KATIA YABUNAKA SAKAGUTI

Modificação química do poli(3-hidroxibutirato) e preparação
de membranas por eletrofiação para aplicação em biomateriais

SÃO PAULO

2019

KATIA YABUNAKA SAKAGUTI

Modificação química do poli(3-hidroxiбутирато) e preparação de membranas por eletrofiação para aplicação em biomateriais

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Wang Shu Hui

SÃO PAULO

2019

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.

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catálogo-na-publicação

Sakaguti, Katia Yabunaka

Modificação química do poli(3-hidroxibutirato) e preparação de membranas por eletrofiliação para aplicação em biomateriais / K. Y. Sakaguti -- versão corr. -- São Paulo, 2019.

80 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

1. Polímeros biodegradáveis 2. PHB-co-PCL 3. Eletrofiliação 4. Biomateriais I. Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais II. t.

SAKAGUTI, K. Y. **Modificação química do poli(3-hidroxibutirato) e preparação de membranas por eletrofiação para aplicação em biomateriais.** 2019. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por sempre acreditarem nos meus sonhos, oferecendo apoio incondicional.

À Prof.^a Dr.^a Wang Shu Hui pelo incentivo, confiança, e orientação, não só no âmbito acadêmico, mas também em outros diversos contextos.

Ao Dr. Lionel Gamarra e sua equipe (CETEC) e à Dr.^a Débora Balogh (IFSC) por terem realizado os ensaios de viabilidade celular e cromatografia de permeação em gel, respectivamente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho, colegas da pós-graduação, técnicos, professores e outros pesquisadores.

RESUMO

Devido ao crescente interesse em polímeros biodegradáveis, muitos estudos têm sido realizados a fim de se obter polímeros biodegradáveis com melhores propriedades mecânicas e de processamento. O poli(3-hidroxibutirato) (PHB) tem sido apresentado como um substituto para polímeros não-biodegradáveis em aplicações comerciais. Porém, sua elevada cristalinidade, instabilidade térmica e alto custo de produção são problemas que dificultam sua comercialização. Uma alternativa para modificá-lo e melhorar suas propriedades mecânicas é através de reações de transesterificação com poli(ϵ -caprolactona) (PCL), um poliéster sintético, também biodegradável e com alto potencial para uso como biomaterial. Neste trabalho, realizou-se a extrusão reativa de blendas de PHB e PCL e o copolímero obtido foi caracterizado por ensaios de solubilidade, calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RNM- ^1H) e de carbono (RNM- ^{13}C). Os resultados indicaram que houve modificação do PHB resultando no copolímero PHB-co-PCL, que apresentou menor cristalinidade que os homopolímeros de partida. Com o PHB-co-PCL, foram feitas medidas de viscosidade e ensaios de eletrofiação, variando-se os parâmetros do processo e da solução. As análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) apontaram formação de fibras lisas e uniformes com diâmetros médios entre 900 a 1200 nm. Análise de viabilidade celular confirmou que o material não é citotóxico, favorecendo sua aplicabilidade em mantas porosas na engenharia de tecidos.

Palavras-chave: Polímeros biodegradáveis. PHB-co-PCL. Eletrofiação. Biomateriais.

ABSTRACT

Due to the increasing interest in biodegradable polymers, many studies have been conducted in order to obtain biodegradable polymers with improved mechanical and processing properties. The poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) has been proposed as an ideal substitute for non-biodegradable polymers in commercial applications. However, its high crystallinity, thermal instability and high production costs are problems that have limited its commercialization. An alternative to modify it and improve its mechanical properties is through transesterification reactions with poly(ϵ -caprolactone) (PCL), a synthetic polyester, also biodegradable and with high potential for use as a biomaterial. In this work, reactive extrusion of PHB/PCL blend was carried out, and the copolymer was characterized by solubility tests, differential scanning calorimetry (DSC), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), hydrogen (^1H -NMR) and carbon (^{13}C -NMR) nuclear magnetic resonance spectroscopies. The results indicated that PHB was modified, resulting in the copolymer PHB-co-PCL, showing lower crystallinity than the homopolymers. Viscosity measurements of PHB-co-PCL solutions were performed and electrospinning tests were carried out under different conditions. The scanning electron microscopy analysis (SEM) indicated the formation of smooth and uniform fibers, with average diameter between 900-1200 nm. Cell viability analysis confirmed that the material is not cytotoxic, favoring its applicability for the production of porous fiber mats in tissue engineering.

Keywords: Biodegradable polymers. PHB-co-PCL. Electrospinning. Biomaterials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas dos homopolímeros (a) PCL e (b) PHB	2
Figura 2 – Estrutura química do PHB-co-PCL.....	2
Figura 3 – Classificação de polímeros biodegradáveis	5
Figura 4 – Número de publicações por ano com a palavra-chave “electrospinning” durante o período de 2010 a 2017	13
Figura 5 – Número de publicações por país com a palavra-chave “electrospinning” durante o período de 2010 a 2017	14
Figura 6 – Dados de patentes publicadas entre 2001-2017 (a) Número de patentes por ano de publicação; (b) Percentual de patentes por idioma de publicação; (c) Número de patentes publicadas dos principais assuntos abordados.....	15
Figura 7 – Esquema simplificado de um processo de eletrofiação. A solução polimérica dentro da seringa (A) sai através de uma agulha metálica (B), conectada a uma fonte de alta voltagem (C), produzindo um jato finíssimo de solução (D), coletado na chapa (E) aterrada	16
Figura 8 – Formação de cone de Taylor na ponta da agulha	17
Figura 9 – Diferentes morfologias de fibras eletrofiadas: (a) “beaded”; (b) lisa; (c) fita; (d) tubular; (e) multicanal tubular; (f) nanofibra em microtubo; (g) “multi-core”; (h,i) fibras porosas.....	18
Figura 10 – Efeito da voltagem aplicada na formação do cone de Taylor	20
Figura 11 – Técnica da engenharia de tecidos.....	22
Figura 12 – Fluxograma do processo de síntese do copolímero.....	26
Figura 13 – Representação esquemática do viscosímetro Ubbelohde, com indicação das duas marcações (pontos A e B)	30
Figura 14 – Equipamento de eletrofiação utilizado no estudo	33
Figura 15 – Etapa do procedimento de cultura celular	35
Figura 16 – Aspecto do copolímero após purificação.....	37

Figura 17 – Curva DSC do PHB.....	39
Figura 18 – Curva DSC do PCL	39
Figura 19 – Curva DSC do copolímero PHB-co-PCL e ampliação na região das T_g 's	40
Figura 20 – Espectros FTIR do PHB	43
Figura 21 – Espectros FTIR do PCL	44
Figura 22 – Espectros FTIR do copolímero PHB-co-PCL	44
Figura 23 – Espectro RMN- ^1H do PHB.....	46
Figura 24 – Espectro RMN- ^1H do PCL.....	47
Figura 25 – RMN- ^1H do copolímero PHB-co-PCL.....	48
Figura 26 – RMN- ^{13}C do PHB	51
Figura 27 – RMN- ^{13}C do PCL.....	51
Figura 28 – RMN- ^{13}C do copolímero PHB-co-PCL.....	52
Figura 29 – Comparação entre (a) PHB insolúvel em 1,2-DCE e (b) copolímero dissolvido em 1,2-DCE	54
Figura 30 – Gráfico de viscosidade dinâmica em função da concentração da solução polimérica.....	55
Figura 31 – Imagens de MEV da amostra 3 com aumento de (a) 1.000x, (b) 5.000x	63
Figura 32 – Imagens de MEV da amostra 4 com aumento de (a) 1.000x, (b) 5.000x	63
Figura 33 – Imagens de MEV da amostra 5 com aumento de (a) 1.000x, (b) 5.000x	64
Figura 34 – Imagens de MEV da amostra 6 com aumento de (a) 1.000x, (b) 5.000x	65
Figura 35 – Dimensões da amostra 6.	66

Figura 36 – Imagens de MEV da amostra 7 com aumento de (a) 1.000x, (b) 5.000x	67
Figura 37 – Imagens de MEV da amostra 8 com aumento de (a) 1.000x, (b) 5.000x	67
Figura 38 – Dimensões e histograma do diâmetro das fibras da amostra 7	68
Figura 39 – Dimensões e histograma do diâmetro das fibras da amostra 8	68
Figura 40 – Amostra de membrana de PHB-co-PCL (a) antes e (b) depois da cultura de células observadas em microscópio digital com aumento de 100x	70
Figura 41 – (a) Amostras analisadas e (b) Imagem por bioluminescência de células C6 Luc	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – PHAs de desenvolvimento comercial	6
Tabela 2 – Parâmetros da eletrofiação e seus efeitos na morfologia da fibra	19
Tabela 3 – Parâmetros de solubilidade dos solventes a 25 °C	29
Tabela 4 – Massas molares dos polímeros determinadas por GPC	38
Tabela 5 – Temperaturas encontradas nas curvas DSC dos homopolímeros e copolímeros.....	40
Tabela 6 – Porcentagem de cristalinidade dos homopolímeros e copolímero determinada por DSC.....	42
Tabela 7 – Principais bandas do PHB, PCL e copolímero P(HB-co-CL) no FTIR	45
Tabela 8 – Comparação entre deslocamento químico encontrado para os homopolímeros (PHB e PCL) e os copolímeros na análise RMN- ¹ H	49
Tabela 9 – Cálculo da proporção de hidrogênios para PHB-co-PCL	49
Tabela 10 – Comparação entre deslocamento químico encontrado para os homopolímeros (PHB e PCL) e os copolímeros na análise RMN- ¹³ C.....	53
Tabela 11 – Comportamento dos polímeros em solvente	53
Tabela 12 – Parâmetros de Hansen dos homopolímeros (Hansen, 2007) e copolímero a 25 °C.....	54
Tabela 13 – Parâmetros utilizados durante o processo de eletrofiação	57
Tabela 14 – Parâmetros utilizados nas amostras 1 e 2, e respectivas imagens obtidas por microscopia ótica	58
Tabela 15 – Parâmetros utilizados nas amostras 3 e 4, e respectivas imagens obtidas por microscopia ótica.....	59
Tabela 16 – Parâmetros utilizados nas amostras 5 e 6, e respectivas imagens obtidas por microscopia ótica	60
Tabela 17 – Parâmetros utilizados nas amostras 7 e 8, e respectivas imagens obtidas por microscopia ótica	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,2-DCE	1,2-dicloroetano
CHCl_3	Clorofórmio
DCM	Diclorometano
DSC	Calorimetria exploratória diferencial (do inglês: <i>differential scanning calorimetry</i>)
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (do inglês: <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>)
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel (do inglês: <i>gel permeation chromatography</i>)
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MO	Microscopia ótica
M_n	Massa molar numérica média
M_w	Massa molar ponderal média
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PHAs	Poli(hidroxiálcanoatos)
PHB	Poli(3-hidroxibutirato)
PHB-co-PCL	Poli(3-hidroxibutirato-co- ϵ -caprolactona)
RMN- ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H)
RMN- ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13 (^{13}C)
THF	Tetra-hidrofurano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1	<i>Polímeros biodegradáveis</i>	4
2.1.1	Poli(3-hidroxibutirato)	5
2.1.2	Poli(ϵ -caprolactona)	8
2.2	<i>Biomateriais</i>	10
2.3	<i>Eletrofiação</i>	13
2.3.1	O processo	16
2.3.2	Parâmetros do processo	18
2.3.3	Aplicação na engenharia de tecidos	21
3	OBJETIVOS	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	<i>Materiais utilizados</i>	25
4.2	<i>Síntese do copolímero</i>	25
4.3	<i>Caracterização do copolímero</i>	27
4.3.1	Ensaio de solubilidade	27
4.3.2	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	29
4.3.3	Ensaio de viscosidade	30
4.3.4	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	31
4.3.5	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	32
4.3.6	Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RNM- ^1H e RNM- ^{13}C)	32
4.4	<i>Ensaio de eletrofiação</i>	33

4.5	<i>Caracterização das membranas eletrofiadas</i>	34
4.6	<i>Ensaio de viabilidade celular</i>	34
4.6.1	<i>Cultura celular</i>	34
4.6.2	<i>Imagem por bioluminescência</i>	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	<i>Síntese dos copolímeros</i>	37
5.2	<i>Cromatografia de Permeação em Gel</i>	37
5.3	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	38
5.4	<i>Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</i>	42
5.5	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-¹H)</i>	46
5.6	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN-¹³C)</i>	50
5.7	<i>Ensaio de solubilidade</i>	53
5.8	<i>Viscosimetria</i>	55
5.9	<i>Eletrofiação</i>	56
5.10	<i>Microscopia Ótica</i>	57
5.11	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	62
5.12	<i>Cultura celular</i>	69
5.13	<i>Imagem por bioluminescência</i>	71
6	CONCLUSÕES	73
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a preocupação com o meio ambiente ganhou importância global e o conceito de sustentabilidade foi introduzido em diferentes setores. Iniciou-se então uma busca crescente por materiais sustentáveis, incluindo polímeros biodegradáveis, a fim de substituir os polímeros convencionais que contribuem com a poluição e ameaça a vida marinha e terrestre, bem documentada pelos resíduos plásticos.

Os polímeros biodegradáveis desenvolvidos até hoje são encontrados no mercado a um preço elevado, e suas propriedades físicas e processabilidade são frequentemente inferiores aos polímeros sintéticos não biodegradáveis. A fim de obter polímeros biodegradáveis com melhores propriedades mecânicas e de processamento, muitos estudos são feitos em síntese de copolímeros ou blendas dos polímeros correspondentes.

O poli(3-hidroxibutirato) (PHB), é polímero *eco-friendly* e tem sido apresentado como um substituto para polímeros não-biodegradáveis em aplicações comerciais. É produzido a partir de fontes renováveis, como a cana-de-açúcar, e o milho (Chen, 2009). Pode ainda ser obtido a partir de resíduos da indústria sucroalcooleira, como o bagaço (Silva *et al.*, 2007; Madhumathi *et al.*, 2016; Nielsen *et al.*, 2017). A cana-de-açúcar, devido à sua alta biomassa e abundância de suas plantações no Brasil, torna-se uma fonte de considerável interesse econômico para o país para a produção do PHB.

O PHB é facilmente biodegradado em solos de compostagem, é biorreabsorvível e biocompatível (Cao *et al.*, 2018). Porém, sua exploração é restrita devido a alguns fatores, como dificuldades de processamento e alta rigidez mecânica, decorrente do seu alto grau de cristalinidade (Alicata *et al.*, 2006; Karahaliloğlu *et al.*, 2012; Marega e Marigo, 2015).

Muitos estudos com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas do PHB têm sido feitos com sucesso, envolvendo a síntese de copolímeros e a formação de blendas com outros polímeros (Roa *et al.*, 2010). Um destes polímeros é a poli(ϵ -caprolactona) (PCL), um poliéster sintético, também biodegradável e com

alto potencial para uso como biomaterial (Woodruff e Hutmacher, 2010; Ali Akbari Ghavimi *et al.*, 2015; Marega e Marigo, 2015).

Figura 1 – Estruturas químicas dos homopolímeros (a) PCL e (b) PHB

A poli(ϵ -caprolactona) exibe miscibilidade com grande variedade de polímeros (Lovera *et al.*, 2007) e, contrastando com o poli(3-hidroxibutirato), apresenta boas propriedades mecânicas (Woodruff e Hutmacher, 2010; Lim *et al.*, 2012) e pode ser processada a temperaturas relativamente baixas (Ali Akbari Ghavimi *et al.*, 2015). Além disso, o PCL pode agir como plastificante polimérico (Gassner e Owen, 1994; Vogelsanger *et al.*, 2003), diminuindo o módulo de rigidez e melhorando a processabilidade do PHB.

A partir da copolimerização de PHB com PCL, obtém-se o copolímero poli(3-hidroxibutirato-co- ϵ -caprolactona) (PHB-co-PCL) (Figura 2), um material biodegradável e biocompatível.

Figura 2 – Estrutura química do PHB-co-PCL.

Kim e Woo (Kim e Woo, 1998) sintetizaram com sucesso o copolímero poli(3-hidroxibutirato-co- ϵ -caprolactona), P(HB-co-CL), por transesterificação em solução com nitrobenzeno na presença de óxido de dibutilestanho, a fim de aumentar a miscibilidade da blenda PHB/PCL. A blenda PHB/PCL é imiscível (Kim e Woo, 1998; Cara *et al.*, 2003), e por isso, é interessante o uso de um agente compatibilizante para melhorar suas propriedades. Impallomeni *et al.* (Impallomeni *et al.*, 2002) produziram o copolímero por transesterificação em solução de tolueno/dicloroetano (3:1) a partir de PHB e PCL, usando o ácido *p*-toluenossulfônico como catalisador. Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2002) e Roa *et al.* (Roa *et al.*, 2010) também o sintetizaram por meio de transesterificação em fase líquida, na presença de catalisadores octanoato de estanho e acetilacetato de zircônio (IV), respectivamente.

Um método interessante para modificar polímeros é por extrusão reativa, na qual dois processos ocorrem simultaneamente na câmara de extrusão: fusão e reação química. É uma técnica simples e econômica para processar polímeros biodegradáveis, e oferece algumas vantagens como o controle do tempo de residência e dispensa a necessidade do solvente (Garcia-Garcia *et al.*, 2017).

Com a reação de transesterificação do PHB e do PCL, espera-se obter um material biodegradável e biocompatível, com boas propriedades mecânicas e de processamento, conveniente para ser usado na composição de membranas na engenharia de tecidos. A técnica de eletrofiação foi adotada nesse estudo por ser um método simples e eficiente para produzir fibras de diâmetro micrométrico/submicrométrico adequadas para esta aplicação (Karahaliloğlu *et al.*, 2012; Kampeerapappun, 2016).

Neste trabalho, o copolímero poli(3-hidroxibutirato-co- ϵ -caprolactona), P(HB-co-CL) foi sintetizado por meio de transesterificação, usando extrusão reativa. Suas propriedades foram estudadas utilizando técnicas espectroscópicas e termogravimétricas, e testes de eletrofiação foram realizados, a fim de se obter nanofibras do copolímero para aplicações em biomateriais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Polímeros biodegradáveis

Na definição da norma ASTM D-5488-94d, biodegradável é aquele capaz de sofrer decomposição em dióxido de carbono, metano, água ou biomassa, em que o mecanismo predominante é a ação enzimática de micro-organismos (fungos, bactérias e algas).

Polímeros biodegradáveis podem ser de origem natural ou sintética. Polímeros sintéticos têm a vantagem de serem mais versáteis que os naturais, podendo ter suas propriedades mecânicas e de degradação de acordo com a aplicação. Por outro lado, polímeros naturais costumam ter ótima biocompatibilidade (Doppalapudi *et al.*, 2014).

Os polímeros gerados a partir de recursos naturais são chamados biopolímeros, e normalmente são biodegradáveis e atóxicos. Estes podem ser produzidos por sistemas biológicos (microorganismos, plantas e animais) ou, ainda, sintetizados quimicamente a partir de materiais biológicos (açúcares, amido, gorduras e óleos naturais) (Flieger, Kantorová, Prell, Řezanka, *et al.*, 2003). A Figura 3 mostra a classificação de polímeros biodegradáveis.

Na presença de polímeros suscetíveis a degradação microbiana, os microorganismos secretam enzimas, que agem num processo de erosão da superfície, já que são grandes demais para difundir no polímero biodegradável, atacando o polímero e rompendo-o em pequenos segmentos (Chiellini e Solaro, 1996). A degradação enzimática de uma cadeia polimérica depende dos seguintes fatores (Breulmann *et al.*, 2009):

- as cadeias poliméricas devem ser flexíveis o suficiente;
- as ligações químicas (por exemplo, ligações do éster) devem ser rompidas pelas enzimas.

Alguns polímeros biodegradáveis demoram apenas algumas semanas para degradar, enquanto outros podem levar meses (Flieger, Kantorová, Prell, Řezanka,

et al., 2003). A biodegradabilidade não depende da origem do material, mas sim da composição química dos polímeros (Breulmann *et al.*, 2009).

Figura 3 – Classificação de polímeros biodegradáveis

Fonte: Doppalapudi *et al.* (2014).

2.1.1 Poli(3-hidroxibutirato)

O PHB pertence à família dos poli(hidroxiálcanoatos) (PHAs), uma classe de poliésteres naturais alifáticos produzidos por fermentação bacteriana de recursos renováveis, como açúcares, amido e ácidos graxos (Breulmann *et al.*, 2009). Possuem propriedades semelhantes às dos plásticos petroquímicos, com a vantagem de poderem ser biodegradados por microrganismos presentes no meio ambiente, em curto espaço de tempo, após o descarte (Franchetti e Marconato, 2006). Como os PHAs são metabólitos diretos de microrganismos encontrados em ambientes naturais, eles são aceitos como fontes de alimento por muitas espécies microbianas abundantes, que quebram o polímero. Por esta razão, os PHAs são rapidamente biodegradados sob condições aeróbicas (por exemplo, compostagem, solo) e em ambientes onde a degradação anaeróbica ocorre (por exemplo, ambiente marinho, usina de biogas) (Breulmann *et al.*, 2009).

Os PHAs de interesse comercial produzidos atualmente são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 – PHAs de desenvolvimento comercial

Empresa	País	Nome comercial	PHA	Fonte	Escala
Biomatera	Canadá	Biomatera	P(3HB-co-3HV)	Açúcar (não especificado)	P&D/Piloto
Biomer	Alemanha	Biomer	P(3HB)	Açúcar (não especificado)	P&D/Piloto
Bio-on	Itália	Minerv-PHA	P(3HB) e P(3HB-co-3HV)	Açúcar (não especificado)	Piloto
Danimer/Meredian	EUA	Nodax	Copolímeros do PHB	Açúcar do milho	Piloto/Industrial
Kaneka	Japão	Kaneka	P(3HB-co-3HHx)	Óleo vegetal	Piloto/Industrial
Mitsubishi Gas Chemical	Japão	Biogreen	P(3HB)	Metanol	P&D/Piloto
PHB Industrial	Brasil	Biocycle	P(3HB) e P(3HB-co-3HV)	Açúcar da cana	P&D/Piloto
Telles	EUA	Mirel	Copolímeros de PHB	Açúcar do milho	Industrial
Tepha	EUA	TephaFlex	P(4HB)	Não informado	P&D/Piloto
Tianan	China	Enmat	P(3HB-co-3HV)	Açúcar do milho	Industrial
Tianjin/DSM	China	GreenBio	P(3HB-co-4HB)	Açúcar (não especificado)	Piloto/Industrial
Tianzhu	China	Tianzhu	PHBHx	Bambu	P&D/Piloto

Fonte: Pagliaro (2007).

O poli(3-hidroxibutirato) (PHB) é principal representante dos PHAs e é sintetizado e acumulado como substância de reserva de energia e carbono por uma grande variedade de microorganismos, como a bactéria *Rastonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) (Flieger, Kantorová, Prell, Řezanka, *et al.*, 2003). Como fontes de carbono, são usadas glicose, sacarose, lactose e xilose. Uma redução de custo adicional de PHA é possível usando substratos baratos, como melaço, soro de leite e hidrolisado hemicelulósico (Reddy *et al.*, 2003).

O PHB pode ser degradado em dióxido de carbono, água e biomassa por uma vasta gama de microorganismos (Chiellini e Solaro, 2003). Devido a suas propriedades inerentes de biodegradabilidade e biocompatibilidade, têm atraído a atenção tanto da academia quanto da indústria, e as pesquisas tem demonstrado tratar-se de um bom candidato na engenharia de tecidos, especialmente se usado em forma de membranas de fibras ultrafinas eletrofiadas (Sombatmankhong *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2015; Castellano *et al.*, 2018; Salvatore *et al.*, 2018).

A produção de PHB se iniciou no Brasil na década de 90, com o desenvolvimento de uma tecnologia para produção de plásticos biodegradáveis empregando como matéria-prima derivados da cana-de-açúcar, a partir de um projeto cooperativo desenvolvido pela Copersucar (Cooperativa dos Produtores de Cana-de-açúcar do Estado de São Paulo), IPT (Instituto de Pesquisas Tecnológicas) e ICB (Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo). Desta parceria, criou-se um modelo de produção industrial de PHB integrado a uma usina sucroalcooleira e levou à criação da empresa PHB Industrial, em Serrana, São Paulo, próxima à Usina da Pedra (Velho e Velho, 2006).

Esse modelo permitiu aproveitar os resíduos e subprodutos da produção de álcool: o açúcar e/ou melaço como constituinte básico do meio fermentativo e o excedente de bagaço de cana-de-açúcar para a geração de energia dos processos industriais (Nascimento, 2001). O bagaço, além do mais, também pode ser usado como matéria-prima alternativa para a produção de PHAs a partir da recuperação de xilose de seu hidrolisado hemicelulósico (Silva *et al.*, 2007).

Dessa integração indústria-usina foi possível reduzir o custo de produção do PHB, que é vendido a preços inferiores ao PHB importado, porém ainda é muito superior aos preços dos polímeros sintéticos da indústria petroquímica, o que desestimula sua comercialização (Quental *et al.*, 2010).

Outro fator que dificulta sua comercialização é sua estreita janela de processamento decorrente da proximidade de sua temperatura de fusão, de aproximadamente 180 °C, com sua temperatura de degradação térmica (Impallomeni *et al.*, 2002; Garcia-Garcia *et al.*, 2017). Além disso, o PHB também é conhecido pela rigidez e fragilidade, devido à sua alta cristalinidade decorrente de sua perfeita estereorregularidade e alta pureza, resultante da produção bacteriana (Ublekov *et al.*, 2018).

Para tornar o PHB um material competitivo é imprescindível otimizar seu processamento utilizando processos usuais de transformação de polímeros a partir do estado plastificado. Como uma solução para a questão do alto custo desses materiais, emerge a necessidade de desenvolvimento de misturas poliméricas biodegradáveis, como a mistura física de dois ou mais tipos de materiais poliméricos ou copolímeros (Stevens, 1999).

2.1.2 Poli(ϵ -caprolactona)

Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) foi um dos primeiros polímeros sintetizados pelo grupo do Carothers no início dos anos 30 e se tornou disponível comercialmente após iniciativas da Union Carbide de identificar polímeros sintéticos que poderiam ser degradados por microorganismos (Huang, 1985; Ratner *et al.*, 2004; Woodruff e Hutmacher, 2010). É um polímero biodegradável produzido a partir do processo de abertura de anel da ϵ -caprolactona, na presença de iniciador/catalisador (Immirzi *et al.*, 1999), poliéster semicristalino, possui baixos pontos de fusão (60 °C) e de transição vítrea (-60 °C) e é obtido a partir de fontes não renováveis (indústria petroquímica). Pode ser produzido a partir de fontes renováveis via tratamento químico de sacarídeos, porém, elevando o seu custo (Gassner e Owen, 1994).

O PCL biodegrada tanto no solo quanto pelo ataque de microorganismos específicos, e o tempo de degradação varia com sua massa molecular, grau de cristalinidade e morfologia (Immirzi *et al.*, 1999). O polímero sofre degradação hidrolítica devido à presença de ligações de éster alifático hidroliticamente instáveis, no entanto a taxa de degradação é lenta (2 a 3 anos) (Nair e Laurencin, 2007).

Seu baixo ponto de fusão, biodegradabilidade, boa solubilidade e excelente biodegradabilidade (Nair e Laurencin, 2007) tem impulsionado um grande número de pesquisas envolvendo a aplicação do PCL na área biomédica durante as últimas décadas (Flieger, Kantorová, Prell, Rezanka, *et al.*, 2003; Woodruff e Hutmacher, 2010). Os principais estudos estão relacionados a sistemas de liberação de fármacos (*drug delivery systems*) e na engenharia de tecidos. Além disso, é pesquisado para aplicação em curativos, e já está disponível para uso clínico como grampo degradável para fechamento de feridas (Ratner *et al.*, 2004).

2.2 Biomateriais

Muitos tecidos do corpo humano não têm a capacidade de se regenerar. Além da dificuldade de cura, lesões em tecidos como nervos, tendões, cartilagem e miocárdio também podem causar dor e deficiência física. Mesmo com intervenção cirúrgica, muitas vezes o retorno à função inicial é limitado e a resposta curativa é mediada por cicatrizes, e não regenerativa (Liu *et al.*, 2012).

Como solução aos danos nos tecidos e transplante de órgãos, a medicina regenerativa tem emergido como um campo de pesquisa interdisciplinar que engloba biologia, ciência dos materiais e engenharia, para desenvolver substitutos funcionais seguros e facilmente disponíveis para pacientes com tecidos ou órgãos danificados. Na medicina regenerativa, elementos como *scaffolds* (estruturas porosas tridimensionais) e controle celular são unidos para melhorar a capacidade de cura ou para substituir um tecido ou órgão (Liu *et al.*, 2012).

Um biomaterial pode ser definido como um material que tem como objetivo atuar no sistema biológico para avaliar, aumentar, tratar ou substituir algum tecido, órgão ou função corporal (Williams).

Durante as últimas décadas, avanços significativos têm sido feitos no desenvolvimento de materiais poliméricos biodegradáveis para aplicação biomédica, incluindo tecnologias como engenharia de tecidos, medicina regenerativa, terapia gênica e bionanotecnologia.

Polímeros representam a maior classe de biomateriais (Ratner *et al.*, 2004). Polímeros biodegradáveis são os favoritos para a aplicação em dispositivos terapêuticos, como próteses temporárias, estruturas porosas tridimensionais como *scaffolds* na engenharia de tecidos, e em sistemas de liberação controlada de fármacos. Porém, cada aplicação demanda materiais com propriedades físicas, químicas, biológicas e biomecânicas específicas para proporcionar um tratamento eficiente (Nair e Laurencin, 2007).

O pré-requisito essencial para qualificar o material como biomaterial é a biocompatibilidade, ou seja, é a habilidade do material em executar uma resposta adequada do organismo hospedeiro, em uma aplicação específica (Williams).

Exemplos de respostas adequadas do hospedeiro incluem a resistência à coagulação sanguínea, resistência à colonização bacteriana e cura normal e sem complicações. Exemplos de aplicações específicas incluem uma membrana de hemodiálise, um catéter urinário ou uma prótese de substituição do quadril (Ratner *et al.*, 2004).

A classificação de um material como biocompatível é determinada por meio de diversos ensaios biológicos, como a ISO 10993, principal diretriz mundial para a realização destes testes. Esse conjunto de normas indica a execução de protocolos por categoria de produto, que dependerão da natureza do contato entre material e corpo humano (superfície, comunicação externa e implantáveis) e do tempo de duração do contato (até 24 horas, de 24 horas à 30 dias e acima de 30 dias).

Um material biodegradável deve seguir algumas regras para ser utilizado como biomaterial (Lloyd, 2002; Nair e Laurencin, 2007):

- não pode provocar reações inflamatórias ou ser tóxico ao ser implantado no corpo;
- deve ter tempo de vida aceitável;
- deve ter permeabilidade apropriada;
- o tempo de degradação do material deve ser compatível com o processo de regeneração do corpo;
- os produtos de degradação não podem ser tóxicos e devem ser expelidos pelo organismo.

Outro conceito importante no domínio de biomateriais é a biorreabsorbilidade. Materiais poliméricos biorreabsorvíveis são eliminados através de meios naturais, seja por filtração simples de subprodutos de degradação ou após a sua metabolização. A biorreabsorção é, portanto, um conceito que reflete a eliminação total do material estranho inicial e da maior parte dos subprodutos de degradação (compostos de baixo peso molecular) sem efeitos colaterais residuais (Vert *et al.*, 1992). Um material biodegradável não necessariamente é biorreabsorvível, pois pode se degradar e se afastar do seu local de ação *in vivo*, mas não obrigatoriamente removido do corpo (Woodruff e Hutmacher, 2010).

Muitos fatores determinam a resposta inflamatória e a taxa de degradação dos polímeros biorreabsorvíveis, entre eles: local de implante, solicitação mecânica, massa molar, distribuição da massa molar, composição química, cristalinidade, sua morfologia, envolvendo o tamanho e geometria do suporte desenvolvido, porosidade, rugosidade da superfície, energia livre de superfície, carga da superfície, pH, presença de aditivos e outros (Barbanti *et al.*, 2005).

Na engenharia de tecidos, o sucesso de reparação depende da presença de sinais regulatórios apropriados para promover um ambiente adequado para a função celular. Para que as células possam se proliferar e se diferenciar com êxito, é necessário evitar danos celulares ocasionados pelos efeitos citotóxicos, genotóxicos e imunotóxicos (Reddi, 1994).

2.3 Eletrofiação

A eletrofiação (*electrospinning*) representa um método simples, eficiente e de baixo custo para produzir fibras de diâmetros nanométricos a partir de materiais poliméricos (Gonçalves *et al.*, 2009).

A técnica é conhecida desde a década de 1930, porém, somente com o advento da nanotecnologia esta técnica foi redescoberta (Costa *et al.*, 2012).

A eletrofiação tem sido largamente estudada nos últimos anos, como demonstra a taxa crescente de contribuições científicas publicadas (Figura 4), de acordo com levantamento feito no *Scopus*, um banco de dados referencial que abrange mais de 5 mil editores, usando a palavra-chave “electrospinning”. Nos últimos anos, o número de publicações envolvendo eletrofiação passou gradualmente de 16 em 2000 para 3724 em 2017, mostrando sua relevância e interesse pela comunidade científica mundial.

Figura 4 – Número de publicações por ano com a palavra-chave “electrospinning” durante o período de 2010 a 2017

Fonte: Scopus.

Grande parte desse crescente interesse vem da China, responsável por mais de 8000 publicações durante o período. Estados Unidos e Coreia do Sul também apresentaram números elevados, de acordo com a base de dados *Scopus*. Os principais países em número de publicações são mostrados na Figura 5. O Brasil aparece em 22º lugar no ranking.

Figura 5 – Número de publicações por país com a palavra-chave “electrospinning” durante o período de 2010 a 2017

Fonte: Scopus.

O número de patentes envolvendo eletrofiação de polímeros também aumentou nos últimos anos. Entre os detentores das patentes aparecem tanto empresas, como DuPont e 3M, quanto universidades (Persano *et al.*, 2013).

Uma análise mais detalhada de patentes contendo a palavra-chave *electrospinning* foi feita com auxílio da ferramenta de pesquisa SciFinder, serviço de

indexação de periódicos científicos do Chemical Abstracts Service (CAS) que agrega informações de mais de 60 autoridades de patentes.

A Figura 6 mostra que esse número de patentes cresceu consideravelmente entre 2001 e 2017, e mais da metade das patentes foi publicada em chinês. Nota-se também que entre os principais temas abordados pelas patentes, fibras e tecidos aparecem em primeiro lugar, seguidos de farmacêuticos.

Figura 6 – Dados de patentes publicadas entre 2001-2017 (a) Número de patentes por ano de publicação; (b) Percentual de patentes por idioma de publicação; (c) Número de patentes publicadas dos principais assuntos abordados

Fonte: SciFinder.

2.3.1 O processo

A eletrofiação baseia-se na aplicação de um campo elétrico entre dois polos: um é a agulha da seringa contendo a solução polimérica, conectada a bomba injetora, e o outro é o coletor metálico, onde o material será depositado (Figura 7).

Figura 7 – Esquema simplificado de um processo de eletrofiação. A solução polimérica dentro da seringa (A) sai através de uma agulha metálica (B), conectada a uma fonte de alta voltagem (C), produzindo um jato finíssimo de solução (D), coletado na chapa (E) aterrada

Este campo elétrico induz uma carga elétrica na superfície da solução, e a repulsão mútua das cargas produz uma força diretamente oposta à tensão superficial. À medida que a intensidade do campo elétrico é aumentada, a superfície hemisférica da solução que sai da ponta da agulha toma a forma cônica, o chamado cone de Taylor (Figura 8). A uma determinada voltagem crítica, a força elétrica repulsiva supera a força da tensão superficial da solução, gerando um jato carregado eletricamente e quase estável. O solvente, então, evapora-se durante o trajeto para o polo oposto e formam-se fibras contínuas de tamanho micrométrico ou nanométrico em uma malha metálica coletora.

Figura 8 – Formação de cone de Taylor na ponta da agulha

Fonte: autora desta dissertação.

Por meio desta técnica, diferentes morfologias de fibras (Figura 9) com diâmetros reduzidos podem ser obtidas controlando-se as variáveis do processo (Ding *et al.*, 2010), e devido ao seu notável desempenho mecânico, têm grande potencial para aplicações tecnológicas.

A morfologia das superfícies fibrosas e as estruturas polidimensionais, associadas às propriedades físicas e químicas da organização fibrosa são objeto de estudo na busca de aplicações na nanotecnologia.

A grande variedade de nanofibras eletrofiadas em termos de material e morfologia resulta em uma extensa gama de aplicações: engenharia de tecidos, fabricação de sensores, fotocatalise, células solares, filtração, entre outras (Cavaliere *et al.*, 2011).

Figura 9 – Diferentes morfologias de fibras eletrofiadas: (a) “beaded”; (b) lisa; (c) fita; (d) tubular; (e) multicanal tubular; (f) nanofibra em microtubo; (g) “multi-core”; (h,i) fibras porosas

Fonte: Ding *et al.* (2010).

A técnica de eletrospiação já foi aplicada com sucesso em mais de 100 tipos diferentes de polímeros sintéticos e naturais, para a geração de nanofibras (Liu *et al.*, 2012). Atualmente, muitos estudos estão sendo feitos com relação à aplicação de nanofibras eletrofiadas na medicina regenerativa, principalmente na busca de um *scaffold* ideal, para exercer a funcionalidade do tecido ou órgão a ser substituído.

2.3.2 Parâmetros do processo

Apesar das potencialidades da eletrospiação realizada na sua configuração básica, existem limitações que condicionam o controle dos parâmetros da solução e

de processamento, uma vez que o processo não é realizado isoladamente das variações ambientais.

Os parâmetros da solução, tais como viscosidade da solução polimérica e tensão superficial influenciam diretamente na morfologia e na geometria das nanofibras (Greiner e Wendorff, 2007; Costa *et al.*, 2012).

Tabela 2 mostra os principais parâmetros (da solução, do processo e do ambiente) que podem influenciar a obtenção das membranas nanofibrílicas durante a eletrofiação e seus efeitos na morfologia das fibras.

Tabela 2 – Parâmetros da eletrofiação e seus efeitos na morfologia da fibra

Parâmetros	Efeito na morfologia da fibra
Solução	
Viscosidade	Aparecimento de <i>beads</i> , diâmetro da fibra.
Concentração da solução	Aumento do diâmetro da fibra com aumento da concentração.
Massa molar do polímero	Redução do número de <i>beads</i> e gotículas com aumento da massa molar.
Condutividade	Diminuição do diâmetro da fibra com aumento da condutividade.
Tensão superficial	Alta tensão superficial resulta em instabilidade do jato. Sem relação conclusiva com a morfologia da fibra.
Volatilidade do solvente	Quanto maior a volatilidade, mais poros na superfície da fibra, aumentando a área superficial
Processo	
Voltagem aplicada	Diminuição do diâmetro da fibra com aumento da voltagem.
Distância de trabalho	Geração de <i>beads</i> se distância não for adequada para formação de fibras uniformes.
Vazão de alimentação	Diminuição do diâmetro da fibra com diminuição da vazão de alimentação. Se vazão for muito alta, pode ocorrer aparecimento de <i>beads</i> .
Ambiente	
Umidade	Alta umidade resulta em poros circulares nas fibras.
Temperatura	Aumento da temperatura resulta em diminuição do diâmetro da fibra.

Fonte: Sill e Von Recum (2008); Bhardwaj e Kundu (2010).

A concentração de polímero na solução e, conseqüentemente, a sua viscosidade, é um dos parâmetros mais importantes no processo de eletrofiação. Quando o valor da concentração é menor que o ideal, o grau de emaranhamento das cadeias poliméricas é pequeno, causando instabilidade capilar na extremidade do jato (Costa *et al.*, 2012). Se a viscosidade da solução é baixa, o jato que sai da seringa se quebra em gotículas como resultado da tensão superficial, causando o chamado *electrospraying* (Deitzel *et al.*, 2001).

Ocasionalmente durante a eletrofiação também podem ser formados *beads*, estruturas em forma de contas dispostas como pérolas em um cordão. Esses *beads* podem ser evitados variando os parâmetros do processo (Greiner e Wendorff, 2007).

O campo elétrico é responsável por fazer com que o material em solução saia do ponto de ejeção em direção à placa coletora. Quanto maior o campo elétrico aplicado ao sistema, maior a força exercida sobre a solução. Em voltagens aplicadas mais baixas, o cone de Taylor se forma na ponta de uma gota pendente. Conforme a voltagem aplicada é aumentada, o volume da gota diminuiu até o cone de Taylor ser formado na ponta do capilar. Porém, se a voltagem for muito alta, o jato da fibra é ejetado de dentro do capilar, o que está associado a um aumento na presença de *beads* (Sill e Von Recum, 2008) (Figura 10).

Figura 10 – Efeito da voltagem aplicada na formação do cone de Taylor

Fonte: Sill e Von Recum (2008).

A distância de trabalho (entre a extremidade do capilar até a placa coletora) deve ter um valor mínimo pra garantir a total evaporação do solvente, e um valor máximo para não desestabilizar o cone de Taylor (Gomes *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2012). A distância também influencia o diâmetro da fibra e pode definir se o resultado final será de eletrofiação ou *electrospraying* (Sill e Von Recum, 2008).

2.3.3 Aplicação na engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos ou engenharia tecidual lida com a regeneração de órgãos e tecidos vivos, através do recrutamento de tecido do próprio paciente, que são dissociados em células e cultivados sobre suportes biológicos ou sintéticos, os *scaffolds* (Barbanti *et al.*, 2005), também conhecidos como arcabouços, matrizes tridimensionais que substituem temporariamente os tecidos em fase de regeneração. A Figura 11 ilustra o desenvolvimento idealizado da técnica.

O implante do conjunto polímero e células pode ocorrer tanto com um tecido prematuro quanto com um tecido maduro formado. No primeiro caso, a função do *scaffold* é proporcionar suporte para o crescimento celular e adicionalmente servir como substituto mecânico/estrutural do tecido original até a formação do novo tecido e sua biorreabsorção completa. Já na segunda estratégia, o polímero é degradado e reabsorvido gradualmente durante a cultura *in vitro*, permitindo espaço para a proliferação celular e formação do tecido no reator biológico, e somente após a formação do tecido, o implante é inserido no organismo (Barbanti *et al.*, 2005).

Figura 11 – Técnica da engenharia de tecidos

Fonte: Barbanti *et al.* (2005).

A utilização de eletrofiação na engenharia de tecidos é bastante vantajosa, pois resulta em um material com alta área superficial e grande porosidade, facilitando a incorporação e perfusão celular. Em geral, na eletrofiação são usados solventes voláteis para facilitar sua remoção durante o processo. Porém, podem causar instabilidade do jato ou entupimento da ponta da agulha (Batabyal *et al.*, 2009). Para a produção de nanofibras com aplicações biomédicas, recomenda-se o

uso de clorofórmio como solvente, devido ao baixo ponto de ebulição, o que diminui a probabilidade de restar solvente no *scaffold* (Baker *et al.*, 2006).

Além disso, a eletrofiação é uma técnica versátil, pois permite a incorporação de outros polímeros ou moléculas bioativas durante o processo ou depois, para melhorar as propriedades do *scaffold*. Substâncias bioativas são usadas para estimular a proliferação e diferenciação de células semeadas *in vitro*, incentivando, assim, a regeneração do tecido. Entre estas substâncias estão incluídos fatores de crescimento, proteínas endógenas capazes de se ligar a receptores celulares e direcionar a atividade celular. Preservar a bioatividade dos *scaffolds* é um grande desafio, já que a própria técnica de eletrofiação pode desativá-la, devido à alta voltagem aplicada, o tipo de solvente, entre outros fatores (Liu *et al.*, 2012).

A seleção do material adequado para sua confecção é um critério importante, pois a natureza química do material tem influência sobre sua biocompatibilidade. As características ideais dos *scaffolds* são dependentes de sua aplicação, mas de maneira geral, devem ser biocompatíveis, biorreabsorvíveis e com uma rede de poros de dimensões suficientes para permitir a penetração celular e melhorar a intercomunicação célula-matriz e a troca de nutrientes e produtos de degradação (Mendonça *et al.*, 2009).

Um dos grandes desafios no campo da engenharia de tecidos é o desenvolvimento de *scaffolds* que permitam a adesão, proliferação e produção da matriz extracelular a taxas que possam compensar a sua degradação. Para isso, é necessário que ele tenha superfície química adequada (Liu e Ma, 2004), visto que as propriedades de superfície dos biomateriais e das células influenciam os eventos observados na interface célula-material resultando ou não na biocompatibilidade.

3 OBJETIVOS

Modificar quimicamente o PHB por extrusão reativa com PCL, obtendo o copolímero poli(3-hidroxibutirato-co- ϵ -caprolactona) (PHB-co-PCL), e caracterizá-lo quanto à sua estrutura química e às suas propriedades físicas.

Produzir nanofibras do copolímero através da técnica de eletrospinning, visando à obtenção de membranas flexíveis, adequadas para a formação de mantas macroporosas para a aplicação em biomateriais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais utilizados

O poli(3-hidroxibutirato) (PHB) utilizado foi o BioCycle[®] produzido pela PHB Industrial (Serrana, SP).

Utilizou-se poli(ϵ -caprolactona) fornecida pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), $M_n = 80.000 \text{ g.mol}^{-1}$ e densidade $1,145 \text{ g.cm}^{-3}$.

Foi utilizado catalisador octanoato de estanho (Sigma-Aldrich).

Os solventes clorofórmio (CHCl_3), metanol (CH_4O) e diclorometano (CH_2Cl_2) foram fornecidos pela CAAL – Casa Americana Artigos para Laboratório. O tetra-hidrofurano ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$) e 1,2-dicloroetano ($\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) utilizados foram fornecidos pela Synth e pela Merck, respectivamente. Todos os solventes foram utilizados sem prévia purificação.

4.2 Síntese do copolímero

O copolímero PHB-co-PCL foi sintetizado por meio de reação de transesterificação dos homopolímeros PHB e PCL com catalisador octanoato de estanho. O fluxograma do processo completo de síntese é mostrado na Figura 12.

Inicialmente foi preparada uma mistura de PHB e PCL na proporção molar 1:1. O frasco foi levado a uma estufa a vácuo, a 60°C , onde permaneceu por 24 horas, até a mistura atingir um valor de massa constante, para que a umidade presente no material fosse eliminada.

Em seguida, dentro de uma *glove box* com atmosfera de N_2 , adicionou-se o catalisador octanoato de estanho, aproximadamente 5% (p/p). Os componentes foram então misturados sobre uma placa de aquecimento ainda na *glove box*, até a fusão dos polímeros. A mistura não fundiu completamente, pois a temperatura

usada, 60°C, é inferior a T_m do PHB, sendo possível a observação de alguns grãos de PHB.

Figura 12 – Fluxograma do processo de síntese do copolímero

Para efetuar a extrusão reativa, a mistura foi adicionada em porções ao funil da minimisturadora/extrusora LME – *Laboratory Mixing Extruder* (Dynisco), alimentando-a no processo de extrusão reativa para a formação de copolímero. O equipamento foi ajustado a 165 °C, próximo a temperatura de fusão do PHB, pois este possui uma estreita janela de processamento.

O produto da extrusão reativa (copolímero) foi dissolvido em diclorometano na concentração de 25% (m/v) e em seguida, a solução foi transferida para dentro de um frasco fechado, levado ao banho ultrassônico a 38 °C, durante 3 horas. Após este tempo, ainda era possível ver alguns grãos de PHB não dissolvidos (material não reagido ou que sofreu pouca modificação).

A solução foi, então, filtrada, eliminando-se o PHB não reagido. A solução filtrada foi precipitada em metanol na proporção 1:7 (v/v) sob agitação, com o auxílio de placa de agitação magnética. Todo o cuidado foi tomado para que o polímero precipitado não se emulsificasse ou formasse fase dispersa fina.

Com o agitador desligado, esperou-se um tempo para que as partículas de polímero decantassem. O precipitado (material I) foi separado do líquido resultante (resíduo I), e passou por um processo de lavagem com tetrahidrofurano para remover o PCL residual.

Finalmente, o material foi filtrado a vácuo, resultando em sólido pulverulento, copolímero (material II), que foi deixado para secar, primeiro a temperatura ambiente e depois na estufa a vácuo.

4.3 Caracterização do copolímero

4.3.1 Ensaios de solubilidade

A partir de testes de solubilidade, é possível confirmar se houve modificação do PHB, já que este se apresenta insolúvel em grande parte dos solventes, com algumas exceções, como o clorofórmio. O PCL, diferentemente do PHB, é solúvel na grande maioria dos solventes.

Os parâmetros de solubilidade de Hansen (δ) representam a somatória de várias forças presentes na molécula: as contribuições relativas às forças de dispersão (δ_d), às forças de pontes de hidrogênio (δ_h) e às interações dipolo-dipolo (δ_p). Essa relação é mostrada na Equação 1.

$$\delta = \sqrt{\delta_d + \delta_h + \delta_p} \quad (1)$$

A solubilidade do polímero é caracterizada no espaço tridimensional por uma região de solubilidade esférica composta por um conjunto de parâmetros de Hansen do polímero (definindo o centro da esfera de solubilidade) e R, o chamado raio de interação (definindo o raio da esfera).

Para um solvente com coordenadas ($\delta_d^i, \delta_h^i, \delta_p^i$) solubilizar um polímero, é preciso que suas coordenadas definam um ponto dentro da esfera de dissolução do polímero, ou seja, a distância entre este ponto e o centro da esfera ($\delta_d^j, \delta_h^j, \delta_p^j$) deve ser menor ou igual ao raio de interação R (Equação 2).

$$R = \sqrt{4(\delta_d^i - \delta_d^j)^2 + (\delta_h^i - \delta_h^j)^2 + (\delta_p^i - \delta_p^j)^2} \quad (2)$$

A solubilidade do copolímero PHB-co-PCL foi testada com 5 solventes: clorofórmio (CHCl_3), diclorometano (DCM), tetra-hidrofurano (THF), 1,2-dicloroetano (DCE) e metanol (MeOH). A Tabela 3 apresenta os parâmetros de solubilidade dos solventes utilizados.

Em cada tubo de ensaio foram colocados aproximadamente 1 mg de polímero em 1 mL de solvente. Algumas amostras foram aquecidas a 50 °C durante alguns minutos em banho ultrassônico.

Tabela 3 – Parâmetros de solubilidade dos solventes a 25 °C

Solvente	δ_d (MPa^{1/2})	δ_p (MPa^{1/2})	δ_h (MPa^{1/2})	δ (MPa^{1/2})
1,2-Dicloroetano (DCE)	19,0	7,4	4,1	20,8
Diclorometano (DCM)	18,2	6,3	6,1	20,2
Clorofórmio (CHCl₃)	17,8	3,1	5,7	18,9
Metanol (MeOH)	15,1	12,3	22,3	29,6
Tetra-hidrofurano (THF)	16,8	5,7	8,0	19,5

Fonte: Hansen (2007).

4.3.2 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A Cromatografia de Permeação em Gel é um método usado para determinar a distribuição de massas molares de uma dada amostra de polímero. A análise é baseada na eluição, através de um leito cromatográfico composto por gel macroporoso, de frações de macromoléculas dentro de uma faixa de tamanho em função do tempo (ou volume de solvente). O gel macroporoso é o recheio da coluna cromatográfica, fase estacionária, apresenta um conjunto de poros cujas dimensões são responsáveis pela retenção de moléculas cujos volumes hidrodinâmicos são superiores ou, ao contrário, pela penetração daquelas com volumes hidrodinâmicos inferiores. O tempo (ou volume de eluição) de uma dada molécula depende de sua massa molar e de sua afinidade com o solvente. Com o auxílio de uma curva de calibração, encontram-se massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderada média (M_w) e distribuição de massas molares.

As análises GPC do PCL e do copolímero PHB-co-PCL foram realizadas no Instituto de Física de São Carlos (IFSC). Foram usadas colunas a temperatura de 23 °C, fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ da fase móvel, THF, e amostras de poliestireno monodisperso como referências de calibração.

Os resultados obtidos por GPC do PHB BioCycle[®] foram tirados dos estudos realizados previamente por L. L. Almeida (Almeida, 2012), que utilizou colunas em série a 30 °C, fluxo a 1,0 mL.min⁻¹ da fase móvel, clorofórmio grau HPLC, e amostras de poliestireno monodisperso como referências de calibração.

4.3.3 Ensaios de viscosidade

A viscosidade de um material é sua resistência à alteração de sua forma, associada ao atrito interno existente entre as moléculas de um fluido, e é um dos parâmetros mais importantes no processo de eletrofiação.

Para estudar a viscosidade da solução polimérica foi utilizado o viscosímetro Ubbelohde (Cannon SimpleVIS™ Portable Instrument), um viscosímetro capilar no qual a viscosidade é medida por meio da velocidade de escoamento do líquido entre duas marcações do capilar, indicados como A e B na Figura 13.

Figura 13 – Representação esquemática do viscosímetro Ubbelohde, com indicação das duas marcações (pontos A e B)

Um volume inicial de solução é inserido no viscosímetro e, aos poucos, uma pequena alíquota de solvente é adicionada, diluindo-se a solução inicial. É registrado o tempo necessário para a solução escoar entre os meniscos para cada concentração. Para a análise, inicialmente foi preparada uma solução do copolímero em clorofórmio a 28% (m/v) e os ensaios foram feitos a temperatura controlada de 20 °C.

A viscosidade cinemática é calculada multiplicando-se o tempo de fluxo pela constante de calibração do viscosímetro, fornecida pelo fabricante (Equação 3).

$$\nu = kt \quad (3)$$

Onde ν é a viscosidade cinemática (em cSt ou $\text{mm}^2.\text{s}^{-1}$); k é a constante de calibração e t , o tempo de fluxo (em s).

Multiplicando a viscosidade cinemática pela densidade de cada solução, obtém-se a viscosidade dinâmica (Equação 4).

$$\eta = \nu\rho \quad (4)$$

Onde η é a viscosidade dinâmica (em cP ou mPa.s); ρ é a densidade (em g.cm^{-3}).

4.3.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica de análise térmica de materiais. No instrumento de DSC, a amostra e um material de referência são colocados e submetidos a aquecimento e resfriamento controlados. A diferença de fluxo de calor entre amostra e referência, necessária para manter ambas em igual temperatura, é registrada enquanto a temperatura aumenta a taxa constante.

As análises de DSC foram realizadas no Departamento de Engenharia Metalúrgica da Escola Politécnica, no equipamento NETZSCH DSC 200F3.

Amostras de massa entre 5 e 10 mg contidas em cadinhos de alumínio foram submetidas a um programa controlado de temperatura, a uma taxa de $10\text{ }^{\circ}\text{C.min}^{-1}$, sob fluxo de nitrogênio.

O programa de temperatura utilizado foi: resfriamento da temperatura ambiente a $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$; isoterma de 5 minutos; aquecimento até $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $10\text{ }^{\circ}\text{C.min}^{-1}$

(primeiro aquecimento); novo resfriamento até $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $10\text{ }^{\circ}\text{C.min}^{-1}$; e finalmente, aquecimento até $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, a $10\text{ }^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ (segundo aquecimento).

4.3.5 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Um espectro no infravermelho é obtido pela passagem de radiação infravermelha através de uma amostra. É feita a determinação da fração da radiação incidente que é absorvida em cada frequência ou comprimento de onda. As frequências onde ocorre absorção geram as bandas de absorção num espectro no infravermelho, que correspondem a uma frequência de vibração de um conjunto de ligações de uma molécula da amostra, permitindo a identificação de grupos funcionais presentes.

As análises por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR) foram realizadas no Laboratório de Macromoléculas do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Poli-USP. Foi utilizado o espectrofotômetro Thermo Scientific Nicolet iS50, e as amostras foram analisadas por reflexão atenuada usando cristal de ZnSe.

4.3.6 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RNM- ^1H e RNM- ^{13}C)

A espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica espectroscópica que se baseia na propriedade de alguns núcleos cujos momentos magnéticos não são nulos.

Diante de um campo magnético intenso, alguns núcleos atômicos, como ^1H e ^{13}C , são capazes de absorver a energia de determinada radiação eletromagnética. Quando se aplica uma frequência constante, nem todos os núcleos do mesmo elemento apresentam ressonância no mesmo campo magnético, pois dependem de seu ambiente químico, podendo ser diferenciados dentro da mesma molécula.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RNM- ^1H) e de carbono-13 (RNM- ^{13}C) foram obtidos na Central Analítica do Instituto de Química da

USP, utilizando o espectrômetro Bruker AIII 500 MHz, em geral, após uma hora de aquisição (coleta de sinal).

As amostras de copolímeros foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) em temperatura ambiente, na concentração 80 mg/mL, e analisadas em tubos de vidro 5 mm de diâmetro.

4.4 Ensaios de eletrofiação

Realizou-se a eletrofiação do copolímero PHB-co-PCL usando o equipamento montado no Laboratório de Processamento de Polímeros do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Poli-USP, que consiste em uma bomba de infusão (Nikkiso PSK-01), uma fonte de tensão (Faíscas) e uma placa coletora vertical (Figura 14).

Figura 14 – Equipamento de eletrofiação utilizado no estudo

Fonte: autora desta dissertação.

Foram utilizadas seringas plásticas de 20 mL, uma agulha sem ponta com diâmetro 22 G como ponto de ejeção, além de folhas de alumínio para revestir a placa coletora.

O polímero em solução é armazenado em uma seringa e posicionado na bomba de infusão. A saída da seringa é conectada ao ponto de ejeção através de uma cânula de polietileno. O polímero, eletricamente carregado, é atraído pela folha de alumínio, aterrada pelo terminal de terra da fonte de tensão.

Os parâmetros foram variados para cada amostra, mantendo a temperatura do ambiente a aproximadamente 23 °C e umidade do ar $\leq 55\%$. A duração de processo de eletrofiação para a preparação de cada membrana durou entre 15 a 30 minutos.

4.5 Caracterização das membranas eletrofiadas

As membranas eletrofiadas, depositadas sobre a folha de alumínio, foram analisadas por microscopia ótica e eletrônica, a fim de verificar a formação de fibras poliméricas.

Foram utilizados o microscópio ótico Olympus BX60M, e o microscópio eletrônico de varredura (MEV) FEI Inspect F50 FEG, ambos no Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Poli-USP.

O diâmetro das fibras foi obtido estatisticamente pelo software ImageJ e plugin DiameterJ.

4.6 Ensaio de viabilidade celular

4.6.1 Cultura celular

A fim de testar a biocompatibilidade do copolímero obtido, foi feita a cultura de células usando como substratos o copolímero e a sua membrana eletrofiada sobre placa de vidro. O procedimento foi realizado no Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia (CETEC) do Hospital Israelita Albert Einstein. Foram utilizadas células de linhagem C6, as quais são células tumorais, expressas à luciferase (C6 Luc) para imagens de bioluminescência.

Primeiramente, as células foram descongeladas. Esse procedimento consiste em aquecê-las em banho-maria, adicionar meio de cultura ao tubo, acrescentar o conteúdo ao meio de congelamento, homogeneizar e centrifugar a solução. Após essa etapa, um *pellet* de células sedimenta-se no fundo do tubo. Essas células são separadas e misturadas ao meio de cultura.

Em uma placa de Petri, amostras de copolímero de fibras eletrofiadas foram posicionadas e cobertas com o meio de cultura (Figura 15). A placa foi então levada à incubadora umidificada a 37°C e 5% de CO₂, onde permaneceu durante 48 horas para o cultivo. Após o período de incubação, a amostra foi removida da suspensão de células e realizou-se um exame visual com auxílio do microscópio digital invertido Nikon Eclipse Ti.

Figura 15 – Etapa do procedimento de cultura celular

Fonte: autora desta dissertação.

4.6.2 Imagem por bioluminescência

O termo bioluminescência refere-se a um processo de emissão de luz como consequência de uma reação enzimática cujo produto é a emissão de luz. É um fenômeno natural, que ocorre em muitas espécies (Rice *et al.*, 2001). Esta reação é causada pela presença da luciferase, enzima encontrada principalmente em organismos marinhos, que catalisa a oxidação do substrato luciferina. Assim, a expressão de luciferase em microorganismos patogênicos, associada ao substrato luciferina, permite localizar o patógeno do hospedeiro devido à emissão de fótons de luz (Hutchens e Luker, 2007).

A imagem por bioluminescência é uma técnica não invasiva que pode ser utilizada para monitorar microorganismos *in vivo* ou *in vitro*. A aquisição de imagens bioluminescentes requer células ou tecidos que expressem o gene repórter da luciferase. Após a adição do substrato é possível detectar luz nas células marcadas com luciferase por meio de câmera acoplada.

Para analisar a viabilidade e distribuição celular no material, após cultura de células C6 Luc, foi obtida a imagem de bioluminescência em amostras de copolímero puro e em membranas contendo fibras eletrofiadas depositadas em uma placa de vidro. Foi utilizado o sistema de imagem ótica por bioluminescência IVIS Lumina LT Series III (Caliper LifeSciences, USA), disponível no CETEC – Hospital Israelita Albert Einstein.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese dos copolímeros

Após a purificação e secagem, o PHB-co-PCL apresentou-se em forma de finíssimas partículas brancas. O rendimento do copolímero obtido em relação ao material inicial, em massa, foi de aproximadamente 32%. O rendimento não foi alto, pois uma expressiva parte do PHB não reagiu e foi eliminado na etapa de purificação. Além disso, uma quantidade significativa de material foi perdida durante a extrusão.

O copolímero PHB-co-PCL foi então caracterizado por meio de análises calorimétricas e espectroscópicas.

Figura 16 – Aspecto do copolímero após purificação

Fonte: autora desta dissertação.

5.2 Cromatografia de Permeação em Gel

As massas molares e polidispersão molecular dos polímeros são mostradas na Tabela 4.

Tabela 4 – Massas molares dos polímeros determinadas por GPC

Polímero	M_n (g.mol⁻¹)	M_w (g.mol⁻¹)	M_n/M_w
PHB	75.400	266.700	3,5
PCL	14.360	28.710	2,0
PHB-co-PCL^(b)	19.230	28.230	1,5

(b) apenas fração solúvel em THF

As análises GPC dos homopolímeros mostraram que a massa molar encontrada para o PCL foi muito menor comparada à indicada no rótulo do fabricante ($M_n = 80.000 \text{ g.mol}^{-1}$). Isso pode ter sido resultado da hidrólise do polímero.

No aparelho de GPC utilizado, o solvente utilizado nas colunas é o tetrahidrofurano (THF), por isso, um pré-requisito para as análises foi que o polímero fosse solúvel em THF. Devido ao fato do copolímero não ser totalmente solúvel em THF, o copolímero foi dissolvido no solvente e removeu-se a porção não-solúvel em deste, ou seja, analisou-se apenas a fração solúvel em THF.

O PCL é solúvel em THF e o PHB insolúvel. Isso explica porque a massa molar encontrada para o copolímero foi próxima ao do PCL, pois para obter a fração solúvel do copolímero, parte da massa correspondente à fração mais rica em segmentos de PHB foi removida.

Observa-se que a polidispersão do copolímero é menor em relação aos homopolímeros, indicando que suas cadeias poliméricas apresentam menor variação de tamanhos/massas molares entre si.

5.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise do segundo aquecimento dos polímeros PHB, PCL e PHB-co-PCL foi obtida pelo ensaio DSC.

O PHB (Figura 17) apresentou temperatura de transição vítrea (T_g) a 2,7 °C, cristalização a 55,3 °C e fusão a 170,4 °C.

O PCL (Figura 18) apresentou T_g a -60,8 °C e fusão a 60,4 °C. Não for observada cristalização durante o ensaio.

Figura 17 – Curva DSC do PHB

Figura 18 – Curva DSC do PCL

Figura 19 – Curva DSC do copolímero PHB-co-PCL e ampliação na região das T_g 's

As temperaturas mais importantes encontradas para os homopolímeros e copolímero são mostradas na Tabela 5.

Tabela 5 – Temperaturas encontradas nas curvas DSC dos homopolímeros e copolímeros

Polímero	T_g (°C)	T_c (°C)	T_m (°C)	
			PCL	PHB
PHB	2,7	55,3	-	170,4
PCL	-60,8	NO	60,4	-
PHB-co-PCL	-59,0 / -1,1	44,9	57,2	169,1

NO: não observado

A curva DSC de PHB-co-PCL (Figura 19) apresentou uma cristalização seguida de fusão, a 44,9 °C e 57,2 °C, respectivamente, e depois, mais uma fusão, a 169,1 °C, correspondente ao segmento PHB. A cristalização a frio dos segmentos PHB no copolímero ocorreu em temperatura mais baixa que aquela observada para o PHB puro, devido à provável miscibilidade parcial com segmentos PCL. Houve também redução nas temperaturas de fusão dos cristalitos em relação aos

homopolímeros, confirmando novamente o efeito da perturbação mútua dos segmentos PCL e PHB, que dificultam o dobramento das cadeias para formar cristalitos maiores e mais perfeitos.

Em um sistema de dois componentes, teoricamente, podem ser encontrados até 5 T_g 's, ou seja, cinco fases possíveis, duas T_g 's referentes aos segmentos exclusivos de PCL e PHB, uma perfeitamente miscível numa determinada proporção e outras duas em que existe uma solubilização parcial com matriz formada por segmentos de PCL ou PHB. Portanto, a identificação de duas T_g 's indica duas fases amorfas presentes, uma de PCL como matriz, e outra de PHB como matriz.

Para entender melhor a fase amorfa dos materiais obtidos, foi estimada a porcentagem em massa dos componentes através da equação de Fox-Flory (Equação 5):

$$\frac{1}{T_g} = \frac{w_{PCL}}{T_{gPCL}} + \frac{w_{PHB}}{T_{gPHB}} \quad (5)$$

sendo w_{PCL} , w_{PHB} , T_{gPCL} e T_{gPHB} as frações em massa e temperaturas de transição vítrea do bloco correspondente no copolímero, respectivamente.

De acordo com a Equação 5, a fração de PCL foi 5,2% na fase com PHB como matriz e 96,3% na fase amorfa de PCL como matriz.

Estes resultados mostram a baixa solubilidade de segmentos de PCL na matriz amorfa de PHB, possivelmente devido à estrutura segmentada das cadeias que inibe a mistura e ao mesmo tempo possibilita a separação e a formação de fase dentro de fase.

Os homopolímeros PHB e PCL são altamente cristalizáveis (Tabela 6). Para calcular a fração mássica de fase cristalina nos homopolímeros e copolímero, $X_{C,PCL}$ e $X_{C,PHB}$, foram utilizados os valores de entalpia de fusão teóricos dos homopolímeros 100% cristalinos (ΔH_m^0), de acordo com a Equação 6.

$$X_{C,i} = \frac{\Delta H_{m,i}}{\Delta H_{m,i}^0 w_i} \quad (6)$$

Sendo i o polímero correspondente, ΔH_m^0 iguais a 146 J.g^{-1} (Chiellini e Solaro, 1996) para o PHB, e 135 J.g^{-1} (Salom *et al.*, 2006) para o PCL, ΔH_m a entalpia de fusão associada a cada pico de fusão, observado para PHB e PCL e w_i a fração em massa do bloco correspondente. Para o copolímero, a curva DSC indicou dois picos endotérmicos, referentes aos dois tipos de segmentos, PCL e PHB.

Tabela 6 – Porcentagem de cristalinidade dos homopolímeros e copolímero determinada por DSC

Polímero	$\Delta H_m (\text{J.g}^{-1})$		$X_c (\%)$	
	PCL	PHB	PCL	PHB
PHB	-	96,9	-	66,4
PCL	61,5	-	45,6	-
PHB-co-PCL	30,6	19,7	31,0	50,0

Foi observada também uma diminuição na área do pico de fusão, relacionada com a diminuição da cristalização do sistema. Os diferentes meros e o aumento de grupos terminais dificultam o empacotamento das cadeias, resultando em queda na cristalinidade em copolímeros comparados aos homopolímeros (Roa *et al.*, 2010).

A redução do grau de cristalinidade do PHB-co-PCL em relação aos homopolímeros de partida enfatiza que se trata de um copolímero e não uma mistura polimérica. Quando ocorre a reação de transesterificação, a viscosidade do sistema aumenta e o PHB não consegue se cristalizar, diminuindo a porcentagem de cristalinidade.

5.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho é uma técnica eficiente para obter informações sobre a copolimerização de polímeros, como a

detecção e criação de novas ligações químicas. Os espectros mostraram algumas bandas importantes correspondentes aos grupos funcionais presentes nos copolímeros.

As bandas presentes em PHB e PCL apresentam semelhança química. As absorções mais intensas observadas para os dois polímeros são devidas aos grupos C-H, estiramento (2.860 e 2.930 cm^{-1}), C=O, estiramento (1.725 cm^{-1}) e C-O, estiramento (1.180 e 1.250 cm^{-1}). Uma série de bandas intensas de deformação axial na região de 1.100 a 1.300 cm^{-1} correspondem a ligações C-O do grupo éster.

No espectro do PHB (Figura 20), o pico observado a cerca de 1.380 cm^{-1} está relacionado ao balanço (*wagging*) simétrico do grupo CH_3 .

Figura 20 – Espectros FTIR do PHB

O espectro de PCL (Figura 21) apresenta muitos picos de absorção na região de impressão digital e uma banda de forte intensidade observada a 730 cm^{-1} , atribuída à ligação C-H por deformação fora do plano (*rocking*), zig-zag da cadeia estendida.

Figura 21 – Espectros FTIR do PCL

A Figura 22 mostra os espectros FTIR do copolímero PHB-co-PCL.

Figura 22 – Espectros FTIR do copolímero PHB-co-PCL

A absorção relativa ao estiramento da carbonila, a aproximadamente 1.725 cm^{-1} , é praticamente idêntica em PHB e PCL. Nota-se ainda que as razões entre as intensidades de algumas bandas e a intensidade da banda da carbonila do copolímero não apresentaram mudanças significativas em relação aos espectros dos homopolímeros.

As bandas intensas de deformação axial na região de 1.100 a 1.300 cm^{-1} atribuídas ao éster indicam a manutenção da estrutura química. Os ésteres possuem as chamadas “vibrações de deformação axial de C-O”, que são duas vibrações assimétricas acopladas: C–C(=O)–O e O–C–C. A banda de C–C(=O)–O dos ésteres saturados é muito intensa e é observada entre 1.210 e 1.163 cm^{-1} .

Como esperado, não houve absorção na região de 3.500 cm^{-1} representando a região de absorção do OH, cuja ausência indica controle da reação de hidrólise, favorecendo a reação de transesterificação.

As bandas mais importantes presentes nos polímeros são aquelas indicadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Principais bandas do PHB, PCL e copolímero P(HB-co-CL) no FTIR

Tipo de interação	Número de onda (cm^{-1})		
	PHB	PCL	P(HB-co-CL)
Estiramento C=O	1717	1719	1725
Estiramento CH_3	2964	-	NI
Estiramento CH_2	2924	2930, 2860	2940, 2865
Estiramento C-O	1271, 1043	1248, 1159	1183
Deformação CH_3 ang.	1380	-	1383
Deformação CH_2 ang.	NI	1070	NI
Deformação CH <i>rock</i> .	-	730	730

NI: não identificado

5.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN- ^1H)

Os espectros RMN- ^1H dos homopolímeros são apresentados como referências para comparação com o do copolímero. Nos espectros de RMN- ^1H , o pico na posição de deslocamento químico $\delta = 7,26$ ppm é referente ao solvente CDCl_3 .

O espectro do PHB (Figura 23) mostra que este polímero apresenta uma microestrutura perfeitamente isotática e os sinais de ressonância observados para CH , CH_2 e CH_3 correspondem individualmente a apenas um isômero ótico. Os hidrogênios do CH_3 apresentam-se a 1,26 ppm como dubleto (acoplamento com CH), enquanto CH_2 a 2,51 ppm, multiplete (acoplamento com CH e CH_3), e CH a 5,25 ppm, também multiplete (acoplamento com CH_2 e CH_3).

Figura 23 – Espectro RMN- ^1H do PHB

Para o PCL (Figura 24), os deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos aparecem a 4,06 (O-CH₂, tripleto) que apresenta pequeno sinal a 3,65 ppm correspondente, provavelmente, a terminação da cadeia, a 2,31 ppm (O=C-CH₂, tripleto), e mais seis hidrogênios, quatro a 1,65 ppm (multiplete) e dois a 1,38 ppm (multiplete).

Figura 24 – Espectro RMN-¹H do PCL

O espectro de ressonância magnética nuclear de ¹H do copolímero é apresentado na Figura 25.

Figura 25 – RMN- ^1H do copolímero PHB-co-PCL

A análise dos espectros de RMN- ^1H do copolímero mostrou que houve incorporação de ambos os homopolímeros. A Tabela 8 mostra que as absorções referentes aos constituintes individuais estão presentes no copolímero, sugerindo formação de copolímero tipo bloco.

Tabela 8 – Comparação entre deslocamento químico encontrado para os homopolímeros (PHB e PCL) e os copolímeros na análise RMN-¹H

Polímero		Deslocamento químico δ (ppm)			
Segmento PHB	PHB	1,26 (dubleto)	2,51 (multipleteo)	5,25 (multipleteo)	
	PHB-co-PCL	1,28 (dubleto)	2,55 (multipleteo)	5,26 (multipleteo)	
Segmento PCL	PCL	1,37 (multipleteo)	1,65 (multipleteo)	2,31 (tripleteo)	4,06 (tripleteo)
	PHB-co-PCL	1,39 (multipleteo)	1,65 (multipleteo)	2,31 (tripleteo)	4,06 (tripleteo)

Os deslocamentos químicos obtidos foram muito próximos aos da literatura, encontrados Roa et al (Roa *et al.*, 2010) em suas análises RMN-¹H (CDCl₃, 200MHz).

No espectro RMN-¹H, a área sob cada pico é proporcional ao número de prótons que geram esse pico, permitindo quantificar as composições das substâncias. Apesar de conter fontes de erros, a integração da área correspondente aos picos foi utilizada para encontrar a proporção de hidrogênios nas estruturas químicas, como mostra a Tabela 9.

Tabela 9 – Cálculo da proporção de hidrogênios para PHB-co-PCL

	PHB				PCL			
	a	b	c	d	e	f	g	h
Carbono								
Área pico	1,00	3,10	2,48	4,66	5,00	9,68		5,09
Área pico/ Área H esperada	0,91	2,83	2,26	1,91	2,05	3,97		2,09
Proporção H aproximada	1	3	2	2	2	4		2

O pico referente ao deslocamento químico $\delta = 1,65$ ppm, mostrado nas Figura 25 24 e 25, abrange 4 hidrogênios. Este dado também foi encontrado na literatura. Isto ocorre devido à dificuldade em interpretar espectros com acoplamento de prótons de moléculas grandes, sendo comum os multipletos de diferentes hidrogênios se sobreporem, alargando os picos.

A razão molar (PHB:PCL) no copolímero foi determinada a partir dos espectros RMN-¹H, utilizando a Equação 7.

$$\frac{PBH}{PCL} = \frac{\frac{A_{PHB}}{nH_{PBH}}}{\frac{A_{PCL}}{nH_{PCL}}} = \frac{5}{3} \frac{A_{PHB}}{A_{PCL}} \quad (7)$$

Onde A_{PHB} e A_{PCL} correspondem à soma das integrações de área dos grupos relacionados aos segmentos PHB e PCL, respectivamente, e nH_{PHB} e nH_{PCL} correspondem ao números de hidrogênios presentes em cada segmento.

Dessa forma, foram encontrados as razões molares aproximadas PHB:PCL de 1:2 para o copolímero. A maior proporção de PCL pode ser explicada pela significativa parcela de PHB que não reagiu durante o processo de síntese, provavelmente porque a temperatura de extrusão não foi suficiente para fundir todos os grânulos. Conforme mencionado anteriormente, uma das grandes dificuldades da aplicabilidade do PHB é seu processamento, já que degrada a uma temperatura muito próxima de sua temperatura de fusão. Dessa forma, a temperatura do processo de extrusão deveria ter sido otimizado para obter uma maior fração de PHB no material.

5.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN-¹³C)

As Figuras 26 e 27 mostram os espectros RMN-¹³C dos homopolímeros. Nos espectros de RMN-¹³C, o pico na posição de deslocamento químico referente ao solvente CDCl₃ aparece em $\delta = 78$ ppm, aproximadamente.

Figura 26 – RMN- ^{13}C do PHB Figura 27 – RMN- ^{13}C do PCL

Aqui, novamente, o espectro do PHB (Figura 26) comprova que o polímero possui uma microestrutura perfeitamente isotática e os sinais de ressonância observados para C=O (169 ppm), CH (67 ppm), CH₂ (40 ppm) e CH₃ (20 ppm) correspondem individualmente a apenas um isômero ótico.

A análise do espectro RMN-¹³C do PCL (

Figura 27) mostra um número de picos intensos igual ao número de carbonos magneticamente distintos presentes na sua estrutura.

O espectro de ressonância magnética nuclear de ¹³C do copolímero é apresentado na Figura 28.

Figura 28 – RMN-¹³C do copolímero PHB-co-PCL

O espectro de PHB-co-PCL indica a presença dos dois tipos de segmento, PCL e PHB, com predominância do PCL, sinalizada pela considerável maior intensidade da carbonila correspondente. Isso demonstra que segmentos de PCL foram introduzidos nas cadeias de PHB por transesterificação.

A Tabela 10 mostra as absorções referentes aos constituintes individuais presentes nos copolímeros.

Tabela 10 – Comparação entre deslocamento químico encontrado para os homopolímeros (PHB e PCL) e os copolímeros na análise RMN-¹³C

Polímero		Deslocamento químico δ (ppm)					
Segmento PHB	PHB	19,7	40,7	67,6	169,1		
	PHB-co-PCL	19,68	40,70	67,55	169,12		
Segmento PCL	PCL	24,7	25,7	28,5	34,3	64,3	175,7
	PHB-co-PCL	24,49	25,46	28,26	34,04	64,09	173,52

Os resultados obtidos foram muito próximos aos deslocamentos encontrados na literatura por Roa et al (Roa *et al.*, 2010), por RMN-¹³C (CDCl₃, 50 MHz).

5.7 Ensaios de solubilidade

Os resultados dos testes de solubilidade mostraram que clorofórmio, diclorometano e 1,2-dicloroetano são bons solventes para o copolímero, como indicado na Tabela 11.

Tabela 11 – Comportamento dos polímeros em solvente

Polímero	Solvente				
	CHCl ₃	THF	DCM	1,2-DCE	MeOH
PHB	S*	I	I	I	I
PCL	S	S	S	S	E
PHB-co-PCL	S	E	S*	S	I

I (insolúvel); E (emulsificado); S (solúvel); S* (solúvel após aquecimento).

A Figura 29 apresenta uma comparação visual de solubilidade do PHB e do copolímero em 1,2-diclorometano durante o teste. Enquanto o PHB apresentou-se

completamente insolúvel no solvente (sólido sobrenadante), o copolímero PHB-co-PCL solubilizou-se facilmente, a temperatura ambiente, resultando em uma solução homogênea e transparente.

Figura 29 – Comparação entre (a) PHB insolúvel em 1,2-DCE e (b) copolímero dissolvido em 1,2-DCE

Fonte: autora desta dissertação

Os parâmetros de solubilidade de Hansen foram calculados para o copolímero, baseados na teoria de contribuição de grupo, utilizando os parâmetros dos homopolímeros de partida e a proporção PHB:PCL encontrada na análise de RMN-¹H, de 1:2. Os resultados são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12 – Parâmetros de Hansen dos homopolímeros (Hansen, 2007) e copolímero a 25 °C

Polímero	δ_d (MPa ^{1/2})	δ_p (MPa ^{1/2})	δ_h (MPa ^{1/2})	δ (MPa ^{1/2})
PHB	15,5	9,0	8,6	19,9
PCL	17,0	4,8	8,3	19,5
PHB-co-PCL	16,5	6,2	8,4	19,5

As interações entre polímero e solventes são comparadas usando o espaço de parâmetro de solubilidade tridimensional. Isto explica porque o copolímero é mais solúvel que PHB nos solventes testados, no entanto, não é suficiente fazer uma avaliação precisa da solubilidade, uma vez que o conceito do parâmetro de solubilidade é aplicável apenas ao polímero amorfo e copolímero com distribuição aleatória dos meros, o que não é o caso. A crosta cristalina do grão de PHB pode resultar em sua insolubilidade na maioria dos solventes a temperatura ambiente (Terada e Marchessault, 1999). Apesar disso, as análises comparativas de solubilidade foram suficientes para indicar a modificação do PHB, ou seja, formação de um novo material, com propriedades de solubilidade intermediárias entre o PHB e o PCL.

5.8 Viscosimetria

Soluções de PHB-co-PCL dissolvido em clorofórmio em diferentes concentrações foram analisadas por viscosimetria capilar. Com base nos resultados obtidos, calculou-se a viscosidade dinâmica para cada concentração e um gráfico de viscosidade dinâmica versus concentração (m/v) foi levantado e analisado por regressão linear. O comportamento reológico das soluções é mostrado na Figura 30.

Figura 30 – Gráfico de viscosidade dinâmica em função da concentração da solução polimérica.

Os resultados mostraram que a viscosidade aumenta drasticamente com o aumento da concentração. Partindo de uma solução 18% (m/v), o aumento de concentração de 20% resultou no dobro do valor de viscosidade.

Na literatura, recomenda-se eletrofiar soluções com viscosidade acima de 1 poise para que o jato inicial não se quebre em gotas, pois abaixo de 1 P a tensão superficial é a influência dominante na morfologia da fibra (Deitzel *et al.*, 2001). Portanto, soluções de concentração acima de 24% (m/v) são mais indicadas para o processo de eletrofiação.

5.9 Eletrofiação

Diferentes testes foram realizados, para soluções poliméricas com diferentes concentrações, variando os parâmetros operacionais do processo. A Tabela 13 mostra o conjunto de parâmetros adotado para cada experimento.

Tabela 13 – Parâmetros utilizados durante o processo de eletrofiação

Amostra	Concentração da solução (wt%)	Tensão (kV)	Vazão (mL.h⁻¹)	Distância de trabalho (cm)
1	15	16	1,0	15
2	15	10	0,5	15
3	20	12	0,3	18
4	20	7	0,3	18
5	20	7	0,1	18
6	20	12	1,0	15
7	25	12	1,0	15
8	25	11	1,2	15

Instabilidade da tensão elétrica no início dos ensaios e eventuais oclusões no bico de ejeção durante a eletrofiação da solução mais viscosa foram algumas dificuldades observadas no processo.

5.10 Microscopia Ótica

Após os testes de eletrofiação, foram feitas análises do material eletrofiado utilizando microscopia ótica, com o objetivo de verificar a formação de fibras contínuas e defeitos presentes.

Nas Tabelas 14 a 17, são apresentadas as imagens de microscopia ótica das amostras, para diferentes aumentos. As linhas paralelas presentes nas micrografias são da folha de alumínio usada como superfície de deposição das fibras.

Tabela 14 – Parâmetros utilizados nas amostras 1 e 2, e respectivas imagens obtidas por microscopia ótica

Amostra	Aumento	Imagem
<p>1</p> <p>15% 16 kV 1,0 mL.h⁻¹ 15 cm</p>	50x
<p>2</p> <p>15% 10 kV 0.5 mL.h⁻¹ 15 cm</p>	200x

Tabela 15 – Parâmetros utilizados nas amostras 3 e 4, e respectivas imagens obtidas por microscopia ótica

Amostra	Aumento	Imagem
3 20% 12 kV 0,3 mL.h ⁻¹ 18 cm	100x
4 20% 7 kV 0,3 mL.h ⁻¹ 18 cm	100x

Tabela 16 – Parâmetros utilizados nas amostras 5 e 6, e respectivas imagens obtidas por microscopia ótica

Amostra	Aumento	Imagem
5 20% 7 kV 0,1 mL.h ⁻¹ 18 cm	100x
6 20% 12 kV 1,0 mL.h ⁻¹ 15 cm	200x

Tabela 17 – Parâmetros utilizados nas amostras 7 e 8, e respectivas imagens obtidas por microscopia ótica

Amostra	Aumento	Imagem
<p>7</p> <p>25% 12 kV 1,0 mL.h⁻¹ 15 cm</p>	100x
<p>8</p> <p>25% 11 kV 1,2 mL.h⁻¹ 15 cm</p>	100x

A amostra 1 não apresentou formação de fibras, e sim, pequenas gotículas de solução polimérica. A tensão aplicada foi, provavelmente, muito elevada para a solução em estudo, de baixa viscosidade. Quando a viscosidade da solução é muito baixa, pode ocorrer formação de gotículas, ou *electrospraying*, no lugar de fibras contínuas.

A amostra 2, preparada com a mesma solução da amostra 1, mas reduzindo-se a tensão elétrica, apresentou os primeiros indícios de formação de fibras do copolímero P(HB-co-CL), junto com gotas solidificadas. O número excessivo de gotas (contas) pode ser explicado pela baixa viscosidade da solução. Em soluções pouco viscosas, o polímero tende a se dividir em gotas antes de alcançar o coletor, devido aos efeitos de tensão superficial.

Essas gotículas também estiveram presentes nas amostras 3, 4 e 5, que apesar disso, resultaram na formação de algumas fibras entre as gotas.

Na amostra 6 foi observada uma rede de fibras e fusão entre as mesmas, fazendo com que seu diâmetro fosse irregular ao longo de seu comprimento. Essa morfologia é causada pela presença de solvente ao ser depositada na placa coletora, causando a junção das fibras. Uma forma de evitar essa ocorrência seria aumentar a distância de trabalho, para dar mais tempo para o solvente evaporar até chegada à placa coletora.

As amostras 7 e 8 apresentaram morfologia semelhante segundo as análises de microscopia ótica. Foi observada em ambas a presença de fibras contínuas, e também de algumas gotas, porém em menor quantidade que nas amostras anteriores. Observou-se que a amostra 8 apresentou morfologia mais regular e maior área fibrosa, enquanto a amostra 7 apresentou somente alguns pontos onde houve formação de fibras e maior.

Soluções de concentração maior que 25% também foram testadas, porém sem sucesso devido à alta viscosidade, causando evaporação acelerada do solvente e entupimento da agulha, e à tendência a gelificação.

As amostras 3 a 8 foram analisadas também em microscópio eletrônico de varredura (MEV), a fim de se obter mais detalhes de morfologia e dimensões das fibras.

5.11 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Como mencionado na seção 5.9, as amostras 3 a 8 foram analisadas com microscopia eletrônica de varredura, a fim de avaliar as fibras dimensionalmente.

As Figuras 31 e 32 mostram as imagens MEV das amostras 3 e 4, respectivamente, para aumentos de 1.000x e 5.000x.

Figura 31 – Imagens de MEV da amostra 3 com aumento de (a) 1.000x, (b) 5.000x

Figura 32 – Imagens de MEV da amostra 4 com aumento de (a) 1.000x, (b) 5.000x

É possível observar que ambas as amostras, cuja concentração foi de 20%, apresentaram semelhanças, com a formação de poucas fibras no meio de muitas gotículas de alta porosidade.

Na amostra 5 (Figura 33) houve a formação de uma quantidade maior de fibras, que também apresentaram maior homogeneidade em suas dimensões. No entanto, muitas gotículas se formaram junto às fibras.

Figura 33 – Imagens de MEV da amostra 5 com aumento de (a) 1.000x, (b) 5.000x

Na amostra 6 (Figura 34), como verificado por microscopia ótica, houve junção entre as fibras, gerando uma rede de fibras de diâmetro não uniforme interconectadas.

Figura 34 – Imagens de MEV da amostra 6 com aumento de (a) 1.000x, (b) 5.000x

Na Figura 35, é possível ver com mais detalhes que as fibras mais próximas a superfícies tiveram diâmetros menores em relação às fibras depositadas nas camadas inferiores. A variação de diâmetro das fibras pode ter sido consequência da instabilidade do jato durante o processo. Percebe-se também que houve pontos de aglomeração de material, com grande entrelaçamento das fibras.

Figura 35 – Dimensões da amostra 6

Nas amostras 7 e 8, foi observada a presença de algumas gotas abaixo das membranas fibrosas, provavelmente decorrentes da variação da tensão elétrica no início do processo de eletrofiação. As duas amostras, obtidas da solução polimérica de concentração 25%, apresentaram semelhança na morfologia. No entanto, na amostra 7 foi detectada maior variação nas dimensões e na morfologia das fibras. Já a amostra 8 apresentou menor quantidade de gotas e maior estabilidade dimensional.

As Figura 36 e 37 mostram as imagens de MEV das amostras 7 e 8, para aumentos de 1.000x e 5.000x.

Figura 36 – Imagens de MEV da amostra 7 com aumento de (a) 1.000x, (b) 5.000x

Figura 37 – Imagens de MEV da amostra 8 com aumento de (a) 1.000x, (b) 5.000x

As Figura 38 e 39 mostram que os diâmetros obtidos nas fibras da amostra 7 foram ligeiramente menores que os da amostra 8. Enquanto a amostra 7 apresentou valor médio entre 900 a 1100 nm de diâmetro, as fibras da amostra 8 exibiram diâmetro médio entre 1100 a 1200 nm, na faixa do micron. Analisando os histogramas do diâmetro das fibras, a amostra 8 apresentou uma distribuição mais estreita que a amostra 7.

Figura 38 – Dimensões e histograma do diâmetro das fibras da amostra 7 **Figura 39** – Dimensões e histograma do diâmetro das fibras da amostra 8

Essa diferença de diâmetro pode ser explicada pela maior vazão da solução na alimentação adotada na eletrofiação da amostra 8. Valores menores de vazão resultam em fibras com diâmetros menores.

As amostras 7 e 8, obtidas com a solução mais concentrada, resultaram em fibras mais homogêneas. Quando a concentração da solução é alta, aumenta-se o número de emaranhamentos das cadeias poliméricas, causando o aumento da viscosidade da solução, o que diminui os efeitos da instabilidade à medida que o jato

se estende numa estrutura filamentosa coerente ao invés de se dividir em pequenas gotas. Como consequência, são formadas fibras mais uniformes.

Nas imagens MEV, é possível visualizar a existência de grandes espaços entre as fibras, decorrente do direcionamento aleatório da deposição do material sobre a placa. Para a aplicação em biomateriais, esses poros facilitam a passagem de fluidos e gases pela membrana.

Outros fatores que podem ter influenciado a morfologia das fibras são a tensão superficial da solução, umidade e temperatura durante o processo de eletrofiação.

5.12 Cultura celular

A cultura de células C6 sobre a amostra de nanofibras eletrofiadas de PHB-co-PCL mostrou que houve incorporação de células, indicando que o material não é citotóxico. As imagens de microscopia podem ser vistas na Figura 40.

As imagens indicam que as células se multiplicaram e se aglomeraram preferencialmente em regiões mais ricas em fibras. É possível observar na Figura 40b a presença de algumas fibras e inúmeros pontos pequenos mais claros, que podem ser células menores.

Idealmente, seria mais adequado analisar a amostra durante um período maior que 48 horas, porém o resultado já é suficiente para afirmar que o material permitiu o crescimento celular.

Figura 40 – Amostra de membrana de PHB-co-PCL (a) antes e (b) depois da cultura de células observadas em microscópio digital com aumento de 100x

5.13 Imagem por bioluminescência

As células C6 Luc nas amostras do copolímero foram testadas para verificar a produção de bioluminescência. A imagem por bioluminescência das células pode ser observada na Figura 41.

Observa-se que na região das amostras houve uma intensa detecção do sinal bioluminescente das células (escala de cores quentes e frias na imagem), evidenciando a existência de células distribuídas de forma heterogênea.

É visível que algumas regiões da placa possuem sinal mais intenso, representado por cores quentes, que outras regiões. Essa distribuição não tem relação com a distribuição de material na superfície da placa. O crescimento das células nas amostras não ocorre de maneira homogênea, células tendem a crescer preferencialmente perto de outras. Por estarem em suspensão, pode ter havido acúmulo de células em áreas específicas, ou então, é possível que as células tenham se deslocado e se acumulado no fundo do recipiente (placa da Petri), abaixo da placa de vidro que continha a amostra, e não acima dela, onde fibras foram depositadas.

Houve crescimento celular, porém não foi feito teste com controle. O controle das amostras seria o mais adequado para verificar se haveria crescimento das células no substrato na ausência de material, porém a análise da imagem permitiu confirmar que a amostra testada não levou à morte das células.

Figura 41 – (a) Amostras analisadas e (b) Imagem por bioluminescência de células C6 Luc

(a)

(b)

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, o copolímero PHB-co-PCL foi sintetizado com sucesso por meio de reação de transesterificação através de extrusão reativa.

As análises térmicas mostraram que houve redução na cristalinidade do copolímero em relação ao PHB, e análise de viabilidade celular confirmou que o material não é citotóxico, favorecendo sua aplicabilidade como biomaterial.

Não foram encontrados na literatura estudos envolvendo síntese do copolímero de PHB/PCL por extrusão reativa, e também, até o momento, não foi reportada a produção de fibras por eletrofiação de PHB-co-PCL.

Através da técnica de eletrofiação foram obtidas fibras lisas e uniformes, de diâmetros médios entre 900 a 1200 nm, do copolímero. Os melhores resultados de eletrofiação foram obtidos com soluções mais concentradas, pois apresentaram morfologia mais uniforme. No entanto, acima da concentração de 25%, a solução se torna excessivamente difícil de trabalhar devido à alta viscosidade.

Além da concentração da solução e viscosidade da solução, outros parâmetros como tensão aplicada pela fonte e vazão também afetaram a formação e dimensão das fibras.

A realização deste trabalho mostrou que é possível a formação de fibras (sub)micrométricas de PHB-co-PCL por eletrofiação, e com propriedades adequadas para a produção de membranas porosas para a engenharia de tecidos. Por meio das análises desenvolvidas nesse estudo, acredita-se que o copolímero PHB-co-PCL seja um material com potencial para ser disponibilizado futuramente na área biomédica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI AKBARI GHAVIMI, S. et al. Polycaprolactone/starch composite: Fabrication, structure, properties, and applications. **J Biomed Mater Res A**, v. 103, n. 7, p. 2482-98, Jul 2015.

ALICATA, R. et al. Characterization of poly[(R)-3-hydroxybutyrate-co-epsilon-caprolactone] copolymers by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight and electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 20, n. 4, p. 568-76, 2006.

ALMEIDA, L. L. D. **Síntese e propriedades do copolímero anfifílico poli(3-hidroxibutirato)-bloco-poli(óxido de etileno) e preparação de nanopartículas**. 2012. Dissertação de mestrado Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BAKER, S. C. et al. Characterisation of electrospun polystyrene scaffolds for three-dimensional in vitro biological studies. **Biomaterials**, v. 27, n. 16, p. 3136-3146, 2006.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A.; DUEK, E. A. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

BATABYAL, S. K. et al. Coordination-Polymeric Nanofibers and their Field-Emission Properties. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 30, n. 15, p. 1356-1361, 2009.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 3, p. 325-347, 2010.

BREULMANN, M. et al. Polymers, Biodegradable. In: (Ed.). **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, 2009.

CAO, K. et al. PLLA-PHB fiber membranes obtained by solvent-free electrospinning for short-time drug delivery. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 8, n. 1, p. 291-302, February 01 2018.

CARA, F. L. et al. Biodegradation of poly- ϵ -caprolactone/poly- β -hydroxybutyrate blend. **Polymer Degradation and Stability**, v. 79, p. 37-43, 2003.

CASTELLANO, D. et al. Electrospun poly(hydroxybutyrate) scaffolds promote engraftment of human skin equivalents via macrophage M2 polarization and angiogenesis. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 12, n. 2, p. e983-e994, Feb 2018.

CAVALIERE, S. et al. Electrospinning: designed architectures for energy conversion and storage devices. **Energy & Environmental Science**, v. 4, n. 12, p. 4761-4785, 2011.

CHEN, C. et al. Synthesis and characterization of poly(β -hydroxybutyrate) and poly(ϵ -caprolactone) copolyester by transesterification. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 40, n. 17, p. 1893-1903, 2002.

CHEN, G. G.-Q. **Plastics from bacteria: natural functions and applications**. Springer Science & Business Media, 2009. ISBN 3642032877.

CHIELLINI, E.; SOLARO, R. Biodegradable polymeric materials. **Advanced Materials**, v. 8, n. 4, p. 305-313, 1996.

CHIELLINI, E.; SOLARO, R. **Biodegradable polymers and plastics**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. ISBN 1441992405.

COSTA, R. G. F. et al. Eletrofiação de polímeros em solução. Parte I: fundamentação teórica. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 170-177, 2012.

DEITZEL, J. M. et al. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. **Polymer**, v. 42, n. 1, p. 261-272, 2001/01/01/ 2001.

DING, B. et al. Electrospun nanomaterials for ultrasensitive sensors. **Materials Today**, v. 13, n. 11, p. 16-27, 2010.

DOPPALAPUDI, S. et al. Biodegradable polymers-an overview. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 25, n. 5, p. 427-435, 2014.

FLIEGER, M. et al. Biodegradable plastics from renewable sources. **Folia Microbiol**, v. 48, p. 27-44, 2003.

FLIEGER, M. et al. Biodegradable plastics from renewable sources. **Folia Microbiologica**, v. 48, n. 1, p. 27, January 01 2003.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis-uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 811, 2006.

GARCIA-GARCIA, D. et al. Improvement of the compatibility between poly(3-hydroxybutyrate) and poly(ϵ -caprolactone) by reactive extrusion with dicumyl peroxide. **European Polymer Journal**, v. 86, p. 41-57, 2017/01/01/ 2017.

GASSNER, F.; OWEN, A. J. Physical properties of poly(β -hydroxybutyrate)-poly(ϵ -caprolactone) blends. **Polymer**, v. 35, n. 10, p. 2233-2236, 1994/05/01/ 1994.

GOMES, D. S. et al. Characterization of an electrospinning process using different PAN/DMF concentrations. **Polímeros**, v. 17, n. 3, p. 206-211, 2007.

GONÇALVES, J. et al. **Caracterização das mantas de poli(3-hidroxibutirato) obtidas pelo método de eletrofiação.** Anais do 10^o Congresso Brasileiro de Polímeros. Foz do Iguaçu 2009.

GREINER, A.; WENDORFF, J. H. Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 30, p. 5670-5703, 2007/07/23 2007.

HANSEN, C. M. **Hansen solubility parameters: a user's handbook**. Second edition. Boca Raton: CRC Press, 2007.

HUANG, S. Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. In: MARK, F. H.;BIKALES, N. M., et al (Ed.). **Encyclopedia of Polymer Science and Engineering**. New York: John Wiley, v.Vol. 2, 1985. p.220–243.

HUTCHENS, M.; LUKER, G. D. Applications of bioluminescence imaging to the study of infectious diseases. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 2315-2322, 2007.

IMMIRZI, B. et al. Blends of biodegradable polyesters by reactive blending: preparation, characterisation and properties. **Journal of Materials Science**, v. 34, n. 7, p. 1625-1639, April 01 1999.

IMPALLOMENI, G. et al. Acid Catalyzed Transesterification as a Route to Poly(3-hydroxybutyrate-co- ϵ -caprolactone) Copolymers from Their Homopolymers. **Biomacromolecules**, v. 3, n. 4, p. 835-840, 2002/07/01 2002.

JIANG, Y. et al. Novel wound dressing based on nanofibrous PHBV–keratin mats. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 9, n. 9, p. 1027-1035, 2015.

KAMPEERAPAPPUN, P. The electrospun polyhydroxybutyrate fibers reinforced with cellulose nanocrystals: Morphology and properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 20, p. 43273, 2016.

KARAHALILOĞLU, Z. et al. Plasma polymerization-modified bacterial polyhydroxybutyrate nanofibrillar scaffolds. **Journal of Applied Polymer Science**, p. 1904-1912, 2012.

KIM, B. O.; WOO, S. I. Compatibilizing capability of poly(β -hydroxybutyrate-co- ϵ -caprolactone) in the blend of poly(β -hydroxybutyrate) and poly(ϵ -caprolactone). **Polymer Bulletin**, v. 41, n. 6, p. 707-712, December 01 1998.

LIM, J. S. et al. Fabrication and evaluation of poly(epsilon-caprolactone)/silk fibroin blend nanofibrous scaffold. **Biopolymers**, v. 97, n. 5, p. 265-75, May 2012.

LIU, W.; THOMOPOULOS, S.; XIA, Y. Electrospun Nanofibers for Regenerative Medicine. **Advanced Healthcare Materials**, v. 1, n. 1, p. 10-25, 2012.

LIU, X.; MA, P. X. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 32, n. 3, p. 477-486, March 01 2004.

LLOYD, A. W. Interfacial bioengineering to enhance surface biocompatibility. **Medical device technology**, v. 13, n. 1, p. 18-21, 2002.

LOVERA, D. et al. Crystallization, Morphology and Enzymatic degradation of polyhydroxybutyrate/polycaprocactone (PHB/PCL) blends. **Macromolecular Chemistry Physics**, v. 208, p. 924-937, 2007.

MADHUMATHI, R.; MUTHUKUMAR, K.; VELAN, M. Optimization of Polyhydroxybutyrate Production by *Bacillus safensis* EBT1. **CLEAN – Soil, Air, Water**, v. 44, n. 8, p. 1066-1074, 2016.

MAREGA, C.; MARIGO, A. Effect of electrospun fibers of polyhydroxybutyrate filled with different organoclays on morphology, biodegradation, and thermal stability of poly(ϵ -caprolattone). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 31, p. n/a-n/a, 2015.

MENDONÇA, R. H. et al. Adsorção de fibronectina a arcabouços de polihidroxibutirato aplicáveis à engenharia óssea. **Polímeros**, v. 19, p. 143-148, 2009.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8, p. 762-798, 2007/08/01/ 2007.

NASCIMENTO, J. F. D. **Estudo da processabilidade e da caracterização do poli(ácido 3-hidroxibutírico) - PHB obtido a partir da cana-de-açúcar**. 2001. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

NIELSEN, C. et al. Food waste conversion to microbial polyhydroxyalkanoates. **Microb Biotechnol**, v. 10, n. 6, p. 1338-1352, Nov 2017.

PAGLIARO, M. Renewable Resources and Renewable Energy. A Global Challenge. Edited by Mauro Graziani and Paolo Fornasiero. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 48, p. 9143-9143, 2007.

PERSANO, L. et al. Industrial upscaling of electrospinning and applications of polymer nanofibers: a review. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 298, n. 5, p. 504-520, 2013.

QUENTAL, A. C. et al. Blendas de PHB e seus copolímeros: miscibilidade e compatibilidade. **Química Nova**, v. 33, p. 438-446, 2010.

RATNER, B. D. et al. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. Elsevier, 2004. ISBN 008047036X.

REDDI, A. H. Symbiosis of biotechnology and biomaterials: Applications in tissue engineering of bone and cartilage. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 56, n. 2, p. 192-195, 1994.

REDDY, C. S. K. et al. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 137-146, 2003/04/01/ 2003.

RICE, B. W.; CABLE, M. D.; NELSON, M. B. In vivo imaging of light-emitting probes. 2001, SPIE. p.9.

ROA, J. P. B. et al. Síntese e caracterização do copolímero Poli(3-Hidroxibutirato-co- ϵ -Caprolactona) a partir de Poli(3-Hidroxibutirato) e Poli(ϵ -Caprolactona). **Polímeros**, v. 20, n. 3, p. 221-226, 2010.

SALOM, C. et al. Poly (ϵ -caprolactone)+ unsaturated isophthalic polyester blends: Thermal properties and morphology. **European polymer journal**, v. 42, n. 8, p. 1798-1810, 2006.

SALVATORE, L. et al. Potential of Electrospun Poly(3-hydroxybutyrate)/Collagen Blends for Tissue Engineering Applications. **Journal of Healthcare Engineering**, v. 2018, p. 13, 2018.

SILL, T. J.; VON RECUM, H. A. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, n. 13, p. 1989-2006, May 2008.

SILVA, L. F. D. et al. Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, v. 30, p. 1732-1743, 2007.

SOMBATMANKHONG, K. et al. Bone scaffolds from electrospun fiber mats of poly(3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and their blend. **Polymer**, v. 48, n. 5, p. 1419-1427, 2007/02/23/ 2007.

STEVENS, M. P. **Polymer Chemistry: An Introduction**. 3rd. New York: Oxford University Press, 1999.

TERADA, M.; MARCHESSAULT, R. H. Determination of solubility parameters for poly(3-hydroxyalkanoates). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, n. 1, p. 207-215, 1999/06/01/ 1999.

UBLEKOV, F. et al. Self-supporting electrospun PHB and PHBV/organoclay nanocomposite fibrous scaffolds. **Materials Letters**, v. 218, p. 353-356, 2018.

VELHO, L.; VELHO, P. Resumos da Technology Transfer Society Conference. **Atlanta, Georgia, USA**, 2006.

VERT, M. et al. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 3, n. 6, p. 432-446, November 01 1992.

VOGELSANGER, N. et al. Blendas biodegradáveis de Poli(3-Hidroxibutirato)/Poli(ϵ -Caprolactona): Obtenção e estudo da miscibilidade. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 359-365, 2003.

WILLIAMS, D. **The Williams Dictionary of Biomaterials Liverpool, UK: Liverpool: University Press.**—1999.—42 p.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217-1256, 2010.