UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ARTES, CIÊNCIAS E HUMANIDADES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

THIAGO REINALDOS SILVA

**Produção de *scaffolds* poliméricos por *Electrospinning* a partir do polímero PLGA com
adição de moléculas de interesse para o aprimoramento de tecidos biomiméticos**

São Paulo
2018

THIAGO REINALDOS SILVA

**Produção de *scaffolds* poliméricos por *Electrospinning* a partir do polímero PLGA com
adição de moléculas de interesse para o aprimoramento de tecidos biomiméticos.**

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

Versão corrigida contendo as alterações solicitadas pela comissão julgadora em 21 de setembro de 2018. A versão original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca da EACH/USP e na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD), de acordo com a Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.

Área de Concentração:

Ciências - Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador:

Profa. Dra. Patricia Targon Campana

São Paulo

2018

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

CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Universidade de São Paulo. Escola de Artes, Ciências e Humanidades. Biblioteca)

CRB-8 4936

Silva, Thiago Reinaldos

Produção de *scaffolds* poliméricos por *eletrospinnig* a partir do polímero PLGA com adição de moléculas de interesse para o aprimoramento de tecidos biomiméticos / Thiago Reinaldos Silva ; orientadora, Patrícia Targon Campana. - 2018

71 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo
Versão corrigida

1. Biotecnologia. 2. Biomateriais compósitos. 3. Biomateriais poliméricos. 4. Biopolímeros. 5. *Scaffolds*. I. Campana, Patrícia Targon, orient. II. Título

CDD 22.ed. – 660.6

SILVA, Thiago Reinaldos.

Produção de *scaffolds* poliméricos por *Electrospinning* a partir do polímero PLGA com adição de moléculas de interesse para o aprimoramento de tecidos biomiméticos.

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

Área de Concentração:
Ciências

Aprovado em: 21/09/2018

Banca Examinadora

Profa. Dra.	Júlia Baruque Ramos	Instituição:	EACH/USP
Julgamento:	Aprovado		

Prof. Dr.	Alexandre Bruni Cardoso	Instituição:	IQ/USP
Julgamento:	Aprovado		

Prof. Dr.	Alexandre Marletta	Instituição:	InFis/UFU
Julgamento:	Aprovado		

*Dedico este trabalho aos meus pais, familiares, e a aqueles que me esperam do lado de fora
desta sala.*

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Patricia Targon Campana, que me corrigiu e me moldou nas diversas dúvidas e angústias.

Aos membros do grupo de pesquisa em biomateriais e espectroscopia (BMESpec), especificamente Luiz Filipe Tsaborpoulos, Aline Orvalho, Isabella Italiano e Kelliton Francisco.

Ao Prof. Dr. Alexandre Marletta pelas discussões, ajuda na análise dos dados de microscopia de força atômica e apoio ao trabalho.

Ao Prof. Dr. José Roberto Tozoni, pela concessão das nanoargilas haloisitas e adsorção de protoporfirina IX nestas.

Aos professores Enrico Traversa e Silvia Licocchia, pela confecção das nanopartículas de óxido de cério, utilizados neste trabalho.

À Profa Dra Júlia Baruque pelas medidas de módulo de Young e pelas discussões em torno dos resultados.

Agradeço a Profa Dra. Viviane Nunes e a aluna de doutorado Jennifer Farias, por realizarem os testes adicionais de cultivo de queratinóticos, utilizando os nossos *scaffolds* como base.

A todos os integrantes do grupo de pesquisa GEM-UFU, em especial a Bárbara Sakamoto e Francisco Van Riel Neto.

À técnica Sandra Bitencourt, por sempre me alegrar em minhas visitas ao CAT, sempre acompanhada de Leonardo, Camila, Milla, Luiza e Georges, que fizeram das minhas tardes um pouco menos produtivas, mas um pouco mais divertidas.

Aos professores do laboratório de biotecnologia da Escola de Artes, Ciências e Humanidades.

À Dayane Bantin, por me ajudar nos meus momentos mais difíceis e angustiantes.

Aos meus pais, que me apoiaram e me guiaram no caminho certo.

E finalmente a todos os meus amigos e familiares que me acompanharam nesta jornada.

“Encontramos sempre o nosso fardo. Mas Sísifo ensina a fidelidade superior que nega os deuses e levanta os rochedos. Ele também julga que tudo está bem. Esse universo enfim sem dono não lhe parece estéril nem fútil. Cada grão dessa pedra cada estilhaço mineral dessa montanha cheia de noite, forma por si só um mundo. A própria luta para atingir os píncaros basta para encher um coração de homem. É preciso imaginar Sísifo feliz.”

(CAMUS, 2002, p. 127)¹

RESUMO

SILVA, Thiago Reinaldos. **Produção de *scaffolds* poliméricos por *Electrospinning* a partir do polímero PLGA com adição de moléculas de interesse para o aprimoramento de tecidos biomiméticos.** 2018. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. Versão corrigida.

O desenvolvimento de *scaffolds* para a aplicação em biomateriais, seja na produção de tecidos biomiméticos ou mesmo em sistemas para liberação de drogas, tem sido fundamental tanto para o entendimento dos mecanismos de crescimento de tecidos biológicos e seu funcionamento, quanto para o desenvolvimento de biomateriais que possam ser incorporados aos tecidos naturais para seu reparo e para a efetiva aplicação de agentes terapêuticos. Dentre as várias técnicas para a produção destes *scaffolds*, a técnica de *Electrospinning* (ES) foi utilizada neste trabalho para a confecção de *scaffolds* poliméricos com a incorporação moléculas de interesse biotecnológico. Foram produzidos *scaffolds* e *scaffolds* compósitos pela adição de nanopartículas de óxido de cério, nanoargila haloisita e protoporfirina IX complexada à nanoargila haloisita, os quais foram estudados quanto à sua morfologia e propriedades tênses, além de terem sido testados quanto a sua viabilidade como sistemas biomiméticos de tecidos. Os *scaffolds* compósitos mostraram um ganho em ordenamento e homogeneidade, e os *scaffolds* compósitos contendo óxido de cério mostraram um leve aumento em sua capacidade elástica, além de terem sido viáveis para o crescimento de células HCat.

Palavras-chave: Biomateriais. *Scaffolds* poliméricos. *Electrospinning*. PLGA.

ABSTRACT

SILVA, Thiago Reinaldos. **Electrospun polymeric scaffolds of PLGA with encapsulation of molecules of biotechnological interest for biomimetic tissue enhancement**. 2018. 71 p. Dissertation (Master in Science) – School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, São Paulo, 2018. Corrected version.

The development of scaffolds for biomaterials' applications, in biomimetic tissues production and drug-delivery systems, have been a fundamental tool for the understanding of biological tissues' growing and repair mechanisms and for the development of biomaterials that can be incorporated to the natural tissues for both repair and effective application of therapeutic agents. Amongst the several techniques for scaffolds' production, the Electrospinning (ES) methodology was applied in this work for developing polymeric scaffolds with the encapsulation of molecules of biotechnological interest. Scaffolds and blend scaffolds by cerium oxide nanoparticles and halosite nanoclay addition were produced and studied regarding its morphology, tensile properties and cell viability as biomimetic tissues. The blend scaffolds showed an enhancement in order and homogeneity, and those within cerium oxide showed also an increase in elastic capacity and viable physical base for HCat cells.

Keywords: Biomaterials. Polymeric Scaffolds. Electrospinning. PLGA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema simplificado da técnica de Electrospinning.	16
Figura 2 - A reação líquida da polimerização de PLGA a partir de lactídeo e glicolídeo.	20
Figura 3 - Imagem de MEV das nanopartículas de CeO ₂ utilizadas na produção dos scaffolds compósitos.	22
Figura 4 - Esquema representativo dos nanotubos de Halosita utilizados neste trabalho. Os pontos azuis representam as moléculas de interesse adsorvidas à superfície interna e externa da nanoargila.	23
Figura 5 - (a) estrutura química da protoporfirina IX (sinônimos: 3,7,12,17-Tetramethyl-8,13-divinyl-2,18-porphinedipropionic acid, porfirina de Kammerer, Ooporfirina); (b) espectro de absorção da protoporfirina IX em clorofórmio.	24
Figura 6 - Foto do sistema patenteado pelo Grupo de Biomateriais e Espectroscopia (BMEspec).	27
Figura 7 - <i>Scaffold</i> de PDL, obtido no experimento 2 da tabela 4. Figura obtida em microscópio ótico, aumento de 10x.	35
Figura 8 - <i>Scaffold</i> de PLLA, obtido no experimento 4 da tabela 6. Figura obtida em microscópio ótico, aumento de 10x.	36
Figura 9 - PLGA-1CeO ₂ (0,25mL/h) com barra de medida de 500 mil micrômetros, aumento de 10x em microscópio ótico.	41
Figura 10 - Imagens de MEV da amostra PLGA ampliadas 500 vezes (esquerda) e 2.000 vezes (direita).	43
Figura 11 - Imagem de AFM da amostra PLGA em escala de 2,5 μm^2 , em topografia (esquerda) e contraste de fase (direita).	44
Figura 12 - Três diferentes amostras de <i>scaffold</i> PLGA. As linhas representam o ponto mais alto onde a deformidade é maior e o processo de rompimento do tecido.	44
Figura 13 - Imagens de MEV da amostra PLGA-1CeO ₂ ampliadas 500 vezes (esquerda) e 2.000 vezes (direita).	46
Figura 14 - Imagens de MEV da amostra PLGA-5CeO ₂ ampliadas 500 vezes (esquerda) e 2.000 vezes (direita).	47
Figura 15 - Imagens de MEV da amostra PLGA-10CeO ₂ ampliadas 500 vezes (esquerda) e 2.000 vezes (direita).	47
Figura 16 - Imagem de MEV da amostra PLGA-20CeO ₂ ampliada 2.000 vezes.	48
Figura 17 - (a) Imagem de MEV da amostra PLGA-10 CeO ₂ ampliada 10.000 vezes; (b) Imagem gerada a partir da linha do oxigênio; (c) Imagem gerada a partir da linha do carbono; e (b) Imagem gerada a partir da linha do cério.	49
Figura 18 - Imagem de AFM da amostra PLGA-10CeO ₂ em escala de 10 μm^2 , em topografia(esquerda) e contraste de fase (direita).	50
Figura 19 - Imagens de MEV da amostra PLGA-1NAH ampliadas 2.000 vezes (esquerda) e 5.000 vezes (direita).	52
Figura 20 - Imagens de MEV da amostra PLGA-1NAPo ampliadas 500 vezes (esquerda) e 5.000 vezes (direita).	52
Figura 21 - (a) Imagem de MEV, amostra PLGA-10NAH ampliada 1.000x; (b) Imagem gerada a partir da linha do oxigênio; (c) Imagem gerada a partir da linha do carbono; e (b) Imagem gerada a partir da linha do silício.	54
Figura 22 - (a) Imagem de MEV da amostra PLGA-1NAPo ampliada 10.000 vezes; (b) Imagem gerada a partir da linha do silício.	55
Figura 23. Imagem de AFM da amostra PLGA-10NAH em escala de 2,5 μm^2 , em topografia(esquerda) e contraste de fase (direita).	55
Figura 24 - Imagem de AFM da amostra PLGA-10NAPo em escala de 2,5 μm^2 , em topografia(esquerda) e contraste de fase (direita).	56

Figura 25 - (a) Imagem de MEV amostra PLGA + HCat ampliada 1.000x e (b) Imagem de MEV, amostra PLGA + HCat ampliada 1.000x.	58
Figura 26 - (a) Imagem de MEV amostra PLGA-10CeO ₂ + HCat ampliada 2.000x e (b) Imagem de MEV, amostra PLGA-10CeO ₂ + HCat ampliada 1.000x.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros usados para a confecção de scaffolds a partir de quitosana em soluções diferentes concentrações de ácido acético.....	32
Tabela 2 - Parâmetros utilizados para a confecção de <i>scaffolds</i> de PDL com peso molecular 75.000 a 120.000 mg/mol.	34
Tabela 3 - Parâmetros utilizados para a confecção de scaffolds de PDL com peso molecular entre 18.000-24.000 mg/mol (PDLA).....	34
Tabela 4 - Parâmetros utilizados para a confecção de scaffolds de PLLA.....	36
Tabela 5 - Parâmetros utilizados para a confecção de scaffolds de PLLA.....	37
Tabela 6 - Nomenclatura dos <i>scaffolds</i> compósitos de PLGA e CeO ₂	40
Tabela 7 - Nomenclatura dos scaffolds compósitos de PLGA e NAH e PLGA NAH-protoporfirina IX. ..	41
Tabela 8 - Caracterização tênsil de três diferentes amostras de <i>scaffold</i> PLGA.	45
Tabela 9 - Caracterização tênsil de três diferentes amostras de <i>scaffolds</i> compósitos de PLGA e CeO ₂	51
Tabela 10 - Caracterização tênsil de três diferentes amostras de <i>scaffolds</i> compósitos de PLGA e NAH (PLGA-NAH); e PLGA e NAH-protoporfirina IX (PLGA-NAPo).	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al(OH) ₃	Oxi-hidróxido de alumínio
CO ₂	Dióxido de carbono
DMF	Dimetilformamida
EDX	<i>Energy Dispersive X-ray Spectroscopy</i>
ES	<i>Electrospinning</i>
HaCat	<i>Keratinocyte cell line from adult human skin</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MFA	Microscopia de força atômica
NAH	Nanoargila haloisita
NaOH	Hidróxido de sódio
PDL	poli(D,L-ácido láctico), 75.000-120.000 mg/mol
PDLA	poli(D,L-ácido láctico), 18.000-24.000 mg/mol
PLGA	<i>poli(lactic-glycolideacid)</i>
PLGA (outra)	<i>Scaffold</i> confeccionado com o polímero PLGA
PLGA-10CeO ₂	Scaffold confeccionado com o polímero PLGA com adição de CeO ₂ 10% m/m
PLGA-10NAH	Scaffold confeccionado com o polímero PLGA 85:15 com adição de nanoargila haloisita 10% m/m
PLGA-10NAPo	Scaffold confeccionado com o polímero PLGA 85:15 com adição de nanoargila haloisita complexada com protoporfirina IX 10% m/m
PLGA-1CeO ₂	<i>Scaffold</i> confeccionado com o polímero PLGA com adição de CeO ₂ 1% m/m
PLGA-1NAH	Scaffold confeccionado com o polímero PLGA 85:15 com adição de nanoargila haloisita 1% m/m
PLGA-1NAPo	Scaffold confeccionado com o polímero PLGA 85:15 com adição de nanoargila haloisita complexada com protoporfirina IX 1% m/m
PLGA-20CeO ₂	Scaffold confeccionado com o polímero PLGA com adição de CeO ₂ 20% m/m
PLGA-20NAH	Scaffold confeccionado com o polímero PLGA 85:15 com adição de nanoargila haloisita 20% m/m

PLGA-5CeO ₂	Scaffold confeccionado com o polímero PLGA com adição de CeO ₂ 5% m/m
PLGA-5NAH	Scaffold confeccionado com o polímero PLGA 85:15 com adição de nanoargila haloisita 5% m/m
PLGA-5NAPo	Scaffold confeccionado com o polímero PLGA 85:15 com adição de nanoargila haloisita complexada com protoporfirina IX 5% m/m
PLLA	<i>poli(l-lactic acid)</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
Si-OH	grupo silanol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	POLÍMEROS DERIVADOS DE PLA	19
1.2	NANOPARTÍCULAS.....	20
1.3	ÓXIDO DE CÉRIO	21
1.4	NANOARGILA HALOISITA (NAH)	22
1.5	PROTOPORFIRINA IX.....	23
2	OBJETIVOS	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	MATERIAIS.....	26
3.2	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	26
3.3	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	28
3.3.1	Ensaio de tração	28
3.3.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV/SEM)	28
3.3.3	Espectroscopia de energia dispersiva (EDX)	29
3.3.4	Microscopia de força atômica (MFA)	29
3.4	VALIDAÇÃO BIOLÓGICA.....	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	SCAFFOLDS	32
4.1.1	Quitossana	32
4.1.2	Poli(D,L-ácido láctico), PDL.....	34
4.1.3	Ácido poli-L-láctico, PLLA	35
4.1.4	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), PLGA.....	37
4.2	SCAFFOLDS COMPÓSITOS	40
4.2.1	Scaffolds compósitos de PLGA e CeO ₂	40
4.2.2	Scaffolds compósitos de PLGA e NAH; e PLGA e NAH-protoporfirina IX	41
4.3	ESTUDOS MORFOLÓGICOS E TÊNSEIS DOS SCAFFOLDS E SCAFFOLDS COMPÓSITOS	43
4.3.1	Scaffolds de PLGA.....	43
4.3.2	Scaffolds compósitos de PLGA e CeO ₂ (PLGA-CeO ₂).....	45
4.3.3	Scaffolds compósitos de PLGA e NAH (PLGA-NAH); e PLGA e NAH-protoporfirina IX (PLGA-NaPo)	51
4.4	VALIDAÇÃO BIOLÓGICA DOS SCAFFOLDS PLGA E SCAFFOLDS COMPÓSITOS PLGA-CeO ₂	58
5	DISCUSSÃO	60
6	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

Os biomateriais, desde a década de 70, foram introduzidos como uma nova categoria de materiais. Esta subclasse é composta, por definição do dicionário *Merriam-Webster*:

Um material natural ou sintético (como um metal ou polímero) que é apropriado para a introdução em tecido vivo, especialmente como parte de um equipamento médico (como uma junta artificial)².

Esta definição se adequa, em parte, aos biomateriais atuais, porém, vale ressaltar que sua atuação transcende este escopo: biosensores, células à combustível, enxertos, hidrogéis, unidades de filtração, materiais de construção funcionalizados, aerogéis, liberação controlada de droga.

Os biomateriais que promovem tanto o suporte físico quanto morfológico às células, podendo, também, servir de meio para liberação de compostos químicos (antígenos, proteínas, fármacos, enzimas e partículas) são chamados de *scaffolds*. Esta palavra, de origem inglesa que faz alusão aos andaimes e plataformas móveis de apoio à construção civil, descreve a função destas estruturas, que, em geral, são absorvidas ou degradadas pelo corpo ao término de sua função.

Existem vários modos de se produzir *scaffolds* com morfologias distintas, tais como: *Thermally Induced Phase Separation* (TIPS), técnica que confecciona estruturas poliméricas em três dimensões, através de indução de gelificação seguida da troca de solventes³; *Electrospinning* (ES), metodologia capaz de produzir fibras de diâmetro micrométrico e submicrométrico a partir da tensão elétrica sobre uma solução polimérica⁴; *porogen leaching* que, de forma semelhante à técnica TIPS, provê a formação de poros geometricamente idênticos através da lixiviação de cristais salinos dentro uma solução polimérica em gel⁵; *Gas foaming*, derivada do *porogen leaching*, porém utilizando cristais efervescentes⁶, e sinterização de microesferas, que se utiliza de cerâmicas em pó aquecidas para formação de esferas poliméricas com maior superfície em relação ao volume. Cada um destes procedimentos resulta em diferentes estruturas, distribuição de porosidade e composição química, apresentando vantagens e desvantagens a depender do tipo de aplicação. Dentre essas, o ES possui alta reprodutibilidade sendo o único, dentre estes métodos citados, que pode desenvolver uma matriz composta de fibras que simule uma matriz extracelular.

Inicialmente proposto em 1934 por Anton Formhals⁷ para a confecção de fios plásticos de forma eficiente e acessível, a técnica de *Electrospinning* (ES) foi adaptada para a área de biomateriais com a confecção de fibras de celulose voltadas para isolamento térmico e produção de roupas⁸. Eficiente para a produção de fibras, o ES foi apontado pelo próprio Formhals como sendo uma metodologia nova para um problema antigo: a dificuldade de se coletar as fibras de acetato de celulose nos métodos anteriores fôra resolvida com a inclusão de um carretel giratório, possibilitando implementação de caráter industrial de seus métodos. No entanto, sua contribuição para o campo da medicina apareceria somente na década de 90, quando da implantação desta técnica no desenvolvimento dos tecidos biomiméticos.⁹

O ES consiste, basicamente, na confecção de fibras de diâmetro relativamente uniforme a partir de polímeros dissolvidos em um solvente apropriado, ou polímeros à temperatura do estado líquido-cristalino (quando recebe o nome de *melt electrospinning*), que são eletricamente induzidos para atingir um alvo metálico.

O sistema para a produção de fibras por ES é composto por um alvo metálico (onde serão depositadas as fibras), uma seringa carregada com solução polimérica acoplada a uma bomba para a injeção da solução e uma fonte de tensão elétrica. A Figura 1, a seguir, exemplifica este sistema.

Figura 1 - Esquema simplificado da técnica de Electrospinning.

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

Da figura acima podem ser extraídos os parâmetros dos quais dependem tanto a geometria quanto a morfologia das fibras confeccionadas pelo sistema. Tais parâmetros e seus efeitos considerados isoladamente na estrutura do tecido formado, encontram-se no quadro 1, abaixo.

Quadro 1 - Parâmetros envolvidos na confecção de tecidos por ES. Os números coincidem com a numeração dos parâmetros descritos na figura 1, acima.

N*	PARÂMETRO	DESCRIÇÃO	EFEITO ISOLADO	REF [‡]
1	Diferença de potencial, ddp (voltagem)	Força motriz da confecção das fibras, a ddp “alonga” a solução em direção ao alvo, determinando combinado a bomba de injeção, a velocidade de ejeção da solução polimérica.	Valor ideal: projeta as fibras com tensão suficiente para a formação dos fios no alvo. Abaixo do valor ideal: a tensão não é suficiente para que a solução atinja o alvo. Acima do valor ideal: pode causar <i>branching</i> : efeito no qual o jato forma diversas ramificações e fibras não regulares. É possível que haja o efeito de pulverização (<i>electrospray</i>).	10
2	Distância	Distância entre a ponta da agulha e o alvo: determina o tempo de secagem das fibras antes da deposição no coletor.	Distância ideal: é suficiente para que a solução seja ejetada e seque até atingir o alvo, formando uma fibra. Abaixo da distância ideal: a solução não seca adequadamente, resultando numa fibra de núcleo líquido. Acima da distância ideal: a solução seca completamente antes que atinja o alvo.	9,10, A#.
3	Temperatura	Temperatura da câmara de <i>electrospinning</i> : influencia na secagem das fibras e na viscosidade da solução. Deve ser ajustada de acordo com a T_m (temperatura de transição) do polímero usado.	$T \gg T_m$: a solução, que pode até entrar na fase gel, seca muito rapidamente, muitas vezes não saindo da seringa. Quando o tecido é formado nesta condição, as fibras resultantes possuem superfície irregular. $T \ll T_m$: a solução fica muito viscosa e a eletrofiação não ocorre.	9,10, A#
4	Solvente	Solventes diferentes apresentam peso molecular, viscosidade e pressão de vapor diferentes, influenciando a taxa de secagem e mobilidade dos portadores de carga.	Solventes ideais: a taxa de evaporação na qual a solução ejetada seque até atingir o alvo, formando uma fibra. Solventes com maior pressão de vapor: a taxa de evaporação muito alta, faz com que a solução seque completamente antes de ser ejetada da agulha. Solventes com menor pressão de vapor: a taxa de evaporação muito baixa faz com que a solução não seque completamente antes de atingir o alvo, formando um filme amorfo, ao invés de fibras definidas.	9,10

Continua...

N*	PARÂMETRO	DESCRIÇÃO	EFEITO ISOLADO	REF [‡]
5	Peso molecular do polímero.	Polímeros de pesos moleculares diferentes possuem diferentes viscosidades intrínsecas e emaranhamento molecular em solução, necessitando de diferentes concentrações em solução, correlacionadas com o seu peso.	Abaixo do ideal: Não possuem a viscosidade necessária para a formação do Cone de Taylor, a partir do qual os fios são formados. Ao invés de fios, a solução é pulverizada no alvo (<i>eletrospray</i>). Ideal: Polímeros de maior peso molecular formam soluções com maior viscosidade, produzindo fibras homogêneas. Acima do ideal: A viscosidade muito alta resulta numa tensão superficial muito alta, promovendo os chamados microlaços (fios dentro de fios) devido ao alto emaranhamento molecular.	9,10
6	Umidade	Umidade relativa do ar na câmara	Influência no tempo de secagem, aumentando ou diminuindo o tempo de secagem da solução. Está correlacionado ao parâmetro de temperatura.	9,10
7	Concentração da solução polimérica	Influência na viscosidade da solução, incutindo-se na viabilidade de fibras homogêneas.	Abaixo do ideal: sem tensão superficial suficiente a ejeção da solução resulta em nano ou microesferas. O aumento da concentração promove a formação de fibras e gotículas misturadas. Ideal: forma fibras de diâmetro contínuo. Acima do ideal: similar ao caso de alto peso molecular, a alta-tensão superficial promove a formação de microlaços.	9,10
8	Diâmetro da agulha	Determina o diâmetro das fibras.	Dependendo da concentração utilizada, o diâmetro da agulha influencia na formação do cone de Taylor que, por sua vez, influencia o diâmetro das fibras formadas.	9,10
9	Diâmetro da seringa	Determina a pressão imposta na solução pela bomba de pressão.	Controlável pelos parâmetros inseridos na bomba de injeção, utilizando seu diâmetro e volume.	9,10,11
10	Velocidade de injeção	Determina a quantidade de solução disponível na extremidade da agulha.	Assim como o diâmetro da agulha, afeta a quantidade de solução submetida à ddp do sistema.	9,10
	Tempo (min)	Tempo de deposição da amostra no alvo, tempo de fiação: determina a espessura do tecido formado.	Com maiores tempos de deposição, tecidos mais espessos se formam.	9,10

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

NOTA: N*: número correspondente na figura 1; REF[‡]: referências; A[#]: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

Como dito anteriormente, o estudo dos biomateriais não se restringe à forma. É importante compreender sua composição química e a morfologia de sua superfície, e estas devem ser adequadas às várias aplicações, uma vez que são diversas as forças que interagem sobre os materiais nas escalas nano e micrométricas. Destarte, o material polimérico não deve funcionar apenas como suporte físico, desempenhando concomitantemente a esta, outras funções que auxilie na sua aplicação.

A utilização de diferentes polímeros (lignina¹², coprolactona, ácido poli-l-láctico, poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)) com aditivos¹³ (fatores de crescimento¹⁴, proteínas^{15,16}, nutrientes¹⁷, antibióticos¹⁸, cerâmicas¹⁹) faz com que o *scaffold* adquira, além das propriedades físicas, outras características físico-químicas interessantes para diferentes aplicações. De forma semelhante, a morfologia do *scaffold* implementado influencia as respostas do sistema vivo, inibindo certas interações como o encapsulamento, infecção ou rejeição. Alguns biomateriais podem até sinalizar células neoplásicas (câncer) resultando em tratamentos radioterápicos localizados²⁰.

Existe uma variedade de materiais poliméricos biocompatíveis para o desenvolvimento de biomateriais. Além da diversidade de cadeias laterais²¹, como a própria definição de polímero recai sobre o material fruto da repetição de uma ou mais unidades de cadeias carbônicas em ordem, alternadas ou aleatórias²², existem diversas taxas de repetições possíveis. Essas duas características fazem dos polímeros uma classe de moléculas muito versátil estruturalmente, na qual se encontram tanto os polímeros que ocorrem naturalmente (celulose e queratina), quanto os polímeros sintetizados (derivados do ácido poli-l-láctico), todos muito usados em aplicações biotecnológicas.

1.1 POLÍMEROS DERIVADOS DE PLA

Os polímeros derivados do ácido poli-l-láctico fazem parte de uma classe que compreende polímeros degradáveis, chamados de poliésteres alifáticos²³. São de fácil manuseio e baixa toxicidade, portanto adequados para a confecção de biomateriais.

O PLLA (poli(*l-lactic acid*), ácido poli-l-láctico, é um polímero que apresenta apenas repetições de ácido láctico e têm sido usados paralelamente ao PLGA, poli(*lactic-glycolideacid*), do inglês, com nomenclatura poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) em português. O PLGA é um poliéster co-polimérico e a alternância entre ácido láctico e ácido glicólico, muda as características físico-químicas do polímero em relação ao PLLA.

eletromagnéticas, como na Taça de Licurgo, composta de vidro colorido com nanopartículas de ouro no século IV. Ao depender do ângulo ela apresenta-se verde (luz refletida), ou vermelha (luz transmitida)²⁷. Além destas propriedades ópticas, as nanopartículas possuem maior reatividade, devido a sua maior área de superfície por volume²⁸, maior bioabsorção, geração de maiores quantidades de espécies reativas de oxigênio²⁹, e dissolução facilitada³⁰. Portanto, estes materiais apresentam propriedades de interesse na confecção de biomateriais, auxiliando em função biológica ou reforço estrutural, formando um compósito. Um compósito é um material composto de duas fases: a matriz, constituída do material principal que irá envolver a segunda fase e a fase dispersa, composta normalmente de partículas ou fibras dispersas entre a matriz, concedendo suas propriedades.⁹

Um dos desafios no desenvolvimento de sistemas biomiméticos de tecidos, ou mesmo para liberação de drogas, é balancear os efeitos citotóxicos de certos materiais e a sua resistência mecânica. Como mencionado anteriormente, o PLGA apresenta boa compatibilidade e biodegradabilidade, mas possui uma baixa resistência mecânica o que diminui sua utilização na forma pura³¹. Neste sentido, o uso de nanopartículas para formação de compósitos com o PLGA se mostra uma alternativa interessante na solução deste problema.

Ainda, a funcionalidade de certos compostos específicos³², adesão celular facilitada³³, desmutação de espécies reativas de oxigênio³⁴ e liberação controlada de drogas³⁵ são propriedades que têm sido levadas em consideração quando se idealiza biomateriais para funções pré-determinadas. Nestes casos, as nanopartículas podem também funcionar como facilitadores na incorporação destes compostos.

1.3 ÓXIDO DE CÉRIO

Óxidos são moléculas compostas, fruto da oxidação, em que um átomo, íon ou molécula perde um elétron ou uma meia reação³⁶. Os óxidos têm sido utilizados pela humanidade desde a pré-história, quando do emprego dos óxidos de ferro nos primeiros registros nas paredes do que hoje são os sítios arqueológicos.

No desenvolvimento de biomateriais, diversos compostos são escolhidos pela sua taxa de reatividade ou capacidade de simular processos biológicos. Neste sentido, os óxidos como os de titânio, por exemplo, por possuir baixa reatividade e baixa dissolução em ambiente biológico, são empregados como nanopartículas na superfície de implantes ósseos.³⁷

Já as nanopartículas de óxido de cério, por sua capacidade de armazenar e liberar oxigênio desmutando as espécies reativas de oxigênio (ROS, *Reactive Oxygen Species*), têm demonstrado amplo potencial para aplicações diversas que vão desde sensores de gás³⁸, catalisadores³⁹ e células combustíveis⁴⁰ até possíveis aplicações como filtros solares⁴¹. Devido a seus estados de oxidação Ce^{3+} e Ce^{4+} ⁴², as nanopartículas de CeO_2 permitem a equalização das cargas nas espécies reativas, podendo ser usada como proteção contra o estresse oxidativo⁴².

A figura a seguir ilustra a distribuição de nanopartículas de utilizadas neste trabalho. As partículas possuem, em geral 100µm de comprimento.

Figura 3 - Imagem de MEV das nanopartículas de CeO_2 utilizadas na produção dos scaffolds compósitos.

Fonte: Patricia Targon Campana, 2012.

Neste sentido, a utilização destas nanopartículas dentro de *scaffolds* poliméricos poderia auxiliar no processo de semear as células⁴² atuando como um sistema protetor de contra ROS durante a regeneração de tecidos ou o crescimento de novos.

1.4 NANOARGILA HALOISITA (NAH)

A nanoargila haloisita (NAH) é um tipo de argila mineral encontrada em climas tropicais úmidos e regiões subtropicais, rochas erodidas e solos vulcânicos, com a morfologia de nanotubos (como mostra a figura 3), podendo formar monocamadas com solventes orgânicos e inorgânicos como a formamida⁴³.

Figura 4 - Esquema representativo dos nanotubos de Haloisita utilizados neste trabalho. Os pontos azuis representam as moléculas de interesse adsorvidas à superfície interna e externa da nanoargila.

Fonte: adaptado de <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la3044973> ⁴⁴.

As NAHs possuem aplicações que vão desde interações com tecidos humanos (ossos e outros tecidos calcários)⁴⁵, até seu uso como moléculas que compõem biomateriais para auxiliar na incorporação e/ou liberação de diversas substâncias^{43,46}. Devido ao fato de apresentarem, naturalmente, a morfologia de nanotubos, formas esféricas e achatadas, as NAHs interagem facilmente com diversas moléculas através de seus grupos silanol (Si-OH) e oxi-hidróxidos de alumínio (Al(OH)₃) expostos em superfícies internas e externas⁴³. Além disso, sua presença em um compósito pode acarretar no aumento da resistência do tecido e da própria funcionalização, de forma que as NAHs podem ser utilizadas como *nanocontainers* (nanorecipientes*) de moléculas de interesse⁴⁶.

Devido, então, à capacidade de conter moléculas de interesse e alterar a estrutura física dos *scaffolds*, a nanoargila haloisita foi incorporada neste trabalho para carregar a molécula protoporfirina IX, com o objetivo de agregar função ao *scaffold* desenvolvido.

1.5 PROTOPORFIRINA IX

A protoporfirina IX pertence à classe das porfirinas: moléculas compostas de macrociclos tetrapirrólicos consistindo em quatro subunidades de anéis pirrólicos, como mostra a figura a seguir (Figura 5a).

* Tradução livre do inglês.

Figura 5 - (a) estrutura química da protoporfirina IX (sinônimos: 3,7,12,17-Tetramethyl-8,13-divinyl-2,18-porphinedipropionic acid, porfirina de Kammerer, Ooporfirina); (b) espectro de absorção da protoporfirina IX em clorofórmio.

Fonte: Modificado de M. Taniguchi⁴⁷.

Seu perfil de absorção, figura 4b, revela uma forte transição para o segundo estado, banda em torno de 400nm (chamada banda de Soret) e outras quatro transições fracas para o primeiro estado excitado, em torno de 500-650nm, as chamadas bandas Q⁴⁸. Devido à estas propriedades fotofísicas, tanto as porfirinas quanto seus derivados possuem atividade estabilizadora para ligantes que passam por estresse oxidativo, se complexando com moléculas com atividade de desmutação de ROS⁴⁹. Diversas proteínas como hemoglobinas, mioglobinas e óxido nítrico-sintetases possuem porfirinas em suas estruturas, que se ligam a seus sítios ativos metálicos de forma a estabilizá-los.

Em biotecnologia, por outro lado, as porfirinas são bastante utilizadas como cromóforos capazes de formação de oxigênio singlete em tecidos neoplásicos. Nestes casos, o objetivo principal não é a proteção das células contra a formação de ROS, mas sim a sua indução ao processo de morte⁵⁰. No desenvolvimento de biomateriais, estas moléculas podem ser incorporadas aos polímeros para o desenvolvimento de sistemas para o uso em terapia fotodinâmica.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal a confecção de *scaffolds* poliméricos principalmente a partir do polímero poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), PLGA, com a adição de nanopartículas de óxido de cério (CeO_2), nanoargila haloisita (NAH) puras e complexadas com protoporfirina IX. Ainda, foram objetos deste estudo tanto a estrutura morfológica quanto as propriedades físico-químicas dos *scaffolds* e dos *scaffolds* compósitos confeccionados.

Especificamente, foram desenvolvidos *scaffolds* de PLGA, em escalas micro e submicrométrica, com orientação caótica e inserção das nanopartículas na solução de *Electrospinning*, resultando em *scaffolds* compósitos para aplicação em biotecnologia. A estrutura morfológica e as propriedades físico-químicas foram estudadas, principalmente, pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (AFM, *Atomic Force Microscopy*) e ensaios de tração.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Foram utilizados os polímeros: PLLA (ácido poli-l-láctico, peso molecular ~ 101,000 g/mol); PLGA 85:15 (poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) peso molecular ~ 50.000-75.000 g/mol); PDL (poli(D,L-ácido láctico), peso molecular ~ 75000-120.000 mg/mol e 18.000-24.000 mg/mol; e quitosana peso molecular ~ 190000-375000 mg/mol, todos adquiridos da *Sigma-Aldrich Corporation* (EUA) e utilizados sem prévia purificação ou processamento. Para a produção dos *scaffolds* compósitos foram utilizadas nanopartículas de nanoargila haloisita (NAH, peso molecular ~ 294,19 g/mol) e protoporfirina IX ambas adquiridas da *Sigma-Aldrich Corporation* (EUA) e nanopartículas de nanoargila haloisita adsorvidas com protoporfirina IX gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. José Roberto Tozoni (InFis, UFU). As nanopartículas de CeO₂ foram produzidas no *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università Degli Studi di Roma "Tor Vergata"*, e gentilmente cedidas pelos Professores Enrico Traversa e Silvia Liccocia. Os polímeros foram dissolvidos em clorofórmio; dimetilformamida; 1,4 dioxano; diclorometano e ácido acético, todos de grade analítica e obtidos na Casa Americana de Artigos para Laboratórios Ltda. (São Paulo, Brasil), utilizados sem prévia purificação. Toda a água utilizada para a preparação de amostras neste trabalho foi água ultrapura obtida em sistema Milli-Q (Merck Millipore Company, EUA).

3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os *scaffolds* e *scaffolds* compósitos foram preparados utilizando o equipamento construído e patenteado pelo Grupo de Biomateriais e Espectroscopia (BMEspec)^{51,52}, que se encontra ilustrado a seguir.

Figura 6 - Foto do sistema patenteado pelo Grupo de Biomateriais e Espectroscopia (BMESpec).

Fonte: Patricia Targon Campana, 2014 (acervo particular)

Foram levados em consideração os parâmetros explicitados no quadro 1 e a configuração do equipamento, resultando no quadro 2, a seguir, que mostra o intervalo de variação dos parâmetros utilizados em todos os experimentos deste trabalho.

Quadro 2 - Intervalo de variação dos parâmetros utilizados em todos os experimentos deste trabalho.

N*	PARÂMETRO	INTERVALO UTILIZADO
1	Diferença de potencial	De 15 a 20 kV.
2	Distância	De 5cm à 22cm, entre o alvo e a ponta da agulha.
3	Temperatura	ΔT : 263 a 288 K
8	Diâmetro da agulha	Diâmetro interno de 1,3mm (17 G [‡] , canhão branco); diâmetro interno de 0,8mm (21G, canhão verde); diâmetro interno de 0,3mm (30G, canhão rosa).
10	Velocidade de injeção	De 0,27mL/h à 13,20mL/h.
11	Tempo de deposição	De 10 a 30 minutos.

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

NOTA: N*: número correspondente na figura 1; G[‡]: sistema métrico inglês (polegadas).

Os valores específicos para cada variável com os quais foram preparados tanto os *scaffolds* quanto os *scaffolds* compósitos encontram-se melhor descritos na seção de resultados correspondente à cada polímero utilizado.

3.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

3.3.1 Ensaios de tração

Os ensaios de tração realizados neste trabalho consistiram na aplicação de tração de carga uniaxial sobre os *scaffolds* e *scaffolds* compósitos, utilizando-se uma máquina de tração universal Instron modelo 5569 (ITW Test & Measurement, Illinois, EUA). A este sistema foi acoplada uma célula de carga de 20N, em intervalos de 2,5 cm. Seguindo a metodologia de Shao *et al.* 2016⁵³, os *scaffolds*, homogeneizados em cortes retangulares com largura e comprimento padronizados em 10mm e 2,5cm, foram colocados em moldura de papel cartão, gramatura 180mg, e cada amostra foi tensionada à velocidade de 10 mm/min. A tensão foi mantida até o rompimento da amostra (verificado a olho nu), e os seguintes parâmetros foram avaliados, para cada um dos padrões de tensão: módulo elástico, carga máxima e elasticidade antes do rompimento. Cada amostra teve sua espessura medida antes da aplicação da tensão.

Os ensaios de tração permitiram também a obtenção, além dos parâmetros acima, do módulo de Young. Esse parâmetro reflete as propriedades da matéria com respeito à irreversibilidade da deformação mecânica de acordo com a seguinte equação:^{53,54}

$$E = \frac{F/A}{\Delta L/L}$$

onde F é a força aplicada (Newtons), A é a área de secção (m^2), L é o comprimento inicial (m) e ΔL é a variação no comprimento após a deformação.

3.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV/SEM)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV, ou SEM, do inglês *Scanning Electron Microscopy*), diferente da microscopia ótica, se utiliza de ondas de matéria para a formação da imagem. Mais especificamente, os elétrons espalhados pela superfície da amostra são coletados pelo detector para formá-la. Ao invés de uma fonte luminosa, no MEV se utiliza um filamento incandescente de tungstênio que, submetido a alta tensão, fornece os elétrons (emissão

termiônica), e bobinas são utilizadas direcionar o feixe eletrônico usando campo magnético externo, funcionando como lentes. Como os elétrons possuem carga, a superfície da amostra deve ser metalizada para que o contraste seja suficiente para o espalhamento.[†]

Neste trabalho foi utilizado o equipamento Vega 3 LMU (Tescan, Brno, República Tcheca), disponível no Laboratório de Multiusuários do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, com o auxílio do técnico Flaysner Magayver Portela, em colaboração com o Grupo de Espectroscopia de Materiais (GEM-InFis), coordenado pelo Prof. Dr Alexandre Marletta. Brevemente, os scaffolds e os scaffolds compósitos foram recobertos com ouro para maior contraste, sendo submetidos à voltagem de 5KV, sob alto vácuo de 21.225×10^{-3} Pa.

3.3.3 Espectroscopia de energia dispersiva (EDX)

A espectroscopia de energia dispersiva (do inglês *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*, EDX) é um método de avaliação qualitativa e semi-quantitativa que utiliza de irradiação de raios-X para acessar amostras utilizando frequências específicas de radiação para cada tipo de elemento. O método pode ser aplicado em materiais para acessar um elemento em baixa concentração, a depender do tempo de contagem de raios-X.

Para este trabalho, foi utilizado módulo EDX do mesmo equipamento no qual foram realizadas as medidas de MEV. Para a análise da composição dos *scaffolds* foram utilizadas as linhas correspondentes ao carbono e oxigênio (K_{α} 0,277 e K_{α} 0,525)[‡], e para os *scaffolds* compósitos foram utilizadas as linhas do cério (L_{α} 4,839) e do silício (K_{α} 1,739) para verificar as distribuições das nanopartículas de CeO₂ e dos nanotubos de nanoargila haloisita, respectivamente.

3.3.4 Microscopia de força atômica (MFA)

A microscopia de força atômica é um tipo de sondagem topológica de amostra, que utiliza a deflexão de um laser sobre uma haste com ponta de sondagem (preferencialmente com um único átomo em sua última camada) realizando uma varredura sobre a superfície de um

[†] Texto produzido a partir das notas de aula da disciplina Caracterização de Biomoléculas (ACH 5007), ministrada pela Profa. Dra. Patricia Targon Campana em 2016.

[‡] As linhas de todos os átomos da tabela periódica podem ser encontradas em <http://www.jeol.com/>.

material⁵⁵. A interação da ponta sobre o material, dentro dos eixos X e Y é definida ao início do experimento, a fim de retirar informações sobre o perfil no eixo Z, criando um modelo tridimensional da amostra. A imagem de AFM é formada por uma relação entre o deslocamento vertical da ponta do *cantilever*, medido pela reflexão de um laser sobre a sua superfície. Qualquer deslocamento fora do padrão é interpretado como uma característica sobre a superfície, sendo integrado à imagem^{56,57}

Um sistema piezoelétrico auxilia na interpretação os dados e evita que a ponta entre em contato direto com a amostra, danificando-a (*taping mode*). O sistema pode ser programado para que a ponta seja utilizada sobre o material afim de demarcar a topologia da amostra de forma destrutiva (*contact mode*) podendo, através de indentações controladas, promover a formação de topologias desejadas⁵⁸. Dependendo do teste, pode-se funcionalizar a ponta com moléculas de interesse, como proteínas, fazendo-as interagir com seus ligantes sobre o recipiente de amostra, recuando o *cantilever* no eixo z de forma semelhante a um teste de tração. Outras utilizações podem ser as medições de carga da superfície e elasticidade, de maneira semelhante ao teste de tração utilizado para amostras macrométricas.^{53,54}

Apesar de utilizar diversos tipos de microscopia eletrônica para acessar a superfície de scaffolds, muitas vezes a disposição de poros, a disponibilidade das fibras e a rugosidade das superfícies não são facilmente visualizadas e podem estar contaminadas pela própria técnica de microscopia, como a queima de pequenas estruturas em SEM. Para estes casos, é necessária a utilização de AFM para acessar tais informações.⁵⁹

Neste trabalho foi utilizado um microscópio de força atômica SPM-9600 *Scanning Probe Microscope* (Shimadzu, Kioto, Japão) disponível no Grupo de Espectroscopia de Materiais (GEM) do Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia, com o auxílio do técnico, em colaboração com o Prof. Dr Alexandre Marletta. Os *scaffolds* e *scaffolds* compósitos foram analisados em áreas específicas de 2,5 μm^2 , 5 μm^2 e 10 μm^2 , sempre na superfície das fibras de cada amostra. Todas as amostras tiveram no mínimo 5 imagens realizadas em cada configuração. As imagens tiveram 10 segmentos de 50 por 50 *pixels*, separadas aleatoriamente sobre a superfície das fibras para análise estatística, através programa *Gwyddion* (disponível no próprio equipamento), atribuindo medidas físicas à imagem, principalmente rugosidade e contraste de fase.

3.4 VALIDAÇÃO BIOLÓGICA

Alguns dos *scaffolds* e *scaffolds* compósitos estudados neste trabalho foram testados quando a sua viabilidade para o crescimento celular em colaboração com a Profa Dra. Viviane Nunes (EACH/USP), utilizando células HaCat, uma linhagem imortalizada de queratinócitos obtida por meio de transformação espontânea. Os experimentos foram realizados pela doutoranda Jennifer Farias, e encontram-se brevemente descritos aqui.

Os *scaffolds* de PLGA e *scaffolds* compósitos PLGA/CeO₂ foram esterilizados por exposição à luz ultravioleta, durante 20 minutos, em cada uma de suas faces. Para facilitar seu manuseio, os *scaffolds* foram colocados sobre suportes MilliCells (Millipore Sigma Company, Massachusetts, EUA), que permitem uma suspensão do material em uma interface ar-líquido. Foi utilizado o meio de cultura Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado com soro fetal bovino 10% e os antibióticos estreptomicina e penicilina 1%, em placas com 6 poços com 35mm de diâmetro, sob atmosfera úmida com CO₂ 5%, durante 27 dias.

Para as medidas de MEV, as amostras foram fixadas de acordo com o seguinte protocolo: ainda nas dentro das MilliCells, os *scaffolds* contendo as células, foram lavados 3 vezes com tampão salino fosfatado pH 7.4 (PBS, *Phosphate Buffer Saline*) gelado. Após as lavagens, os *scaffolds* foram cuidadosamente removidos das MilliCells, e transferidos para placas de 6 poços limpas onde foi acrescida a solução de glutaraldeído 3% (diluído em PBS). As placas foram mantidas em geladeira por 3 horas. Após esse período, as amostras foram lavadas novamente com PBS (3 vezes) e foi adicionado tetróxido de ósmio 1% (diluído em água destilada), sendo incubado por 1 hora, em temperatura ambiente. Finalmente, as amostras foram lavadas 2 vezes com água destilada, desidratadas com concentrações crescentes de etanol (35%, 50%, 75%, 95%, absoluto) por 10 minutos e secas na estufa a 37° C, por 1 hora.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SCAFFOLDS

4.1.1 Quitosana

O polímero natural quitosana foi utilizado primeiramente como adquirido, mas os experimentos não resultaram em fibras, nem tampouco chegaram a formar algum filme ou outra forma que pudesse ser otimizada com a variação dos parâmetros do ES. Desta forma, passou-se à adaptação do tratamento alcalino proposto por Homayoni et al⁶⁰, para otimizar sua viabilidade na confecção dos *scaffolds*. Brevemente, o tratamento alcalino consistiu em solubilizar 4% de quitosana m/v em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 3 N em água (pH 8), à temperatura de 70°C para a eliminação de um grupamento amina de sua estrutura, levando à diminuição de seu peso molecular e por consequência de sua viscosidade⁶⁰. Em tese, esse procedimento deveria tornar a solução de quitosana mais suscetível ao campo elétrico e, portanto, possibilitar a eletrofiação.

A partir da quitosana tratada, foram preparadas diversas soluções ácidas, à base de água, para sua dissolução, em quantidades que variaram de 2% a 90% para a utilização no sistema ES. As soluções e seus gradientes encontram-se na tabela a seguir. Em todos os experimentos foram utilizadas agulhas com diâmetro interno de 0,8mm (21G, canhão verde).

Tabela 1 - Parâmetros usados para a confecção de scaffolds a partir de quitosana em soluções diferentes concentrações de ácido acético.

N*	POLÍMERO	SOLVENTE	CONC. (m/v)	DISTÂNCIA (cm)	TEMPO (min)	INJEÇÃO (mL/h)	T (K)	ddp (kV)
1	quitosana tratada	90% de ácido acético em água	7%	15	10	0,2	298	15
2	quitosana tratada	90% de ácido acético em água	7%	20	10	0,2	298	20
3	quitosana tratada	90% de ácido acético em água	2,5%	15	10	0,2	298	15
4	quitosana tratada	90% de ácido acético em água	5%	15	10	0,2	298	15
5	quitosana tratada	90% de ácido acético em água	3%	10	10	0,2	298	20

Continua...

...

N*	POLÍMERO	SOLVENTE	CONC. (m/v)	DISTÂNCIA (cm)	TEMPO (min)	INJEÇÃO (mL/h)	T (K)	ddp (kV)
6	quitosana tratada	90% de ácido acético em água	3%	20	10	0,2	298	20
7	quitosana tratada	90% de ácido acético em água	3%	20	10	0,2	298	15
8	quitosana tratada	5% de ácido acético em água	3%	20	10	0,2	298	15
9	quitosana tratada	15% de ácido acético em água	3%	20	10	0,2	298	15
10	quitosana tratada	20% de ácido acético em água	3%	20	10	0,2	298	15
11	quitosana tratada	30% de ácido acético em água	3%	20	10	0,2	298	15

Fonte: Thiago Reinaldos Silva. 2018.

NOTA: N*: número do experimento; Conc.: concentração da solução polimérica; Distância: distância do alvo à ponta da seringa; Tempo: tempo de deposição; Injeção: velocidade de injeção; T: temperatura da câmara; ddp: Diferença de potencial.

A adição do ácido em solução teve duas funções: dissolver o polímero e prover cargas em solução para diminuição da tensão de superfície e aumento da condutividade elétrica⁶¹. Ainda, para diminuir a viscosidade e aumentar a volatilidade da solução foi adicionado etanol nas concentrações de 5%, 30% e 50% v/v. O etanol, no entanto, interferiu na dissolução da quitosana não havendo êxito na produção dos *scaffolds*.

Todas as soluções resultantes, mesmo tendo sido tratadas para diminuição da viscosidade, ainda possuíam, aparentemente (ao toque), viscosidade muito mais alta que outros polímeros eletrofiados no sistema BMEspec, como PLA e seus derivados. As tensões disponíveis no laboratório pareciam não serem suficientes para transpor a barreira da energia livre de Gibbs do líquido, além da propriedade diamagnética da água, de forma que para fiar tais soluções com alta viscosidade seriam necessárias tensões maiores que os 20 KV máximos do equipamento. Além disso, a solução de quitosana e ácido acético em água, aparentemente não possui a quantidade de portadores de carga necessária para o depósito das fibras poliméricas no alvo coletor, pois, em todos os casos observados, a solução foi “atraída” pelo alvo, sendo suscetível ao campo, porém, não suficiente para que a solução atingisse o alvo, depositando-se na base do equipamento.

4.1.2 Poli(D,L-ácido láctico), PDL

O poli(D,L-ácido láctico) foi o primeiro polímero derivado de ácido láctico estudado neste trabalho. Solubilizado na proporção 15% m/v em uma mistura de clorofórmio e dimetilformamida (DMF) na proporção de 3:1, o PDL foi eletrofiado em vários experimentos, nos quais foram variados os parâmetros do ES até a obtenção dos *scaffolds*.

Para a melhor compreensão do processo de formação das fibras, o PDL foi utilizado em duas formas diferentes: com peso molecular entre 75.000-120.000 mg/mol (PDL) e com peso molecular entre 18.000-24.000 mg/mol (PDLA). Deste modo, se pôde observar o comportamento físico-químico da mesma unidade estrutural, porém com pesos moleculares diferentes. Os parâmetros para cada experimento encontram-se nas tabelas a seguir. Em todos os experimentos foram utilizadas agulhas com diâmetro interno de 0,8 mm (21G, canhão verde).

Tabela 2 - Parâmetros utilizados para a confecção de *scaffolds* de PDL com peso molecular 75.000 a 120.000 mg/mol.

N*	POLÍMERO	SOLVENTE	CONC. (m/v)	DISTÂNCIA (cm)	TEMPO (min)	INJEÇÃO (mL/h)	T (K)	ddp (kV)
1	PDL	Clorofórmio: DMF (3:1)	15%	10	20	0,25	303	12
2	PDL	Clorofórmio: DMF (3:1)	15%	10	20	0,25	303	14
3	PDL	Clorofórmio: DMF (3:1)	15%	10	20	0,25	303	16
4	PDL	Clorofórmio: DMF (3:1)	15%	10	20	0,25	303	18
5	PDL	Clorofórmio: DMF (3:1)	15%	10	20	0,25	303	20

Fonte: Thiago Reinaldos Silva. 2018.

NOTA: N*: número do experimento; Conc.: concentração da solução polimérica; Distância: distância do alvo à ponta da seringa; Tempo: tempo de deposição; Injeção: velocidade de injeção; T: temperatura da câmara; ddp: Diferença de potencial.

Tabela 3 - Parâmetros utilizados para a confecção de *scaffolds* de PDL com peso molecular entre 18.000-24.000 mg/mol (PDLA).

N*	POLÍMERO	SOLVENTE	CONC. (m/v)	DISTÂNCIA (cm)	TEMPO (min)	INJEÇÃO (mL/h)	T (K)	ddp (kV)
1	PDLA	Clorofórmio: DMF (3:1)	15%	20	20	0,25	303	20
2	PDLA	Clorofórmio: DMF (3:1)	15%	10	20	0,25	303	20
3	PDLA	Clorofórmio: DMF (3:1)	15%	5	20	0,25	303	20

Fonte: Thiago Reinaldos Silva. 2018.

NOTA: N*: número do experimento; Conc.: concentração da solução polimérica; Distância: distância do alvo à ponta da seringa; Tempo: tempo de deposição; Injeção: velocidade de injeção; T: temperatura da câmara; ddp: Diferença de potencial.

Os *scaffolds* obtidos por ES a partir dos polímeros PDL e PDLA foram constituídos de fibras, como mostra a figura obtida em microscópio ótico, a seguir.

Figura 7 - *Scaffold* de PDL, obtido no experimento 2 da tabela 4. Figura obtida em microscópio ótico, aumento de 10x.

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

É interessante notar que, mesmo em baixa resolução, se comparado ao MEV, é possível verificar a relativa coesão do tecido e a ausência de aglomerados poliméricos (*beads, clusters*) evidentes nos fios. Embora este *scaffold* tenha sido obtido com sucesso, optou-se por não introduzir as moléculas de interesse neste sistema devido à simetria da orientação D deste polímero, que não é comumente encontrada na natureza. Assim, passou à utilização do polímero ácido poli-l-láctico, PLLA.

4.1.3 Ácido poli-l-láctico, PLLA

O polímero PLLA foi solubilizado em dois solventes diferentes para a eletrofiação: o diclorometano e o 1,4 dioxano. Em ambos casos, os *scaffolds* resultantes foram bastante heterogêneos. Em todos os experimentos foram utilizadas agulhas com diâmetro interno de 0,8mm (21G, canhão verde). Os parâmetros dos experimentos realizados encontram-se na tabela a seguir.

Tabela 4 - Parâmetros utilizados para a confecção de scaffolds de PLLA.

N*	POLÍMERO	SOLVENTE	CONC. (m/v)	DISTÂNCIA (cm)	TEMPO (min)	INJEÇÃO (mL/h)	T (K)	ddp (kV)
1	PLLA	Diclorometano	10%	20	10	8	303	20
2	PLLA	Diclorometano	10%	20	10	8	303	20
3	PLLA	Diclorometano	10%	20	10	8	303	20
4	PLLA	Diclorometano	10%	20	10	6	303	20
5	PLLA	1,4-dioxano	10%	16,5	10	6	303	20
6	PLLA	1,4-dioxano	10%	16,5	10	6	303	20
7	PLLA	Diclorometano	10%	20	10	2	303	20

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

NOTA: N*: número do experimento; Conc.: concentração da solução polimérica; Distância: distância do alvo à ponta da seringa; Tempo: tempo de deposição; Injeção: velocidade de injeção; T: temperatura da câmara; ddp: Diferença de potencial.

Os *scaffolds* resultantes destes experimentos apresentaram fibras em sua estrutura, porém, nenhuma das amostras resultou em tecidos de fibras uniformes, todas elas possuindo fibras bastante heterogêneas e carregadas de aglomerados poliméricos, como pode ser visto na figura 8.

Figura 8 - Scaffold de PLLA, obtido no experimento 4 da tabela 6. Figura obtida em microscópio ótico, aumento de 10x.

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

Devido à heterogeneidade destes *scaffolds*, o polímero PLLA, assim como o PDL, também não foi utilizado para a confecção dos *scaffolds* compósitos. Assim, optou-se por

utilizar um copolímero: polímero com mais de um tipo de mero. No caso deste trabalho, o copolímero escolhido foi o poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), PLGA.

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

Neste trabalho foi utilizado o copolímero PLGA 85:15, que possui 85% do mero lactídeo e 15% do glicolídeo em sua composição. Neste caso, a viscosidade é maior que os copolímeros 75:25 ou mesmo 50:50, uma vez que o mero lactídeo tem a propriedade de *cross-linking* com outras cadeias de ácido láctico na mesma solução, de forma que a viscosidade aumenta nas correlações que têm mais peso deste mero. No entanto, a presença do mero glicolídeo faz com que a viscosidade diminua sensivelmente em relação ao PLLA, que é 100% mero lactídeo.

Nos experimentos que se seguem, o PLGA 85:15 foi dissolvido nas alíquotas de 5%, 10% e 15% de massa em solução de clorofórmio e dimetilformamida (DMF) na proporção de 1:3 (v/v) e os parâmetros experimentais encontram-se na tabela a seguir.

Tabela 5 - Parâmetros utilizados para a confecção de scaffolds de PLLA.

N*	POLÍMERO	SOLVENTE	CONC. (m/v)	DISTÂNCIA (cm)	TEMPO (min)	INJEÇÃO (mL/h)	T (K)	ddp (kV)
1	PLGA 85:15	clorofórmio	10%	16,5	10	1	293-296	20
2	PLGA 85:15	clorofórmio	10%	16,5	10	1	290-297	20
3	PLGA 85:15	clorofórmio	10%	16,5	10	3	290-297	20
4	PLGA 85:15	clorofórmio	10%	16,5	10	6	290-297	20
5	PLGA 85:15	clorofórmio	10%	16,5	10	12	290-297	20
6	PLGA 85:15	clorofórmio	3%	16,5	10	3	297-300	20
7	PLGA 85:15	clorofórmio	3%	16,5	10	1	298-303	20
8	PLGA 85:15	clorofórmio	3%	16,5	10	1	298-303	20
9	PLGA 85:15	clorofórmio	3%	16,5	10	1	308	20
10	PLGA 85:15	clorofórmio	13 %	16,5	10	1	308	20
11	PLGA 85:15	clorofórmio	13 %	16,5	10	1	308	20

Continua...

...

N*	POLÍMERO	SOLVENTE	CONC. (m/v)	DISTÂNCIA (cm)	TEMPO (min)	INJEÇÃO (mL/h)	T (K)	ddp (kV)
12	PLGA 85:15	DMF	33%	10	20	2	308	12
13	PLGA 85:15	clorofórmio/ DMF (3:1)	4%	10	10	1	308	16
14	PLGA 85:15	clorofórmio/ DMF (3:1)	4%	10	10	1	308	20
15	PLGA 85:15	clorofórmio/ DMF (3:1)	4%	10	10	0,8	308	16
16	PLGA 85:15	clorofórmio/ DMF (3:1)	4%	10	10	0,8	308	20
17	PLGA 85:15	clorofórmio/ DMF (3:1)	4%	10	10	1	308	20
18	PLGA 85:15	clorofórmio/ DMF (3:1)	4%	10	10	1	303	15
19	PLGA 85:15	clorofórmio/ DMF (3:1)	4%	10	20	0,5	303	15
20	PLGA 85:15	clorofórmio/ DMF (3:1)	4%	10	20	0,5	303	15
21	PLGA 85:15	clorofórmio/ DMF (3:1)	4%	10	20	0,5	303	20
22	PLGA 85:15	clorofórmio/ DMF (3:1)	4%	10	20	0,5	303	20
23	PLGA 85:15	clorofórmio/ DMF (3:1)	7%	10	30	0,5	303	20
24	PLGA 85:15	clorofórmio/ DMF (3:1)	15%	10	30	0,5	303	20
25	PLGA 85:15	clorofórmio/ DMF (3:1)	15%	10	30	0,5	30	20
26	PLGA 85:15	clorofórmio/ DMF (3:1)	15%	10	30	0,5	30	20
27	PLGA 85:15	clorofórmio/ DMF (3:1)	15%	10	30	0,5	30	20
28	PLGA 85:15	clorofórmio/ DMF (3:1)	15%	10	30	0,5	30	20
29	PLGA 85:15	clorofórmio/ DMF (3:1)	15%	10	30	0,5	30	20
30	PLGA 85:15	clorofórmio/ DMF (3:1)	15%	10	30	0,5	30	20
31	PLGA 85:15	clorofórmio/ DMF (3:1)	15%	10	20	0,25	30	12
32	PLGA 85:15	clorofórmio/ DMF (3:1)	15%	10	20	0,125	30	12

Fonte: Thiago Reinaldo Silva. 2018.

NOTA: N*: número do experimento; Conc.: concentração da solução polimérica; Distância: distância do alvo à ponta da seringa; Tempo: tempo de deposição; Injeção: velocidade de injeção; T: temperatura da câmara; ddp: Diferença de potencial.

Dos experimentos 1 a 20 não foram observadas fibras. Os *scaffolds*, quando eram formado no alvo, consistiam basicamente de filmes muito finos e quebradiços. A partir do experimento de número 21, fios passaram a ser observados nos scaffolds formados, mas ainda muito heterogêneos. Para diminuir estas imperfeições e, mais especificamente, diminuir a formação de aglomerados poliméricos (*beads*, *clusters*), seguindo os resultados de Ramakrishna e colaboradores⁹, as agulhas usadas até então (diâmetro interno de 0,8mm, 21G,

canhão verde) foram substituídas por agulhas com diâmetro interno menores (diâmetro interno de 0,3mm, 30G, canhão rosa).

Os *scaffolds* resultantes se mostraram relativamente homogêneos quando observados ao microscópio (resultados não mostrados) ótico e, o experimento de número 31, também por sua reprodutibilidade, foi adotado como o conjunto de parâmetros base para a produção *scaffolds* compósitos.

4.2 SCAFFOLDS COMPÓSITOS

4.2.1 Scaffolds compósitos de PLGA e CeO₂

As nanopartículas de óxido de cério (CeO₂) foram incorporadas aos *scaffolds* nas proporções de 1%, 5%, 10% e 20% resultando em 4 tipos de *scaffolds* compósitos. As amostras foram nomeadas como constam na tabela a seguir.

Tabela 6 - Nomenclatura dos *scaffolds* compósitos de PLGA e CeO₂.

NOME	CONSTITUIÇÃO DA AMOSTRA
PLGA	<i>Scaffold</i> confeccionado com o polímero PLGA 85:15
PLGA-1CeO ₂	<i>Scaffold</i> confeccionado com o polímero PLGA 85:15 com adição de CeO ₂ 1% m/m
PLGA-5CeO ₂	<i>Scaffold</i> confeccionado com o polímero PLGA 85:15 com adição de CeO ₂ 5% m/m
PLGA-10CeO ₂	<i>Scaffold</i> confeccionado com o polímero PLGA 85:15 com adição de CeO ₂ 10% m/m
PLGA-20CeO ₂	<i>Scaffold</i> confeccionado com o polímero PLGA 85:15 com adição de CeO ₂ 20% m/m

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

Optou-se por incorporar as nanopartículas de forma gradual seguindo uma frequência exponencial, para que fosse avaliado seu papel na formação das fibras do *scaffold*. As nanopartículas foram adicionadas à solução polimérica previamente preparada e agitados por 30 minutos.

Os parâmetros do ES foram para todos os experimentos de incorporação foram: polímero PLGA 85:15 dissolvido em solução de clorofórmio e dimetilformamida (3:1), na concentração de 15% m/v de polímero, eletrofiados em câmara à 303 K, ddp 12 kV a uma distância de 10 cm (alvo, agulha). Apenas a velocidade de injeção foi variada em dois experimentos: um deles com 0,5mL/h e outro com 0,25mL, tendo sido a segunda velocidade a que produziu os *scaffolds* compósitos mais heterogêneos. A figura a seguir ilustra um dos *scaffolds* compósitos, onde esta heterogeneidade é facilmente verificada.

Figura 9 - PLGA-1CeO₂ (0,25mL/h) com barra de medida de 500 mil micrômetros, aumento de 10x em microscópio ótico.

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

De forma semelhante aos *scaffolds* de PLGA, os *scaffolds* compósitos mostram relativa uniformidade e ausência de aglomerados poliméricos em meio às fibras.

4.2.2 Scaffolds compósitos de PLGA e NAH; e PLGA e NAH-protoporfirina IX

A nanoargila haloisita (NAH) e nanoargila haloisita complexada com protoporfirina IX (NAPo), de forma semelhante aos scaffolds compósitos de PLGA e CeO₂, também foram incorporadas aos *scaffolds* nas proporções de 1%, 5%, 10% e 20% para o compósito PLGA e NAH e 1%, 5% e 10% o compósito PLGA e NAPo resultando em 7 tipos de *scaffolds* compósitos. As amostras foram nomeadas como constam na tabela abaixo.

Tabela 7 - Nomenclatura dos scaffolds compósitos de PLGA e NAH e PLGA NAH-protoporfirina IX.

NOME	CONSTITUIÇÃO DA AMOSTRA
PLGA-1NAH	<i>Scaffold</i> confeccionado com o polímero PLGA 85:15 com adição de nanoargila haloisita 1% m/m
PLGA-5NAH	<i>Scaffold</i> confeccionado com o polímero PLGA 85:15 com adição de nanoargila haloisita 5% m/m
PLGA-10NAH	<i>Scaffold</i> confeccionado com o polímero PLGA 85:15 com adição de nanoargila haloisita 10% m/m
PLGA-20NAH	<i>Scaffold</i> confeccionado com o polímero PLGA 85:15 com adição de nanoargila haloisita 20% m/m
PLGA-1NaPo	<i>Scaffold</i> confeccionado com o polímero PLGA 85:15 com adição de nanoargila haloisita complexada com protoporfirina IX 1% m/m

PLGA-5NaPo	<i>Scaffold</i> confeccionado com o polímero PLGA 85:15 com adição de nanoargila haloisita complexada com protoporfirina IX 5% m/m
PLGA-10NaPo	<i>Scaffold</i> confeccionado com o polímero PLGA 85:15 com adição de nanoargila haloisita complexada com protoporfirina IX 10% m/m

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

Os parâmetros de ES foram os mesmos utilizados na preparação dos *scaffolds* compósitos de PLGA e CeO₂, no entanto, no caso das amostras contendo nanoargila haloisita complexada com protoporfirina IX a viscosidade foi um fator limitante, de forma que as amostras com concentrações de 20% m/m não foram obtidas com sucesso.

4.3 ESTUDOS MORFOLÓGICOS E TÊNSEIS DOS SCAFFOLDS E SCAFFOLDS COMPÓSITOS

4.3.1 Scaffolds de PLGA

Para analisar com maior detalhamento o arranjo das fibras nos *scaffolds* PLGA foram realizadas medidas de MEV. A figura a seguir ilustra esta estrutura.

Figura 10 - Imagens de MEV da amostra PLGA ampliadas 500 vezes (esquerda) e 2.000 vezes (direita).

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

Pode-se observar, nas figuras acima, que as fibras possuem morfologia relativamente heterogênea, além da presença de aglomerados poliméricos entre elas. Esta morfologia pode ser um produto de viscosidade abaixo da solução polimérica abaixo do valor ideal.

Apesar dos pequenos defeitos na estrutura, as fibras são pouco rugosas e de constituição relativamente homogênea, como revelam as figuras de microscopia de força atômica, a seguir.

Figura 11 - Imagem de AFM da amostra PLGA em escala de $2,5 \mu\text{m}^2$, em topografia (esquerda) e contraste de fase (direita).

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

Nota-se que a superfície das fibras, apesar de alguns vales em sua composição, não apresenta diferenças em defasagem, possuindo uma fase contínua e se mostrando pouco rugosa.

Os estudos tênses dos *scaffolds*, incluindo o módulo de Young, são fundamentais para a caracterização de biomateriais, principalmente no que diz respeito à aplicação destes como sistemas biomiméticos de tecido. Em sistemas biológicos a tensão dos movimentos de diferentes tecidos requer materiais com diferentes tipos de estruturas e características tênses⁵⁰.

A título de ilustração tem-se o um gráfico representando a extensão, deformação e subsequente rompimento de um *scaffold* de PLGA e, na tabela 10 encontram-se os dados relativos à caracterização tênsil deste *scaffold*.

Figura 12 - Três diferentes amostras de *scaffold* PLGA. As linhas representam o ponto mais alto onde a deformidade é maior e o processo de rompimento do tecido.

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

Tabela 8 - Caracterização tênsil de três diferentes amostras de *scaffold* PLGA.

PLGA	CARGA MÁXIMA (N)	EXTENSÃO MÁXIMA (mm)	ESTRESSE TÊNSIL NA CARGA MÁXIMA (MPa)	MÓDULO DE YOUNG (MPa)	ESPESSURA DA AMOSTRA (mm)
Amostra 1	1,6	2	1,1	12,6	0,09
Amostra 2	1	2,42	1,7	-	0,1
Amostra 3	1,1	6,2	1,1	1,4	0,1

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

É interessante notar, na tabela acima que, considerando a espessura os valores do módulo de Young das amostras 1 e 3 podem ser comparáveis. No entanto, os valores encontrados para os *scaffolds* PLGA ainda são relativamente baixos se comparados aos tecidos naturais, como por exemplo, as microfibras fosfolipídicas que possuem um módulo elástico de 17,26 MPa⁶⁰.

4.3.2 Scaffolds compósitos de PLGA e CeO₂ (PLGA-CeO₂)

A adição de nanopartículas de CeO₂ promoveu uma homogeneização das fibras poliméricas dos *scaffolds* compósitos, quando comparados aos *scaffolds* PLGA, como pode ser observado a seguir.

Figura 13 - Imagens de MEV da amostra PLGA-1CeO₂ ampliadas 500 vezes (esquerda) e 2.000 vezes (direita).

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

Nota-se que, o compósito formado com a menor quantidade de CeO₂ (1% em massa) já causa uma drástica mudança na morfologia do *scaffold* compósito quando comparado ao *scaffold* PLGA. As fibras se tornam mais homogêneas e menores, em média. Os aglomerados poliméricos já são mais difíceis de serem vistos nas fibras.

O aumento da quantidade de CeO₂ no *scaffold* compósito até 10% (em massa) segue o padrão morfológico exibido pelo *scaffold* compósito PLGA-1CeO₂, como pode ser observado nas figuras a seguir.

Figura 14 - Imagens de MEV da amostra PLGA-5CeO2 ampliadas 500 vezes (esquerda) e 2.000 vezes (direita).

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

Figura 15 - Imagens de MEV da amostra PLGA-10CeO2 ampliadas 500 vezes (esquerda) e 2.000 vezes (direita).

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

Nos *scaffolds* compósitos PLGA-5CeO₂ e PLGA-10CeO₂, assim como no caso dos *scaffolds* compósitos PLGA-1CeO₂, é visível presença de fibras coesas e homogeneamente distribuídas, apesar de algumas regiões indicarem início de saturação do tecido, principalmente em PLGA-10CeO₂.

Já nos *scaffolds* compósitos PLGA-20CeO₂, figura 16 abaixo, o aumento da concentração de nanopartículas de óxido de cério para 20% mostra áreas nas quais as fibras encontram-se rompidas, possivelmente devido à alta viscosidade promovida pela adição das nanopartículas.

Figura 16 - Imagem de MEV da amostra PLGA-20CeO₂ ampliada 2.000 vezes.

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

Para verificar a distribuição das nanopartículas de CeO₂ no *scaffolds* compósitos, foram analisadas as emissões de raios-X dos compostos carbono, oxigênio e cério dos *scaffolds* compósitos contendo nanopartículas de CeO₂, via EDX. Foram avaliadas as amostras PLGA-1CeO₂, PLGA-5CeO₂, PLGA-10CeO₂, e PLGA-20CeO₂, e a figura a seguir ilustra a distribuição destes compostos na amostra PLGA-10CeO₂.

Figura 17 - (a) Imagem de MEV da amostra PLGA-10 CeO₂ ampliada 10.000 vezes; (b) Imagem gerada a partir da linha do oxigênio; (c) Imagem gerada a partir da linha do carbono; e (d) Imagem gerada a partir da linha do cério.

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

É possível observar que a distribuição de nanopartículas de cério é homogênea ao longo dos fios do *scaffold* composto. As áreas onde são vistas algumas aglomerações são áreas de intersecções e sobreposições das fibras e, portanto, da emissão do cério.

Assim como no caso dos *scaffolds* PLGA, a morfologia da superfície das fibras dos *scaffolds* compostos PLGA-1CeO₂, PLGA-5CeO₂, PLGA-10CeO₂ e PLGA-20CeO₂ foi avaliada através das medidas de microscopia de força atômica.

Como pode ser observado a seguir, a adição das nanopartículas de CeO_2 não provoca mudanças sensíveis na rugosidade das fibras.

Figura 18 - Imagem de AFM da amostra PLGA-10 CeO_2 em escala de $10\text{ }\mu\text{m}^2$, em topografia(esquerda) e contraste de fase (direita).

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

É importante observar que não há contraste de fase ao longo da fibra, assim como no caso do *scaffold* PLGA, indicando que as nanopartículas de CeO_2 encontram-se encapsuladas dentro das fibras e não distribuídas sobre a superfície.

A inclusão de aditivos, como as nanopartículas de CeO_2 podem modificar as propriedades mecânicas dos *scaffolds* compósitos em relação aos *scaffolds* de PLGA. Para verificar a ocorrência ou não destas mudanças, foram realizados estudos tênses, cujos resultados encontram-se a seguir.

Tabela 9 - Caracterização tênsil de três diferentes amostras de *scaffolds* compósitos de PLGA e CeO₂.

AMOSTRA	CARGA MÁXIMA (N)	EXTENSÃO MÁXIMA (mm)	ESTRESSE TÊNSIL NA CARGA MÁXIMA (MPa)	MÓDULO DE YOUNG (MPa)	ESPESSURA DA AMOSTRA (mm)
PLGA-1CeO ₂	2,7	5,71	3	16,1	0,09
	1,8	3,95	2,2	10,5	0,08
	1,8	7,29	1,9	6,1	0,1
PLGA-5CeO ₂	2,5	10,8	2,8	9,6	0,09
	1,7	15,88	2,8	8,3	0,06
	2	5,11	1,8	17,5	0,11
PLGA-10CeO ₂	2,4	9,14	2,7	7,1	0,09
	2,4	7,29	1,8	9	0,13
	1,8	7,54	1,8	4,4	0,1
PLGA-20CeO ₂	2,3	10,75	1,9	5,1	0,12
	1,3	9,75	2	2,3	0,06
	2,7	9,51	2,7	8,8	0,1

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

A adição do CeO₂ promoveu uma mudança no padrão de elasticidade dos *scaffolds* PLGA, resultando em maiores valores de extensão para os *scaffolds* compósitos, além de aumentar sensivelmente o suporte de carga máxima. No entanto, o aumento da concentração de nanopartículas na constituição do *scaffold* compósito não provoca estas mudanças linearmente, ou seja, em média e considerando as espessuras das amostras, o compósito PLGA-1CeO₂ e os demais têm as características tênsis semelhantes entre si. Os *scaffolds* compósitos também possuem valores de módulo de Young maiores, refletindo em maior elasticidade, quando comparados aos *scaffolds* PLGA.

4.3.3 Scaffolds compósitos de PLGA e NAH (PLGA-NAH); e PLGA e NAH-protoporfirina IX (PLGA-NaPo)

De forma similar aos demais *scaffolds* estudados, os *scaffolds* compósitos PLGA e NAH; e PLGA e NAH-protoporfirina IX também foram avaliados quanto à sua morfologia por MEV. Embora a introdução das NAHs tenha modificado as propriedades morfológicas dos *scaffolds* compósitos em relação aos *scaffolds* PLGA, não foram verificadas diferenças significativas na estrutura dos *scaffolds* compósitos formados com ou sem a protoporfirina IX, como pode ser verificado a seguir.

Figura 19 - Imagens de MEV da amostra PLGA-1NAH ampliadas 2.000 vezes (esquerda) e 5.000 vezes (direita).

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

Figura 20 - Imagens de MEV da amostra PLGA-1NAPo ampliadas 500 vezes (esquerda) e 5.000 vezes (direita).

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

As figuras acima mostram que, tanto a introdução de nanoargila haloisita (figura 19) quanto de nanoargila haloisita complexada com protoporfirina IX (figura 20) causam os mesmos efeitos na morfologia dos *scaffolds* compósitos quando comparados aos *scaffolds* PLGA: as fibras formadas são bastante homogêneas, não há presença de aglomerados poliméricos e as superfícies das fibras não possuem poros e possuem pouca rugosidade.

Para verificar a presença das NAH e NAH complexadas com protoporfirina IX, foram feitas, como no caso anterior, as análises por EDX. Neste caso, foram avaliadas as linhas das emissões de raios-X dos compostos carbono, oxigênio e silício dos *scaffolds*. A análise específica da protoporfirina IX não foi possível por esta técnica pois, esta molécula não possui nenhum átomo em sua composição que não esteja presente também no polímero.

Foram avaliadas as amostras PLGA-1NAH, PLGA-5NAH, PLGA-10NAH, PLGA-20NAH, PLGA-1NaPo, PLGA-5NaPo, PLGA-10NaPo, e a figura a seguir ilustra a distribuição destes compostos nas amostras PLGA-10NAH e PLGA-1NaPo.

Figura 21 - (a) Imagem de MEV, amostra PLGA-10NAH ampliada 1.000x; (b) Imagem gerada a partir da linha do oxigênio; (c) Imagem gerada a partir da linha do carbono; e (b) Imagem gerada a partir da linha do silício.

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

Figura 22 - (a) Imagem de MEV da amostra PLGA-1NAPo ampliada 10.000 vezes; (b) Imagem gerada a partir da linha do silício.

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

Nota-se que, assim como acontece com as nanopartículas de CeO_2 , tanto as NAH quanto as NAH complexadas com protoporfirina IX encontram-se homogeneamente distribuídas nas fibras dos *scaffolds* compósitos. A morfologia das fibras também foi avaliada por microscopia de força atômica, como mostram os resultados a seguir.

Figura 23. Imagem de AFM da amostra PLGA-10NAH em escala de $2,5 \mu\text{m}^2$, em topografia (esquerda) e contraste de fase (direita).

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

Figura 24 - Imagem de AFM da amostra PLGA-10NAPo em escala de $2,5 \mu\text{m}^2$, em topografia (esquerda) e contraste de fase (direita).

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

Novamente, observando as microscopias acima, em ambos casos não há contraste de fase ao longo das fibras dos *scaffolds* compósitos, de forma que tanto as nanoargilas (NAHs) quanto as nanoargilas complexadas com protoporfirina IX (NAPo), provavelmente, se encontram encapsuladas dentro das fibras e não distribuídas sobre a superfície. Os estudos tênséis relativos a estes *scaffolds* compósitos encontram-se a seguir.

Tabela 10 - Caracterização tênsil de três diferentes amostras de *scaffolds* compósitos de PLGA e NAH (PLGA-NAH); e PLGA e NAH-protoporfirina IX (PLGA-NAPo).

Amostra	Carga máxima (N)	Extensão máxima (mm)	Estresse tênsil na carga máxima (MPa)	Módulo de Young (MPa)	Espessura da amostra (mm)
PLGA-1NAH	1,1	3,52	1,1	2,2	0,13
	1,8	4,68	2,2	10,6	0,15
	1	4,65	1	6,4	0,1
PLGA-5NAH	1,3	2,19	2,7	16	0,05
	1,2	4,83	2,2	8	0,06
	1,6	4,54	22,5	23,4	0,06
PLGA-1NAPo	2,7	12,87	3,2	11,9	0,08
	3	8,07	2,5	25,7	0,12
	2,7	8,18	2,7	25,7	0,1
PLGA-5NAPo	2,2	1,16	0,9	34,6	0,24
	3,8	1,72	2,1	51,4	0,18
	1,7	0,89	0,8	28,7	0,21

Fonte: Thiago Reinaldos Silva, 2018.

Considerando as espessuras das amostras, os valores do módulo de Young para os *scaffolds* compósitos PLGA-NAH foram sensivelmente menores que o módulo de Young para os *scaffolds* de PLGA (não compósitos), reiterando a diminuição da capacidade elástica destes materiais. Por outro lado, os *scaffolds* compósitos contendo a protoporfirina IX complexada à NAH (PLGA-NAPo), possuem os valores do módulo de Young muito próximos aos dos *scaffolds* de PLGA (não compósitos).

4.4 VALIDAÇÃO BIOLÓGICA DOS SCAFFOLDS PLGA E SCAFFOLDS COMPÓSITOS PLGA-CeO₂

Os *scaffolds* e *scaffolds* compósitos de PLGA e CeO₂, mais precisamente, contendo 10% de óxido de cério (PLGA-10CeO₂) foram testados quanto à sua viabilidade de crescimento celular com células HCat, como descrito na seção 3 (Materiais e métodos).

Quando semeadas em *scaffolds* PLGA, as células HCat cresceram e formaram uma espécie de “tapete”, chegando a cobrir completamente as fibras em algumas regiões do *scaffold*, como pode ser visto a seguir.

Figura 25 - (a) Imagem de MEV amostra PLGA + HCat ampliada 1.000x e (b) Imagem de MEV, amostra PLGA + HCat ampliada 1.000x.

Fonte: Patricia Targon Campana, 2017.

Os *scaffolds* também foram analisados em cortes transversais para que se verificasse se as células foram capazes de atravessar o tecido, populando também as regiões internas dos *scaffolds*. Nos cortes transversais não foram observadas células.

Quando semeadas nos *scaffolds* compósitos PLGA-10CeO₂, as células HCat também foram viáveis e se multiplicaram formando superfícies de morfologia similar ao caso anterior.

Figura 26 - (a) Imagem de MEV amostra PLGA-10CeO₂ + HCat ampliada 2.000x e (b) Imagem de MEV, amostra PLGA-10CeO₂ + HCat ampliada 1.000x.

Fonte: Patricia Targon Campana, 2017.

A semeadura nos *scaffolds* compósitos de PLGA CeO₂ demonstrou que estes são viáveis para o cultivo celular mesmo com a morfologia e elasticidade diferentes dos *scaffolds* PLGA (não compósitos).

5 DISCUSSÃO

Os *scaffolds* obtidos a partir de PLGA 85:15 mostraram morfologia controlável com a adição das moléculas de interesse, as nanopartículas. A adição destas nanopartículas causou modificações nas superfícies das fibras e em sua morfologia, podendo ter sido provocadas, principalmente, pela modificação na viscosidade das soluções, pelo aumento do tempo de ação por contato eletrostático, aumento da área de superfície, resultando na melhor organização das fibras e na ausência de aglomerados poliméricos.

Mais especificamente, a adição do óxido de cério na solução polimérica para a confecção dos *scaffolds* compósitos PLGA-CeO₂ resultou na homogeneidade das fibras, além da diminuição da rugosidade aparente. Os *scaffolds* compósitos resultantes formaram uma disposição homogênea e integrada das fibras. Ainda, os resultados de EDX mostraram que as nanopartículas de CeO₂ encontram-se homogeneamente distribuídas ao longo das fibras. No entanto, a disposição das nanopartículas só foi esclarecida após as medidas de contraste de fase (em MFA). A ausência de contraste ao longo da fibra indica que as nanopartículas encontram-se dentro da fibra polimérica e não em sua superfície.

Estudos revelam que a introdução de aditivos em fibras poliméricas pode alterar seus padrões de elasticidade devido, entre outros fatores, à presença de regiões contendo diferentes concentrações do aditivo, além de interações diversas entre essas moléculas e os polímeros⁶¹. No caso da adição das nanopartículas de CeO₂, os resultados sugerem maior coesão entre as fibras do *scaffold* compósito quando comparado ao *scaffold* PLGA, efeito que pode ter sido causado também aumento da viscosidade e da taxa de evaporação do solvente (visualmente verificados) causados pela adição das nanopartículas de CeO₂. Ainda, a adição do CeO₂ promoveu uma mudança no padrão de elasticidade dos *scaffolds* PLGA, resultando em maiores valores de extensão para os *scaffolds* compósitos, além de aumentar sensivelmente o suporte de carga máxima. No entanto, o aumento da concentração de nanopartículas na constituição do *scaffold* compósito não provoca estas mudanças linearmente, ou seja, em média e considerando as espessuras das amostras, o compósito PLGA-1CeO₂ e os demais têm as características tenséis semelhantes entre si. Os *scaffolds* compósitos também possuem valores de módulo de Young maiores, refletindo em maior elasticidade, quando comparados aos *scaffolds* PLGA.

A adição de NAH e NAH complexada com protoporfirina IX à solução polimérica para a produção dos *scaffolds* compósitos PLGA-NAH e PLGA-NAPo também causou mudanças na morfologia das fibras, de forma que o tecido resultante também se apresentou coeso, com

ausência de malformações e/ou aglomerados poliméricos e fibras homogêneas. A presença das nanoargilas na solução polimérica aumenta sua viscosidade de forma que, até 10% (em massa) as fibras são formadas homogeneamente. Acima desta concentração, 20% por exemplo, os *scaffolds* compósitos formados apresentaram defeitos como fibras interrompidas e malformadas, além da presença de aglomerados poliméricos. Neste caso, haveria a necessidade de mudanças no campo elétrico e na taxa de injeção da solução para o alongamento correto das fibras.⁶² De forma análoga aos *scaffolds* compósitos PLGA CeO₂, os resultados de EDX e medidas de contraste de fase (em MFA) combinados mostraram que, tanto as NAHs quanto as NAHs complexadas com protoporfirina IX encontram-se homogeneamente distribuídas ao longo das fibras, encapsuladas em seu interior, e não depositadas em sua superfície.

As nanoargilas haloisita, provavelmente devido às características cristalinas das nanoestruturas em que elas se encontram arranjadas, provocaram uma diminuição da capacidade elástica destes compósitos quando comparados aos *scaffolds* compósitos de PLGA e CeO₂. Nos casos em que a concentração de NAH e NApO nos compósitos foi acima de 10% em massa, a razão entre o material mineral cristalino e o material polimérico cristalino na constituição das fibras aumentou, diminuindo a sua elasticidade a ponto de não ser possível medir sua capacidade de extensão do material, apesar da dureza que o material mineral pode ter impresso às fibras.⁶³

Os valores do módulo de Young para os *scaffolds* compósitos PLGA-NAH foram menores que o módulo de Young para os *scaffolds* de PLGA (não compósitos), refletindo a diminuição da capacidade elástica destes materiais. Já os *scaffolds* compósitos contendo a protoporfirina IX complexada à NAH mostraram valores para o módulo de Young próximos aos dos *scaffolds* de PLGA, sugerindo que as interações intermoleculares entre a protoporfirina IX e as cadeias laterais do polímero PLGA tenham provido físico-químicas adequadas para o aumento capacidade elástica mesmo na presença do material mineral cristalino (NAH).

Mesmo com a diminuição da capacidade elástica, os *scaffolds* compósitos e não-compósitos serviram de suporte físico para a semeadura de células HCat, nas duas faces do biomaterial. Não foram observadas células na parte interna dos *scaffolds*, sugerindo que a espessura, ou mesmo a distância entre as fibras não tenham permitido que as células migrassem por dentro do biomaterial, constituindo assim um tecido biomiméticos em três dimensões. Ainda, segundo Hadjizadeh A.⁶⁴ a diminuição na capacidade elástica dos *scaffolds* compósitos podem ter sido um fator adicional que dificultou a migração das células.

6 CONCLUSÃO

- Os *scaffolds* e *scaffolds* compósitos foram obtidos com sucesso via ES a partir do polímero PLGA, reprodutíveis e com morfologia controlável pela adição de nanopartículas;
- A adição de nanopartículas causou modificações nas superfícies das fibras e em sua morfologia, resultando homogeneidade das fibras, além da diminuição da rugosidade aparente;
- As nanopartículas encontram-se homogeneamente distribuídas ao longo das fibras, encapsuladas em seu interior e não depositadas sobre a superfície;
- Os padrões de elasticidade dos *scaffolds* foram alterados com a introdução dos aditivos;
- Os *scaffolds* compósitos e não-compósitos serviram de suporte físico para a semeadura de células HCat, nas duas faces do biomaterial.

REFERÊNCIAS

1. CAMUS, A. **O Mito de Sísifo**: ensaio sobre o absurdo. Lisboa: Livros do Brasil, 2002.
2. MERRIAM-WEBSTER. Definition of biomaterial. Disponível em: <https://www.merriam-webster.com/dictionary/biomaterial?utm_campaign=sd&utm_medium=serp&utm_source=jsonld>. Acesso em 12 jun. 2016.
3. WEI, G.; MA, P. X. Partially nanofibrous architecture of 3D tissue engineering scaffolds. **Biomaterials**, Guildford, v. 30, n.32, p. 6426–6434, Nov. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.08.012> . Acesso em 26 jan 2017.
4. GENTILE, P. et al. An overview of poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 15, n. 3, p. 3640–3659, Fev. 2014. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/15/3/3640>>. Acesso em 26 Jan. 2017.
5. WU, L. et al. Fabrication of three-dimensional porous scaffolds of complicated shape for tissue engineering. I. Compression molding based on flexible-rigid combined mold. **Tissue Engineering**, New Rochelle, v.11, n.7–8, p.1105–1114. Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-24644486326&partnerID=tZOtx3y1>. Acesso em 07 jun. 2017.
6. JING, X.; MI, H.Y.; TURNG, L.S. Comparison between PCL/hydroxyapatite (HA) and PCL/halloysite nanotube (HNT) composite scaffolds prepared by co-extrusion and gas foaming. **Materials Science and Engineering: C**, Lausanne, v.72, n.1, p. 53–61, Mar. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.049>>. Acesso em: 30 Ago. 2017.
7. FORMHALS, A.; GASTELL, S.R. Process and apparatus for preparing artificial threads. US Pat. 1975504A, 2 out. 1934. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US1975504>>. Acesso em: 22 jul. 2017.

8. TUCKER, N. et al. The history of the science and technology of electrospinning from 1600 to 1995. **Journal of engineered fibers and fabrics**, v. 7, p. 63-73, 2012.
9. RAMAKRISHNA, S. et al **Introduction to electrospinning and nanofibers**. Primeira Edição; Singapura; World Scientific; 2005.
10. ZHENYU, L.; WANG, C.; BRIEFS, S. **One-Dimensional Nanostructures Electrospinning Technique and Unique Nanofibers**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013.
11. TAN, S-H. Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process. **Polymer**, Amsterdam, v. 46, n. 16. p. 6128-6134, Jul. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.05.068>>. Acesso em 22 ago. 2017.
12. POLETO, M. Compósitos termoplásticos com madeira- uma breve revisão. **Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada**, v. 2, n.4, setembro 2017. Disponível em:<<http://www.ucs.br/etc/revistas/index.php/ricaucs/article/view/5743>>. Acesso em 02 de Out. 2018.
13. RATNER, B.D.; BRYANT, S.J. Where We Have Been and Where We Are Going. **Annual Review of Biomedical Engineering**, Palo Alto, v.6, n.1, p.41–75, Ago. 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027>>. Acesso em 23 ago. 2017.
14. QAZI, T.H. et al. Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: Existing technologies and future trends. **Biomaterials**, Guildford, v. 35, n.1, p.502–521. Mar. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.110>>. Acesso em 18 mar. 2017.
15. BORSELLI, C. et al. Bioactivation of collagen matrices through sustained VEGF release from PLGA microspheres. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, New Jersey, v.92, n.1, p. 94–102, Nov. 2009. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbm.a.32332>>. Acesso em 15 mar. 2017.

16. AMINI, N. et al. Manufacturing polymethyl methacrylate nanofibers as a support for enzyme immobilization. **Fibers and Polymers**, Sillimdong, v.13, n. 8, p. 994-998, Out. 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12221-012-0994-y>>. Acesso em 16 mar. 2017.

17. PENCE, J. C.; CLANCY, K. B. H.; HARLEY, B. A. C. The induction of pro-angiogenic processes within a collagen scaffold via exogenous estradiol and endometrial epithelial cells. **Biotechnology and Bioengineering**, Nova Iorque, v. 112, n. 10, p. 2185-2194, Jul. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25944769>>. Acesso em 20 mar. 2017.

18. HASAN, J.; CRAWFORD, R. J.; IVANOVA, E. P. Antibacterial surfaces: The quest for a new generation of biomaterials. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.31, n.5, p.295–304, Mai 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.017>>. Acesso em 31 out. 2017.

19. LEE, H. J. et al. Biomedical applications of magnetically functionalized organic/inorganic hybrid nanofibers. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v.16, n.6, p.13661–13677, Jun. 2015. Disponível em:<<https://www.mdpi.com/1422-0067/16/6/13661>>. Acesso em 22 dez. 2017.

20. REJINOLD, N.S.; JAYAKUMAR, R.; KIM, Y.C. Radio frequency responsive nanobiomaterials for cancer therapy. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v.204, n.1, p.85–97, Abr. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.02.036>>. Acesso em 23 fev. 2018.

21. D'ARCY, R.; BURKE, J.; TIRELLI, N. Branched polyesters: Preparative strategies and applications. **Advanced Drug delivery Reviews**, v.107, n.1, Dez. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.005>>. Acesso em 07 jan. 2018.

22. CALLISTER, W. D. **Ciência e Engenharia de Materiais**. Sétima edição. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

23. MOTTA, A.C., DUEK, E.A.R. Síntese, caracterização e degradação “in vitro” do Poli(L-ácido láctico). **Polímeros**, São Carlos, v.16, n.1, p. 26-32, Jan. 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282006000100008>>. Acesso em 09 set. 2017.
24. BETANCOURT, T. et al. PEGylation strategies for active targeting of PLA/PLGA nanoparticles. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, New Jersey, v.91, n.1, p. 263-276, Nov. 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jbm.a.32247>>. Acesso em 06 fev. 2018.
25. FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, São Paulo, v.32, n.7, p.1860–1870, Ago. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000700033>>. Acesso em 22 Nov. 2017.
26. AUFFAN, M. et al. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective, **Nature Nanotechnology**, London, v.4, n.1, p.634-641, Set. 2009. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nnano.2009.242>>. Acesso em 18 dez. 2017.
27. GHOSH, S. K.; PAL, T. Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications. **Chemical Reviews**, v.107, n. 11, p.4797-4862, Nov. 2007. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr0680282>>. Acesso em 22 out. 2018.
28. NAITO, M. et al. **Nanoparticle Technology Handbook**. 3ª edição. Amsterdam: Elsevier; 2018. Capítulo 1; p. 3-47.
29. WANG, D. et al. Quantitative Analysis of Reactive Oxygen Species Photogenerated on Metal Oxide Nanoparticles and Their Bacteria Toxicity: The Role of Superoxide Radicals. **Environmental Science & Technology**, Easton, v.51, n.1, p.10137-10145, Jul. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28699742>>. Acesso em 15 out. 2018.

30. LANZL, C. A.; BALTRUSAITIS, J.; CWIERTNY D. M. Dissolution of Hematite Nanoparticle Aggregates: Influence of Primary Particle Size, Dissolution Mechanism, and Solution pH, **Langmuir**, Washington, v. 28, n. 45, Out. 2012. Disponível em: <<http://doi.org/10.1021/la3022497>>. Acesso em 10 out. 2018.

31. SONG, X. et al. Study on tough blends of polylactide and acrylic impact modifier. **Bio-Resources**, Raleigh, v. 9, n.2, p. 1939–1952, Fev. 2014. Disponível em: <http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/Bio-Res_09_2_1939_Song_Blends_Polylactide_Modifier>. Acesso em 16 out. 2017.

32. MAHAPATRO, A. Bio-functional nano-coatings on metallic biomaterials. **Materials Science and Engineering: C**, Lausanne, v. 55, n. 1, p. 227-251, Mai. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.05.018>>. Acesso em 04 mai. 2018

33. KEIVANI, F. et al. Engineered electrospun poly(caprolactone)/polycaprolactone-g-hydroxyapatite nano-fibrous scaffold promotes human fibroblasts adhesion and proliferation. **Material Science & Engineering C**, Lausanne, v. 68, n. 1, p.78-88, Mai. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.098>>. Acesso em 27 fev. 2017.

34. PAGLIARI, F. et al. Cerium oxide nanoparticles protect cardiac progenitor cells from oxidative stress. **ACS Nano**, Washington, v. 6, n. 5, p. 3767-3775, Abr. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22524692>>. Acessado em 15 jan. 2017.

35. TOPETE, A.; BARBOSA, S.; TABOADA, P. Intelligent micellar polymeric nanocarriers for therapeutics and diagnosis. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v. 132, n. 41, p. 46250-46268, Jul. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/app.42650>>. Acesso em 23 abr. 2018.

36. ATKINS, P. W.; JONES, L. **Princípios de Química: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente**. 5ª Edição. Porto Alegre: Bookman, 2011.

37. DI BARTOLOMEO, E. et al. Planar electrochemical sensors based on tape-cast YSZ layers and oxide electrodes. **Solid State Ionics**, Amsterdam, v. 171, n. 3-4, p.173-181, Jun.

2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167273804002127>>. Acesso em 30 ago. 2017.
38. MONTINI, T. et al. Fundamentals and Catalytic Applications of CeO₂-Based Materials. **Chemical Reviews**, Washington, v. 116, n. 10, p.5987-6041, Mai. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27120134>>. Acesso em 12 ago. 2017.
 39. YU, Lihong; XI, Jingyu. CeO₂ nanoparticles improved Pt-based catalysts for direct alcohol fuel cells. **international journal of hydrogen energy**, v. 37, n. 21, p. 15938-15947, 2012. Disponível em:<[10.1016/j.ijhydene.2012.08.063](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.08.063)>. Acesso em 22 out. 2017.
 40. CAPUTO, F. et al. Cerium oxide nanoparticles, combining antioxidant and UV shielding properties, prevent UV-induced cell damage and mutagenesis. **Nanoscale**, Cambridge, v. 7, n. 1, p. 15643-15656, Out. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26349675>>. Acesso em 30 ago. 2017.
 41. MANDOLI, C. et al. Stem cell aligned growth induced by CeO₂ nanoparticles in PLGA scaffolds with improved bioactivity for regenerative medicine. **Advanced Functional Materials**, Weinheim, v. 20, n. 10, p. 1617-1624, Mai. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/adfm.200902363>>. Acesso em 31 ago. 2017.
 42. MACHADO, G. S. et al. Immobilization of metalloporphyrins into nanotubes of natural halloysite toward selective catalysts for oxidation reactions. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, Amsterdam, v. 283, n. 1–2, p. 99-107, Mar. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molcata.2007.12.009>>. Acesso em 20 out. 2018.
 43. LVOV, Y. et al. Halloysite Clay Nanotubes for Loading and Sustained Release of Functional Compounds. **Advanced Materials**, v. 28, n. 6, p. 1227–1250, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/adma.201502341>>. Acesso em 15 nov. 2018.
 44. JING, X.; MI, H. Y.; TURNG, L. S. Comparison between PCL/hydroxyapatite (HA) and PCL/halloysite nanotube (HNT) composite scaffolds prepared by co-extrusion and gas foaming. **Material Science & Engineering C**, Lausanne, v. 72, n. 1, p. 53-61, Mar. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.049>>. Acesso em 24 nov. 2017.

45. ZHANG, X. et al. Poly(L-lactide)/halloysite nanotube electrospun mats as dual-drug delivery systems and their therapeutic efficacy in infected full-thickness burns. **Journal of biomaterials applications**, Lancaster, v. 30, n. 5, p. 512-525, Jul. 2015. Disponível em: <<http://jba.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0885328215593837>>. Acesso em 13 jun. 2017.
46. BEDIAKO, E.G. et al. Modified halloysite nanoclay as a vehicle for sustained drug delivery. **Heliyon** 4 (2018) e00689, Jul. 2018. Disponível em: <<http://www.heliyon.com/article/e00689>>. Acesso em 5 ago. 2018.
47. TANIGUCHI, M. Protoporphyrin IX dimethyl ester in chloroform. Disponível em: <<https://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/149.html>>. Acesso em 18 nov. 2018.
48. JEONG, H. G.; CHOI, M. S. Design and Properties of Porphyrin-based Singlet Oxygen Generator. **Israel Journal of Chemistry**, Weinheim, v. 56, n. 2–3, p. 110–118, Ago. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ijch.201500026>>. Acesso em 06 Out 2018.
49. BATINIC-HABERLE, I.; TOVMASYAN, A.; SPASOJEVIC, I. An educational overview of the chemistry, biochemistry and therapeutic aspects of Mn porphyrins - From superoxide dismutation to H₂O₂-driven pathways. **Redox Biology**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 43-65, Ago. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.017>>. Acesso em 15 ago 2017.
50. KOU, J.; DOU, D.; YANG, L. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. **Oncotarget**, Albany, v.8, n. 46. p. 81591–81603, Out. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29113417>>. Acesso em 04 mar. 2018.
51. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Patricia Targon Campana, Kelliton José Mendonça Francisco. **Dispositivo para electrospinning horizontal automatizado** BR n. PI 1020140237976. 25 de setembro de 2014.
52. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Patricia Targon Campana, Kelliton José Mendonça Francisco. **Programa de Computador “ES-TETRIS”**. BR n. PI 512014001192-5, 10 de outubro de 2014.

53. WALKER J.; RESNICK R.; HALLIDAY D. Fundamentals of physics. Hoboken, NJ.: Wiley; 2014.
54. SEO, Y.; JHE, W. Atomic force microscopy and spectroscopy. **Reports on Progress in Physics**, v. 71, n. 1, p. 016101, 2007. Disponível em: <<http://doi.org/10.1088/0034-4885/71/1/016101/meta>>. Acesso em 19 nov. 2018
55. GIESSIBL, F. J. Advances in atomic force microscopy. **Reviews of modern physics**, v. 75, n. 3, p. 949, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1103/RevModPhys.75.949>>. Acesso em 19 nov. 2018
56. D'ACUNTO, M.; DINELLI, F.; PINGUE, P. Nanoscale rippling on polymer surfaces induced by AFM manipulation. **Beilstein J Nanotechnol.** 2015;6(1):2278–89.
57. MONTGOMERY, P.C.; et al. Multi-scale roughness measurement of cementitious materials using different optical profilers and window resizing analysis. 2015;9525(June 2015):95250Z. [citado 30 abr 2018]. Disponível em: <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.2184711>
58. HOMAYONI, M.H.; RAVANDI, S.A.H.; VALIZADEH, M. Electrospinning of chitosan nanofibers : Processing optimization. **Polymers C, Scie.** 2009; July 2016.
59. SALLES, T.H.C.; LOMBELLO, C.B.; D'AVILA, M.A. Electrospinning of Gelatin/Poly (Vinyl Pyrrolidone) Blends from Water/Acetic Acid Solutions. **Mat. Res. [online]**. 2015;18(3): 509-518. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/1516-1439.310114>>.
60. RAMAKRISHNA, S. et al. Introduction to electrospinning and nanofibers; Primeira Edição; Singapura; World Scientific; 2005.
61. SHEKARFOROUSH, E. et al. Electrospun phospholipid fibers as micro-encapsulation and antioxidant matrices. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1–16, 2017. Disponível em: <<http://doi.org/10.3390/molecules22101708>>. Acesso em 16 fev. 2017.

62. CHOU, S-F.; WOODROW, K. A. Relationships between mechanical properties and drug release from electrospun fibers of PCL and PLGA blends. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v. 65, p. 724-733, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.09.004>>. Acesso em 10 out. 2018.
63. HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, I. K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. **Arabian Journal of Chemistry**, Amsterdam, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.015>>. Acesso em 21 fev. 2018.
64. GAD, H. A.; EL-NABARAWI, M. A.; EL-HADY S. S. A. Formulation and evaluation of PLA and PLGA in situ implants containing secnidazole and/or doxycycline for treatment of periodontitis. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v. 9, n. 3, p. 878-884, Nov. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1208/s12249-008-9126-9>>. Acesso em 22 ago. 2017.
65. HADJIZADEH, A.; DOILLON, C. J. Directional migration of endothelial cells towards angiogenesis using polymer fibres in a 3D co-culture system. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, Chichester, v. 4, n. 7, p. 524-531, Out. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/term.269>>. Acesso em 25 ago. 2017.