterials. v. 11, p. 108-112, 1990.

CHEN, L.X.L.; YU, J. **Abiotic hydrolysis of poly(R-3-hydroxybutyrate) in acidic and alkaline media**. Macromol. Symp. v. 224, p.35-46, 2005.

CONTI, D.S. **Estudo de miscibilidade, morfologia e propriedades mecânicas de blendas de PHB/PHBV e equilíbrio de fases em alta pressão de PHB/PHBV em gases densos**. Joinville. Dissertação (Mestrado Ciências e Engenharia dos Materiais), Universidade do Estado de Santa Catarina, 2006.

DAWES, E.A.; SENIOR, P.J. **The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms**. Adv. Microbiol. Physiol, v. 10, p. 135-266, 1973.

DOELLE, H.W. **Bacterial Metabolism**. New York .Academic Press, 1975.

DOI, Y.; TAMAKI, A.; KUNIOKA, M.; SOGA, K. **Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids**. Appl Microb. Biotechnol. v. 28, p. 330-334, 1988.

DOI, Y.; KANESAWA, Y.; KUNIOKA, M.; SAITO, T. **Biodegradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)**. Macromolecules. v. 23, p.26-31, 1990.

DUARTE, M.A.T. **Estudo do processamento e da biodegradação do poli(3-hidroxi-butirato) e de suas blends com poli(ϵ -caprolactona)**. Joinville. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade do Estado de Santa Catarina, 2004.

FORMOLO, M.C.; VOGELSANGER JR, N.; SCHNEIDER, A.L.; FURLAN, S.A.; ARAGÃO, G.M.F.; PEZZIN, S.H.; PEZZIN, A.P.T. **Biossíntese de polímero biodegradável: caracterização térmica e espectroscópica**. Anais do VII Congresso Brasileiro de Polímeros. Anais. Belo Horizonte. Associação Brasileira de Polímeros. 2003.

GABIZON, A.; PAPAHDJOPOULOS, D. **Liposome formulation with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors**. Proc. Natl. Acad. Sci. v. 85, p. 6949-6953, 1988.

GARCIA, M.C.F.; DUARTE, M.A.T.; SCHNEIDER, A.L.S.; FURLAN, S.A.; PEZZIN, A.P.T. **Polihidroxicanoatos: biopoliésteres produzidos a partir de fontes renováveis**. Revista Saúde e Ambiente, v. 4, p. 14-21, 2003.

GARCIA, M.C.F. **Proposta de um processo de extração de poli(3-hidroxi-butirato) produzido por *Cupriavidus necator* e seu efeito sobre as características do polímero**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de alimentos Universidade Federal de Santa Catarina), 2006.

GOMES, J.G.C.; BUENO NETTO, C.L. **Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias**. Revista Brasileira de Eng. Química. v. 17, p. 24-29, 1997.

HOCKING, J.; MARCHESSAULT, R.H. Biopolyesters, *In*: G.F.L. Griffin (Ed.), **Chemistry and Technology of biodegradable Polymers**, Chapman and Hall, London, p. 48-96, 1994.

IKEHARA, Y.; NIWA, T.; BIAO, L.; IKEHARA, S.K.; OHASHI, N.; KOBAYASHI, T.; SHIMIZU, Y.; KOJIMA, N.; NAKANISHI H.A. **Carbohydrate Recognition-Based**

Drug Delivery and Controlled Release System using Intraperitoneal Macrophages as a Cellular Vehicle. *Cancer Res.* v. 66, p. 8740-8748, 2006.

IZA, M.; STOIANOVICI, G.; VIORA, L.; GROSSIORD, J.L.; COUARRAZE, G. **Hydrogels of poly(ethylene glycol): mechanical characterization and release of a model drug.** *Journal of Controlled Release.* v. 52, p.41–51. 1998.

JENDROSSEK, D.; SCHIRMER, A.; SCHLEGEL, H.G. **Biodegradation of polyhydroxyaldanoic acids.** Mini-review. *Appl Microbial Biotechnol.* v. 46, p.451-456, 1996.

LEE, S.Y. **Plastic bacteria – progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria.** *Trends Biotechnology.* v. 14, p. 437 – 438, 1996.

LEE, S.Y.; CHOI, I.; WONG, H.H. **Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review.** *International Journal of Biological Macromolecules .* v. 25, p. 31 – 36, 1999.

LOH, W. **Formulação de creme de barbear e propriedades do polietilenoglicol.** American Chemical Society, 1999.

MANO, E.B. **Química Experimental de Polímeros.** 1ed. São Paulo: Ed.Edgard Blucher, 2004.

MANSON, J.A.; SPERLING, L.H. ***Polymers Blends and Composites*,** Plenum Press, New York, 1976.

MARANGONI, C. **Estudo de estratégias de produção de poli(3-hidroxiбутирато) por *Ralstonia eutropha* utilizando substrato de baixo custo e ácido propiônico.** Florianópolis. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

MI, F.; LIN, Y.; WU, Y.; SHYU, S., TSAI, Y. **Chitin/PLGA blend microspheres as a biodegradable drug-delivery system: phase-separation, degradation and release behaviour.** *Biomaterials*. v. 23, p. 3257-3267, 2002.

MILLER, G.L. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOGHIMI, S.M.; HUNTER, A.C. **Capture of stealth nanoparticles by body's defenses.** *Critical Reviews in Therapeutic Carrier Systems*. v. 18, p. 527-550, 2001.

PARRA, D.F.; RODRIGUES, J.A.F.R.; LUGÃO, A. B. **Biodegradable Polymeric Films of PHB from *Burkholderia saccharia* in presence of Polyetenoglycol.** *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v.8, 2005.

POUTON, C.W.; AKTAR S. **Biosynthetic polyhydroxyalcanoates and their potential in drug delivery.** *Adv. Drug Del. Rev.* v.18, p. 133-162, 1996.

POIRIER, Y.; NAWRATH, C.; SOMERVILLE, C. **Production of poluhydroxyalcanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers in bacteria and plants.** *Biotechnology*, v. 13, 1995.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLEMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. **Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from performed polymers.** *Drug Dev. Ind. Pharm.* v.24, p. 1113-1128, 1998.

REE, Y.H.; KIM, G.J.; YUN, K.Y.; BAE, K.S. **Accumulation of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes sp SH – 69* in batch culture.** *Biotechnology Letters*. v.14, p. 27 – 32, 1992.

REUTZ, I.; SCHOBERT, P.; BOWIEN, B. **Effect of phosphoglycerate mutase deficiency metabolism of *Alcaligenes eutrophus*.** *Journal Bacteriol.* v. 151, p.8-14, 1982.

RODRIGUES, J.A.F.R.; PARRA, D.F.; LUGÃO, A.B. **Crystallization on films of PHB/PEG blends**. Journal of Thermal analysis and Calorimetry. v. 79, p. 379-381, 2005. 17º CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 15 a 19 de Novembro de 2006, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.

ROSTOVTSEV, V.; GREEN, L.G.; FOKIN V.V.; SHARPLESS, K.B. **A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective Ligation of Azides and Terminal Alkynes**. Angew. Chem. Int. Ed. v. 41, p. 2596-2599, 2002.

SCHNEIDER, A.L.S.; MERKLE, R.; CARVALHOJONAS, M.F.; JONAS, R.; FURLAN, S.A. **Oxygen transfer on β -D-galactosidase production by *Kluyveromyces marxianus* using sugar cane molasses as carbon source**. Biotechnology Letters, v. 23, p.547-550, 2001.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C.; ALENCASTRO, R.B. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5. ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SIMON-COLIN, C.; RAGUÉNÈS, G.; COZIEN, J.; GUEZENNEC, J.G. ***Halomonas profundus* sp., a new PHA-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp**. Journal of Applied Microbiology. v. 104, p. 1425-1432, 2008.

SPIER, V.C. **Caracterização espectroscópica e cromatográfica de copolímeros biodegradáveis**. Joinville. Dissertação de Mestrado (Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade do Estado de Santa Catarina, 2005.

SQUIO, C. **Estratégias de alimentação e utilização de suplementos nutricionais na produção de poli(3-hidroxi butirato-co-3-valerato) por *Ralstonia eutropha***. Florianópolis. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. 2003.

STEINBUCHER, A.; PIEPER, U. **Production of a copolyesters of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon**

sources by a mutant of *A. eutrophus*. Appl. Microbiol Biotechnol. v. 37,p. 1-6, 1992.

SUAVE, J.; DALLAGNOL, E.C.; PEZZIN, A.P.T.; SILVA, D.A.K.; MEIER, M.M.; SOLDI V. **Microencapsulação: inovação em diferentes áreas.** Revista Saúde e Ambiente, v. 7, p. 12-20, 2006.

SUDESH, K.; ABE H.; DOI, Y. **Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters.** Progress in Polymer Science. v. 25, p.1503 – 1555, 2000.

TANAKA, K.; ISHIZAKI, A.; KANAMARU, T.; KAWANO, T. **Production of poly- (D-3- hydroxybutyrate) from CO₂, H₂ and O₂ by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes eutrophus*.** Biotechnol. Bioeng. v. 45, p. 268 – 275, 1994.

VERT, M., LI, S.M., SPENLEHAUER, G. AND GUERIN, P. **Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters.** J. Mater. Sci. Mater. Med, v.3, p.432-446,1992.

WANG, J.G.; BAKKEN, L.R. **Screening of soil bacteria for poly-beta-hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation.** Microb. Ecol., v. 35, p. 94-104, 1998.

WENDLANDT, W.W.; GALLAGHER, P.K. *In*: TURI, E.A. **Thermal Characterisation of Polymeric Materials.** Orlando: Academic Press, 1981.

WESSLER, K. **Sistemas de PHB e PHBV com PCL-T: comportamento de fase, reologia, propriedades mecânicas e processabilidade.** Joinville. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade do Estado de Santa Catarina, 2007.

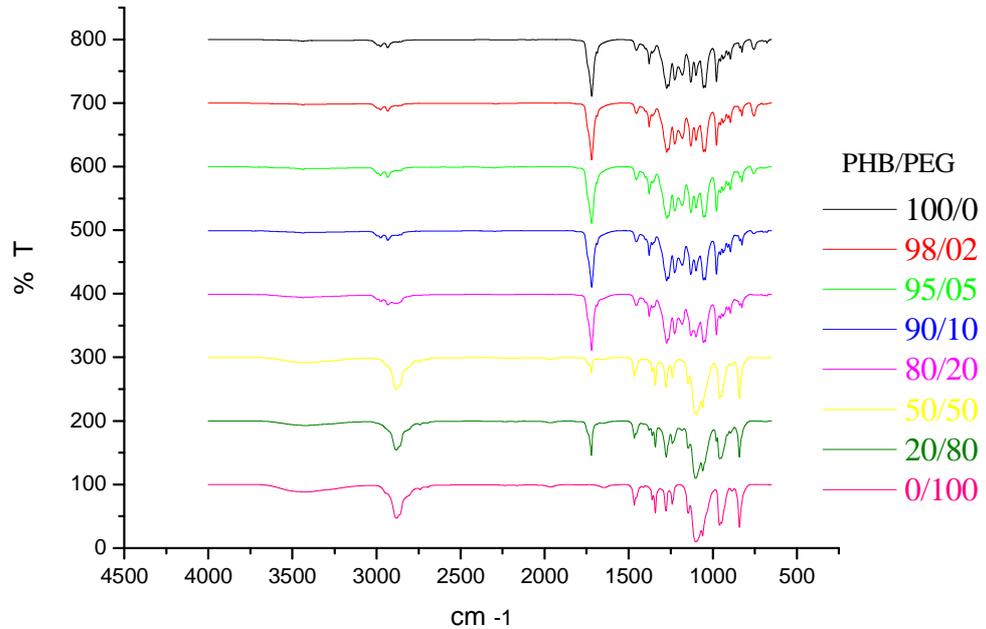
WHATELEY, T.L. **Biodegradable microspheres for controlled drug delivery.** *In:* Karsa, DR, Stephenson, RA. Encapsulation and Controlled Release. The Royal Society of Chemistry, p. 52-65, 1993.

WILLIAMS, D.F. **Definitions in Biomaterials** - Progress in Biomedical Engineering, Elsevier, v.4, Cap.1, 1987.

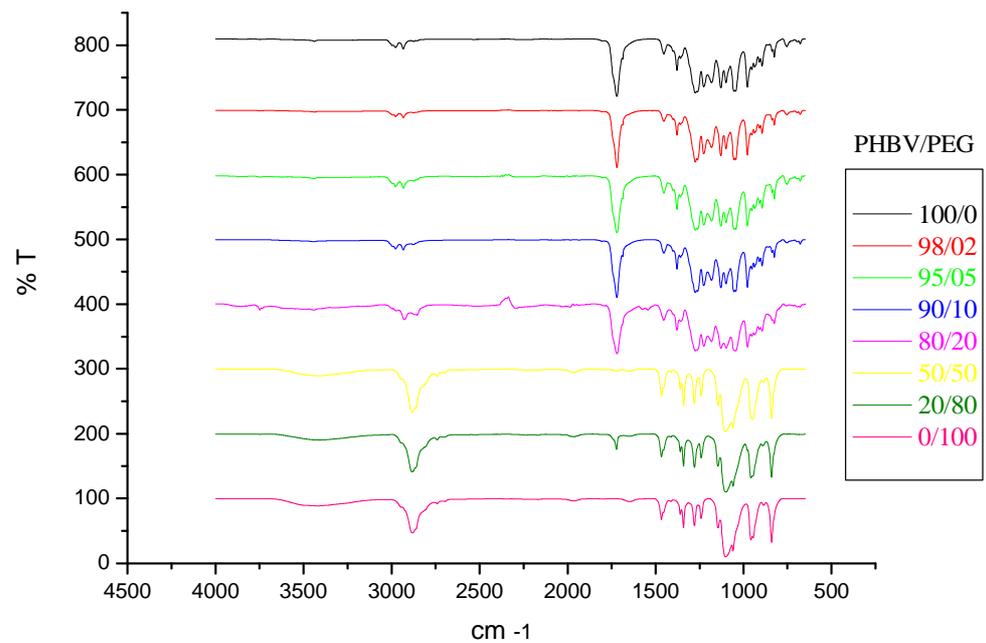
ZINN, M.B.; WITHOULT, B.; EGLI, T. **Ocurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate.** Adv. Drug Del. Rev. v. 53, p. 5-21, 2001.

ANEXO I

Os espectros de FTIR dos filmes de PHB/PEG e PHBV/PEG estão apresentados nas figuras 19a e 19b, respectivamente.



1)



2)

Figura A – FTIR dos filmes de 1)PHB/PEG e 2) PHBV/PEG.

As principais bandas encontradas nos espectros de FTIR dos polímeros puros, bem como suas respectivas atribuições, estão relacionadas na tabela 5.

Todas as bandas encontradas experimentalmente para o PHB e o PHBV puros foram similares as descritas na literatura por WESSLER (2007) e SILVERSTEIN (1994).

Tabela A. Relação das principais bandas determinadas experimentalmente para os polímeros puros.

Atribuição das bandas	PHB (cm⁻¹)	PHBV (cm⁻¹)
Deformação axial da ligação C=O	1719,70	1719,55
Deformação axial da ligação C-C	978	978,17
Deformação angular da ligação C-C	-----	-----
Deformação axial da ligação C-O no grupo ester	1275,06 1226,79	1274,84 1226,38
Deformação axial assimétrica e simétrica da ligação C-H no grupo metil	2976,56 -----	2976,23 -----
Deformação angular assimétrica e simétrica da ligação C-H no grupo metil	1453,17 1379,25	1453,52 1379,17
Deformação assimétrica da ligação C-H do grupo metileno	2933,15	2933,03