UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ISABELA FARIA SANTOS

Síntese de nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato-co-3hidroxivalerato) modificadas com aminosilanos para aplicação em engenharia de tecidos

> Lorena-SP 2017

ISABELA FARIA SANTOS

Síntese de nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato-co-3hidroxivalerato) modificadas com aminosilanos para aplicação em engenharia de tecidos

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de Novos Materiais e Química Fina.

Orientador: Prof. Dr. Amilton Martins dos Santos

Edição reimpressa e corrigida

Lorena-SP

Novembro, 2017

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

> Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado da Escola de Engenharia de Lorena, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Santos, Isabela Faria Síntese de nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato co-3-hidroxivalerato) modificadas com aminosilanos para aplicação em Engenharia de Tecidos / Isabela Faria Santos; orientador Amilton Martins dos Santos ed. reimp., corr. - Lorena, 2017. 102 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Engenharia Química na Área de Novos Materiais e Química Fina) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2017 Orientador: Amilton Martins dos Santos

1. Engenharia de tecidos. 2. Nanopartículas. 3. Phbhv. 4. Matriz extracelular. I. Título. II. Santos, Amilton Martins dos, orient. Dedicatória

Dedico esse trabalho à Vó Lia (*in memorian*), por todas as orações, por todo o carinho e por sempre unir a família.

"Vó Lia, você permanecerá eternamente em nossas lembranças e em nossos corações."

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus pela saúde e pela força, me ajudando a não desanimar diante das dificuldades.

Aos meu pais, Ana Lázara e Paulo Pirola, e minha irmã Gabi, por todo apoio, carinho paciência e amor.

Ao meu companheiro André, por me ouvir nos momentos difíceis e me ajudar nos momentos de dúvida.

Aos meus avós, João Mendes e Dona Lia (*in memorian*), e aos meus tios e primos, por todos os momentos de distração e por se fazerem presentes mesmo distantes.

Aos amigos de laboratório por toda ajuda para superar os obstáculos, que não foram poucos.

Ao meu orientador, pelas correções e sugestões durante o desenvolvimento da dissertação e do artigo.

Ao Programa de Pós-Graduação (PPGEQ) e a todos os professores e funcionários que fizeram parte desse momento especial.

A CAPES pelo auxílio financeiro, tornando possível minha dedicação integral ao trabalho.

Resumo

SANTOS, I. F. Síntese de nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3hidroxivalerato) modificadas com aminosilanos para aplicação em Engenharia de Tecidos. 2017. 102p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

A Engenharia de Tecidos tem como objetivo desenvolver alternativas para o tratamento de doenças degenerativas e regeneração de tecidos lesionados. O princípio básico da Engenharia de Tecidos é promover o crescimento de células sobre um substrato. Esse substrato deve reproduzir a matriz extracelular, influenciando a diferenciação e as funções celulares. Para isso, neste trabalho, nanopartículas poliméricas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBHV), com diferentes diâmetros hidrodinâmicos, foram sintetizadas pelo método de emulsão-evaporação do solvente. A concentração do surfactante, a velocidade de agitação durante a emulsificação e o tempo de agitação foram variados a fim de se analisar a influência desses parâmetros no diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade e estabilidade coloidal das emulsões. Os parâmetros que mais influenciaram no diâmetro hidrodinâmico e no índice de dispersidade foram a concentração de surfactante e a amplitude de sonicação da emulsão, respectivamente. Após a obtenção das dispersões com estabilidade coloidal, realizou-se a modificação química da superfície dessas partículas utilizando os aminosilanos, 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) e 3aminopropiltrietoxisilano (APTES). Essa modificação química na superfície das nanopartículas teve como objetivo a mimetização da matriz extracelular, permitindo a adesão e proliferação das células. As partículas modificadas foram caracterizadas por espalhamento de luz dinâmico (DLS), microscopia de força atômica (AFM), calorimetria exploratória diferencial (DSC), Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H). Os resultados de FTIR mostraram o aparecimento de pico referente ao grupo amino, que foi indicativo da modificação química da superfície das nanopartículas. Os resultados de RMN ¹H mostraram o sinal dos grupos CH₃ do silano APTMS no espectro das nanopartículas modificadas por APTMS, e nas partículas modificadas por APTES, foi possível identificar o sinal referente aos grupos CH₂ do APTES. A partir desses resultados comprovou-se a modificação química da superficie das nanopartículas pelos aminosilanos.

Palavras-chave: Engenharia de Tecidos. Nanopartículas. PHBHV. Matriz extracelular.

Abstract

SANTOS, I. F. Synthesis of poly (3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) nanoparticles modified by aminosilanes to be used in tissue engineering. 2017. 102p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017

Tissue engineering aims to develop alternatives to treat damaged tissues by promoting tissue regeneration. The basic principle of Tissue Engineering is to promote the growth of cells on a substrate. This substrate must reproduce the extracellular matrix, influencing particular cell functions and differentiation fate. For this purpose, at the present work, polymeric nanoparticles of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBHV) with different hydrodynamic diameters were synthesized by emulsion-solvent evaporation technique. The concentration of the surfactant, stirring speed during emulsification and stirring time were varied in order to analyze the influence of these parameters on hydrodynamic diameter, polydispersity and colloidal stability. The parameters that most influenced the hydrodynamic diameter and polydispersity index were the variation in the surfactant concentration and the variation of emulsion sonication amplitude, respectively. After that, the nanoparticles had their surface modified by 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS) and 3aminopropyltriethoxysilane (APTES). The aim of this chemical modification was to mimic the extracellular matrix, allowing the adhesion and proliferation of cells. The modified particles were characterized by dynamic light scattering (DLS), atomic force microscopy (AFM), differential scanning calorimetry (DSC), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR). The FTIR results showed a peak of the amino group, which was an indicative of the nanoparticles surface chemical modification. ¹H NMR results showed the signal of the CH₃ groups of the APTMS silane in the spectrum of the APTMS-modified nanoparticles and in the APTES-modified particles it was possible to identify signal relating to the CH₂ groups of the APTES. From these results, it was verified the nanoparticles surface chemical modification by the aminosilanes.

Keywords: Tissue Engineering. Nanoparticles. PHBHV. Extracellular Matrix

Lista de Figuras

Figura 1- Estrutura dos polihidroxialcanoatos
Figura 2 - Estrutura do poli(3-hidroxibutirato) (PHB)
Figura 3 - Estrutura do poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBHV)41
Figura 4 - Fórmula estrutural da sequência RGD
Figura 5 - Cromatogramas de GPC do PHBHV de partida e do PHBHV obtido pela reação
de transesterificação com etileno glicol (PHBHV-diol)
Figura 6 - Espectros de RMN ¹ H do PHBHV ($M_n = 121$ KDa, $D= 1,90$) e do PHBHV-diol
$(M_n = 22 \text{KDa}, D = 1,47)$
Figura 7 - Espectro de FTIR do poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) e do poli(3-
hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) dihidroxilado56
Figura 8 - Termogramas de DSC do poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) e do poli(3-
hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) dihidroxilado57
Figura 9 - Variação do diâmetro hidrodinâmico das partículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa,
D=1,90) em função do tempo64
Figura 10 - Variação do índice de polidispersidade das dispersões de nanopartículas de
PHBHV ($M_n = 121$ KDa, $D= 1,90$) em função do tempo
Figura 11 - Variação do pH das dispersões de nanopartículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa,
D=1,90) em função do tempo
Figura 12 - Micrografias de microscopia de força atômica (AFM) e distribuição de diâmetros
das nanopartículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, $D= 1,90$) e PHBHV-diol ($M_n = 22$ KDa, $D=$
1,47)
Figura 13 - Espectros das nanopartículas de PHBHV não modificadas e das nanopartículas
de PHBHV modificadas por APTES e APTMS73
Figura 14 - Espectros das nanopartículas de PHBHV-diol não modificadas e das
nanopartículas de PHBHV-diol modificadas por APTES e APTMS74
Figura 15 - Espectro de RMN ¹ H do aminosilano APTMS, das nanopartículas de PHBHV-
diol modificadas por APTMS e do PHBHV-diol ($M_n = 22$ KDa, $D= 1,47$)77
Figura 16 - Espectro de RMN ¹ H do aminosilano APTES, das nanopartículas de PHBHV-
diol modificadas por APTES e do PHBHV-diol ($M_n = 22$ KDa, $D= 1,47$)78
Figura 17 - Termogramas de DSC das nanopartículas de PHBHV, das nanopartículas de
PHBHV-diol e nanopartículas de PHBHV e PHBHV-diol modificadas por APTMS e
APTES

Figura 18 - Micrografias de microscopia de força atômica (AFM) e distribuição de diâmetros
de nanopartículas de PHBHV modificadas por APTMS e APTES
Figura 19 - Variação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de PHBHV (M_n =
121KDa, Đ= 1,90) modificadas com APTMS e APTES em função do tempo
Figura 20 - Variação do índice de polidispersidade das dispersões de nanopartículas de
PHBHV ($M_n = 121$ KDa, $D= 1,90$) modificadas por APTMS e APTES em função do tempo
Figura 21 - Variação do potencial zeta das nanopartículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, $D=$
1,90) modificadas por APTMS e APTES em função do tempo

Lista de Tabelas

Đ= 1,90) pelo método de emulsão-evaporação do solvente
Tabela 2 - Massas molares do PHBHV de partida e do PHBHV obtido como produto das
reações de transesterificação com etileno glicol, obtidas pela técnica de Cromatografia de
Permeação em Gel
Tabela 3 - Valores das temperaturas de transição, entalpia de fusão e grau de cristalinidade
do poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) e do poli(3-hidroxibutirato-co-3-
hidroxivalerato) dihidroxilado obtidos por DSC
Tabela 4 – Resultados obtidos no estudo do efeito dos parâmetros do processo de síntese de
nanopartículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, $D= 1,90$)
Tabela 5 - Estudo da estabilidade coloidal das dispersões de partículas de PHBHV ($M_n =$
121KDa, Đ= 1,90)
Tabela 6 - Parâmetros de processo para a síntese de nanopartículas de PHBHV pelo método
de emulsão-evaporação do solvente
Tabela 7 - Efeito da concentração de surfactante no diâmetro hidrodinâmico, índice de
polidispersidade e pH das dispersões de nanopartículas de PHBHV-diol (M _n = 22KDa, Đ=
1,47)
Tabela 8 - Estudo da estabilidade coloidal das dispersões de partículas de PHBHV-diol (Mn
= 22KDa, Đ= 1,47) ao longo do tempo
Tabela 10 - Comparação do diâmetro de partículas obtido por microscopia de força atômica
(AFM) (Dp) e diâmetro hidrodinâmico obtido por espalhamento de luz dinâmico (DLS) (Dh)
para as partículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, $D= 1,90$) e PHBHV-diol ($M_n = 22$ KDa, $D=$
1,47)
Tabela 11 - Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersidade das partículas de PHBHV
$(M_n = 121 \text{KDa}, D= 1,90)$ e PHBHV-diol $(M_n = 22 \text{KDa}, D= 1,47)$ antes da reação de
funcionalização com APTMS e APTES
Tabela 12 - Valores das temperaturas de transição, entalpia de fusão e grau de cristalinidade
das nanopartículas de PHBHV, das nanopartículas de PHBHV-diol e nanopartículas de
PHBHV e PHBHV-diol modificadas obtidos por DSC
Tabela 13 - Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade e potencial zeta das
nanopartículas de PHBHV modificadas por APTMS e APTES, das nanopartículas de

PHBHV-diol modificadas por APTMS e APTES e das nanopartículas de PHBHV e
PHBHV-diol sem modificação
Tabela 14 - Comparação do diâmetro de partícula obtido por microscopia de força atômica
(AFM) (Dp) e diâmetro hidrodinâmico obtido por espalhamento de luz dinâmico (DSL) (Dh)
das partículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, $D = 1,90$) modificadas pelos aminosilanos APTMS
e APTES
Tabela 15 - Estudo da estabilidade coloidal das dispersões de partículas de PHBHV ($M_n =$
121KDa, Đ= 1,90) modificadas por APTMS e APTES

Lista de Abreviações

- AFM microscopia de força atômica
- APTES 3-aminopropiltrimetoxisilano
- APTMS 3-aminopropilmetoxisilano
- BG vidro bioativo
- Dh-diâmetro hidrodinâmico
- DSC- calorimetria exploratória diferencial
- DLS espalhamento de luz dinâmico
- ELS espalhamento de luz eletroforético
- FTIR espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
- GPC cromatografia de permeação em gel

HA- hidroxiapatita

- MEV microscopia eletrônica de varredura
- M_n massa molar numérica média
- NPs nanopartículas
- $PCL poli(\epsilon$ -caprolactona)
- PDI índice de polidispersidade
- PDLLA poli(L-co-D, L ácido láctico)
- PGA poli(ácido glicólico)
- PHAs polihidroxialcanoatos
- PHB poli(hidroxibutirato)
- PHBHV poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)
- PLA poli(ácido láctico)
- PLGA poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
- RGD Sequência peptídica arginina-glicina-ácido aspártico
- RM medicina regenerativa
- RMN¹H ressonância magnética nuclear de hidrogênio
- SDS dodecil sulfato de sódio
- TC triclosan

Sumário

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	17	
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20	
2.1	Engenharia de Tecidos	20	
2.1.	1 Células-tronco	22	
2.1.2	2 Suportes	26	
3	OBJETIVO	45	
3.1	Objetivo Geral	45	
3.2	2 Objetivos específicos		
4	MATERIAIS E MÉTODOS	46	
4.1	Reagentes	46	
4.2	Métodos	46	
4.2.	1 Redução da massa molar do poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivale	ato)	
(PH	BHV)	46	
4.2.2	2 Síntese das nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) via	
méte	odo de emulsão-evaporação do solvente	47	
4.2.	3 Modificação química da superfície das nanopartículas de PHBHV	com	
amii	nosilanos	48	
4.3	Caracterizações	49	
4.3.	1 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	49	
4.3.2	2 Espalhamento de Luz Eletroforético (ELS)	50	
4.3.	3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	50	
4.3.4	4 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	50	
4.3.	5 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	51	
4.3.0	6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	51	
4.3.	7 Microscopia de Força Atômica (AFM)	52	
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53	
5.1	Redução da massa molar do PHBHV via transesterificação com etileno glicol	53	
5.1.	1 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	53	
5.1.2	2 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	54	
5.1.	3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	56	
5.1.4	4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	57	

5.2 Síntese de nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) e poli(3hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) dihidroxilado 59 5.2.1 Estudo do efeito dos parâmetros de processo na síntese de nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) e estabilidade coloidal das dispersões obtidas 59 5.2.2 Estudo do efeito dos parâmetros de processo na síntese de nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) dihidroxilado (PHBHV-diol) e estudo da estabilidade coloidal das dispersões obtidas 67 5.2.3 Influência da variação da massa molar do poli(3-hidroxibutirato-co-3hidroxivalerato) no diâmetro hidrodinâmico das partículas 69 5.2.4 Morfologia e topografia das nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato-co-3hidroxivalerato) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) dihidroxilado 70 5.3 Modificação química da superfície das nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato-co-3hidroxivalerato) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) dihidroxilado (PHBHV-diol) 71 5.3.1 Caracterização nanopartículas poli(3-hidroxibutirato-co-3das de hidroxivalerato) modificadas por aminosilanos 73 5.3.2 Avaliação da estabilidade coloidal das partículas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) modificadas pelos aminosilanos APTMS e APTES 88 6 CONCLUSÕES 92 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 94 Referências 95

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A crescente demanda por transplante de órgãos e a alta escassez destes impede o salvamento de inúmeras vidas. Buscando uma solução para esse problema, muitos estudos estão sendo desenvolvidos no campo da engenharia de tecidos, visando o tratamento de doenças degenerativas e a regeneração de tecidos lesionados.

A engenharia de tecidos, subcampo da medicina regenerativa, tem como definição a produção de partes do corpo *ex vivo*, através da inoculação de células em suportes (ORLANDO et al., 2011).

As células-tronco são interessantes para aplicação em Engenharia de Tecidos, pois são células indiferenciadas e não-especializadas, podendo formar diferentes tipos celulares, se inoculadas em suportes adequados (ULLAH; SUBBARAO; RHO, 2015; WATT; HOGAN, 2000; BERNÁ et al., 2001). Estas células são classificadas em embrionárias, adultas e de pluripotência induzida, sendo as mais utilizadas as adultas, devido a sua estabilidade genômica e por não envolverem questões éticas, como é o caso das embrionárias (ULLAH; SUBBARAO; RHO, 2015).

Os suportes utilizados em engenharia de tecidos, onde as células são inoculadas, devem reproduzir a matriz extracelular, para permitir o crescimento celular e regenerar os tecidos lesionados (KUO et al., 2015). Esses substratos podem ser encontrados na forma de fibras, espumas, esponjas, hidrogéis e microesferas, sendo compostos por materiais como metais, cerâmicas, polímeros naturais e sintéticos (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011; OLSSON et al., 2008). Os suportes precisam atender certas características de geometria, porosidade, propriedades de superfície, biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas, para garantir o crescimento e a proliferação celular (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011).

Os modelos convencionais de materiais utilizados como suportes em Engenharia de Tecidos envolvem uma interação matriz-célula estática, o que na verdade não ocorre, pois, essas interações são altamente dinâmicas (SHARMA; SCHWARZBAUER; MOGHE, 2011).

Visando tornar as interações suporte-células dinâmicas, nanopartículas podem ser adicionadas aos suportes. Além disso, as nanopartículas atuam como reguladores de interações entre integrinas, células e ligantes da matriz extracelular, possibilitando o controle da adesão celular (SHARMA; SCHWARZBAUER; MOGHE, 2011). Elas também podem ser adicionadas aos substratos visando alterar características de bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e proliferação celular dos materiais utilizados para a preparação dos suportes (SHARMA; SHREIBER; MOGHE, 2008; PETER et al., 2010; ROOHANI- ESFAHANI et al., 2011; VERGNOL et al., 2016; TAJBAKHSH; HAJIALIB, 2017).

A síntese das nanopartículas pode ser realizada utilizando diferentes tipos de materiais e métodos. Os materiais poliméricos têm posição de destaque nessa área, pois é possível adequar sua estrutura, de maneira que se consiga atingir as propriedades necessárias para promover a adesão celular (JAYARAMAN et al., 2015). Além do tipo de material utilizado na síntese das nanopartículas, o tamanho destas e as suas propriedades de superfície tem grande influência nos processos de adesão e proliferação celular (SHARMA; SHREIBER; MOGHE, 2008).

Para se obter os tamanhos desejados das nanopartículas e um sistema coloidal estável é necessário ajustar os parâmetros do processo de formulação. No processo de emulsão-evaporação do solvente, por exemplo, alguns parâmetros podem ser ajustados, como velocidade de agitação, tempo de agitação, concentração do polímero utilizada, concentração do surfactante, relação polímero/surfactante, tipo do solvente orgânico e a taxa de evaporação deste (PACHECO et al., 2015). Com o ajuste desses parâmetros é possível obter uma dispersão de partículas com estabilidade coloidal para serem aplicadas em suportes para Engenharia de Tecidos.

Além do tamanho das nanopartículas e estabilidade do sistema, muitas vezes, se faz necessário alterar as propriedades de superfície das partículas, visando o aumento da interação celular. Com isso, para aumentar a adesão celular em suportes contendo nanopartículas, uma modificação química da superfície dessas partículas pode ser realizada, pela inserção de moléculas bioativas como proteínas, ácidos nucléicos e carboidratos, tornando o material mais adequado ao crescimento celular, devido à mimetização da matriz extracelular (ARMENTANO et al., 2010; HERSEL; DAHEMEN; KESSLER, 2003).

A modificação química ou funcionalização da superfície com oligopeptídeos ou ligantes de matriz pode ser realizada utilizando agentes de acoplamento, que são moléculas que permitem a ligação da superfície do material polimérico com a molécula biológica. Como agentes de acoplamento, pode-se citar os aminosilanos, cujo grupo amino do material se liga à molécula biológica e o grupo silanol se liga à superfície do material polimérico (RIAU et al., 2015).

Com isso, o principal objetivo desse trabalho foi sintetizar nanopartículas de poli(3hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBHV), funcionalizadas com grupo amino através da utilização de aminosilanos, para atuarem como reguladoras da diferenciação celular de células-tronco.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Engenharia de Tecidos

A substituição de partes do corpo por próteses, como exemplo, protéses metálicas, implantes dentários, etc. podem ser consideradas como ínicio da Medicina Regenerativa. No período da Revolução Científica, a substituição de dentes, com utilização de implantes dentários, encontrada em um crânio humano mostra a recuperação da função que foi perdida (MEYER, 2009).

Um grande marco na medicina regenerativa e reconstrutiva iniciou-se em torno da década de 50, com o transplante de órgãos, uma das primeiras formas de terapia celular. No início, o sucesso do transplante dependia apenas da habilidade do cirurgião, pois não se conhecia a importância da resposta imune do corpo. Apenas com o advento dos imunossupressores que o transplante cresceu consideravelmente (KEMP, 2006).

Com o avanço dessa tecnologia, o primeiro transplante de rim foi realizado em 1954; em 1963 realizou-se os primeiros transplantes de figado e pulmão; em 1966 realizouse o primeiro transplante de pâncreas e em 1967, o primeiro transplante de coração. Em 1968 ocorreu o primeiro transplante de células-tronco hematopoéticas, onde a inoculação dessas células no paciente permitiu a reconstituição da medula óssea. Esse rápido crescimento no transplante de orgãos permitiu o salvamento de inúmeras vidas, mas não foi possível atender grande parte dos pacientes, devido a grande demanda e a escassez de órgãos disponíveis (KEMP, 2006).

A regeneração de órgãos e tecidos ocorre dentro do reino animal, apresentando diferenças entre animais de espécies diferentes, como por exemplo entre mamíferos e anfibios. Essa disparidade também ocorre dentro do próprio corpo humano, como por exemplo, a diferença na capacidade de regeneração entre o figado e o rim. Essa característica sempre intrigou a comunidade científica (CHRIST et al., 2013). Então, impulsionados por essa curiosidade e pelo grande crescimento no número de transplantes de órgãos e a escassez destes, na década de 60, as pesquisas voltadas à culturas celulares e de tecidos cresceram muito, e, segundo Kemp (2006), buscou-se entender como ocorre o crescimento celular, a importância dos tipos celulares diferentes, as funções dos diferentes metabólitos, os sinais e comportamentos celulares. Devido a essas pesquisas, nos anos 90, iniciou-se o uso e

comercialização de enxertos de pele, sendo um marco na visão moderna da Engenharia de Tecidos (ORLANDO et al., 2011).

Além dos estudos voltados a regeneração do tecido epitelial, tem-se a construção de traqueia, que foi implantada com sucesso em pacientes; vasos sanguíneos, uretra, coração, figado, rim e pâncreas sintetizados utilizando a Engenharia de Tecidos (DAAR, 2013).

O termo engenharia de tecidos foi introduzido em 1985 pelo pesquisador YC Fung da Universidade da Califórnia em São Diego (KEMP, 2006). As definições de Engenharia de Tecidos variam e muitas vezes se confundem com a Medicina Regenerativa (KATARI; PELOSO; ORLANDO, 2015).

Engenharia de tecidos e medicina regenerativa são conceitos usados, frequentemente, sem distinção. Mas, muitos especialistas argumentam que estes dois termos representam campos de pesquisa diferentes e, portanto, seus conceitos semânticos são distintos. O termo engenharia de tecidos foi mencionado aproximadamente 15 anos antes que o termo medicina regenerativa, mas grande parte dos pesquisadores considera a engenharia de tecidos como um subcampo da medicina regenerativa (KATARI; PELOSO; ORLANDO, 2015).

Segundo Orlando et al. (2011), a medicina regenerativa envolve a regeneração de células, tecidos e órgãos humanos, tanto *in vivo*, quanto *ex vivo*. Para permitir a regeneração são utilizadas células, suportes, fatores de crescimento e manipulação de genes. E, para esses mesmos autores, engenharia de tecidos é um subcampo da medicina regenerativa, em que a produção de partes do corpo ocorre exclusivamente *ex vivo*, sendo realizada através da inoculação de células em suportes.

Para Daar e Greenwood (2007), a engenharia de tecidos faz parte da medicina regenerativa. Para os autores, a medicina regenerativa é tratada como um campo mais amplo, e a engenharia de tecidos utiliza a combinação de células, biomateriais e moléculas solúveis para estimular o crescimento celular e tecidual e a medicina regenerativa inclui esses fatores, mas também pode envolver engenharia genética e o transplante de células, sem necessariamente o uso de suportes.

De acordo com Katari, Peloso e Orlando (2015), os avanços tecnológicos mostram que essas duas categorias estão extremamente relacionadas e há uma tendência em combinar os termos e tratá-los como uma única atividade de pesquisa.

Mesmo com as diferentes interpretações dos conceitos de medicina regenerativa e engenharia de tecidos encontradas na literatura, para o presente trabalho, foram consideradas as definições fornecidas por Daar e Greenwood (2007) e Orlando et al. (2011), em que a

engenharia de tecidos tem como objetivo a combinação de células, biomateriais e moléculas solúveis para estimular o crescimento celular e tecidual *ex vivo*, possibilitando a regeneração de órgãos e tecidos lesionados, sendo uma das técnicas utilizadas no ramo da Medicina Regenerativa.

2.1.1 Células-tronco

A ideia de células-tronco existia pelo menos 90 anos antes de sua descoberta. Segundo Armstrong et al. (2012), a teoria da existência das células-tronco foi proposta por Haeckels em 1868, que idealizou a existência de uma "*stamzelle*", que seria uma célula não comprometida ou indiferenciada, responsável pela produção de diversos tipos celulares diferentes, para a regeneração das partes do corpo.

As evidências que comprovaram a teoria de Haeckel foram mostradas em 1963 com o artigo de Becker et al. (1963), mas os trabalhos envolvendo essa pesquisa iniciaram em 1961 com os pesquisadores James Till, físico de radiação e Ernest McCulloch, hematologista e especialista em leucemia. Os cientistas estavam pesquisando a sensibilidade das células normais da medula óssea de ratos versus células cancerígenas, quando submetidas à radiação, para avaliar como o campo da radioterapia poderia ser direcionado. Com o trabalho, perceberam que colônias celulares de eritróides e mielóides estavam sendo formadas nos baços dos hospedeiros irradiados e que essas colônias estavam surgindo de um único tipo celular, ou seja, um precursor comum estava formando tipos celulares diferentes. Com o conhecimento e tecnologia disponíveis na epóca, não foi possível isolar esse tipo celular para conhecer seu fenótipo (ARMSTRONG et al., 2012; WEISSMAN, 2014; BECKER et al., 1963).

Após a descoberta das células tronco adultas por Till e McCulloch na década de 60, os cientistas Martin Evans e Matthew Kaufman (1981), após inúmeras tentativas sem sucesso, descobriram as células-tronco embrionárias em ratos. Os cientistas descreveram a obtenção de cultura de tecidos de linhas celulares pluripotentes. Essas linhas celulares foram isoladas a partir de cultura *in vitro* de blastocisto de rato e com isso, os autores mostraram que essas células eram capazes de se diferenciar *in vitro* e *in vivo*, após inoculação em ratos.

É de se imaginar que as células-tronco embrionárias humanas foram descobertas logo após a comprovação das células-tronco embrionárias em ratos, mas isso não aconteceu. Apenas em 1998, com os experimentos de Thomson et al. (1998) comprovou-se a existência das células-tronco embrionárias humanas. Essa diferença no tempo de descoberta entre as células-tronco embrionárias de ratos e as embrionárias humanas ocorreu devido a problemas éticos envolvendo a pesquisa de embriões de espécie humana. Mas, testes com células-tronco embrionárias de primatas não humanos foram realizados *in vitro* e permitiram a compreensão da diferenciação de tecidos humanos, mesmo antes de serem testados (THOMSON et al., 1998).

Defini-se células-tronco como células indiferenciadas e não especializadas, que tem capacidade de autorrenovação e que, através da diferenciação, podem formar diferentes linhagens de células (ULLAH; SUBBARAO; RHO, 2015; WATT; HOGAN, 2000; BERNÁ et al., 2001).

Com as diversas descobertas obtidas nos últimos 50 anos, essas células foram categorizadas em células-tronco embrionárias, células-tronco adultas e células-tronco de pluripotência induzida (ULLAH; SUBBARAO; RHO, 2015).

As células-tronco embrionárias são isoladas da mórula embrionária ou da massa celular interna dos blastoscitos. São capazes de proliferação ilimitada *in vitro* e são pluripotentes, ou seja, possuem a capacidade de se diferenciar em tipos de células diversos, como células do endoderma, ectoderma ou mesoderma (THOMSON et al., 1998; MIYAGI, 2008; EVANS; KAUFMAN, 1981).

Já as células-tronco adultas podem ser encontradas em alguns tecidos, como medula óssea, sangue, retina do olho, cérebro, figado, pele, placenta e cordão umbilical. Acreditavase estas células tinham a capacidade de formar apenas células do mesmo tecido, mas sabese que seu potencial de diferenciação é muito maior (MIYAGI, 2008).

As células-tronco de pluripotência induzida foram produzidas em laboratório, em 2006, pelos cientistas Shynia Yamanaka e Kazutoshi Takahashi. Os pesquisadores reprogramaram células diferenciadas para se comportar como células-tronco embrionárias. Neste estudo, os autores examinaram se determinados fatores de transcrição poderiam induzir a característica de pluripotência em células somáticas. Ao combinar alguns fatores de transcrição, eles foram capazes de gerar células pluripotentes a partir de embrião do rato e de culturas de fibroblastos de ratos adultos (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

O uso das células-tronco embrionárias envolve várias questões éticas e políticas, que dificultam sua utilização. Com isso, as células-tronco adultas passaram a ser mais utilizadas e muito se tem estudado sobre o potencial de utilização das células-tronco de pluripotência induzida, mas sua estabilidade genômica ainda é questionável (ARMSTRONG et al., 2012; ULLAH; SUBBARAO; RHO, 2015).

Dentro do grupo das células-tronco adultas, tem-se um tipo celular muito importante, que são as células-tronco mesenquimais. Estas são isoladas do indivíduo adulto e sua principal fonte é a medula óssea. Os primeiros experimentos envolvendo esse tipo celular iniciaram na década de 60, juntamente com os experimentos envolvendo as células-tronco hematopoéticas (JONES; YANG, 2011; ARMSTRONG et al., 2012; ULLAH; SUBBARAO; RHO, 2015).

As células-tronco hematopoéticas podem também ser encontradas na medula óssea e são responsáveis pela formação das células sanguíneas (JONES; YANG, 2011).

Já as células-tronco mesenquimais, dentre as adultas, são muito interessantes, pois podem se diferenciar em adipócitos (células gordurosas), condrócitos (células de cartilagem), osteoblastos (células ósseas), miócitos (células musculares) e hepatócitos (células do figado) (PARREIRA; RESENDE, 2013; ULLAH; SUBBARAO; RHO, 2015).

Esse grande interesse nas células-tronco mesenquimais se deve a sua maior disponibilidade, pois pode ser encontrada na medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical, líquido amniótico, placenta, endométrio, dentes, glândula salivar, sangue mestrual, pele e prepúcio, etc (ULLAH; SUBBARAO; RHO, 2015; ARMSTRONG et al., 2012). Além disso, muitos estudos já foram realizados com essas células, permitindo sua fácil obtenção, além de não envolver questões éticas.

Esse tipo celular é considerado uma fonte promissora para o tratamento de doenças degenerativas, inflamatórias e autoimunes. Vários estudos vêm sendo realizados, testando o comportamento das células-tronco no tratamento dessas doenças em animais. Dentre as doenças que vem sendo estudadas, tem-se esclerose lateral amiotrófica, Parkinson, Alzheimer, artrite reumatóide, diabetes tipo 1 e doenças cardiovasculares (ULLAH; SUBBARAO; RHO, 2015).

Essas células são relevantes para engenharia de tecidos, pois sua capacidade de diferenciação permite a formação de diversos tecidos do corpo, se inoculadas em suportes adequados, que reproduzam o meio extracelular.

2.1.1.1 Matriz Extracelular

A transmissão de sinais e a diferenciação celulares são determinadas pela ligação das células à sua vizinhança. Essa vizinhança é chamada de matriz extracelular. Com essa

ligação, define-se o formato celular, mantendo sua função e a integridade do tecido (RUOSLAHTI; PIERSCHBACHER, 1987).

Além da ligação à matriz extracelular, as células também podem se aderir entre si, onde essas ligações ocorrem por diferentes mecanismos (RUOSLAHTI; PIERSCHBACHER, 1987).

A matriz extracelular é fundamental para o meio celular, pois é responsável pela adesão celular ao substrato, interação célula-célula, recebimento e emissão de sinais moleculares, migração e proliferação celular (ARAÚJO, 2008). Com isso, para entender o mecanismo de interação célula-matriz extracelular, é preciso definir do que essa matriz é composta. Segundo os autores Borges (2006) e Rebelo et al. (2016) a matriz extracelular é formada principalmente por colágeno, elastina, proteoglicanos e glicoproteínas e a distribuição destes componentes na matriz varia de tecido para tecido, determinando suas características fisiológicas.

Além das proteínas presentes na matriz, os processos de adesão nas interações célula-célula e célula-matriz também envolvem a participação de receptores específicos, como caderinas, selectinas, superfamília de receptores de imunoglobulinas e integrinas (HAUBNER; FINSINGER; KESSLER, 1997).

As integrinas realizam a ligação entre as proteínas da matriz e as células e são caracterizadas como proteínas transmembranas, podendo ser encontradas no citoplasma ou ao longo da superfície da célula (DYCE et al., 2002).

Algumas integrinas realizam a ligação da célula à proteína fibronectina, glicoproteína encontrada na matriz extracelular. Essa glicoproteína, interage através das integrinas com fibroblastos (componente celular), sendo estes atuantes na proliferação celular (FUJIMURA et al., 2007). Com isso, a presença de fibronectina em suportes, mimetizaria a matriz extracelular e permitiria a adesão e proliferação celular.

Uma das limitações da fibronectina é o aumento do risco de infecções, já que a fibronectina é isolada de microorganismos e purificada. Uma alternativa a esse problema, é a utilização do tripeptídeo RGD (sequência arginina-glicina-ácido aspártico), identificado como a sequência mínima presente na fibronectina, que leva à adesão celular e não apresenta as desvantagens da fibronectina (HERSEL; DAHEMEN; KESSLER, 2003).

2.1.2 Suportes

Suportes desempenham um papel essencial em engenharia de tecidos, direcionando as células ao crescimento celular e à produção de matriz extracelular e outras moléculas biológicas, permitindo a formação dos tecidos e órgãos. Para que esses suportes permitam a formação dos tecidos e órgãos, alguns pré-requisitos precisam ser atendidos, sendo estes muito complexos e não completamente entendidos e estudados. Esses substratos devem ser biocompatíveis, porosos e permeáveis, permitindo a entrada de células e nutrientes, devem possuir propriedades mecânicas que reproduzam o ambiente tecidual e propriedades de superfície que permitam a adesão celular. Atendendo a esses aspectos, os suportes permitem a adesão, crescimento, migração e diferenciação celular (WANG et al., 2016).

Segundo Dhandayuthapani et al. (2011), as características físico-químicas que os suportes utilizados em engenharia de tecidos devem possuir são:

- Geometria externa: a manutenção de tecidos porosos, altamente interligados, de elevada densidade superficial proporciona uma relação área/volume extremamente elevada, favorecendo a adesão e proliferação das células. A estrutura dos suportes de macro para a nano escala tem aumentado consideravelmente, pois mimetizam a matriz extracelular, tanto geometricamente quanto topologicamente.

- Porosidade e tamanho dos poros: os suportes devem possuir uma estrutura porosa e interligada. Essa estrutura porosa aumenta a relação área/volume e, com isso, permite o crescimento celular, a distribuição uniforme das células, a neovascularização, etc. O tamanho dos poros é um parâmetro importante para o crescimento celular, pois poros muito pequenos bloqueiam a penetração celular, impedindo a produção da matriz extracelular e a neovascularização das áreas internas do suporte. Os parâmetros que podem ser controlados/medidos para manter a porosidade adequada são tamanho médio e distribuição de tamanho dos poros, volume, interconectividade e formato destes.

 Propriedades de superficie: estas propriedades incluem as características químicas e topográficas dos suportes. A superficie dos suportes é o ponto inicial de contato com as células e o desenvolvimento da maioria das células depende de sua ancoragem (sua ligação com o meio), por isso, um suporte que favoreça a adesão celular é extremamente necessário. Dependendo dos materiais utilizados é preciso modificar sua superfície para permitir a adesão celular. Com isso, técnicas de modificação estão sendo amplamente utilizadas. Essa modificação pode ser realizada através de ligação covalente de biomoléculas aos suportes, ou ainda essas biomoléculas podem ser adsorvidas eletrostaticamente ou automontadas sob a superfície do biomaterial. As biomoléculas que normalmente são utilizadas para modificação da superfície dos materiais são: colágeno, fibronectina, peptídeo RGD e fatores de crescimento.

- Taxa de degradação: os suportes não biodegradáveis devem ser biologicamente estáveis e permanentes ao longo do tempo, sendo que a situação ideal seria o suporte se manter estável durante toda a vida do paciente. Já para os polímeros biodegradáveis, a degradação dos suportes pode ocorrer por processos químicos, físicos, ou ainda, biológicos, devido a ação de agentes, como as enzimas. Os materiais biodegradáveis se degradam gradualmente e, com isso, vão sendo substituídos pelos novos tecidos formados. Essa degradação é dependente da estrutura química, da presença de ligações hidroliticamente instáveis, do nível de hidrofilicidade e hidrofobicidade, da morfologia cristalina ou amorfa, da temperatura de transição vítrea (Tg), da proporção do copolímero e da massa molar. A degradação dos biomateriais poliméricos ocorre por meio de clivagem hidrolítica ou enzimática das ligações do polímero.

- Propriedades mecânicas: a estabilidade dos suportes depende de fatores como força, elasticidade, absorção na interface do material e degradação química. Os biomateriais devem suportar temporariamente as cargas e tensões do tecido que está sendo formado. Os parâmetros que são medidos, para se avaliar se o suporte será ou não adequado, são: módulo elástico, módulo flexural, resistência à tração, tensão máxima, etc.

- Biocompatibilidade e aderência interfacial: biocompatibilidade se refere a capacidade do material em desempenhar sua função, sem provocar efeitos indesejáveis no paciente. Para se determinar a biocompatibilidade de um material é importante observar suas características químicas, sua estrutura e morfologia, sendo estas afetadas pela síntese, processo e esterilização do material. Algumas modificações de superfície são utilizadas para otimizar a biocompatibilidade dos materiais.

Os biomateriais empregados como suportes para engenharia de tecidos podem ser classificados como permanentes ou temporários. Os materiais permanentes substituem os tecidos lesionados por tempo indeterminado. Já os suportes temporários preenchem temporariamente a região, para direcionar o processo regenerativo (SANTOS; WADA, 2007). Vert et al. (1992) classificou esses materiais temporários como biodegradáveis, bioreabsorvíveis, bioabsorvíveis e bioerodíveis. Para os autores, os materiais e dispositivos biodegradáveis se decompõem devido a sua degradação macromolecular em dispersão *in vivo*, mas não são eliminados do organismo. Essa degradação pode ser realizada por agentes

biológicos, gerando fragmentos ou subprodutos que podem se distanciar do local do implante, mas não necessariamente são eliminados do corpo. Os materiais e dispositivos biorreabsorvíveis sofrem degradação em toda sua estrutura simultaneamente e são absorvidos *in vivo*. Esses materiais são eliminados naturalmente pelo organismo, sem efeitos residuais. Os materiais e dispositivos bioerodíveis são materiais que sofrem degradação da sua superfície, e não de toda estrutura de maneira simultânea como ocorre nos bioreabsorvíveis, e depois são reabsorvidos. Bioerosão é um conceito que também se refere a eliminação total do material inicial e dos subprodutos formados, sem gerar efeitos residuais. Os materiais e dispositivos bioabsorvíveis são dissolvidos nos fluidos do corpo, sem ocorrer clivagem da cadeia polimérica ou diminuição da massa molar. Um material bioabsorvível pode ser considerado bioreabsorvível se as macromoléculas dispersas no corpo forem totalmente excretadas.

Os tipos de suportes que vem sendo estudados são formados por materiais como metais, cerâmicas, polímeros naturais e sintéticos.

Dentro do grupo dos metais, os materiais mais utilizados em implantes incluem os aços inoxidáveis, ligas de titânio e ligas de magnésio, que são materiais bionertes, não interagindo com os tecidos e não levando a uma resposta imunológica do paciente devido a presença de corpo estranho. Esses materiais bioinertes, ao entrarem em contato com o corpo, são envolvidos por um tecido fibroso que os isolam do meio, não havendo interação com os tecidos e células, podendo causar problemas de coagulação sanguínea e infecção bacteriana. Além disso, muitos dos biomateriais metálicos, como aços inoxidáveis, têm limitações devido a sua não biodegradabilidade, atuando como dispositivos permanentes, com uma vida útil de 10 a 20 anos (WANG, 2016). As ligas de magnésio são biomateriais metálicos biodegradáveis, mas apesar dessa característica de biodegradabilidade e de sua nãotoxicidade, pode levar ao acúmulo de substâncias danosas no corpo. Isso acontece, pois sua taxa de degradação in vivo é extremamente rápida. Para resolver esses problemas relacionados a falta de interação célula-suporte, coagulação, infecção bacteriana, taxa de degradação acelerada das ligas de magnésio, etc., modificações nas superfícies dos implantes podem ser realizadas (WANG, 2016). Além da modificação química da superfície, estudos envolvendo a produção de metais biodegradáveis vem crescendo consideravelmente. Como metais biodegradáveis têm-se as ligas de ferro e magnésio e pesquisas estão sendo conduzidas visando a modificação da taxa de degradação dessas ligas, através da alteração da sua composição química e microestrutura (HOU et al., 2016).

Além dos biomateriais metálicos, as cerâmicas também são utilizadas na produção de suportes. Dentre os materiais cerâmicos utilizados tem-se as cerâmicas inertes como alumina, zircônia, nitretos de silício e carbono; as semi-inertes e bioativas como certas cerâmicas de vidro e hidroxiapatita densa; e, como reabsorvíveis tem-se fosfato de cálcio, de alumínio, gesso de Paris, hidroxiapatita e fosfato tricálcico. Os biomateriais cerâmicos apesar da boa compatibilidade, resistência à corrosão e resistência a compressão, possuem algumas desvantagens, como fragilidade, baixa resistência a fratura, falta de resiliência, biocompatibilidade e biodegradabilidade muitas vezes insuficientes. Para superar esses impasses, blendas e compósitos destes materiais com polímeros sintéticos e naturais podem ser preparados e sintetizados (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011).

Os biomateriais poliméricos são bastante versáteis, pois suas estruturas podem ser adequadas, visando atingir as propriedades necessárias para cada tipo de suporte. Dentro do grupo de polímeros, tem-se os naturais e sintéticos.

Segundo Armentano et al. (2010), os polímeros sintéticos têm a geometria, propriedades mecânicas e taxa de degradação facilmente modificáveis, mas possuem algumas desvantagens como baixa sinalização e interação com as células. Já os polímeros naturais têm interação celular, permitindo a adesão com as células, mas possuem propriedades mecânicas inferiores, além de elevado custo.

Dentre os sintéticos, os mais empregados são os poli(α -hidróxi ácidos), representantes de uma classe de poliésteres alifáticos sintéticos, os quais podemos citar o poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-*co*-ácido glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e seus copolímeros (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005; TAJBAKHSH; HAJIAL, 2017). Outros polímeros que vem sendo estudados como matéria-prima para aplicação biomédica são os polihidroxialcanoatos, sendo estes, poliésteres produzidos por microorganismos (SANTOS; WADA, 2007; TAJBAKHSH; HAJIAL, 2017).

Hou et al. (2016) definiram as principais características dos polímeros sintéticos. Segundo os autores, o PGA é considerado um dos primeiros polímeros sintéticos biodegradáveis estudado para aplicações biomédicas, sendo altamente cristalino, hidrofílico, com estrutura linear alifática, alto ponto de fusão e baixa solubilidade em solventes orgânicos. Pode ser copolimerizado com outros monômeros para reduzir sua rigidez. Sua degradação ocorre principalmente por erosão em massa. O PLA também é um poliéster de cadeia alifática, mais hidrofóbico, mais amorfo e mais solúvel que o PGA devido a presença de um grupo metil extra em sua estrutura química. Tem-se três diferentes formas desse polímero, mas a mais utilizada é o poli(L-ácido láctico) (PLLA). O PLA é bastante estudado para aplicações cardiovasculares e em sistemas de liberação de fármacos. Já o poli(Ecaprolactona) (PCL) é um poliéster alifático semi-cristalino. A degradação do PCL ocorre por cisão hidrolítica aleatória de seus grupos éster e, também, por degradação enzimática. Este polímero pode ser utilizado na produção de blendas e copolímeros, para melhorar suas propriedades mecânicas e físicas, biocompatibilidade e taxa de degradação. O poli(hidroxibutirato) (PHB) é um poliéster alifático termoplástico e cristalino, que faz parte da família dos Polihidroxialcanoatos, sendo produzido por microorganismos, com a função de reserva energética. O PHB e seus copolímeros podem ser degradados enzimaticamente e são muito utilizados como suportes em engenharia de tecidos por serem biodegradáveis e biocompatíveis. O ácido hidroxibutírico pode ser copolimerizado com o ácido 3hidroxivalérico, formando o poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBHV). PHB e seus copolímeros são utilizados em dispositivos biomédicos como placas para ossos, suturas, pinos ortopédicos e suportes de medula óssea. Normalmente, PHB e seus copolímeros sofrem erosão superficial por clivagem hidrolítica das ligações éster, levando à uma grande redução da massa molar antes de qualquer perda de massa do material (HOU et al., 2016).

Dentre os polímeros naturais, temos os polissacarídeos e as proteínas. Os polissacarídeos mais usados em engenharia de tecidos são glicosaminoglicanos, celulose, quitina, quitosana, amido, alginato e ácido hialurônico. Já as proteínas mais usadas são colágeno, elastina, queratina, miosina, actina, gelatina, etc. (ARMENTANO et al., 2010; CHEN; USHIDA; TATEISHI, 2002; DHANDAYUTHAPANI et al., 2011).

Com isso, há diversos materiais disponíveis para aplicação em engenharia de tecidos e sua utilização dependerá das características desejadas do suporte.

Além dos tipos de materiais e seus compósitos e blendas, a geometria do material também interfere na interação suporte-célula, na adesão, proliferação e diferenciação celular.

Os tecidos no corpo estão organizados em estruturas tridimensionais, portanto para substituir órgãos e tecidos, os suportes devem ser estruturados para facilitar a distribuição celular e guiar a regeneração em três dimensões (ARMENTANO et al., 2010).

Os modelos de suporte devem ser escolhidos de maneira que promovam uma distribuição uniforme das células sobre o material, permitam o crescimento celular e a difusão de nutrientes. Dentro dessas características, os modelos mais utilizados incluem malhas, fibras, esponjas e espumas. Para a fabricação desses suportes, as técnicas são escolhidas de acordo com a estrutura e propriedades de superfície do material que será

utilizado (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011). Algumas técnicas incluem evaporação do solvente e lixiviação das partículas, liofilização, litografia suave, espuma de gás, impressão tridimensional, eletrofiação, secagem por congelamento em emulsão, prototipagem rápida e separação de fases induzida termicamente (ARMENTANO et al., 2010; REBELO et al., 2016; CHEN; USHIDA; TATEISHI, 2002).

Os suportes porosos como espumas ou esponjas são utilizados para crescimento de tecidos, ossos e vascularização de órgãos. Os poros desse tipo de suporte simulam a arquitetura da matriz extracelular, criando um microambiente 3D, em que as células entram, permitindo a interação célula-célula. As estruturas das esponjas e espumas são mais estáveis que as malhas. O tamanho dos poros ideais varia de acordo com o tecido onde estas células estão localizadas, com isso, os suportes porosos podem ser fabricados com tamanho de poro, porosidade, cristalinidade e relação área/volume específicos. O tamanho dos poros é um parâmetro crítico pois pode influenciar a capacidade celular de preencher os espaços 3D dos poros, influenciando na interação entre as células. Como método para fabricação desses suportes porosos tem-se a evaporação do solvente e lixiviação de partículas e a eletrofiação (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011; KNIGHT; PRZYBORSKI, 2015).

Os suportes fibrosos são formados por fibras que possuem tamanho variando de nanômetros para micrometros. A eletrofiação, separação de fases e a automontagem ("selfassembly") são métodos utilizados para a produção das fibras, sendo o método de eletrofiação o mais estudado (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011; KNIGHT; PRZYBORSKI, 2015). As fibras eletrofiadas possuem diâmetros pequenos, grande área superficial e propriedades mecânicas superiores (ARMENTANO et al., 2010). A alta relação área/volume, combinada com a estrutura formada por poros favorece a adesão, proliferação e diferenciação celular (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011). Diversos estudos reportaram a capacidade das fibras em promover a adesão e proliferação celular, assim como permitir a produção de componentes da matriz extracelular de tecidos como a pele, vasos sanguíneos, cartilagem, músculos, nervos e ossos (ARMENTANO et al., 2010). Grande parte das fibras poliméricas não possuem grupos funcionais específicos para permitir a adesão celular, e por isso, estas podem ser modificadas superficialmente com ligantes e proteínas adesivas, (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011) ou modificadas pela produção de blendas e nanocompósitos. A produção de nanocompósitos formados por fibras e partículas permite a proliferação e diferenciação celular e tem grande potencial em engenharia de tecidos (ARMENTANO et al., 2010).

Os hidrogéis também podem ser utilizados em engenharia de tecidos, para a recuperação e cicatrização de feridas na cartilagem, regeneração óssea e liberação de fármacos. Eles são biocompatíveis, com taxa de degradação controlada e interação celular, podem possuir variações de um lote para outro para um mesmo material e possuem propriedades mecânicas limitadas (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011). O microambiente criado pelos hidrogéis mimetiza a matriz extracelular e pode ser modificado através da incorporação de moléculas biológicas ativas. Além disso, alguns tipos celulares só podem ser cultivados por períodos de tempo curtos devido à problemas relacionados a difusão de nutrientes através do hidrogel (KNIGHT; PRZYBORSKI, 2015).

Os suportes baseados em microesferas possuem uma matriz polimérica usada para encapsulação e liberação de fármacos a uma taxa controlada em um período de tempo (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011).

Como é possível perceber, para permitir o crescimento celular, a composição química, a geometria e a forma do material são determinantes para o sucesso da aplicação. Alguns materiais utilizados para a produção do suporte precisam ser modificados para melhorar suas propriedades mecânicas, biocompatibilidade, adesão celular, etc. Os materiais nanoestruturados permitem a mimetização da matriz extracelular, sendo esta composta por biomoléculas na escala nano e as células interagem com essas biomoléculas. Com isso, materiais com dimensões em escala nanométrica como nanopartículas, nanotubos, nanofibras, e outros dispositivos com dimensões inferiores a 500 nm podem mimetizar a natureza do sistema biológico, garantindo o crescimento celular e a regeneração dos tecidos (LIMONGI et al., 2017). Portanto, a adição de nanopartículas aos suportes é uma alternativa para aumentar a interação celular, permitindo o crescimento e diferenciação celular e ampliando a gama de produtos utilizados em engenharia de tecidos.

2.1.2.1 Nanopartículas em Engenharia de Tecidos

As nanopartículas (NPs) em engenharia de tecidos podem ser incorporadas ao substrato com a função de melhorar as propriedades desses suportes, como biocompatibilidade, propriedades mecânicas, bioatividade, pulsos elétricos, interação, proliferação e adesão celular (SHARMA; SHREIBER; MOGHE, 2008; PETER et al., 2010; ROOHANI- ESFAHANI et al., 2011; BAEI et al., 2016; VERGNOL et al., 2016; TAJBAKHSH; HAJIALIB, 2017).

As NPs têm como vantagens a grande área superficial e a capacidade de se ligar, transportar e absorver biomoléculas tais como proteínas, fármacos, células e genes. As características físico-químicas dessas partículas determinam sua reatividade e propriedades de superfície, influenciando as interações biológicas e toxicidade nas células. Com o objetivo de se direcionar ligações específicas com as células, melhorando as propriedades das partículas, biomoléculas podem ser conjugadas à essas partículas, via grupos funcionais de superfície (JAYARAMAN et al., 2015).

O tipo de material utilizado na síntese das nanopartículas vai determinar a sua função no substrato, podendo ser formadas por metais, cerâmicas, polímeros naturais e sintéticos.

Alguns trabalhos sobre adição de nanopartículas metálicas envolvem materiais como ouro, prata e ferro. Baei et al. (2016) incorporaram nanopartículas de ouro em uma matriz de quitosana a fim de fornecer pulsos elétricos. Esse substrato permitiu a migração e proliferação de células-tronco mesenquimais. Na matriz com as nanopartículas de ouro dispersas foi possível observar um aumento na diferenciação cardiomiogênica das células-tronco sem efeitos adversos nas propriedades físico-químicas do material, quando comparada com a matriz sem a adição de nanopartículas. Blaeser et al. (2016) incorporaram nanopartículas de ouro e de ferro em uma matriz de alginato. No substrato composto por nanopartículas de ferro em uma matriz de alginato houve aumento da proliferação e viabilidade celular quando comparados com os substratos de matriz de alginato com nanopartículas de ouro e com o controle (poliestireno para cultura de tecidos). Lee et al. (2016) prepararam fibras por eletrofiação coaxial compostas por gelatina e poliuretano e incorporaram nanopartículas de prata nesse material. A presença das nanopartículas mostrou excelente atividade bactericida, o que pode prevenir infecções após aplicação dos implantes.

As nanopartículas mais utilizadas, dentro do grupo das cerâmicas, são formadas por materiais como hidroxiapatita (HA), fosfatos de cálcio e vidro bioativo (BG), em particular o Bioglass®, sendo utilizadas como cargas bioativas em nanocompósitos (TAJBAKHSH; HAJIALIB, 2017). Vergnol et al. (2016) investigaram a possibilidade de utilização do compósito formado por uma matriz de poli(L-*co*-D, L ácido láctico) PDLLA e partículas de Bioglass® para aplicação em dispositivos de fixação óssea. A adição dessas partículas inorgânicas aumentou a taxa de degradação do compósito quando comparado com a matriz polimérica. Os testes *in vivo* desse material mostraram que a presença do Bioglass® acelerou a osteointegração óssea, especialmente no primeiro mês de implantação. Dumont et al.

(2016) sintetizaram um biocompósito formado por uma matriz de quitosana com nanopartículas de hidroxiapatita. Os testes realizados mostraram a não citotoxicidade do material e viabilidade celular. Já os testes de diferenciação osteogênica mostraram que os compósitos são osteoindutores para células estaminais mesenquimais. A incorporação de partículas de fosfato de cálcio em matriz de poli(ácido láctico) (PLA) aumentou o módulo de compressão e a viabilidade celular, quando comparados com a matriz de PLA pura. Além disso, permitiu uma maior interação entre material e tecido ósseo (TAJBAKHSH; HAJIALIB, 2017).

Nanopartículas também podem ser formadas por polímeros naturais ou sintéticos. Dentro do grupo dos polímeros sintéticos tem-se PGA, PLA, PCL e seus copolímeros (JAYARAMAN et al., 2015), enquanto que para os polímeros naturais tem-se albumina, gelatina, colágeno, quitosana, etc. Azimi et al. (2016) desenvolveram um sistema polimérico combinando propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas pela síntese de nanopartículas de gelatina contendo albumina de soro bovino e posterior incorporação em uma matriz de PCL. Esse sistema polimérico pode ser utilizado em suturas, em liberação controlada de fármacos ou como suporte bioativo para engenharia de tecidos. Com a presença das nanopartículas, a taxa de degradação das fibras de PCL foi favorecida, sem afetar suas propriedades térmicas. Kaffashi, Davoodi e Oliaei (2016) sintetizaram nanopartículas de PLA contendo Triclosan (TC) (agente bactericida) e incorporaram-nas em uma matriz de PCL. A presença das nanopartículas de PLA desacelerou a liberação de TC da matriz de PCL, aumentou a hidrofilicidade e o módulo elástico do material e estendeu a propriedade antibacteriana das amostras em até 2 anos, quando comparadas com a matriz de PCL pura. Além disso, a taxa de proliferação de células de fibroblastos aumentou proporcionalmente à concentração de nanopartículas na matriz. Com isso, esse sistema pode ser utilizado para regeneração de tecido conjuntivo. Karri et al. (2016) prepararam uma matriz de colágeno-alginato impregnada com nanopartículas de quitosana contendo curcumina (agente anti-inflamatório e antioxidante). Esse substrato híbrido apresentou boa biocompatibilidade e melhor captação de água. Além disso, os testes de regeneração de feridas realizados *in vivo* mostraram que as feridas tratadas com o substrato híbrido se recuperaram mais rapidamente que as feridas do grupo de controle.

A vantagem dos polímeros sintéticos com relação aos outros materiais reside no fato de ser possível adaptar suas propriedades mecânicas e sua taxa de degradação. Além
disso, é possível preparar materiais com a geometria e superfície química desejada, proporcionando um ambiente favorável ao crescimento celular (JAYARAMAN et al., 2015).

Dentro do grupo dos polímeros, o PHBHV, pertencente a classe dos Polihidroxialcanoatos vem despertando grande interesse devido as suas características de biodegradabilidade e biocompatibilidade. Além disso, materiais formados por PHBHV podem ter sua superfície modificada quimicamente levando ao aumento da adesão, proliferação e diferenciação celular. Esse polímero vem sendo bastante utilizado em engenharia de tecidos na forma de fibras para suporte de células, mas não na forma de nanopartículas com superfície modificada, o que pode ser promissor no processo de adesão, proliferação e diferenciação celular.

2.1.2.2 Síntese e estabilização de nanopartículas poliméricas

Para a síntese desses sistemas coloidais compostos por partículas finas, podem ser utilizadas duas vias, conforme Kuroiwa et al. (2015), sendo elas:

- Abordagem descendente (*"top down"*): as partículas são formadas através de técnicas mecânicas envolvendo alta quantidade de energia. As forças utilizadas na quebra das partículas maiores são compressão, cisalhamento e impacto. Essas emulsões podem ser obtidas utilizando dispositivos de homogeneização, como misturador de alta velocidade, homogeneizador de alta pressão, dispositivos ultrassônicos e microfluidização. Para essa abordagem são necessárias pequenas quantidades de surfactante e a composição final do sistema é definida desde o começo do processo. Como exemplos de métodos que utilizam a abordagem descendente tem-se a emulsificação e atomização.

- Abordagem ascendente (*"bottom-up"*): esse processo envolve a condensação de moléculas ou monômeros em fase líquida ou sólida, através de processos químicos ou físicos. Esse sistema é estável termodinamicamente, requerendo altas concentrações de surfactante e, muitas vezes, cosurfactante. Dentro da abordagem ascendente, para a formação de partículas, pode-se citar a precipitação e polimerização.

Dentro da abordagem descendente, tem-se como principais métodos para a síntese de nanopartículas a partir de polímeros pré-formados, a emulsão-evaporação do solvente, emulsão-difusão do solvente e nanoprecipitação.

O método de emulsão-evaporação do solvente pode ser realizado, principalmente, a partir de emulsão simples óleo em água (o/a) ou múltipla água em óleo em água (a/o/a). A

emulsão do tipo óleo/água (o/a) envolve a dissolução do polímero e do princípio ativo em um solvente orgânico volátil, como diclorometano, clorofórmio e acetona. Uma fase aquosa contendo um tensoativo do tipo óleo/água também é preparada. Submetem-se essas soluções à emulsificação e, em seguida, o solvente orgânico é submetido à evaporação (ESSA; RABANEL; HILDGEN, 2011; LEMOS-SENNA et al., 1998). Na dupla emulsão do tipo a/o/a, a fase aquosa contém o emulsificante e o princípio ativo e é adicionada a uma fase orgânica. Essa fase orgânica contém um solvente parcialmente miscível em água e um polímero. Essa primeira emulsão a/o formada é emulsionada em um maior volume de água, contendo um emulsificante. Após isso, o solvente é submetido à evaporação (PACHECO et al., 2015).

O método de emulsão-difusão envolve primeiramente a preparação de uma emulsão óleo/água, contendo um solvente parcialmente miscível em água, o polímero e o princípio ativo. Essa fase é adicionada a uma dispersão aquosa de um tensoativo ou outro estabilizante, sob agitação constante. Após a emulsificação da solução orgânica em água, um excesso de água é adicionado induzindo a difusão do solvente orgânico para a fase contínua. As partículas formadas podem ser recuperadas por filtração (SOUGUIR et al., 2013).

Na nanoprecipitação, o polímero e o princípio ativo são dissolvidos em um solvente orgânico polar, como etanol e acetona. Depois, essa solução é adicionada à uma solução não solvente do soluto e miscível com o solvente orgânico, como a água, contendo um agente estabilizante. Após a adição da fase orgânica à fase aquosa, as partículas são formadas com evaporação do solvente orgânico sob pressão reduzida. Nucleação, crescimento e agregação são os estágios pelos quais as partículas são formadas (BADRI et al., 2017).

Yukuyama et al. (2016) descreveram os principais equipamentos utilizados na abordagem descendente. Segundo os autores, os equipamentos de sonicação ou ultrassom são os dispositivos mais amplamente utilizados em escala laboratorial. A sonicação é baseada na cavitação. Durante o processo ocorre uma sucessão de compressões e depressões mecânicas que levam à implosão das gotas. Esse colapso fornece energia suficiente para aumentar a área interfacial das gotas. A diminuição do tamanho das gotas não é proporcional a energia fornecida pelo ultrassom e nem ao tempo utilizado no processo, uma vez que o limite ótimo seja atingido. Em métodos que utilizam esse equipamento, a formação das gotículas está relacionada com a quantidade de surfactante adicionada ao sistema. Nos dispositivos de homogeneização de alta pressão, as gotas são afetadas por cisalhamento, colisão e força de cavitação. Este equipamento é aplicado em meios de média a baixa viscosidade. Já nos misturadores de alta velocidade, os rotores são utilizados para dividir as gotas maiores em gotas menores. Nesse processo é difícil a obtenção de gotas em escala nanométrica. Estes aparelhos podem ser utilizados em métodos combinados com o homogeneizador de alta pressão ou método de autodifusão, para formar partículas em escala nanométrica.

Para a aplicação dessas dispersões poliméricas, tanto no campo de engenharia de tecidos, como em indústrias alimentícias ou farmacêuticas, é necessário que possuam estabilidade coloidal.

Kuroiwa et al. (2015) definiram estabilidade coloidal como sendo determinada pelo equilíbrio das forças repulsivas e as atrativas de *Van Der Waals* e esse equilíbrio acontece quando as partículas se aproximam devido ao movimento Browniano. Para que as dispersões permaneçam estáveis, as forças repulsivas devem ser maiores que as atrativas. Ainda segundo os autores, a desestabilização dessas dispersões pode ocorrer devido a fenômenos como alteração do pH, força iônica, tratamento térmico, etc e como mecanismos de desestabilização das dispersões, tem-se:

- Dissolução ou crescimento das partículas: depende da concentração do material, de sua solubilidade e difusão.

- Maturação de *Ostwald*: difusão das pequenas gotas da emulsão para as gotas maiores. Isto acontece devido a diferença de solubilidade e dos potenciais químicos entre partículas que possuem tamanhos diferentes.

- Coalescência: fusão de uma ou mais gotas que levam a formação de uma gota maior, podendo com o tempo levar a separação de fases.

- Floculação: duas ou mais gotas se aproximam para formar um agregado, mas cada uma mantendo sua integridade física.

- *Creaming*: refere-se à separação das gotas da fase dispersa, devido a ação da gravidade. As gotas se concentram em uma camada na superfície da fase dispersa, devido a sua menor densidade. Para a sedimentação, as gotas se concentram na base do líquido devido a sua maior densidade.

- Inversão de fases: ocorre quando um sistema óleo/água é convertido para água/óleo e vice-versa.

- Coalescência Parcial: ocorre quando um cristal de uma gota parcialmente cristalina penetra na parte líquida de outra gota parcialmente cristalina, formando um agregado com formato irregular.

A estabilização das dispersões pode ocorrer através da estabilização estérica ou eletrostática. Na estabilização estérica, surfactantes não iônicos ou polímeros podem ser adicionados ao sistema coloidal para serem adsorvidos na superfície da partícula, prevenindo a agregação. Já a estabilização eletrostática ocorre através da repulsão entre partículas carregadas igualmente, superando as forças de *Van der Waals*. Um sistema que possui esses dois mecanismos para estabilização das partículas é chamado eletroestérico (KUROIWA et al., 2015).

Surfactantes podem ser adicionados às dispersões para fornecer a estabilização estérica e/ou eletrostática. Essas moléculas permitem a estabilização das emulsões pois reduzem a tensão interfacial entre a fase polar e a apolar. A quantidade de surfactante requerida para o processo é um fator importante sendo sua concentração responsável pelo aumento ou redução no tamanho das partículas (KATHE; HENRIKSEN; CHAUHAN, 2014).

Surfactantes são moléculas anfifilicas com grupos lipofilicos e hidrofilicos (CARDELLINI et al., 2016), podendo ser não-iônicos, aniônicos, catiônicos e zwitteriónicos (WOLF; FELDMANN, 2015). Os iônicos estabilizam as emulsões eletrostaticamente, enquanto os não-iônicos estabilizam através de repulsão estérica. Para que os surfactantes sejam eficientes, devem adsorver rapidamente na superfície das partículas formadas durante a etapa de homogeneização. Em uma emulsão óleo/água, durante a homogeneização, a parte polar desta molécula se orienta em direção a água e a parte apolar se orienta em direção a superfície da partícula (KUROIWA et al., 2015).

Além do surfactante, outros parâmetros precisam ser ajustados para se obter as propriedades físico-químicas desejadas.

No método de emulsão-evaporação do solvente, a concentração do polímero utilizado no meio altera o tamanho das partículas formadas, pois quanto maior a concentração, maior a viscosidade da solução e, consequentemente, maior o diâmetro hidrodinâmico obtido. Além do polímero, os solventes utilizados durante o processo interferem na morfologia e topografia das partículas. A taxa de evaporação do solvente orgânico utilizado tem grande influência na rugosidade da superfície do material. A relação surfactante/polímero e a velocidade de agitação do equipamento utilizado nesse método também afetam nas propriedades e características das dispersões (PACHECO et al., 2015).

Como pode ser observado, diversos parâmetros interferem nas características e propriedades das partículas, e por isso, devem ser estudados para se obter as propriedades ideais para determinada aplicação.

2.1.2.3 Polihidroxialcanoatos

O polímero utilizado nesse trabalho é um Polihidroxialcanoato (PHA).

Os PHAs (poliésteres de ácidos hidroxi-alcanóicos) são polímeros bacterianos biodegradáveis, possuindo a função de reserva energética (YU, 2001).

A estrutura química da unidade monomérica do PHA está representada na figura 1.

Figura 1- Estrutura dos polihidroxialcanoatos



Fonte: Arquivo Pessoal

As diferentes unidades monoméricas dos polímeros e copolímeros são originadas dos tipos de grupo lateral R e o valor de n. O grupo lateral R pode ser formado por um átomo de hidrogênio até 13 átomos de carbono, podendo conter insaturações, ligações com halogênio e grupos aromáticos (MADISON; HUISMAN, 1999).

A primeira unidade monomérica hidroxialcanoato foi determinada por Lemoigne (1926) e foi identificada como poli(3-hidroxibutirato) (PHB). A estrutura do PHB é mostrada na figura 2.

Figura 2 - Estrutura do poli(3-hidroxibutirato) (PHB)



Fonte: Arquivo Pessoal

O ácido hidroxibutírico é frequentemente copolimerizado com ácido hidroxivalérico, formando o copolímero poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato). A estrutura do PHBHV é mostrada na Figura 3.





Fonte: Arquivo Pessoal

Os PHAs vem sendo utilizados em engenharia de tecidos para preparação de substratos na forma de fibras, filmes, membranas, micropartículas, microgrânulos, tubos, etc (SHISHATSKAYA et al., 2016).

Os substratos para engenharia de tecidos preparados a partir dos PHAs facilitam a proliferação de vários tipos celulares, incluindo fibroblastos, condrócitos, neurônios e células tronco. Estudos sugerem que os PHAs são ainda mais eficientes que substratos formados por ácido poliláticos, pois os resultados mostraram que os fibroblastos e queratinócitos crescem mais em substratos compostos por PHAs (SHISHATSKAYA et al., 2016).

Os PHAs mais estudados e utilizados são o poli(3-hidroxibutirato) (PHB) e o poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) (PHBHV) (SQUIO; ARAGÃO, 2004).

O PHBHV é um polímero biodegradável e biocompatível e sua aplicação em engenharia de tecidos pode ocorrer na forma de espumas (LIU et al., 2010), hidrogéis (NAIR et al. 2015), micropartículas (ZHU; WANG; TONG, 2009), fibras (SUNDARAMURTHI et al., 2014), etc.

Diversos trabalhos envolvendo fibras de PHBHV já foram realizados, mostrando a eficiência desse polímero em engenharia de tecidos. Em particular, Zou et al. (2016) mostraram que substratos de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3hidroxivalerato) (PHBHV) preparados por eletrofiação promovem o crescimento de células-tronco mesenquimais, podendo ser aplicados em engenharia de tecidos para a formação de cartilagem. Fibras eletrofiadas de PHBHV também podem ser utilizadas como um substituto da pele, para tratar queimaduras de terceiro grau, úlceras traumáticas e ferimentos causados por diabetes (SUNDARAMURTHI et al., 2014). Wang et al. (2016) prepararam nanofibras por eletrofiação coaxial para obtenção de substratos formados por compósitos de

PHBHV/proteínas. As proteínas testadas foram colágeno, queratina e gelatina. Todos os substratos preparados apresentaram excelente citocompatibilidade, principalmente o substrato formado por nanofibras compostas por PHBHV/colágeno.

O PHBHV também pode ser utilizado na forma de espumas, conforme trabalho de Liu et al. (2010). Os pesquisadores avaliaram a capacidade do PHBHV como suporte para formação de cartilagem, através do cultivo de células condrogênicas pré-diferenciadas. Esse estudo mostrou que os suportes de PHBHV/células são efetivos para regeneração de cartilagem.

Além das fibras e espumas, o PHBHV também pode ser utilizado na área de engenharia de tecidos na forma de hidrogéis e de microesferas. Nair et al. (2015) sintetizaram um hidrogel composto por quitosana e PHBHV e incorporaram nanopartículas de sulfato de condroitina nessa matriz. Esse suporte possui propriedades mecânicas, adesão celular e viabilidade para ser utilizado em regeneração de disco intervertebral. Zhu, Wang e Tong (2007) sintetizaram microesferas de PHBHV, através do método de emulsão-evaporação do solvente, para serem utilizadas como suporte em Engenharia de tecidos, permitindo o crescimento das células do figado. A proliferação celular sob o substrato de microesferas foi duas vezes maior que o substrato formado por filmes do polímero, confirmando que as microesferas de PHBHV são suportes adequados para engenharia de tecidos.

Devido às características de biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades físico-químicas superiores como permeabilidade ao oxigênio, o PHBHV é utilizando em Engenharia de Tecidos, principalmente na forma de fibras (SUNDARAMURTHI et al., 2014). A utilização do PHBHV na forma de nanopartículas incorporadas à substratos para crescimento celular é promissora e seu potencial ainda é pouco investigado.

O PHBHV, como foi visto, pode ser utilizado como suporte para engenharia de tecidos, mas algumas propriedades, como adesão celular, podem ser melhoradas através de estratégias de funcionalização. Esse polímero, por ser um poliéster alifático, não fornece um ambiente favorável para adesão celular, quando comparado com a matriz extracelular natural, devido à falta de reconhecimento biológico pelas células e a hidrofobicidade, pois não expõe grupos funcionais para adesão de moléculas biológicas. As estratégias de funcionalização de suportes incluem moléculas bioativas como proteínas e ligantes de matriz (ARMENTANO et al., 2010).

Com isso, a incorporação de nanopartículas de PHBHV, com sua superficie modificada quimicamente, em substratos para Engenharia de Tecidos, pode criar um ambiente favorável para a adesão e proliferação celular mantendo as características de biodegradabilidade e de biocompatibilidade do PHBHV.

2.1.2.4 Modificação química da superfície de nanopartículas para aplicação em Engenharia de Tecidos

A modificação química da superfície de nanopartículas para engenharia de tecidos permite a alteração das características do material, levando ao aumento da adesão, proliferação e diferenciação celular. Os principais fatores envolvendo o uso de nanopartículas em Engenharia de Tecidos estão relacionados com o tamanho das nanopartículas utilizadas e a concentração de oligopeptídeos em sua superfície (SHARMA; SHREIBER; MOGHE, 2008).

Entre os oligopeptídeos que podem ser incorporados a essas nanopartículas, podemos citar o RGD, que é uma sequência dos aminoácidos arginina, glicina e ácido aspártico (Arg-Gly-Asp) (SANTOS; WADA, 2007). A estrutura do RGD está descrita na figura 4.

Figura 4 - Fórmula estrutural da sequência RGD



Fonte: Balacheva et al. (2012)

O RGD foi identificado como a sequência mínima presente na fibronectina, composto presente na matriz extracelular, que leva à adesão celular, e com isso, sua incorporação no sistema particulado aumenta a capacidade de mimetização dessa matriz (HERSEL; DAHEMEN; KESSLER, 2003).

Sharma, Shreiber e Moghe (2008) adsorveram nanopartículas de albumina funcionalizadas com fibronectina sob substrato de vidro e demostraram que a variação no tamanho das nanopartículas levou a uma alteração no processo de adesão celular. Para nanopartículas de maior tamanho (100 nm e 125 nm), obteve-se maior adesão celular e melhor organização do citoesqueleto, se comparadas com nanopartículas de tamanhos menores (30 nm e 50 nm). Além do tamanho, os autores também observaram que a concentração de fibronectina na superficie das nanopartículas influencia o processo de adesão celular.

Uma maneira de se realizar a modificação da superfície de nanopartículas com oligopeptídeos consiste no uso de agentes de acoplamento. Agentes de acoplamento promovem a adesão de materiais às moléculas biológicas, sendo os mais utilizados, os aminosilanos (VANSANT; VAN DER VOORT; VRANCKEN, 1995; GONG; GRAINER, 2007).

O grupo amino dos aminosilanos é responsável por sua alta reatividade. Esse grupo amino pode ser ligado covalentemente com carboxilas presentes em moléculas bioativas, como colágeno, por exemplo. Já a ligação do silano com a superfície do suporte ocorre por meio de uma reação de condensação, envolvendo o grupo silanol do aminosilano e grupos presentes na superfície do material polimérico (RIAU et al., 2015).

Como exemplo envolvendo a adesão de oligopeptídeos à nanopartículas utilizando agentes de acoplamento, pode-se citar o trabalho de El-Ghannam et al. (2004). Os pesquisadores mostraram que o RGD pode ser acoplado a uma superfície de sílica através de um agente de acoplamento, conservando as atividades biológicas das células. O agente de acoplamento utilizado foi o 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES). Essa alteração na superfície da sílica aumentou significativamente a adesão celular, o espalhamento, a sinalização de integrina e a melhor organização do citoesqueleto.

Com isso, através da utilização de agentes de acoplamentos, como aminosilanos, as nanopartículas de PHBHV, preparadas neste projeto, podem ser modificadas, permitindo sua aplicação em engenharia de tecidos, podendo aumentar a adesão, proliferação e diferenciação celular e mantendo suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Sintetizar nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) modificadas pelos aminosilanos 3-aminopropiltrimetoxisilano e 3aminopropiltrietoxisilano, visando aplicação em engenharia de tecidos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito dos parâmetros de processo na síntese de nanopartículas de poli(3hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) no diâmetro hidrodinâmico das partículas, no índice de polidispersidade e na estabilidade coloidal das dispersões poliméricas;

- Avaliar a modificação química da superfície das nanopartículas de poli(3hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) pelo 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS);

- Avaliar a modificação química da superfície das nanopartículas de poli(3hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) pelo 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES);

- Avaliar a influência da massa molar do poli(3-hidroxibutirato-co-3hidroxivalerato) no grau de enxertia dos silanos na superfície das partículas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

PHBHV (M_n = 121KDa, gentilmente doado pela PHBISA, contendo 9,8% de HV), clorofórmio (CHCl₃, 99,8%, P.A., Synth), dodecil sulfato de sódio (SDS), diclorometano (DCM, 99,5%, P.A, Synth), dibultil dilaurato de estanho (DBTB, 95%, Sigma-Aldrich), etileno glicol (99,8%, Sigma-Aldrich), éter etílico (98%, P.A, Synth), n-hexano (98,5%, P.A., Synth), dietilenoglicol dimetil éter (diglima, 99,5%, Sigma-Aldrich), etanol (99,5%, P.A., Synth), hidróxido de amônio (27%, P.A., Synth), ácido acético (99,7%, P.A., Synth), 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES, 98%, Sigma-Aldrich) e 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS, 97%, Sigma-Aldrich).

PHBHV foi purificado conforme segue: 50 g do material foram submetidas à agitação em 1 L de água deionizada a 1500 rpm por 2 h. O material foi então filtrado e lavado com 500 mL de éter etílico gelado. Por fim, o PHBHV foi seco a 30 °C por 8 h. Os outros reagentes foram utilizados como recebidos. Água destilada e deionizada foi utilizada durante todo o desenvolvimento do trabalho.

4.2 Métodos

4.2.1 Redução da massa molar do poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) (PHBHV)

A redução da massa molar do PHBHV ($M_n = 121$ kDa, D= 1,90) foi realizada via reação de transesterificação com excesso de etileno glicol, catalisada por dibutil dilaurato de estanho, de acordo com metodologia adaptada do trabalho de Abdelwahab et al. (2012). A rota sintética para a redução da massa molar do PHBHV está representada no esquema 1.

Esquema 1 - Rota sintética da redução da massa molar do PHBHV por transesterificação usando etileno glicol



Fonte: Arquivo Pessoal

Primeiramente, 10 g de PHBHV ($M_n = 121$ kDa, D= 1,90) juntamente com 150 mL de diglima foram adicionados a um balão de fundo redondo, equipado com agitador magnético e condensador de refluxo.

Após solubilização completa do PHBHV em diglima a 140 °C, estabilizou-se a temperatura da reação em 120 °C. Em paralelo, preparou-se uma solução de 0,1 g de dibutil dilaurato de estanho em 10 mL de diglima. Essa solução, juntamente com 20 mL de etileno glicol foram adicionados ao reator. Após o tempo de reação de 3 h, o sistema foi imerso em banho de água, a temperatura ambiente. Em seguida, a solução polimérica foi colocada em água gelada. O recipiente foi mantido refrigerado até separação das fases e o polímero foi recuperado por filtração sob vácuo. O material recuperado foi seco em estufa à vácuo por 48 h. O polímero seco foi dissolvido em diclorometano (5%) e purificado via precipitação em hexano gelado (1:10).

4.2.2 Síntese das nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) via método de emulsão-evaporação do solvente

A síntese de nanopartículas foi realizada conforme metodologia adaptada de Leimann et al. (2013). Para as sínteses foram utilizados dois copolímeros a base de hidroxibutirato e hidroxivalerato (PHBHV), com diferentes massas molares: poli(3hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) ($M_n = 121$ kDa, D = 1,90) e poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) dihidroxilado ($M_n = 22$ kDa, D = 1,47) (produto obtido na etapa de redução da massa molar via transesterificação com etileno glicol). Duas soluções foram preparadas. Primeiramente, uma fase orgânica foi preparada pela dissolução de 0,3 g do polímero PHBHV em 6 mL de clorofórmio e uma fase aquosa foi preparada pela dissolução de dodecil sulfato de sódio (SDS) em 24 mL de água deionizada.

À fase aquosa foi adicionada a fase orgânica usando uma bomba dosadora, a uma taxa de 0,4 mL/min, sob agitação magnética, por 60 min. Em seguida, a dispersão foi submetida à homogeneização a 6000 rpm, durante 30 min em equipamento Ultra-Turrax, IKA T18.

A dispersão, então, foi colocada em banho de gelo e submetida a sonicação por 180s no equipamento Sonics Vibra Cell, equipado com sonda de $\frac{1}{2}$ ", a 70% de amplitude, com pulsos de 30 s e intervalo de 10 s entre os pulsos.

A emulsão resultante foi transferida a um balão de fundo redondo de 250 mL e a remoção do clorofórmio foi realizada a 51°C durante 3 h sob agitação magnética.

As formulações utilizadas nas sínteses de nanopartículas de PHBHV estão apresentadas na Tabela 1.

Exp	PHBHV* (g)	Água (mL)	CHCl3 (mL)	SDS (g)	A (min)	B (min)	C (rpm)	D (%)	E (min)
1	0,3	24	6	0,072	60	-	-	70	3
2	0,3	24	6	0,072	60	30	6000	70	3
3	0,3	24	6	1,600	60	30	6000	70	3
4	0,3	24	6	0,072	30	30	6000	70	3
5	0,3	24	6	0,072	60	30	6000	30	3
6	0,3	24	6	0,072	60	30	6000	70	6

Tabela 1 - Formulações utilizadas nas sínteses de nanopartículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D=1,90) pelo método de emulsão-evaporação do solvente

*PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90); A- Tempo de agitação com agitador magnético; B - Tempo de homogeneização com equipamento Ultra-Turrax®; C - Velocidade de homogeneização com equipamento Ultra-Turrax®; D - Amplitude de sonicação no equipamento de ultrassom; E - Tempo de sonicação no equipamento de ultrassom.

Fonte: Arquivo Pessoal

4.2.3 Modificação química da superfície das nanopartículas de PHBHV com aminosilanos

A superfície das nanopartículas de PHBHV foi modificada usando os aminosilanos 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) e 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES), obtendo-se as nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)-APTMS e poli(3hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)-APTES, respectivamente, conforme representado nos esquemas 2 e 3 e de acordo com metodologia adaptada de Xu, Liu e Finch (1997), como segue: 1,3 mL de APTMS/APTES foi adicionado a 5,2 mL de água deionizada e essa solução foi mantida em agitação durante 10 min e depois foi adicionada a um balão contendo 25 mL da dispersão de nanopartículas, a um pH de 10,5. A suspensão foi então aquecida a 50°C por 3 h, sob atmosfera de nitrogênio e agitação magnética. Em seguida, a suspensão foi resfriada e centrifugada, a 26000 rpm, em uma centrífuga Allegra 64R, por 1 h. O sobrenadante foi retirado e as partículas foram lavadas duas vezes com água e duas vezes com etanol, e centrifugadas após cada lavagem, para remoção do excesso de aminosilano, removendo-se também o surfactante adicionado na etapa de síntese das nanopartículas. Após estas sucessivas etapas de lavagem, as partículas foram redispersas em água em presença de surfactante dodecil sulfato de sódio. O volume de água e quantidade de surfactante foram os mesmos utilizados na suspensão original.

Esquema 2 – Reação de modificação da superfície das nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) (PHBHV) com o silano 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS)



Fonte: Arquivo Pessoal

Esquema 3 – Reação de modificação da superfície de nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) (PHBHV) com o silano 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES)



Fonte: Arquivo Pessoal

4.3 Caracterizações

4.3.1 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

A avaliação do diâmetro hidrodinâmico e a distribuição de tamanho das partículas de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato), das partículas de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato)-APTMS e das partículas de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato)-APTES foram realizados diluindo as suspensões em água (Ultrapura) e utilizando a técnica

de espalhamento de luz dinâmico (DSL) em um analisador de partículas ZetaSizer Nano ZSda MALVERN Instruments® (LabPol/EEL/USP) à 25°C. As medidas foram realizadas em triplicata. Antes da coleta da alíquota para posterior análise no equipamento, as dispersões foram agitadas em ultrassom de banho por 5min.

4.3.2 Espalhamento de Luz Eletroforético (ELS)

A densidade de cargas na superfície das partículas de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3hidroxivalerato), das partículas de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato)-APTMS e das partículas de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato)-APTES foi medida utilizando a técnica de espalhamento de luz eletroforético em equipamento ZetaSizer Nano ZS - da MALVERN Instruments® (LabPol/EEL/USP). As amostras foram preparadas diluindo a suspensão em água (Ultrapura) 50 vezes. As medidas foram realizadas em triplicata.

4.3.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros do infravermelho foram obtidos por meio de Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

A composição química do poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato), do polímero poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) dihidroxilado, das partículas de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato)-APTMS e de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato)-APTES foi avaliada qualitativamente por espectroscopia de infravermelho (FTIR). Utilizou-se 1-2 mg de amostra que foram embutidas em pastilhas contendo de 100-200 mg de KBr. As amostras foram analisadas em um espectrômetro de infravermelho da marca Shimadzu®, modelo IR Prestige-21, localizado no Departamento de Biotecnologia da EEL-USP (DEBIQ-EEL/USP).

4.3.4 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H)

A estrutura química do poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato), do polímero poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) dihidroxilado, das partículas de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato)-APTMS e de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato)-APTES foi avaliada por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

(RMN¹H). As análises de RMN¹H foram realizadas em espectrofotômetro Varian Mercury (Laboratório de Espectrometria – DEQUI/EEL-USP) operando com frequência de 300 MHz. Para essas caracterizações, 10 mg de amostra purificada e seca foram solubilizadas em 1 mL de solução de clorofórmio deuterado (CDCl₃, 99,8%, Sigma-Aldrich).

4.3.5 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A massa molar e a dispersidade (Đ) dos polímeros poli(3-hidroxibutirato-co-3e poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) dihidroxilado hidroxivalerato) foi determinada por cromatografia de permeação em gel (GPC). Utilizou-se um cromatógrafo da marca Waters, incluindo uma bomba isocrática Waters 1515, injetor automático Waters 717 Plus, detector de índice de refração Waters 2414 (Laboratório de Polímeros, LOQ -EEL-USP). As amostras foram dissolvidas em clorofórmio, na concentração de 10 mg/mL, filtradas em filtro de membrana de PVDF modificada (0,45 µm) e depois injetadas no As análises foram realizadas empregando colunas Phenogel, marca equipamento. Phenomenex de 500, 10³ e 10⁴ Å. Clorofórmio grau HPLC foi utilizado como eluente numa vazão de 1mL/min, e a temperatura interna das colunas foi mantida a 30 °C. A curva de calibração foi construída utilizando padrões de poliestireno.

4.3.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises térmicas do poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato), do polímero poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) dihidroxilado, das partículas de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato)-APTMS e poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato)-APTES foram conduzidas em um calorímetro da marca TA Instruments®, modelo Q20 (LabPol-EEL/USP), calibrado com padrões de Índio (In). As amostras (5-8 mg) foram inseridas em porta amostra hermético de alumínio, aquecidas de 40 a 180°C, a 10°C.min⁻¹, para remover seu histórico térmico e analisadas nas seguintes condições: taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹, faixa de temperatura entre -60 e 230 °C, fluxo de nitrogênio a 50 mL.min⁻¹. O resfriamento foi feito com adição de nitrogênio líquido, com a auxílio de um "*Quench cooler*".

Dos termogramas de DSC, além das temperaturas de transição e entalpias, também foi possível obter o grau de cristalinidade do poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato), do poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) dihidroxilado, e das partículas de poli(3-

hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato)-APTMS e de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato)-APTES, conforme equação 1.

$$X_{PHBHV} = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_{100-PHBHV}} \ x \ 100 \qquad (1)$$

Onde ΔH_m se refere a entalpia de fusão do pico com maior temperatura e intensidade (T_{m2}) e $\Delta H_{100-PHBHV}$ se refere a entalpia do PHBHV 100% cristalino (109 J/g) (DAGNON et al., 2009).

4.3.7 Microscopia de Força Atômica (AFM)

As propriedades morfológicas e topográficas e o diâmetro das partículas de poli(3hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato), de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato)-APTMS e de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato)-APTES foram obtidos por Microscopia de Força Atômica (AFM) em um microscópio de força atômica da Park Systems XE7 (LabPol – EEL/USP) com uma taxa de scan de 1Hz. O modelo do *cantilever* utilizado para as análises foi o PPP-NCHR 5M. O modo de análise utilizado foi não-contato. O processamento e análises das imagens obtidas por AFM foram realizadas em software *Gwyddion*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Redução da massa molar do PHBHV via transesterificação com etileno glicol

A redução da massa molar do PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90) via transesterificação com etileno glicol, catalisada por dibutil dilaurato de estanho foi realizada visando obter o polímero poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) dihidroxilado (PHBHV-diol). Esse PHBHV-diol possui suas extremidades funcionalizadas com hidroxilas, enquanto o PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90) possui uma hidroxila terminal e uma carboxila terminal. Com essa funcionalização do PHBHV-diol, uma maior quantidade de grupos hidroxilas estariam disponíveis na superfície das nanopartículas para realização da reação de condensação com os aminosilanos.

Com isso, o PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90) e o PHBHV-diol foram caracterizados utilizando-se as técnicas de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H), Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

5.1.1 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

As massas molares do PHBHV de partida e do PHBHV obtido como produto da reação de transesterificação com etileno glicol (PHBHV-diol) foram obtidas pela técnica de Cromatografia de Permeação em Gel, conforme Tabela 2. Os cromatogramas de GPC do PHBHV e do PHBHV-diol encontram-se na Figura 5.

Tabela 2 - Massas molares do PHBHV de partida e do PHBHV obtido como produto das reações de transesterificação com etileno glicol, obtidas pela técnica de Cromatografia de Permeação em Gel

PHBHV	M _w (KDa)	M _n (KDa)	Ð
PHBHV de partida	229,518	120,891	1,899
PHBHV (3h de reação)	33,136	22,494	1,470

Fonte: Arquivo Pessoal

Figura 5 - Cromatogramas de GPC do PHBHV de partida e do PHBHV obtido pela reação de transesterificação com etileno glicol (PHBHV-diol)



Fonte: Arquivo Pessoal

Como esperado, a reação de transesterificação com etileno glicol provocou a redução da massa molar do polímero. Essa redução significativa da massa molar do polímero, após 3h de reação, foi de 81,4%, permitindo uma avaliação da influência da massa molar no diâmetro hidrodinâmico das partículas sintetizadas pelo método de emulsão-evaporação do solvente.

5.1.2 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H)

A estrutura química do PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90) e do PHBHV obtido pela reação de transesterificação ($M_n = 22$ KDa, D= 1,47) foi avaliada utilizando a técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H). Com a avaliação da estrutura química foi possível confirmar a obtenção do PHBHV-diol, que foi obtido após 3h de reação de transesterificação com etileno glicol.

Os espectros do PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D = 1,90) e do PHBHV-diol ($M_n = 22$ KDa, D = 1,47) encontram-se nas figuras 6a e 6b, respectivamente.



Figura 6 - Espectros de RMN ¹H do PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90) e do PHBHV-diol ($M_n = 22$ KDa, D= 1,47)

(a) PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D = 1,90) e (b) PHBHV-diol ($M_n = 22$ KDa, D = 1,47) Fonte: Arquivo Pessoal

Pelo espectro de RMN ¹H da figura 6a foi possível verificar os deslocamentos característicos do PHBHV, onde tem-se: em 0,9 ppm sinal referente aos grupos CH₃ do grupo valerato; em 1,27 ppm tem-se o sinal referente ao CH₃ do grupo butirato; em 1,61 ppm tem o sinal referente ao CH₂ do grupo valerato; em 2,4-2,7 ppm sinais referentes ao CH₂; e, por fim, em 5,2 ppm sinal referente ao CH.

Com relação ao espectro do PHBHV-diol (Figura 6b), foi possível identificar os grupos característicos do PHBHV e, também, confirmar a presença dos grupos hidroxilas terminais, devido ao aparecimento de sinal em 3,72-3,82 ppm, característico do grupo CH_2 do etileno glicol (OCH_2CH_2OH) e aparecimento de sinal em 4,0-4,25ppm referente aos grupos CH_2 do etileno glicol (OCH_2CH_2OH).

Também foi possível avaliar a quantidade da unidade ácido hidroxivalérico no polímero, sendo de 8,9% para o PHBHV de maior massa molar, e de 10,1% para o PHBHVdiol, que possuir menor massa molar.

Com isso, a estrutura química do PHBHV obtido pela reação de transesterificação se refere ao PHBHV dihidroxilado.

5.1.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A estrutura química do PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90) e do PHBHV obtido pela reação de transesterificação (PHBHV-diol) também foi avaliada utilizando a técnica de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

Os espectros do PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D = 1,90) e do PHBHV-diol ($M_n = 22$ KDa, D = 1,47) encontram-se na Figura 7.

Figura 7 - Espectro de FTIR do poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) e do poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) dihidroxilado



(a) PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90) e (b) PHBHV-diol ($M_n = 22$ KDa, D= 1,47) Fonte: Arquivo Pessoal

Pela Figura 7, foi possível observar as bandas referentes aos estiramentos vibracionais dos grupos C-H em 2975cm⁻¹ e 2745cm⁻¹. Em 3440 cm⁻¹, observou-se deformação axial de OH. Em 1724cm⁻¹, foi possível observar uma banda forte que corresponde a deformação axial do grupo éster C=O. Em 1380cm⁻¹ tem-se a banda correspondente à deformação assimétrica da ligação C-H do grupo metil. Em 1132cm⁻¹, tem-se a banda característica dos estiramentos simétricos e assimétricos do grupo C-O-C. Já em 1050cm⁻¹ e 979 cm⁻¹ tem-se a banda que representa as deformações axiais das ligações C-O e C-C, respectivamente. (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006; MONTORO, 2005)

Através das análises por FTIR foi possível observar que não houve alteração na estrutura química do PHBHV, conforme esperado.

5.1.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D = 1,90) e o PHBHV-diol foram submetidos a técnica de Calorimetria Exploratória Diferencial com o objetivo de se verificar o comportamento térmico do material devido a inclusão das hidroxilas terminais e, principalmente, devido a redução da massa molar.

Os termogramas mostrados na Figura 8 e os dados apresentados na Tabela 3 se referem ao segundo aquecimento.

Figura 8 - Termogramas de DSC do poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) e do poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) dihidroxilado



(a) PHBHV ($M_n = 121$ kDa, D= 1,90) e (b) PHBHV-diol ($M_n = 22$ kDa, D= 1,47) Fonte: Arquivo Pessoal

Polímero	Tg (°C)	T_{m1} (°C)	T _{m2} (°C)	Tcc (°C)	ΔH_{m1}	ΔH_{m2}	Cristalinidade (%)
PHBHV*	1,00	144,72	163,66	62,76	2,85	39,71	36,4
PHBHV- diol**	-0,76	140,75	159,34	61,79	4,45	45,41	41,7

Tabela 3 - Valores das temperaturas de transição, entalpia de fusão e grau de cristalinidade do poli(3hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) e do poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) dihidroxilado obtidos por DSC

* $(M_n = 121$ kDa, D= 1,90); ** $(M_n = 22$ kDa, D= 1,47) Fonte: Arguivo Pessoal

Fonte: Arquivo Pessoal

Foi possível notar que, tanto o PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D = 1,90) quanto o PHBHVdiol apresentaram eventos endotérmicos com transição de segunda ordem, referente a transição vítrea do material (T_g), determinados pela variação de Cp. A diferença entre os valores de T_g para o PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D = 1,90) e o PHBHV-diol não foi significativa, sendo de apenas 0,24°C.

Também foi possível observar picos referentes a eventos de primeira ordem, sendo um exotérmico, referente a cristalização e dois endotérmicos, referentes a fusão do material.

A inserção das hidroxilas terminais na cadeia do PHBHV levou a uma alteração nos valores das temperaturas de fusão cristalina. Os dois picos de fusão localizados em 144,72 e 163,66°C para o PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D = 1,90) e 140,75°C e 159,34°C para o PHBHV-diol se referem ao processo de fusão-recristalização-refusão (LIU et al., 2009). Conforme Liu et al. (2009) geralmente o ponto de fusão com maior temperatura (T_{m2}) é utilizado como o ponto de fusão do copolímero. Foi possível perceber uma diminuição da T_m do PHBHV-diol, quando comparado com a T_m do PHBHV ($M_n = 121$ kDa, D = 1,90), na ordem de 4,32°C. Esse fenômeno de redução da T_m com a inserção de hidroxilas terminais e diminuição da massa molar também foi observado por Liu et al. (2012), mas para os autores a redução da temperatura de fusão foi mais significativa que a evidenciada no presente trabalho. Isso pode ter acontecido, pois as diferenças das massas molares dos polímeros utilizados pelos autores foram muito maiores que a diferença do PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D = 1,90) e PHBHV-diol ($M_n = 22$ KDa, D = 1,47), afetando diretamente na quantidade de hidroxilas terminais presentes no material. De acordo com os autores, a redução nos valores de T_m foi consequência da redução na perfeição dos cristais do PHBHV (diol.

Além das diferenças nos valores obtidos para as T_m , no termograma do PHBHVdiol, o primeiro pico de fusão ficou mais evidente, quando comparado com o PHBHV ($M_n = 121$ kDa, D= 1,90), como pode ser observado pela Figura 9 e pelo valor da entalpia de fusão (ΔH_{m1}) da Tabela 3, que se relaciona com o valor da área do pico. Esse resultado também foi obtido por Liu et al. (2012). Os autores concluíram que isso ocorreu, pois, o PHBHV-diol possui maior concentração de grupos terminais hidroxila. Essa alta concentração de grupos terminais hidroxila levaria a uma formação de estruturas lamelares secundárias, diminuindo a perfeição dos cristais.

Analisando o grau de cristalinidade do material, foi possível perceber que após diminuição da massa molar do PHBHV e a introdução dos grupos hidroxilas terminais, a cristalinidade do material aumentou. Com o aumento da cristalinidade do material e diminuição da T_m , pode-se inferir que apesar do aumento da densidade de cristais, evidenciado pelo aumento da cristalinidade, ocorreu uma diminuição na perfeição dos cristais, conforme observado pela diminuição do valor da T_m e pelo aumento da intensidade do pico referente a T_{m1} (DAGNON et al., 2009).

5.2 Síntese de nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) e poli(3hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) dihidroxilado

Para a síntese de nanopartículas, avaliou-se a influência dos parâmetros do processo de emulsão-evaporação do solvente no diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade e estabilidade coloidal das dispersões.

A partir desse estudo foram selecionados dois diâmetros hidrodinâmicos diferentes, tanto para as partículas de PHBHV quanto para as partículas de PHBHV-diol. Com as nanopartículas selecionadas, de diâmetros hidrodinâmicos e massas molares diferentes, realizou-se a modificação química da superfície desses materiais com os aminosilanos.

5.2.1 Estudo do efeito dos parâmetros de processo na síntese de nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) e estabilidade coloidal das dispersões obtidas

Estudou-se o efeito dos parâmetros do processo de síntese de nanopartículas de PHBHV no diâmetro hidrodinâmico das partículas, índice de polidispersidade e na estabilidade coloidal das dispersões.

Os parâmetros de processo variados foram, a concentração do surfactante, velocidade e tempo de homogeneização no agitador Ultra-Turrax, tempo de agitação com agitador magnético, e o tempo e amplitude de sonicação no ultrassom. Com esse estudo, verificou-se os parâmetros de processo que mais influenciam no diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersidade, e também, serviu de base para a síntese de nanopartículas de PHBHV-diol.

A Tabela 1 apresenta as formulações utilizadas para a síntese das nanopartículas de PHBHV via método de emulsão-evaporação do solvente e a Tabela 4 apresenta a média e o desvio padrão dos resultados dos diferentes produtos obtidos utilizando os mesmos parâmetros de processo e mesmas quantidades de reagentes (n=2). As medições de cada um desses produtos foram realizadas em triplicatas.

Tabela 4 – Resultados obtidos no estudo do efeito dos parâmetros do processo de síntese de nanopartículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90)

Experimento	D _h ±DP* (nm)	PDI**±DP*	pH±DP*
1	113,60±1,41	0,126±0,004	2,76±0,18
2	125,20±3,96	0,119±0,019	3,64±0,43
3	90,01±7,68	0,171±0,033	6,78±0,04
4	$118,95\pm 3,04$	0,126±0,002	3,37±0,04
5	138,15±6,29	0,196±0,029	3,18±0,21
6	$110,75\pm 3,89$	$0,128\pm0,002$	$2,89\pm0,04$

^{*}DP se refere ao desvio padrão calculado a partir dos diferentes produtos que foram obtidos utilizando os mesmos parâmetros de processo de síntese (n=2); **PDI= índice de polidispersidade. Fonte: Arquivo Pessoal

Os resultados de espalhamento de luz apresentados na Tabela 4 mostraram que o aumento da concentração de surfactante levou à diminuição do D_h das partículas, como esperado. Essa diminuição no diâmetro hidrodinâmico causada pelo aumento da concentração do surfactante foi de 28%.

A formulação 2 difere da formulação 1, devido a inclusão da etapa de homogeneização com agitador Ultra-Turrax®, ao processo de síntese das nanopartículas. Com a inclusão da etapa de homogeneização, utilizando-se tempo de 30 minutos e velocidade de 6000 rpm, foi observado um aumento de 10% no diâmetro hidrodinâmico das partículas.

Reduzindo-se o tempo de agitação magnética de 60 minutos (Formulação 2) para 30 minutos (Formulação 4), verificou-se uma diminuição de apenas 5% no diâmetro da partícula. Portanto, o tempo de agitação com o agitador magnético não influenciou significativamente o tamanho das partículas de PHBHV.

Uma diminuição na amplitude do ultrassom de 70% (Formulação 2) para 30% (Formulação 5), resultou no aumento do diâmetro das partículas na ordem de 10% e o aumento do tempo de sonicação de 3 minutos (Formulação 2) para 6 minutos (Formulação 6) provocou uma redução do tamanho das partículas de 11,5%. Esse aumento do diâmetro hidrodinâmico com a diminuição da amplitude e do tempo foi obtido também por Colmán (2008), na síntese de poliestireno, via polimerização em miniemulsão. O sistema utilizado por Colmán (2008) não foi o mesmo do utilizado no presente trabalho, mas, de um modo geral, a emulsificação de líquidos utilizando surfactantes via ultrassom, apresenta esta tendência de aumento do diâmetro das partículas com a diminuição da amplitude e/ou tempo pode não mais levar a uma redução significativa do diâmetro das nanopartículas, devido ao aumento nas frequências de colisão e a baixa velocidade de adsorção do surfactante, dificultando a estabilização das partículas nessa situação (JAFARI; HE; BHANDARI, 2007). Essa diminuição do diâmetro hidrodinâmico, devido ao aumento da amplitude e tempo no ultrassom, está relacionada com o fenômeno da cavitação.

Cavitação está relacionada a formação de cavidades preenchidas com gás e vapor quando a pressão estática diminui e o colapso dessas cavidades, quando a pressão estática aumenta novamente (FREUDIG; TESCH; SCHUBERT, 2003). O colapso dessas bolhas, quando próximo a uma superfície sólida produz jatos de alta velocidade, os quais são os responsáveis pela diminuição do tamanho das partículas por cisalhamento, alisamento e escavação da superfície dessas partículas (RONCHI, 2014). Conforme mostrado por Tsai, Bai e Chen (2008), esse fenômeno de cavitação está relacionado com a energia utilizada no ultrassom, onde tem-se: quanto maior o tempo e a amplitude utilizada no ultrassom, maior a energia de entrada no sistema, produzindo um maior efeito de cavitação e, com isso, formando partículas menores e com menor índice de polidispersidade.

Levando em consideração o índice de polidispersidade das dispersões obtidas percebeu-se que a introdução da etapa de homogeneização (Ultra-turrax®), na metodologia proposta por Leimann et al. (2013), resultou na redução do índice de polidispersidade (PDI) do material em 6% (Formulações 1 e 2).

O índice de polidispersidade representa a faixa de distribuição de diâmetros de partícula e é um indicativo da estabilidade das suspensões. Quanto menor o valor desse índice, mais homogênea é a suspensão. Visando menores valores no índice de polidispersidade, a etapa de homogeneização com o equipamento Ultra-Turrax® foi mantida nas sínteses das nanopartículas de PHBHV.

A diminuição da amplitude de sonicação de 70% (Formulação 2) para 30% (Formulação 5) provocou aumento do PDI em 65%. Esse aumento do PDI também está relacionado com o efeito de cavitação. Com a diminuição da amplitude no ultrassom, a energia de entrada no sistema foi menor, produzindo um menor efeito de cavitação, o que provocou o alargamento nas faixas de distribuição de tamanho das partículas (TSAI; BAI; CHEN, 2008).

O aumento do tempo de sonicação de 3 minutos (Formulação 2) para 6 minutos (Formulação 6) resultou no aumento do índice de polidispersidade em 8% e o aumento do tempo de agitação em agitador magnético, de 30 minutos (Formulação 4) para 60 minutos (Formulação 2), provocou redução do índice de polidispersidade em 6%.

Tendo como base os resultados obtidos nesse estudo, observou-se que a variação da quantidade de surfactante na formulação teve influência mais significativa na variação do diâmetro hidrodinâmico. E, o parâmetro que teve maior efeito no PDI foi a diminuição da amplitude de sonicação de 70%.

Após a análise do efeito dos parâmetros do processo de síntese de nanopartículas de PHBHV no diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersidade, realizou-se o estudo da estabilidade das dispersões dessas partículas ao longo do tempo.

5.2.1.1 Estudo da estabilidade coloidal das dispersões de nanopartículas de poli(3hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato)

O objetivo desse estudo foi checar a possibilidade de degradação química do polímero, assim como a estabilidade coloidal das dispersões ao longo do tempo. A estabilidade coloidal é uma característica essencial para a aplicação dessas nanopartículas em substratos para engenharia de tecidos.

Esse estudo foi realizado através da medição do diâmetro hidrodinâmico das partículas, do índice de polidispersidade e do pH das dispersões ao longo do tempo. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 5.

		Inicial		15 dias			
Exp.	D _h ±DP*(nm)	PDI**±DP*	pH±DP*	D _h ±DP (nm)	PDI±DP	pH±DP	
1	113,60±1,41	0,126±0,004	2,76±0,18	116,8±3,11	0,162±0,011	2,90±0,15	
2	125,20±3,96	0,119±0,019	3,64±0,43	124,35±4,03	0,114±0,012	3,75±0,02	
3	90,01±7,68	0,171±0,033	6,78±0,04	85,42±8,21	0,118±0,004	7,12±1,02	
4	118,95±3,04	0,126±0,002	3,37±0,04	119,40±1,84	0,125±0,007	3,43±1,07	
5	138,15±6,29	0,196±0,029	3,18±0,21	131,15±3,89	0,122±0,010	3,22±0,49	
6	110,75±3,89	0,128±0,002	2,89±0,04	110,85±4,45	0,125±0,003	3,04±1,03	
		30 dias			60 dias		
Exp.	D _h ±DP (nm)	30 dias PDI±DP	pH±DP	D _h ±DP (nm)	60 dias PDI±DP	pH±DP	
<i>Exp</i> .	D _h ±DP (nm) 122,90±3,68	30 dias PDI±DP 0,209±0,003	pH±DP 2,74±0,12	D _h ± DP (nm) 143,85±10,82	60 dias PDI±DP 0,349±0,001	pH±DP 2,71±0,06	
<i>Exp.</i> 1 2	D _h ± DP (nm) 122,90±3,68 125,00±2,40	30 dias PDI±DP 0,209±0,003 0,127±0,026	pH±DP 2,74±0,12 3,62±0,34	D _h ± DP (nm) 143,85±10,82 124,35±2,90	60 dias PDI±DP 0,349±0,001 0,109±0,001	pH±DP 2,71±0,06 3,50±0,40	
<i>Exp.</i> 1 2 3	D h ±DP (nm) 122,90±3,68 125,00±2,40 84,00±5,13	30 dias PDI±DP 0,209±0,003 0,127±0,026 0,135±0,061	pH±DP 2,74±0,12 3,62±0,34 7,32±0,26	D h ±DP (nm) 143,85±10,82 124,35±2,90 80,06±6,68	60 dias PDI±DP 0,349±0,001 0,109±0,001 0,114±0,006	pH±DP 2,71±0,06 3,50±0,40 7,01±0,18	
<i>Exp.</i> 1 2 3 4	D_h±DP (nm) 122,90±3,68 125,00±2,40 84,00±5,13 121,85±1,06	30 dias PDI±DP 0,209±0,003 0,127±0,026 0,135±0,061 0,145±0,014	pH±DP 2,74±0,12 3,62±0,34 7,32±0,26 3,16±0,17	D_h±DP (nm) 143,85±10,82 124,35±2,90 80,06±6,68 126,40±2,26	60 dias PDI±DP 0,349±0,001 0,109±0,001 0,114±0,006 0,181±0,008	pH±DP 2,71±0,06 3,50±0,40 7,01±0,18 3,04±0,08	
<i>Exp.</i> 1 2 3 4 5	D_h±DP (nm) 122,90±3,68 125,00±2,40 84,00±5,13 121,85±1,06 133,30±4,38	30 dias PDI±DP 0,209±0,003 0,127±0,026 0,135±0,061 0,145±0,014 0,150±0,027	pH±DP 2,74±0,12 3,62±0,34 7,32±0,26 3,16±0,17 3,08±0,13	D h ±DP (nm) 143,85±10,82 124,35±2,90 80,06±6,68 126,40±2,26 137,50±3,54	60 dias PDI±DP 0,349±0,001 0,109±0,001 0,114±0,006 0,181±0,008 0,173±0,003	pH±DP 2,71±0,06 3,50±0,40 7,01±0,18 3,04±0,08 2,92±0,04	

Tabela 5 - Estudo da estabilidade coloidal das dispersões de partículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90)

* DP se refere ao desvio padrão calculado a partir dos diferentes produtos que foram obtidos utilizando os mesmos parâmetros de processo de síntese (n=2); ** PDI= índice de polidispersidade Fonte: Arquivo Pessoal

Primeiramente, analisou-se a variação dos diâmetros hidrodinâmicos das partículas de PHBHV ao longo do tempo, utilizando como base a Tabela 5 e a Figura 9.



Figura 9 - Variação do diâmetro hidrodinâmico das partículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90) em função do tempo

Fonte: Arquivo Pessoal

Comparando os valores de diâmetro hidrodinâmico obtidos inicialmente e após os 60 dias, constatou-se que os produtos obtidos com as formulações 1 e 6 apresentaram aumento no diâmetro hidrodinâmico ao longo do tempo, com variação de aproximadamente 27% e 23%, respectivamente. Para este mesmo tempo de estocagem (60 dias), o produto obtido com a formulação 3 apresentou redução de 11% no seu diâmetro hidrodinâmico e o produto obtido pela formulação 4 apresentou aumento no diâmetro hidrodinâmico de 6%. E, por fim, os produtos obtidos com as formulações 2 e 5 não apresentaram alteração significativa, sendo a variação menor que 1%.

A variação no diâmetro hidrodinâmico das partículas em função do tempo sugere uma possível perda de estabilidade coloidal, principalmente das amostras obtidas pelas formulações 1 e 6.

A variação do índice de polidispersidade das dispersões de nanopartículas de PHBHV encontram-se na Tabela 5 e Figura 10.



Figura 10 - Variação do índice de polidispersidade das dispersões de nanopartículas de PHBHV (M_n = 121KDa, D= 1,90) em função do tempo

Fonte: Arquivo Pessoal

Comparando-se os valores do índice de polidispersidade obtidos inicialmente e após os 60 dias, foi possível perceber que os produtos obtidos com as formulações 1, 4 e 6 apresentaram aumento significativo no índice de polidispersidade com o tempo, na ordem de 177%, 44% e 157%, respectivamente. Os produtos obtidos com as formulações 3 e 5 tiveram seu PDI reduzido na primeira semana, mas ao final dos 60 dias, o produto obtido com a formulação 5 teve aumento significativo do seu PDI. O produto obtido com a formulação 5, depois da diminuição do PDI na primeira semana, apresentou tendência de aumento do PDI ao longo do tempo. Já o produto obtido com a formulação 3 teve seu PDI variando ao longo dos 60 dias, mas sem tendência de diminuição ou aumento ao longo do tempo.

Como foi possível perceber, essa elevada variação do PDI sugeriu uma perda de estabilidade e, além dessa medição, as amostras obtidas pelas formulações 1,4, 5 e 6 apresentaram precipitado ao final dos 60 dias, o que também foi uma indicação da perda da estabilidade coloidal.

Os produtos com menores variações no índice de polidispersidade ao longo do tempo, mostrando-se, portanto, estáveis, foram os obtidos com as formulações 2 e 3.

Com isso, foi possível concluir que os produtos obtidos com as formulações 2 e 3 apresentaram maior estabilidade coloidal, como pôde ser corroborado pelo diâmetro hidrodinâmico, que não alterou significativamente e pelo índice de polidispersidade que se manteve reduzido e sem variação significativa ao longo do tempo.

Além da variação do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersidade em função do tempo, também foi avaliada a variação do pH das dispersões em função do tempo (Figura 11). Essa é uma importante informação acerca do estudo da degradação química, pois variações de pH podem ser uma indicação da degradação das cadeias poliméricas. Guterres et al. (1995) avaliaram o pH de dispersões de poli(dl- ácido láctico) ao longo do tempo e observaram uma diminuição do pH, devido a liberação de ácido láctico no meio como resultado da degradação do polímero. A degradação do PHBHV ocorre através de clivagem das ligações acil-oxigênio (R-C=O-O-R'), liberando álcool e ácido carboxílico, o que levaria a uma alteração do pH do meio (KE et al., 2015).





Fonte: Arquivo Pessoal

Como foi possível perceber, as suspensões não apresentaram variações significativas do pH em função do tempo, mostrando que as cadeias poliméricas não sofreram degradação significativa no do período avaliado. A característica de hidrofobicidade e cristalinidade do PHBHV são responsáveis por esse comportamento, pois impedem uma rápida taxa de degradação (KE et al., 2015).

Portanto, as amostras mais estáveis coloidalmente, que não sofreram variação no diâmetro hidrodinâmico e nem no índice de polidispersidade, foram as sintetizadas pelo

processo de homogeneização com o equipamento Ultra-turrax®, amplitude de sonicação de 70% e tempo de sonicação de 3 min (Formulações 2 e 3). A diferença entre as formulações 2 e 3 está relacionada a variação da concentração de surfactante utilizada no processo. Já com relação a degradação química, as amostras obtidas com essas formulações não apresentaram variação significativa do pH, o que pode significar a não ocorrência de degradação significativa do polímero.

Com esse estudo, definiu-se os parâmetros de processo de síntese de nanopartículas de PHBHV por emulsão-evaporação do solvente, conforme apresentado na Tabela 6. A escolha desses parâmetros foi estabelecida visando a obtenção de partículas estáveis coloidamente, para viabilizar a modificação química da superfície dessas nanopartículas com aminosilanos.

Tabela 6 - Parâmetros de processo para a síntese de nanopartículas de PHBHV pelo método de emulsão-evaporação do solvente

Parâmetros	Valores
Tempo de agitação em agitador magnético (min)	60
Tempo de homogeneização no Ultra-Turrax (min)	30
Velocidade de homogeneização no Ultra-Turrax (rpm)	6000
Tempo no ultrassom de sonda (min)	3
Amplitude no ultrassom de sonda (%)	70

Fonte: Arquivo Pessoal

A concentração de surfactante não foi fixada em apenas um único valor, pois a intenção era obter dois diâmetros hidrodinâmicos diferentes para o PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90) e para o PHBHV-diol.

5.2.2 Estudo do efeito dos parâmetros de processo na síntese de nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) dihidroxilado (PHBHV-diol) e estudo da estabilidade coloidal das dispersões obtidas

As partículas de PHBHV-diol foram sintetizadas pelo método de emulsãoevaporação do solvente, onde os parâmetros de processo utilizados se encontram definidos na Tabela 6. Com o objetivo de se obter dois diferentes diâmetros hidrodinâmicos para as partículas de PHBHV-diol, variou-se a concentração do surfactante, conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 – Efeito da concentração de surfactante no diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade e pH das dispersões de nanopartículas de PHBHV-diol ($M_n = 22$ KDa, D = 1,47)

Exp.*	PHBHV- diol (g)	CHCl₃ (mL)	Água (mL)	SDS (g)	D _h ±DP** (nm)	PDI***±DP*	pH±DP*
22P1	0,3	6	24	1,600	56,40±0,28	0,256±0,091	6,62±0,37
22P2	0,3	6	24	0,072	120,20±2,62	0,150±0,060	4,99±0,83

*As amostras foram nomeadas primeiramente pela massa molar do polímero usado na síntese das nanopartículas (no caso, 22KDa), depois P1 se refere as partículas de menor diâmetro e P2 as de maior diâmetro; **DP se refere ao desvio padrão calculado a partir dos diferentes produtos que foram obtidos utilizando os mesmos parâmetros de processo de síntese (n=2); *** PDI= índice de polidispersidade

Fonte: Arquivo Pessoal

Os resultados apresentados na Tabela 7 mostram que a variação da concentração do surfactante resultou na alteração do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas, como esperado.

Avaliou-se a estabilidade coloidal das partículas de PHBHV-diol ao longo do tempo, obtendo-se os resultados mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Estudo da estabilidade coloidal o	las dispersões de partículas de PHBHV-diol (Mn
= 22KDa, D = 1,47) ao longo do tempo	

Exp.		Inicial		15 dias			
	D _h ±DP*(nm)	PDI**±DP*	pH±DP*	Dh±DP (nm)	PDI±DP	pH±DP	
22P1	56,40±0,28	0,256±0,091	6,62±0,37	56,50±4,03	0,202±0,124	6,85±0,07	
22P2	120,20±2,62	0,150±0,060	4,99±0,83	114,7±7,92	0,115±0,021	4,62±0,64	
-	30 dias			60 dias			
Exp.	Dh±DP (nm)	PDI±DP	pH±DP	Dh±DP (nm)	PDI±DP	pH±DP	
22P1	56,80±3,96	0,171±0,077	6,95±0,21	58,30±2,83	0,181±0,091	7,19±0,45	
22P2	126,90±2,69	0,162±0,008	5,17±1,37	123,70±7,35	0,143±0,035	5,37±1,29	

*DP se refere ao desvio padrão calculado a partir dos diferentes produtos que foram obtidos utilizando os mesmos parâmetros de processo de síntese (n=2); ** PDI= índice de polidispersidade

As partículas de PHBHV-diol apresentaram mesmo comportamento das partículas preparadas com o PHBHV, de maior massa molar (Tabela 5, Experimentos 2 e 3), ou seja, as dispersões não apresentaram variação significativa no pH e o diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersidade dos produtos não variaram significativamente ao longo do tempo.

Portanto, foi possível concluir que as dispersões de nanopartículas de PHBHV-diol permaneceram estáveis coloidalmente, possibilitando a modificação química da superfície dessas nanopartículas com os aminosilanos.

5.2.3 Influência da variação da massa molar do poli(3-hidroxibutirato-*co*-3hidroxivalerato) no diâmetro hidrodinâmico das partículas

Para avaliar a influência da massa molar do PHBHV no diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas, realizou-se a síntese de nanopartículas de PHBHV e PHBHV-diol utilizando os parâmetros de processo definidos na Tabela 6, apresentados no estudo de estabilidade coloidal.

Comparando os resultados de diâmetro hidrodinâmico, para as partículas de PHBHV (Tabela 4, experimentos 2 e 3) e PHBHV-diol (Tabela 7), foi possível perceber que o diâmetro hidrodinâmico das partículas preparadas utilizando maior concentração de surfactante (1,6g) foi alterado, significativamente, em função da massa molar de PHBHV utilizada. Com o aumento da massa molar do polímero, houve um aumento no diâmetro hidrodinâmico das partículas, utilizando as mesmas condições de processo. Essa diminuição do diâmetro hidrodinâmico das partículas devido a diminuição da massa molar era esperada, pois conforme Zanetti-Ramos et al. (2006) quanto maior a massa molar do polímero, maior é a viscosidade da emulsão e, com isso, maior a dificuldade em se obter pequenas gotículas, formando assim partículas de maior tamanho.

Foi possível perceber que, para as formulações com maior concentração de surfactante, ou seja, para a preparação de partículas de menor diâmetro, foi observado um aumento do diâmetro hidrodinâmico de 33,61 nm, quando a massa molar do polímero passou de 22 KDa para 121 KDa. Já para as partículas preparadas com menor concentração de surfactante (0,072g), o aumento do diâmetro hidrodinâmico, quando a massa molar do polímero aumentou de 22 KDa para 121 KDa, foi de apenas 5 nm.

5.2.4 Morfologia e topografia das nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3hidroxivalerato) e poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) dihidroxilado

A Figura 12 mostra as micrografías e os histogramas de distribuição do diâmetro das nanopartículas de PHBHV e PHBHV-diol obtidas por microscopia de força atômica (AFM). Foi possível observar que as nanopartículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D = 1,90) e de PHBHV-diol ($M_n = 22$ KDa, D = 1,47) apresentaram formato esférico.

Para as micrografias, foram colocadas as imagens em duplicatas e todos os diâmetros obtidos para cada massa molar, como foram realizados os experimentos, mas selecionou-se imagens representativas para avaliar o formato das nanopartículas e a relação dos diâmetros obtidos pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e microscopia de força atômica (AFM).

Figura 12 - Micrografias de microscopia de força atômica (AFM) e distribuição de diâmetros das nanopartículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90) e PHBHV-diol ($M_n = 22$ KDa, D= 1,47)



(a) Nanopartículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90) com diâmetro hidrodinâmico de 87,15nm; (b) Nanopartículas de PHBHV-diol ($M_n = 22$ KDa, D= 1,47) com diâmetro hidrodinâmico de 122,10nm

Fonte: Arquivo Pessoal

Os valores encontrados para comparação entre o diâmetro hidrodinâmico obtido por DSL (D_h) e o diâmetro de partículas (D_p) obtidos por AFM encontram-se apresentados na Tabela 10.
Exp.	Massa molar (KDa)	D _h (nm)	Dp (nm)	
121P1	121	87,15	82,69	
22P2	22	122,10	122,76	

Tabela 9 - Comparação do diâmetro de partículas obtido por microscopia de força atômica (AFM) (Dp) e diâmetro hidrodinâmico obtido por espalhamento de luz dinâmico (DLS) (Dh) para as partículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90) e PHBHV-diol ($M_n = 22$ KDa, D= 1,47)

Fonte: Arquivo Pessoal

Para as partículas de PHBHV, o diâmetro de partículas obtido foi de 82,69 nm e o diâmetro hidrodinâmico de 87,15 nm. Já para as partículas preparadas com o PHBHV-diol, o diâmetro médio de partícula encontrado foi de 122,76 nm e o diâmetro hidrodinâmico de 122,10 nm. Com isso, os diâmetros médios de partícula obtidos por microscopia de força atômica confirmam os resultados de diâmetro hidrodinâmico obtido por espalhamento de luz dinâmico.

5.3 Modificação química da superfície das nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) dihidroxilado (PHBHV-diol)

As nanopartículas de PHBHV e PHBHV-diol foram modificadas quimicamente de acordo com a rota química elucidada nos Esquemas 2 e 3.

A modificação química ocorre através dos grupos hidroxilas presentes na superfície das nanopartículas à base de PHBHV. O acoplamento dos silanos se dá via ligações covalentes com as hidroxilas, funcionalizando a superfície das nanopartículas com grupos amino.

O polímero de menor massa molar (PHBHV-diol) possui duas hidroxilas terminais, enquanto o polímero de maior massa molar (PHBHV) possui uma hidroxila terminal e uma carboxila. Devido a isso, era esperado que as nanopartículas de PHBHV-diol possuíssem mais grupos hidroxilas disponíveis na superfície da partícula para se ligar covalentemente ao silano, levando à uma maior concentração de grupos aminos na superfície.

Com isso, foram sintetizadas novas dispersões de nanopartículas utilizando PHBHV e PHBHV-diol para serem utilizadas nas reações de modificação química com os aminosilanos. O diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade e potencial zeta das nanopartículas que foram submetidas a modificação química por APTMS e APTES se encontram na Tabela 11.

O potencial zeta se refere a medida do potencial eletrostático na dupla camada elétrica que envolve uma nanopartícula em solução, sendo esse valor influenciado pela composição da partícula e pelo meio no qual ela está dispersa. As nanopartículas com potencial zeta entre +10 e -10 são consideradas aproximadamente neutras, enquanto que as nanopartículas com potencial zeta acima de +30 ou acima de -30 são fortemente catiônicas ou aniônicas, sendo estáveis em solução, pois a carga de superfície impede a agregação das partículas (CLOGSTON, PATRI; 2011; MOHANRAJ, CHEN; 2006). Partículas catiônicas, normalmente, exibem maior toxicidade associada a ruptura da parede celular (CLOGSTON, PATRI; 2011), portanto, partículas aniônicas seriam mais interessantes para aplicação em Engenharia de Tecidos.

Tabela 10 - Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersidade das partículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90) e PHBHV-diol ($M_n = 22$ KDa, D= 1,47) antes da reação de funcionalização com APTMS e APTES

Amostras*	Massa molar (KDa)	D _h (nm)	PDI**	Potencial zeta
121T1	121	84,58	0,147	-54,6
121T2	121	131,60	0,145	-63,9
22T1	22	51,53	0,155	-62,2
22T2	22	106,90	0,140	-35,9

*As amostras foram nomeadas primeiramente pela massa molar do polímero usado na síntese das nanopartículas (121 ou 22KDa), depois o "T1" se refere as partículas de menor tamanho sintetizadas utilizando o PHBHV de massa molar 121 ou 22KDa e o "T2" se refere as partículas de maior tamanho. **Índice de Polidispersidade. Fonte: Arquivo Pessoal

As nanopartículas de PHBHV-diol e PHBHV modificadas quimicamente foram caracterizadas utilizando-se as técnicas de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Espalhamento de Luz Dinâmico e Eletroforético (DLS) e (ELS) e Microscopia de Força Atômica (AFM). Após as caracterizações para se analisar a ocorrência da funcionalização, avaliou-se a estabilidade coloidal das partículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90) modificadas por APTMS e APTES.

5.3.1 Caracterização das nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3hidroxivalerato) modificadas por aminosilanos

5.3.1.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As nanopartículas de PHBHV modificadas foram caracterizadas por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier. Os espectros de FTIR para as nanopartículas obtidas com o PHBHV de maior massa molar modificadas com 3aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) e 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) são apresentados na Figura 13 e os espectros das nanopartículas obtidas com o PHBHV de menor massa molar (PHBHV-diol) modificadas com 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) e 3aminopropiltrietoxisilano (APTES) são apresentados na Figura 14.





(a) Nanopartículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90); (b) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=131,60$ e modificadas por APTES; (c) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=131,60$ e modificadas por APTMS; (d) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (e) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (e) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (f) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (e) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (f) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (f) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (f) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (f) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (f) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (f) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (f) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (f) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (f) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (f) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (f) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (f) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (f) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (f) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (f) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (f) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (f) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (f) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (f) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (f) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (f) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modificadas por APTES; (f) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=84,58$ e modifica

Figura 14 – Espectros das nanopartículas de PHBHV-diol não modificadas e das nanopartículas de PHBHV-diol modificadas por APTES e APTMS



(a) Nanopartículas de PHBHV ($M_n = 22$ KDa, D = 1,47); (b) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=106,90$ e modificadas por APTES; (c) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=106,90$ e modificadas por APTMS; (d) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=51,53$ e modificadas por APTES; (e) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=51,53$ e modificadas por APTES; (e) Nanopartículas de PHBHV com $D_h=51,53$ e modificadas por APTES; Fonte: Arquivo Pessoal

Como foi possível perceber pelos espectros de FTIR tanto da Figura 13 quanto da Figura 14, todas as amostras de nanopartículas de PHBHV modificadas apresentaram as bandas características do PHBHV e banda de absorção em 1630 cm⁻¹-1642 cm⁻¹ (indicado pelas setas presentes nas Figuras 13 e 14), diferindo na sua intensidade.

A modificação química da superficie das partículas levaria a formação de grupos amino e a formação da ligação R-O-Si. Em um espectro típico de FTIR, as aminas primárias alifáticas absorvem em 3400 cm⁻¹-3330 cm⁻¹ e 3330 cm⁻¹-3250 cm⁻¹. Já a banda correspondente à deformação angular simétrica de N-H de amina primária é observada na região de 1650 cm⁻¹–1580 cm⁻¹. As bandas de absorção C-N nas aminas aparecem na região 1250 cm⁻¹-1020 cm⁻¹. Já em relação as bandas de absorção referentes a ligação Si-O-R, as deformações axiais Si-O-R (alifático) aparecem em 1100 cm⁻¹-1000 cm⁻¹. A deformação angular simétrica fora do plano Si-CH₂ aparece em 1459 cm⁻¹ (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

Para identificação da modificação química da superficie das partículas, analisou-se todos os espectros das partículas que tiveram sua superficie modificadas e comparou-se com o espectro das nanopartículas de PHBHV não modificadas, para se definir quais bandas permitiriam a identificação da modificação química e quais bandas estariam sobrepostas.

Frequências de deformação axial de OH ocorrem em 3550 cm⁻¹-3200 cm⁻¹ e as frequências de deformação axial de NH em 3400 cm⁻¹-3330 cm⁻¹. A sobreposição das bandas atribuídas a esses grupos químicos em 3200 cm⁻¹-3550 cm⁻¹ torna a diferenciação NH-OH equívoca (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006). Com isso, não foi possível utilizar essa frequência de deformação axial do NH para avaliar a ocorrência da modificação química na superfície das nanopartículas.

As deformações axiais Si-O-R (1100 cm⁻¹-1000 cm⁻¹) do silano se sobrepõem as deformações axiais das ligações C-O e C-C do PHBHV (1050 cm⁻¹e 979 cm⁻¹). Já as bandas de absorção C-N das aminas (1250 cm⁻¹-1020 cm⁻¹) se sobrepõem as bandas características dos estiramentos simétricos e assimétricos do grupo C-O-C do PHBHV (1132cm⁻¹). Devido a essas sobreposições, para se avaliar a modificação da superfície das nanopartículas de PHBHV pelos aminosilanos APTMS e APTES, foi necessário confirmar a presença da deformação angular simétrica de N-H, que pode ser observada na região 1650 cm⁻¹ – 1580 cm⁻¹.

Ao observar o espectro obtido para as partículas de PHBHV-diol (M_n = 22KDa, D= 1,47) de menor diâmetro hidrodinâmico modificadas por APTMS e APTES, representados na Figura 14d e 14e, foi possível perceber uma significativa alteração no espectro nas regiões de 1600 cm⁻¹ a 500 cm⁻¹. As bandas dessa região foram modificadas em comparação ao espectro das nanopartículas de PHBHV-diol sem modificação. Essa região foi alterada devido a presença de bandas de absorção C-N (1250 cm⁻¹-1020 cm⁻¹) e Si-O-R (1100 cm⁻¹-1000 cm⁻¹) do APTMS e APTES. Também foi observado a presença da banda na região de 1630 cm⁻¹-1642 cm⁻¹.

As dispersões de partículas de menor diâmetro ($D_h=51,53$; PDI=0,155) e sintetizadas com o PHBHV-diol, que possui menor massa molar, devem possuir maior quantidade de silano, pois quanto menor o tamanho das partículas, maior a área superficial total do material. Aumentando a área superficial, aumenta-se a quantidade de grupos OH presentes no meio. Com uma maior quantidade de grupos OH disponíveis, uma maior quantidade de silano iria reagir e se ligar covalentemente à superficie do material, aumentando-se, assim, a relação silano/PHBHV.

Com isso, foi possível concluir que com o aumento da quantidade de silano nas dispersões de partículas, devido ao menor diâmetro hidrodinâmico, aumentou-se a intensidade de absorção dessa banda (1630 cm⁻¹- 1642 cm⁻¹) e alterou-se o espectro na região 1600 cm⁻¹ a 500 cm⁻¹.

Com relação a influência da massa molar e da quantidade de hidroxilas terminais na reação de silanização, percebeu-se que a banda de absorção em 1630 cm⁻¹-1642 cm⁻¹ para as partículas de PHBHV de maior massa molar foi menor que para as partículas de PHBHV-diol. Isso provavelmente ocorreu devido a quantidade de grupos OH disponíveis na superfície, que é maior para o PHBHV-diol, pois possui menor massa molar e suas duas extremidades funcionalizadas com hidroxilas.

A partir desses dados, pode-se concluir que as partículas de PHBHV foram modificadas pelos aminosilanos 3-aminopropiltrimetoxisilano e 3aminopropiltrietoxisilano, para todos os diâmetros, apresentando o grupo NH₂ livre, ocorrendo a reação de modificação por silanização.

5.3.1.2 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H)

Análises de RMN ¹H foram realizadas com o objetivo de se confirmar a modificação química da superficie das nanopartículas de PHBHV pelos aminosilanos. A figura 15 apresenta o espectro de RMN ¹H do PHBHV-diol, do APTMS e das nanopartículas de PHBHV-diol de menor diâmetro modificadas por APTMS (amostra 22T1-APTMS) e a Figura 16 apresenta o espectro do PHBHV-diol, do APTES e das nanopartículas de PHBHV-diol de menor diâmetro modificadas por APTES (amostra 22T1-APTMS).

Selecionou-se as amostras 22T1-APTMS e 22T1-APTES para avaliação da estrutura química por RMN ¹H, pois as nanopartículas preparadas com o PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90) modificadas apresentam alta massa molar, o que dificultaria a visualização da modificação química da superfície das nanopartículas. Já as amostras selecionadas para as análises são formadas por nanopartículas de menor massa molar, preparadas com o PHBHV-diol e menor diâmetro hidrodinâmico, facilitando a identificação dos picos característicos do APTMS e do APTES no espectro de RMN ¹H das nanopartículas modificadas.





(a) Nanopartículas de PHBHV-diol ($M_n = 22$ KDa, D = 1,47) modificada por APTMS; (b) APTMS; (c) PHBHV-diol ($M_n = 22$ KDa, D = 1,47) Fonte: Arquivo Pessoal

Observando a Figura 15c foi possível observar os deslocamentos característicos do PHBHV dihidroxilado.

A Figura 15b apresenta os deslocamentos referentes ao silano APTMS em: em 3,56 ppm referente aos grupos CH₃ do silano (-O-<u>CH₃</u>, a); em 3,46 ppm referente ao NH₂ (CH₂-CH₂-<u>NH₂</u>, d) em 2,63-2,71 ppm referente ao CH₂ próximo ao grupo amino (-CH₂-<u>CH₂-NH₂</u>, b); em 1,48-1,60 ppm referente ao CH₂ (-<u>CH₂-CH₂-CH₂-NH₂</u>, c) e, por fim, em 0,6-0,69 ppm referente ao CH₂ próximo ao Si (Si-<u>CH₂-CH₂-CH₂-NH₂, e).</u>

O sinal mais intenso no espectro de RMN ¹H do APTMS (Figura 15b) se refere aos grupos CH₃ do silano (em 3,56 ppm) e foi o sinal utilizado para avaliar a modificação química das nanopartículas, pois, além dos outros sinais terem baixa intensidade, também se sobrepunham a sinais de alta intensidade do PHBHV-diol, que foi utilizado na preparação das partículas.

Ao observar o espectro das nanopartículas modificadas por APTMS (Figura 15a) foi possível perceber um sinal em 3,69ppm e um em 3,65 ppm que não apareceu no espectro do PHBHV dihidroxilado. Esse sinal em 3,69ppm se refere aos grupos CH₃ do silano, como pode ser percebido através da comparação do espectro do APTMS (Figura 15b) com o espectro das nanopartículas modificadas por APTMS (Figura 15a). O aparecimento desse pico confirmou a modificação química da superfície das nanopartículas de PHBHV pelo APTMS.

Figura 16 - Espectro de RMN ¹H do aminosilano APTES, das nanopartículas de PHBHV-diol modificadas por APTES e do PHBHV-diol ($M_n = 22$ KDa, D= 1,47)



(a) Nanopartículas de PHBHV-diol ($M_n = 22$ KDa, D = 1,47) modificada por APTES; (b) APTES; (c) PHBHV-diol ($M_n = 22$ KDa, D = 1,47) Fonte: Arquivo Pessoal

A Figura 16b apresenta os deslocamentos referentes ao silano APTES em: 1,22 ppm referente aos grupos CH₃ do silano (-CH₂-<u>CH₃</u>, d); em 3,8 ppm ppm referente ao CH₂ (-O-<u>CH₂-CH₃, a); em 1,43-1,58 ppm referente ao CH₂ (-CH₂-CH₂-NH₂, c); em 3,7 ppm referente ao NH₂ (-CH₂-<u>NH₂</u>, e); 2,61-2,70 ppm referente ao CH₂ próximo ao grupo amino (-CH₂-</u> <u>CH</u>₂-NH₂, b), e, por fim, em 0,57-0,67 ppm sinal referente ao CH₂ próximo ao Si (Si-<u>CH</u>₂-CH₂-CH₂-NH₂, f).

Ao observar o espectro da Figura 16a referente as nanopartículas de PHBHV-diol modificadas por APTES, pode-se observar que a maioria dos sinais do PHBHV-diol se sobrepõe aos sinais do APTES. Foi possível observar o aparecimento dos picos em 3,75 ppm e em 3,64 ppm no espectro das nanopartículas modificadas (Figura 16a), ao se comparar com o espectro do PHBHV-diol, sendo esse sinal referente aos grupos CH₂ (-O-<u>CH₂-CH₃, a) e NH₂ do silano (NH₂, e). Com isso, através do aparecimento desses picos, foi possível confirmar a modificação química da superfície das nanopartículas de PHBHV pelo APTES.</u>

5.3.1.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As nanopartículas de PHBHV modificadas por APTMS e APTES e as nanopartículas de PHBHV-diol modificadas por APTMS e APTES foram submetidas à caracterização via a técnica de Calorimetria Exploratória Diferencial com o objetivo de se verificar o comportamento térmico do material devido à modificação química da superfície das nanopartículas com os aminosilanos.

Os termogramas mostrados na Figura 17 se referem às nanopartículas preparadas com o PHBHV de maior massa molar, modificadas pelos aminosilanos APTMS e APTES, às nanopartículas obtidas com o PHBHV-diol, de menor massa molar, modificadas pelos mesmos silanos. Também são apresentados nesta figura os termogramas das nanopartículas de PHBHV e PHBHV-diol. Os valores das temperaturas de transição vítrea, temperaturas de fusão e temperaturas de cristalização, entalpia de fusão e grau de cristalinidade, obtidos nessas análises, são apresentados na Tabela 12.



Figura 17 - Termogramas de DSC das nanopartículas de PHBHV, das nanopartículas de PHBHVdiol e nanopartículas de PHBHV e PHBHV-diol modificadas por APTMS e APTES

121T1-APTMS e 121T1-APTES: NPs de PHBHV (Dh 84,58nm) modificadas com APTMS e APTES, respectivamente; 121T2-APTMS e 121T2-APTES: NPs de PHBHV (Dh 131,6nm) modificadas com APTMS e APTES, respectivamente; 22T1-APTMS e 22T1-APTES: NPs de PHBHV-diol (Dh 51,53nm) modificadas com APTMS e APTES, respectivamente; 22T2-APTMS e 22T2-APTES: NPs de PHBHV-diol (Dh 106,9nm) modificadas com APTMS e APTES, respectivamente. Fonte: Arquivo Pessoal

Amostras	T _g (°C)	T _{m1} (°C)	$T_{m2}(^{\circ}C)$	T _{cc} (°C)	ΔH_{m1}	ΔH_{m2}	Cristalinidade (%)
PHBHV*	0,96	143,71	163,13	62,92	1,14	30,76	28,2
121T1- APTES	-1,32	139,55	160,34	54,91	2,70	35,72	32,8
121T1- APTMS	-2,50	121,69	150,10	46,66	2,99	40,66	37,3
121T2- APTES	-2,85	133,44	157,56	53,00	1,34	32,04	29,4
121T2- APTMS	-2,50	128,16	153,60	51,85	4,23	40,76	37,4
PHBHV- diol**	-1,49	130,16	153,9	62,95	4,41	36,25	33,3
22T1- APTES	-5,00	122,63	151,91	53,07	0,69	5,75	5,3
22T1- APTMS	-7,64	126,09	151,24	66,00	1,06	4,06	3,7
22T2- APTES	-13,62	89,77	132,37	46,76	1,69	13,12	12,0
22T2- APTMS	-16,20	95,11	115,33	54,75	2,28	5,04	4,6

Tabela 11 - Valores das temperaturas de transição, entalpia de fusão e grau de cristalinidade das nanopartículas de PHBHV, das nanopartículas de PHBHV-diol e nanopartículas de PHBHV e PHBHV-diol modificadas obtidos por DSC

*NPs de PHBHV ($M_n = 121$ KDa) **NPs de PHBHV-diol ($M_n = 22$ KDa); 121T1-APTMS e 121T1-APTES: NPs de PHBHV ($D_h = 84,58$ nm) modificadas com APTMS e APTES, respectivamente; 121T2-APTMS e 121T2-APTES: NPs de PHBHV ($D_h = 131,6$ nm) modificadas com APTMS e APTES, respectivamente; 22T1-APTMS e 22T1-APTES: NPs de PHBHV-diol ($D_h = 51,53$ nm) modificadas com APTMS e APTES, respectivamente; 22T2-APTMS e 22T2-APTES: NPs de PHBHV-diol ($D_h = 106,9$ nm) modificadas com APTMS e APTES, respectivamente. Fonte: Arquivo Pessoal Foi possível notar que todas as nanopartículas modificadas apresentaram eventos endotérmicos com transição de segunda ordem, referente a transição vítrea do material (Tg).

Os valores de T_g das nanopartículas modificadas foram menores que os valores para o PHBHV sem modificação. Essa tendência foi observada tanto para o PHBHV, quanto para o PHBHV-diol.

Para as nanopartículas preparadas com o PHBHV de maior massa molar e modificadas, as diferenças nos valores de T_g quando comparadas com as nanopartículas obtidas com este mesmo polímero, porém sem modificação, foram de 2,28°C, 3,46°C, 3,81°C e 3,46°C referentes as amostras 121T1-APTES, 121T1-APTMS, 121T2-APTES e 121T2-APTMS, respectivamente. Para as nanopartículas de PHBHV-diol modificadas, as diferenças nos valores de T_g quando comparadas com as nanopartículas obtidas com este mesmo polímero, porém sem a modificação química da superfície, foram de 3,51°C, 6,15°C, 12,13°C e 14,71°C referentes as amostras 22T1-APTES, 22T1-APTMS, 22T2-APTES e 22T2-APTMS, respectivamente.

Com isso, foi possível perceber que os valores de T_g para as nanopartículas de PHBHV-diol modificadas diminuíram de maneira mais significativa quando comparado com a diminuição dos valores de T_g para as nanopartículas de PHBHV de maior massa molar modificadas. Isso pode ter acontecido devido a quantidade de silano na superfície do material, que por ser maior nas nanopartículas de PHBHV-diol modificadas - devido a menor massa molar e maior concentração de hidroxilas terminais - possui maior efeito plastificante, causando uma redução nos valores de T_g . Essa diminuição no valor da T_g poderia ser explicada pela diminuição das forças intermoleculares entre as cadeias poliméricas, aumentando a flexibilidade e mobilidade das cadeias (REQUENA et al., 2016).

Era esperado que os valores de T_g para as nanopartículas das amostras 22T1-APTES e 22T1-APTMS fossem menores que os valores das partículas das amostras 22T2-APTES e 22T2-APTMS, pois as duas primeiras apresentam nanopartículas com menores diâmetros hidrodinâmicos, o que levaria ao aumento da concentração de silano nas dispersões de nanopartículas, reduzindo ainda mais a T_g . Essa tendência poderia não ter sido seguida, pois o cálculo dos valores de T_g para os materiais das amostras 22T1-APTES e 22T1-APTMS foi dificultado devido ao pico de fusão que apareceu juntamente com a T_g (Figura 17). Esse efeito se chama relaxação entálpica e ocorre devido a um processo de envelhecimento do material (LIZUNDIA et al., 2016; CASSIMIRO, 2010). Com o reaquecimento da amostra, após esse envelhecimento, as moléculas ganham mais mobilidade e relaxam-se, resultando no pico endotérmico (CASSIMIRO, 2010). O aumento do pico referente a relaxação entálpica tem relação com o tempo, onde, quanto maior o tempo de envelhecimento, maior o pico referente a relaxação entálpica (LIZUNDIA et al., 2016).

Uma explicação para o aparecimento da entalpia de relaxação se refere a quantidade de silano na superfície do material, que é maior para as amostras 22T1-APTES e 22T1-APTMS devido ao menor diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas, alterando as propriedades do material e provocando o aparecimento do pico de fusão referente a relaxação entálpica. Além disso, segundo Lizundia et al. (2016) o aumento do envelhecimento do material resulta em uma sobrecarga endotérmica (pico de relaxação entálpica) e aumento da T_g, o que explicaria a maior T_g encontrada para as nanopartículas das amostras 22T1-APTES e 22T1-APTMS e 22T1-APTES quando comparadas com as amostras 22T2-APTES e 22T2-APTES.

Também foi possível observar picos referentes a eventos de primeira ordem em todas as nanopartículas modificadas, sendo um exotérmico, referente a cristalização e dois endotérmicos, referente a fusão do material.

A inserção dos silanos na superfície das nanopartículas de PHBHV levou a uma alteração nos valores das temperaturas de fusão cristalina. Os dois picos de fusão que apareceram em todas as amostras se referem ao processo de fusão-recristalização-refusão (LIU et al., 2009). Conforme Liu et al. (2009) geralmente o ponto de fusão com maior temperatura (T_{m2}) é utilizado como o ponto de fusão do copolímero PHBHV e este ponto foi utilizado para se comparar o efeito da modificação química na temperatura de fusão das nanopartículas de PHBHV.

Foi possível perceber uma diminuição da T_{m2} para as nanopartículas de PHBHV de maior massa molar e modificadas, quando comparadas com a T_{m2} das nanopartículas desse mesmo polímero sem modificação e uma diminuição da T_{m2} das nanopartículas de PHBHV-diol modificadas quando comparadas com as nanopartículas de PHBHV-diol.

Comparando os valores de T_{m2} das nanopartículas de PHBHV de maior massa molar e modificadas com o valor de T_{m2} para as nanopartículas de PHBHV sem modificação, tem-se redução de 2,79°C, 13,03°C, 5,57°C e 9,53°C para as amostras 121T1-APTES, 121T1-APTMS, 121T2-APTES e 121T2-APTMS, respectivamente. Comparando-se os valores de T_{m2} das nanopartículas de PHBHV-diol modificadas com as nanopartículas de PHBHV-diol sem modificação, foi possível observar uma redução de 1,99°C, 2,66°C, 21,53°C e 38,57°C referente as amostras 22T1-APTES, 22T1-APTMS, 22T2-APTES e 22T2-APTMS, respectivamente. Pode-se sugerir que a redução nos valores de T_{m2} foi consequência da redução na espessura das lamelas cristalinas do PHBHV e do PHBHV-diol após modificação química da superfície das nanopartículas com os aminosilanos.

Analisando o grau de cristalinidade do material, foi possível perceber que após a modificação química da superficie das nanopartículas de PHBHV de maior massa molar quando comparadas com as nanopartículas de PHBHV sem modificação, o grau de cristalinidade praticamente não sofreu alteração, sendo observados aumentos da cristalinidade de apenas 4,6%, 9,0%, 1,2% e 9,2% para as amostras 121T1-APTES, 121T1-APTES, 121T2-APTES e 121T2-APTMS, respectivamente. Esse resultado poderia ser explicado pela maior massa molar do polímero (PHBHV) e ainda pelo fato de que a modificação química pelos silanos ocorre apenas na superficie das nanopartículas.

Já para as nanopartículas de PHBHV-diol modificadas foi possível observar uma redução significativa na cristalinidade quando comparadas com as nanopartículas de PHBHV-diol, sem modificação, sendo de 28,0%, 29,5%, 21,2% e 28,6% para as amostras 22T1-APTES, 22T1-APTMS, 22T2-APTES e 22T2-APTMS, respectivamente. Conforme Requena et al. (2016) plastificantes impedem a cristalização do PHBHV devido a diminuição das interações entre as cadeias poliméricas. Com isso, essa redução no valor da cristalinidade, juntamente com a redução nos valores de T_g , mostraram o efeito plastificante da inserção dos aminosilanos na superfície das nanopartículas de PHBHV.

5.3.1.4 Espalhamento de Luz dinâmico e eletroforético

Os resultados de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade e potencial zeta obtidos pelas técnicas de espalhamento de luz dinâmico e eletroforético das nanopartículas de PHBHV modificadas por APTMS e APTES, das nanopartículas de PHBHV-diol modificadas por APTMS e APTES e das nanopartículas de PHBHV e PHBHV-diol sem modificação foram apresentados na Tabela 13.

	Antes da modificação			Modificada por APTMS			Modificada por APTES		
Amostras	DP	PDI	Zeta	DP	PDI	Zeta	DP	PDI	Zeta
121T1*	84,58	0,147	-54,60	95,49	0,099	-62,0	113,0	0,099	-52,7
121T2*	131,6	0,145	-63,9	139,10	0,111	-28,50	153,50	0,174	-38,7
22T1**	51,53	0,155	-54,5	63,20	0,173	-39,5	68,85	0,157	-45,6
22T2**	106,9	0,140	-59,8	112,0	0,146	-42,6	125,5	0,432	-47,9

Tabela 12 - Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade e potencial zeta das nanopartículas de PHBHV modificadas por APTMS e APTES, das nanopartículas de PHBHV-diol modificadas por APTMS e APTES e das nanopartículas de PHBHV e PHBHV-diol sem modificação

*PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D = 1,90); ** PHBHV-diol($M_n = 22$ KDa, D = 1,47)

Fonte: Arquivo Pessoal

A partir dos dados da Tabela 13 foi possível observar que, tanto as nanopartículas de PHBHV quanto as de PHBHV-diol, após a modificação com APTMS e com APTES tiveram aumento do diâmetro hidrodinâmico. O aumento do diâmetro hidrodinâmico após a funcionalização pode ter ocorrido devido à perda de estabilidade coloidal, com a heterocoagulação de algumas partículas, e deslocamento do D_h para maiores valores.

Com relação ao potencial zeta, foi possível observar que para a maioria das nanopartículas, após a modificação, ocorreu diminuição do potencial zeta. Apenas para as nanopartículas de PHBHV de menor tamanho, modificada por APTMS (amostra 121T1-APTMS) que essa tendência não foi seguida. A diminuição do valor apresentada pela maioria das nanopartículas modificadas pode ser explicada devido aos grupos funcionais carregados positivamente dos aminosilanos, quando protonados (WITECKA et al., 2012), e a carga negativa da superfície das nanopartículas devido ao surfactante aniônico, reduzindo o valor final do potencial zeta. Mesmo com a redução do valor do potencial zeta obtido para as nanopartículas, este ainda ficou acima ou próximo de -30mV, que é fortemente aniônico, prevenindo a agregação das nanopartículas.

Com relação ao índice de polidispersidade, não foi observada variação significativa após a modificação química das nanopartículas com APTMS e APTES.

5.3.1.5 Microscopia de Força Atômica

A Figura 18 apresenta as micrografias e a distribuição de diâmetros das nanopartículas de PHBHV modificadas por APTMS e APTES obtidas por microscopia de força atômica (AFM).

Figura 18 - Micrografías de microscopia de força atômica (AFM) e distribuição de diâmetros de nanopartículas de PHBHV modificadas por APTMS e APTES



(d)a) 121T1-APTMS; (b)121T1-APTES; (c) 121T2-APTMS; (d)121T2-APTES Fonte: Arquivo Pessoal

Foi possível observar que as nanopartículas de PHBHV modificadas apresentaram formato esférico.

Os valores encontrados para comparação entre o diâmetro hidrodinâmico obtido por DLS (D_h) e o diâmetro de partícula (Dp) obtidos por AFM encontram-se apresentados na Tabela 14.

Tabela 13 - Comparação do diâmetro de partícula obtido por microscopia de força atômica (AFM) (Dp) e diâmetro hidrodinâmico obtido por espalhamento de luz dinâmico (DSL) (D_h) das partículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D = 1,90) modificadas pelos aminosilanos APTMS e APTES

Exp.	D _h (nm)	Dp (nm)
121T1-APTMS	95,49	82,38
121T1-APTES	113,00	101,52
121T2-APTMS	131,60	127,12
121T2-APTES	153,50	151,51

Fonte: Arquivo Pessoal

Para as nanopartículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90) modificadas, tanto por APTMS quanto por APTES, o Dp encontrado foi menor que o D_h. O diâmetro obtido pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, normalmente, é superior ao diâmetro obtido por microscopia de força atômica (AFM), devido à existência de uma camada de hidratação em torno da partícula, enquanto no AFM, a amostra é analisada após secagem, não havendo, portanto, a presença de água no meio. Com isso, os valores de diâmetro de partícula (Dp) encontrados confirmaram os resultados de diâmetro hidrodinâmico obtido por DSL.

Comparando as micrografias das nanopartículas de PHBHV modificadas com APTMS e APTES (Figura 18) e das nanopartículas de PHBHV não modificadas (Figura 12), foi possível perceber que a densidade de partículas é maior para as partículas de PHBHV modificadas com os aminosilanos. Isso pode ter acontecido, pois as análises de AFM são realizadas sobre um suporte contendo lâminas de mica. Conforme pesquisa realizada pelos autores Herder, Vagberg e Stenius (1988) sobre adsorção de aminosilanos em mica, os aminosilanos se ligam através de interação iônica com a mica. Já as partículas sem modificação apresentam pouca adesão a esse substrato, levando a menor densidade de partículas.

5.3.2 Avaliação da estabilidade coloidal das partículas de poli(3-hidroxibutirato-*co*3-hidroxivalerato) modificadas pelos aminosilanos APTMS e APTES

O objetivo desse estudo foi checar a estabilidade coloidal das dispersões de nanopartículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D = 1,90) modificadas por APTMS e APTES.

Esse estudo foi realizado através da medição do diâmetro hidrodinâmico das partículas, do índice de polidispersidade e do potencial zeta das dispersões ao longo do tempo. Os resultados obtidos para o tempo inicial e após 15, 30 e 60 dias encontram-se na Tabela 15.

	Inicial			15 dias		
Exp.	D _h (nm)	PDI	Zeta	D _h (nm)	PDI	Zeta
121T1- APTMS	95,49	0,099	-62,0	91,03	0,135	-46,60
121T1- APTES	113,0	0,099	-52,7	108	0,104	-59,80
121T2- APTMS	139,10	0,111	-28,50	143,10	0,108	-38,30
121T2- APTES	153,70	0,174	-38,7	155,0	0,155	-34,7
		30 dias			60 dias	
Exp.	Dh (nm)	PDI	Zeta	D _h (nm)	PDI	Zeta
121T1-	91,43	0,105	-51,80	88,93	0,087	-47,20
APTMS						
121T1-	106,4	0,117	-26,8	105,40	0,099	-54,10
APTES						
121T2- APTMS	143,60	0,111	-54,5	141,40	0,110	-46,70
121T2- APTES	152,5	0,154	-44,30	157,20	0,185	-49,20

Tabela 14 - Estudo da estabilidade coloidal das dispersões de partículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90) modificadas por APTMS e APTES

121T1-APTMS e 121T1-APTES: NPs de PHBHV ($D_h = 84,58nm$) modificadas com APTMS e APTES, respectivamente; 121T2-APTMS e 121T2-APTES: NPs de PHBHV ($D_h = 131,6nm$) modificadas com APTMS e APTES, respectivamente; Fonte: Arquivo Pessoal

Primeiramente, se analisou a variação dos diâmetros hidrodinâmicos das partículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90) modificadas ao longo do tempo, utilizando a Figura 19.





Fonte: Arquivo Pessoal

Comparando os resultados de D_h iniciais e ao final dos 60 dias, teve-se uma diminuição de 6,9% e 6,7% para os valores de D_h das nanopartículas das amostras 121T1-APTMS e 121T1-APTES e um aumento de 1,7% e 2,3% nos diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas das amostras 121T2-APTMS e 121T2-APTES. Analisando as variações no diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90) modificadas ao longo do tempo, foi possível observar pela Figura 19 que nenhuma das dispersões apresentaram variação significativa do diâmetro com o tempo.

A variação do índice de polidispersidade com o tempo está representada na Figura 20.





Fonte: Arquivo Pessoal

Pela Figura 20 pode-se observar variações do índice de polidispersidade com o tempo, para todas as partículas, mas nenhuma tendência foi observada. Comparando-se os valores iniciais e finais, tem-se uma variação do índice de polidispersidade de 12,1%, 0,0%, 0,9% e 6,3% para as amostras 121T1-APTMS, 121T1-APTES, 121T2-APTMS, 121T2-APTES, respectivamente.

A variação do potencial zeta das nanopartículas de PHBHV modificadas por APTMS e APTES encontra-se na Figura 21.

Figura 21 - Variação do potencial zeta das nanopartículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90) modificadas por APTMS e APTES em função do tempo



Fonte: Arquivo Pessoal

Observando a Figura 21, é possível concluir que o potencial zeta das nanopartículas de PHBHV modificadas por APTMS e APTES apresentou variação ao longo do tempo, mas nenhuma tendência pode ser observada. Também foi possível perceber que a maioria dos resultados de potencial zeta ficaram acima de -30Mv, o que é indicativo da estabilidade coloidal das dispersões.

Além das análises de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade e potencial zeta das dispersões, também foi avaliado se haveria formação de precipitado nas dispersões, o que seria um indicativo da perda da estabilidade coloidal. Para todas as dispersões de nanopartículas de PHBHV modificadas não foi observado a formação de precipitado.

Com isso, através do estudo de estabilidade coloidal, acompanhando a variação do diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersidade, foi possível concluir que as dispersões de nanopartículas de PHBHV ($M_n = 121$ KDa, D= 1,90) modificadas por APTMS e APTES permaneceram estáveis dentro do período avaliado (60 dias).

6 CONCLUSÕES

A presente pesquisa teve como objetivo a síntese de nanopartículas de poli(3hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBHV) modificadas com os aminosilanos 3aminopropiltrietoxisilano (APTES) e 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS). Primeiramente, para atingir o objetivo proposto no trabalho, realizou-se a redução da massa molar do PHBHV via transesterificação com etileno glicol. Através dessa reação de redução, foi possível obter o PHBHV com duas hidroxilas terminais (PHBHV-diol). Após isso, nanopartículas de PHBHV com massa molar de 121KDa foram sintetizadas pelo método de emulsão-evaporação do solvente, tendo como objetivo definir os parâmetros de processo que permitiriam sintetizar dispersões de nanopartículas estáveis coloidalmente, com dois diâmetros de partícula. Nesse estudo foi observado que a variação da quantidade de surfactante teve influência mais significativa na variação do diâmetro hidrodinâmico das partículas. E, o parâmetro que teve maior efeito no índice de polidispersidade foi a alteração da amplitude de sonicação no ultrassom de sonda.

Após a otimização do processo, foram preparadas dispersões de nanopartículas, com dois diâmetros, utilizando o polímero de origem, de maior massa molar (PHBHV) e o polímero obtido na reação de redução de massa molar (PHBHV-diol).

Em uma outra etapa da pesquisa, nanopartículas preparadas com o PHBHV de maior massa molar e com o PHBHV obtido na reação de redução de massa molar (PHBHVdiol) tiveram sua superfície modificada pelos aminosilanos 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) e 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES).

A confirmação da modificação química da superficie das partículas foi realizada por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), em que foi possível encontrar bandas referentes ao grupo amino livre na superficie das nanopartículas, e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) através do aparecimento de sinais referentes a grupos CH₃ do APTMS e CH₂ do APTES. A alteração no espectro de FTIR, devido a modificação química, foi mais evidente para as partículas de menor diâmetro hidrodinâmico e sintetizadas com PHBHV de menor massa molar (PHBHV-diol)

As propriedades térmicas das nanopartículas foram estudadas através da técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC), e percebeu-se que a introdução dos aminosilanos na superfície das nanopartículas levou a diminuição da temperatura de transição vítrea (Tg) devido à diminuição das forças intermoleculares entre as cadeias

poliméricas, aumentando a flexibilidade e mobilidade das cadeias. Também se observou redução na temperatura de fusão (T_m) e cristalinidade. Com os resultados obtidos, foi possível observar o efeito plastificante dos aminosilanos.

A morfologia das nanopartículas foi avaliada por microscopia de força atômica. Foi observado um formato esférico para as nanopartículas de PHBHV de maior massa molar, modificadas ou não, e para as nanopartículas de PHBHV-diol, obtido pela reação de redução de massa molar, tanto para as modificadas quanto para as não modificadas.

A estabilidade coloidal das partículas modificadas por APTMS e APTES foi estudada através da técnica de espalhamento de luz dinâmico, onde foi possível observar variação do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersidade ao longo do tempo. Como a variação não foi significativa, dentro do período avaliado, foi possível concluir que as dispersões de nanopartículas modificadas mantiveram sua estabilidade coloidal.

Com isso, foi possível confirmar a modificação química da superfície das nanopartículas de PHBHV com os aminosilanos APTMS e APTES, permitindo sua utilização em suportes para engenharia de tecidos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar análise estatística do efeito dos parâmetros de processo de síntese das nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) no diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersidade. Os parâmetros de processo variados foram, a concentração do surfactante, velocidade e tempo de homogeneização no agitador Ultra-Turrax, tempo de agitação com agitador magnético, e o tempo e amplitude de sonicação no ultrassom.

- Checar se a cristalinidade do polímero poli(3-hidroxibutirato-co-3hidroxivalerato) foi alterada após a modificação química da superfície com os aminosilanos, via técnica de difração de raios X (DRX);

 Explorar melhor a análise de morfologia e o diâmetro médio das nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) modificadas pelos aminosilanos, via microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Referências

ABDELWAHAB, M. A. et al. Poly[(R)-3-hydroxybutyrate)]/poly(styrene) blends compatibilized with the relevant block copolymer. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, v. 50, p. 5151-5160, 2012.

ARAÚJO, B. B. Componentes da matriz extracelular e seus reguladores no músculo liso brônquico na asma. 2008. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ARMENTANO, I. et al. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, p. 2126-2146, 2010.

ARMSTRONG, L. et al. Editorial: our top 10 developments in stem cell biology over the last 30 years. **Stem Cells**, v. 30, p. 2–9, 2012.

AZIMI, B. et al. Application of the dry-spinning method to produce poly(e-caprolactone) fibers containing bovine serum albumin laden gelatin nanoparticles. J. Appl. Polym. Sci., v. 133, n. 48, p. 1-9, 2016.

BADRI, W. et al. Effect of process and formulation parameters on polycaprolactone nanoparticles prepared by solvent displacement. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 516, p. 238-244, 2017.

BAEI, P. et al. Electrically conductive gold nanoparticle-chitosan thermosensitive hydrogels for cardiac tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 63, p. 131–141, 2016.

BALACHEVA, A. et al. In vitro assessment of the cytotoxic effects of novel RGD analogues. **BioDiscovery**, v. 4, p. 1-6, 2012.

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.

BECKER, A. J.; MCCULLOCH, E. A.; TILL, J. E. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. **Nature**, v. 197, p. 452-454, 1963.

BERNÁ, G. et al. Stem cells and diabetes. Biomed Pharmacother, v. 55, p. 206-212, 2001.

BLAESER, A. et al. Laser-based *in situ* embedding of metal nanoparticles into bioextruded alginate hydrogel tubes enhances human endothelial cell adhesion. **Nano Research**, v. 9, n. 11, p. 3407–3427, 2016.

BORGES, L. F. Matriz extracelular na aorta descendente humana: quantificação morfométrica do colágeno em aortas normais e análise topográfica da matrilisina, estromelisina e plasmina em dissecações e aneurismas não inflamatórios. 2006. 75 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CARDELLINI, A. et al. Thermal transport phenomena in nanoparticle suspensions. J. Phys.: Condens. Matter, v. 28, n. 48, p. 1-17, 2016.

CASSIMIRO, D. L. Caracterização e estudo do comportamento térmico dos adutos flunixina-meglumina e diclofenaco-meglumina. 2010. 136f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, UNESP, Araraquara, 2010.

CHEN, G.; USHIDA, T.; TATEISHI, T. Scaffold design for tissue engineering. **Macromol. Biosci.**, v. 2, p. 67–77, 2002.

CHRIST, G. J. et al. The pharmacology of regenerative medicine. **Pharmacol Rev**, v. 65, p. 1091–1133, 2013.

CLOGSTON, J. F.; PATRI, A. K. Zeta Potential Measurement. In: McNeil S. (eds) **Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery**. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), Humana Press, 2011, vol 697, p. 63 - 70.

COLMÁN, M. M. E. Incorporação de poliestireno em reações de polimerização em miniemulsão. 2008. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

DAAR, A. S. The future of replacement and restorative therapies: from organ transplantation to regenerative medicine. **Transplantation Proceedings**, v. 45, p. 3450-3452, 2013.

DAAR, A. S.; GREENWOOD, H. L. A proposed definition of regenerative medicine. J **Tissue Eng Regen Med**, v. 1, p. 179–184, 2007.

DAGNON, K. L. et al. Poly[(3-hydroxybutyrate)-*co*-(3-hydroxyvalerate)]/layered double hydroxide nanocomposites. **Polym Int**, v. 58, p. 133–141, 2009.

DHANDAYUTHAPANI, B. et al. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. **International Journal of Polymer Science**, v. 2011, ID 290602, p. 1-19, 2011.

DUMONT, V. C. et al. Glycol chitosan/nanohydroxyapatite biocomposites for potential bone tissue engineering and regenerative medicine. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93 (B), p. 1465-1478, 2016.

DYCE, O. H. et al. Integrins in head and neck squamous cell carcinoma invasion. **The Laryngoscope**, v. 112, p. 2025 – 2032, 2002.

EL-GHANNAM, A. R. et al. Model surfaces engineered with nanoscale roughness and RGD tripeptides promote osteoblast activity. **J Biomed Mater Res A**, v. 68, p. 615–627, 2004.

ESSA, S.; RABANEL, J. M.; HILDGEN, P. Characterization of rhodamine loaded PEG-g-PLA nanoparticles (NPs): Effect of poly(ethylene glycol) grafting density. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, p. 178 – 187, 2011.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, p. 154-156, 1981.

FREUDIG, B., TESCH, S.; SCHUBERT, H. Production of emulsions in high-pressure homogenizers – Part II: Influence of cavitation on droplet breakup. **Eng. Life Sci.**, v. 3, p. 266 – 270, 2003.

FUJIMURA, T. et al. Crucial role of fibroblast integrins $\alpha 2$ and $\beta 1$ in maintaining the structural and mechanical properties of the skin. **Journal of Dermatological Science**, v. 45, n. 1, p. 45-53, 2007.

GONG, P.; GRAINER, D. W. Nonfouling surfaces: a review of principles and applications for microarray capture assay design. **Microarrays**, v. 1, p. 59–92, 2007.

GUTERRES, S. S. et al. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, p. 57-63, 1995.

HAUBNER, R.; FINSINGER, D.; KESSLER, H. Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the $\alpha_v\beta_3$ integrin for a new cancer therapy. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 36, p. 1374–1389, 1997.

HERDER, P.; VAGBERG, L.; STENIUS, P. ESCA and Contact Angle Studies of the Adsorption of Aminosilanes on Mica. **Colloids and Surfaces**, v. 34, p. 117-132, 1988/89.

HERSEL, U.; DAHEMEN, C.; KESSLER, H. RGD: modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4385 – 4415, 2003.

HOU, L. et al. A review on biodegradable materials for cardiovascular stent application. **Front. Mater. Sci.**, v. 10, n. 3, p. 238–259, 2016.

JAFARI, S. M.; HE, Y.; BHANDARI, B. Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. Journal of Food Engineering, v. 82, p. 478–488, 2007.

JAYARAMAN, P. et al. Controlled release of drugs in electrosprayed nanoparticles for bone tissue engineering. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 94, p. 77–95, 2015.

JONES, E.; YANG, X. Mesenchymal stem cells and bone regeneration: current status. Int. J. Care Injured, v. 42, p. 562–568, 2011.

KAFFASHI, B.; DAVOODI, S.; OLIAEI, E. Poly(e-caprolactone)/triclosan loaded polylactic acid nanoparticles composite: a long-term antibacterial bionanocomposite with sustained release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 508, p. 10–21, 2016.

KARRI, V. V. S. R. et al. Curcumin loaded chitosan nanoparticles impregnated intocollagenalginate scaffolds for diabetic wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1519–1529, 2016.

KATARI, R.; PELOSO, A.; ORLANDO, G. Tissue engineering and regenerative medicine: semantic considerations for an evolving paradigm. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 2, n. 57, p. 1-6, 2015.

KATHE, N.; HENRIKSEN, B.; CHAUHAN, H. Physicochemical characterization techniques for solid lipid nanoparticles: principles and limitations. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 40, n. 12, p. 1565–1575, 2014.

KE, Y. et al. Comparative degradation study of surface modified polyacrylamide/poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) membranes. **Polymer Science**, v. 57 (B), n. 5, p. 538–546, 2015.

KEMP, P. History of regenerative medicine: looking backwards to move forwards. **Regenerative Medicine**, v. 1, n. 5, p. 653-669, 2006.

KNIGHT, E.; PRZYBORSKI, S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissuelike structures to be created *in vitro*. J. Anat., v. 227, p. 746-756, 2015.

KUO, C.-Y.; et al. Incorporation of chitosan in biomimetic gelatin/chondroitin-6-sulfate/hyaluronan cryogel for cartilage tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 722–730, 2015.

KUROIWA, T. et al. Formulation and stabilization of nano-/microdispersion systems using naturally occurring edible polyelectrolytes by electrostatic deposition and complexation. Advances in Colloid and Interface Science, v. 226 (A), p. 86–100, 2015.

LEE, S. J. et al. One-Step Fabrication of AgNPs Embedded Hybrid Dual Nanofibrous Oral Wound Dressings. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 12, n. 11, p. 2041-2050, 2016.

LEIMANN, F. V. et al. Hydrolysis of poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanoparticles. Journal of Applied Polymer Science, v. 128, p. 3093-3098, 2013.

LEMOIGNE, M. Produit de déshydratation et de polymérisation de l'acid βoxybutyrique. **Bull Soc. Chim. Bi**, v. 8, p. 770-782, 1926.

LEMOS-SENNA, E. et al. Preparation of amphiphilic cyclodextrin nanospheres using the emulsification solvent evaporation method. Influence of the surfactant on preparation and hydrophobic drug loading. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 170, p. 119–128, 1998.

LIMONGI, T. et al. Fabrication and applications of micro/nanostructured devices for tissue engineering. **Nano-Micro Lett.**, v. 9, p. 1, 2017.

LIU, J. et al. PHBV and predifferentiated human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 94 (A), n. 2, p. 603-610, 2010.

LIU, Q. et al. Particular thermal properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) oligomers. **J Polym Res**, v. 19, p. 9756, 2012.

LIU, Q. et al. Reducing the formation of six-membered ring ester during thermal degradation of biodegradable PHBV to enhance its thermal stability. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, p. 18–24, 2009.

LIZUNDIA, E. et al. Physical aging and mechanical performance of poly(L-lactide)/ZnO nanocomposites. J. Appl. Polym. Sci., v. 133, n. 45, p. 1-7, 2016.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from dna to plastic. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 63, n. 1, p. 21-53, 1999.

MEYER, U. The history of tissue engineering and regenerative medicine in perspective In: MEYER, U.; MEYER, T.H; HANDSCHEL, J. WIESMANN, H. P. Fundamentals of tissue engineering and regenerative medicine, Germany: Springer Science & Business Media 2009, p. 1049. ISBN:978-3-540-77754-0

MIYAGI, S. P. H. Análise in vitro da expressão de proteínas da matriz extracelular (MEC) de metaloproteinases da matriz (MMPs) em células-tronco de polpa dentária humana. 2008. 127 f. Tese (doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

MONTORO, S. R. Redução da massa molar do poli-3-hidroxibutirato-co-3hidroxivalerato (PHBHV) para sua posterior utilização no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada. 2005. 209f. Dissertação (Mestrado Engenharia de Materiais) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, SP, 2005.

NAIR, M. B. et al. Composite hydrogel of chitosan–poly(hydroxybutyrate-co-valerate) with chondroitin sulfate nanoparticles for nucleus pulposus tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 84–92, 2015.

OLSSON, D. C. et al. Bone marrow progenitor cells enriched scaffold biological behavior in bone repair. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2403-2412, 2008.

ORLANDO, G. et al. Regenerative medicine and organ transplantation: past, present, and future. **Transplantation**, v. 91, p. 1310–1317, 2011.

PACHECO, D. P. et al. Development of an injectable PHBV microparticles-GG hydrogel hybrid system for regenerative medicine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, p. 398–408, 2015.

PARREIRA, R. C.; RESENDE, R. R. Células-tronco mesenquimais, o que são e de onde vêm? **Nanocell News**, v. 1, n. 2, 2013.

PETER, M. et al. Nanocomposite scaffolds of bioactive glass ceramic nanoparticles disseminated chitosan matrix for tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 284–289, 2010.

REBELO, M. A. et al. Scaffolds and tissue regeneration: an overview of the functional properties of selected organic tissues. J Biomed Mater Res Part B, v. 104 (B), p. 1483–1494, 2016.

REQUENA, R. et al. Effect of plasticizers on thermal and physical properties of compression-moulded poly[(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyvalerate)] films. **Polymer Testing**, v. 56, p. 45-53, 2016.

RIAU, A.K. et al. Surface modification of pmma to improve adhesion to corneal substitutes in a synthetic core-skirt keratoprosthesis. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 7, p. 21690–21702, 2015.

RONCHI, R. P. Avaliação da eficiência do ultrassom no processo de separação de fases em água produzida e em emulsões sintéticas do tipo o/a. 2014. 168 f. Dissertação (Mestrado em Energia) - Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2014.

ROOHANI-ESFAHANI, S. I. et al. Effects of bioactive glass nanoparticles on the mechanical and biological behavior of composite coated scaffolds. Acta Biomaterialia, v. 7, p. 1307–1318, 2011.

RUOSLAHTI, E.; PIERSCHBACHER, M. D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. **Science**, v. 238, p. 491-497, 1987.

SANTOS, A. R.; WADA, M. L. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, p. 308-317, 2007.

SHARMA, R. I.; SCHWARZBAUER, J. E.; MOGHE, P. V. Nanomaterials can dynamically steer cell responses to biological ligands. **Small**, v. 7, n. 2, p. 242–251, 2011.

SHARMA, R. I.; SHREIBER, D. I.; MOGHE, P. V. Nanoscale variation of bioadhesive substrates as a tool. **Tissue Engineering: Part A**, v. 14, p. 1237-1250, 2008.

SHISHATSKAYA, E.I. et al. Experimental wound dressings of degradable PHA for skin defect repair. J Mater Sci: Mater Med, v. 27, p. 165, 2016.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7^a. ed. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, 2006.

SOUGUIR, H. et al. Nanoencapsulation of curcumin in polyurethane and polyurea shells by an emulsion diffusion method. **Chemical Engineering Journal**, v. 221, p. 133-145, 2013

SQUIO, C. R.; ARAGÃO, G. M. F. Estratégias de cultivo para a produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-hidroxibutirato) e poli(3-hidroxibutirato-co-3- hidroxivalerato) por bactérias. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 615-622, 2004.

SUNDARAMURTHI, D.; KRISHNAN, U. M.; SETHURAMAN, S.; Epidermal differentiation of stem cells on poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxybalerate) (phbv) nanofibers. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 42, n. 12, p. 2589–2599, 2014.

TAJBAKHSH, S.; HAJIALI, F. A comprehensive study on the fabrication and properties of biocomposites of poly(lactic acid)/ceramics for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering:** C, v. 70, n. 1, p. 897–912, 2017.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, p. 663–676, 2006.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, 1998.

TSAI, M. L.; BAI, S. W.; CHEN, R. H. Cavitation effects versus stretch effects resulted in different size and polydispersity of ionotropic gelation chitosan–sodium tripolyphosphate nanoparticle. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, 448–457, 2008.

ULLAH, I.; SUBBARAO, R. B.; RHO, G. J. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. **Bioscience Reports**, v. 35, e00191, 2015.

VANSANT, E. F.; VAN DER VOORT, P.; VRANCKEN, K. C. Characterization and chemical modification of the silica surface. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 93, p. 149-192, 1995.

VERGNOL, G. et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of a polylactic acid-bioactive glass composite for bone fixation devices. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 104 (B), n. 1, p. 180 – 191, 2016.

VERT M. et al. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. **J Mater Sci**, v. 3, n. 6, p. 432-466, 1992.

WANG, Y. Bioadaptability: An innovative concept for biomaterials. Journal of Materials Science & Technology, v. 32, p. 801–809, 2016.

WANG, Y. et al. Differences in cytocompatibility between collagen, gelatin and keratin. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 30-34, 2016.

WATT, F. M.; HOGAN, B. L. Out of the Eden: stem cells and their niches. **Science**, v. 287, p. 1427-1430, 2000.

WEISSMAN, I. L. Clonal origins of the hematopoietic system: the single most elegant experiment. J. Immunol, v. 192, p. 4943-4944, 2014.

WITECKA, A. et al. Surface characterization and cytocompatibility evaluation of silanized magnesium alloy AZ91 for biomedical applications. Science and Technology of Advanced Materials, v. 13, n. 6, p. 1-6, 2012.

WOLF, S.; FELDMANN, C. Microemulsions: options to expand the synthesis of inorganic nanoparticles. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 55, p. 15728 – 15752, 2016.

XU, Z.; LIU, Q.; FINCH, J. A. Silanation and stability of 3-aminopropyl triethoxy silane on nanosized superparamagnetic particles: I. Direct silanation. **Applied Surface Science**, v. 120, p. 269-278, 1997.

YU, J. Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. Journal of Biotechnology, v. 86, p. 105–112, 2001.

YUKUYAMA, M. N. et al. Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics – a review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 38, p. 13–24, 2016.

ZANETTI-RAMOS, B. et al. The effect of polyethylene glycol on drug content, particle morphology and carbamazepine release profiles of sustained release microspheres prepared from cellulose acetate butyrate. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 177-183, 2006.

ZHU, X. H.; WANG, C.; TONG, Y. W. Growing tissue-like constructs with hep3b/hepg2 liver cells on phbv microspheres of different sizes. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, v. 82, n. 1, p. 7-16, 2007.

ZHU, X. H.; WANG, C.; TONG, Y. W. In vitro characterization of hepatocyte growth factor release from PHBV/PLGA microsphere scaffold. Journal of Biomedical Materials Research Part A, v. 89, n. 2, p. 411 – 423, 2009.

ZOU, P. et al. Surface dextran modified electrospun poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) fibrous scaffold promotes the proliferation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Materials Letters**, v. 179, p. 109 - 113, 2016.