UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIAS DE MATERIAIS

NATÁLIA FERREIRA BRAGA

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS ESTRUTURAIS BASEADOS EM POLI (3-HIDROXIBUTIRATO-CO-HIDROXIVALERATO) E NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO PARA O EMPREGO EM ENGENHARIA TECIDUAL

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
2015

NATÁLIA FERREIRA BRAGA

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS ESTRUTURAIS BASEADOS EM POLI (3-HIDROXIBUTIRATO-CO-HIDROXIVALERATO) E NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO PARA O EMPREGO EM ENGENHARIA TECIDUAL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Engenharia e Ciências de Materiais
Orientação: Prof. Dr. Fernando Henrique Cristovan
Co-orientadora: Profa. Dra. Tatiane Moraes Arantes

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
2015

Braga, Natália Ferreira.

Preparação e caracterização de nanocompósitos estruturais baseados em poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) e nanopartículas de dióxido de titânio para o emprego em engenharia tecidual / Natália Ferreira Braga – 2015.
1 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo, Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2015.
Orientação: Prof. Dr. Fernando Henrique Cristovan.

1. Polímeros biodegradáveis. 2. Poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato). 3. Dióxido de titânio. 4. Nanocompósitos. 5. Engenharia tecidual.

I. Fernando Henrique Cristovan. II. Preparação e caracterização de nanocompósitos estruturais baseados em poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) e nanopartículas de dióxido de titânio para o emprego em engenharia tecidual.

NATÁLIA FERREIRA BRAGA

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS ESTRUTURAIS BASEADOS EM POLI (3-HIDROXIBUTIRATO-CO-HIDROXIVALERATO) E NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO PARA O EMPREGO EM ENGENHARIA TECIDUAL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Engenharia e Ciências de Materiais

Aprovação: 30 / 10 / 15

Fernando H. Cristovan

Prof. Dr. Fernando Henrique Cristovan
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo
Universidade Federal de São Carlos

Tada

Profa. Dra. Dayane Batista Tada
Universidade Federal de São Paulo

Lilia M. Guerrini

Profa. Dra. Lilia Müller Guerrini
Universidade Federal de São Paulo

Dedico este trabalho

Aos meus pais Milton e Sandra.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as coisas.

Ao Prof. Dr. Fernando Cristovan pela orientação e por todos os ensinamentos.

A minha co-orientadora e amiga Prof. Dra. Tatiane Arantes pelo apoio dedicado, discussões e sugestões deste trabalho.

Ao programa de pós-graduação em Engenharia e Ciência de Materiais da Universidade Federal de São Paulo, pela oportunidade de realização do mestrado.

A Prof. Dra. Ana Paula Lemes pelo empréstimo do PHBV.

A Prof. Dra. Dayane Tada e os alunos Wagner e Daniela pelas análises de crescimento de células.

Aos amigos da UFSCar e ao LIEC pelas análises de HRTEM.

Ao prof. Fábio Passador pelas análises de DMA.

Ao Daniel, Karina e Profa. Lilia Guerrini pela ajuda na eletrofiação dos nanocompósitos.

Aos professores por terem aceitado o convide para participar da banca de defesa.

A FAPESP pela bolsa de mestrado.

Aos meus pais, meu namorado e todos meus familiares, pela paciência, apoio e por todo amor.

E a todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

Natália Ferreira Braga

Formação:

Engenharia de Materiais – ênfase em materiais poliméricos

(01/2008 – 12/2012)

Universidade Presbiteriana Mackenzie

Produção Científica:

- Projetos desenvolvidos: Preparação e Caracterização de Nanocompósitos Estruturais de Polímeros Biocompatíveis com nanopartículas de TiO_2 para o emprego em Engenharia Tecidual.

Período: 01/03/2014 a 29/02/2016

Agência Financiadora: FAPESP (2013/14954-6)

- Artigos completos publicados em periódicos:

MARINHO, JULIANA FRANÇA; **BRAGA, NATÁLIA FERREIRA**; KROHN, ANNELISE; MYATA, FERNANDA SALVIANO; SILVEIRA, LUIZ HENRIQUE; CABRAL NETO, ABNER; FECHINE, GUILHERMINO JOSÉ MACÊDO. **Melt processing of polymer biocomposites**. *Polímeros*, v. 25, p. 133-136, 2015.

- Resumos publicados em congressos:

1. BRAGA, N. F.; ARANTES, T. M.; LEMES, A. P.; CRISTOVAN, F. H. Preparation and characterization of PHBV- TiO_2 nanocomposites for the use in tissue engineering. In: SBPMat, 2014, João Pessoa. XIII Encontro da SBPMat, 2014. Apresentação de Pôster.

2. BRAGA, N. F.; ARANTES, T. M.; LEMES, A. P.; CRISTOVAN, F. H. Study of Poli(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-TiO_2 nanocomposites for application in biomaterials. In: MRS Fall Meeting and Exhibit, 2014, BOSTON. MRS Fall Meeting and Exhibit, 2014. Apresentação de Pôster.

3. BRAGA, N. F.; ARANTES, T. M.; CRISTOVAN, F. H. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) - TiO_2 nanocomposites processed by solvent casting and electrospinning. In: SBPMat, 2015, Rio de Janeiro. XIV Encontro da SBPMat, 2015. Apresentação de Pôster.

4. BRAGA, N. F.; RAMOS, W.; FORMAGGIO, D.; ARANTES, T. M.; TADA, D. B.; CRISTOVAN, F. H. Evaluation of cell viability of PHBV/TiO_2 nanocomposites used as scaffolds in tissue engineering. In: SBPMat, 2015, Rio de Janeiro. XIV Encontro da SBPMat, 2015. Apresentação Oral.

RESUMO

Preparação e caracterização de nanocompósitos estruturais baseados em poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) e nanopartículas de dióxido de titânio para o emprego em engenharia tecidual

Neste trabalho foram desenvolvidos nanocompósitos baseados em poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) e dióxido de titânio (TiO_2), por meio de três diferentes técnicas: *casting*, eletrofiação e *spin coating*. Para tanto, foram sintetizadas nanopartículas de TiO_2 pelo tratamento hidrotérmico do gel PCT (peroxo complexo de titânio). As nanopartículas apresentaram um formato de bastões com diâmetro médio de 12 nm e comprimento médio de 40 nm com predominância da fase cristalográfica rutilo. Posteriormente, foram preparados nanocompósitos de PHBV com diferentes proporções de nanopartículas de TiO_2 (1%, 2,5% e 5% m/m) e comparados ao polímero puro quanto as suas propriedades físico-químicas e termomecânicas. As nanopartículas catalisaram o processo de fotodegradação e de biodegradação da matriz polimérica do PHBV. As análises de DSC mostraram que a Tg do material diminui com a inserção de TiO_2 e por meio do TGA revelaram que a temperatura de degradação é menor nos nanocompósitos comparadas ao polímero puro. Enquanto que, análises de DMA indicaram que ocorreu um aumento nas propriedades de amortecimento dos nanocompósitos em relação ao PHBV. Por fim, foram preparadas mantas por meio da eletrofiação, para verificar a viabilidade celular destes nanocompósitos. Análises de MEV mostraram a formação de fibras contínuas interconectadas, sendo assim candidatos para o emprego na engenharia tecidual. O estudo da viabilidade celular dos nanocompósitos mostrou que as células cultivadas sobre as mantas de PHBV apresentaram uma boa adesão e taxa de multiplicação celular e que o tratamento com TiO_2 aumentou o crescimento celular. Membranas preparadas pela técnica de *spin-coating* apresentaram espessura muito fina que variou de 3,8 μm até 9,1 μm.

Palavras-chave: Polímeros biodegradáveis. Poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato). Dióxido de titânio. Nanocompósitos. Engenharia de tecidos.

ABSTRACT

Preparation and characterization of structural nanocomposites based on poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and titanium dioxide nanoparticles for use in tissue engineering

In this work it was developed nanocomposites based on poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV) and titanium dioxide (TiO_2), by means of three different techniques: casting, electrospinning, and spin-coating. Therefore, the TiO_2 nanoparticles were synthesized by hydrothermal treatment of PCT gel (titanium peroxo complex). The nanoparticles had a rod format with average diameter of 12 nm and an average length of 40 nm with predominantly of rutile crystallographic phase. Subsequently, PHBV nanocomposites were prepared with different proportions of TiO_2 nanoparticles (1%, 2.5% and 5% w/w) and compared with the neat polymer as its physical-chemical and thermal properties. In general, the nanoparticles catalyzed the process of biodegradation and photo-degradation of the PHBV polymer matrix. DSC analysis showed that the Tg of the material decreases with the inclusion of TiO_2 and by TGA revealed that the degradation temperature is smaller in nanocomposites compared to pure polymer. While, DMA analysis indicated that there was an increase in the damping properties of the nanocomposites compared to PHBV. Finally, mats were prepared by electrospinning to verify cell viability of the nanocomposites. SEM analyzes showed the formation of interconnected continuous fibers, so candidates for use in tissue engineering. Thus, the study of cell viability was conducted in the nanocomposites, which showed that the cells growth on PHBV mats showed good cell adhesion and proliferation rate and, in general, treatment with TiO_2 increased cell growth. Membranes prepared by spin-coating technique showed very thin thickness that ranged from 3.8 μm to 9.1 μm.

Keywords: Biodegradable polymers. Poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate). Titanium dioxide. Nanocomposites. Tissue engineering.

SUMÁRIO

1. Introdução 1

2. Revisão de Literatura 5

2.1. Polímeros Biodegradáveis 5

2.2 Dióxido de Titânio 8

2.2.1 Mecanismo de formação das nanopartículas 10

2.3 Método de síntese das nanopartículas 12

2.4 Nanocompósitos poliméricos 13

2.4.1 Métodos de síntese de nanocompósitos 15

3. Objetivos 17

3.1 Objetivo Geral 17

3.2 Objetivos Específicos 17

4. Materiais e Métodos 18

4.1 Materiais 18

4.2 Síntese das nanopartículas de dióxido de titânio 18

4.3 Preparação dos nanocompósitos 19

4.3.1 Processamento por *Casting* 19

4.3.2 Processamento por Eletrofiação 20

4.3.3 Processamento por *Spin Coating* 21

4.4 Fotodegradação 22

4.5 Testes de biodegradação 22

4.5.1 Teste de biodegradação em meio líquido 23

4.5.2 Teste de biodegradação no solo 24

4.6 Ensaio de crescimento de células 26

4.6.1 Cultivo celular 26

4.6.2 Teste de proliferação celular 26

4.7 Caracterizações 27

4.7.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) 27

4.7.2 Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) 27
4.7.3 Difração de raios X (DRX) 27
4.7.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR) 27
4.7.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) 28
4.7.6 Análise Termogravimétrica (TGA) 28
4.7.7 Análise Dinâmico – Mecânica (DMA) 28
4.7.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 28
5. Resultados e discussões 29
5.1 Síntese das nanopartículas de dióxido de titânio 29
5.1.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET e Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução – HRTEM 31
5.1.2 Difração de Raios X – DRX 35
5.2 Preparação dos nanocompósitos pela técnica de *Casting* 38
5.2.1 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho – FTIR 39
5.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial - DSC 40
5.2.3 Análise Termogravimétrica - TGA 45
5.2.4 Análise Dinâmico – Mecânica - DMA 47
5.3 Estudo de Fotodegradação 51
5.4 Biodegradação em meio líquido 54
5.5 Biodegradação no solo 56
5.6 Eletrofiação 60
5.7 Crescimento Celular 63
5.8 *Spin coating* 65
6. Conclusões 70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Grânulos de PHB no interior da célula [41]. 6
Figura 2. Fórmula estrutural do poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato). 7
Figura 3. Estruturas cristalinas do dióxido de titânio [51]. 8
Figura 4. Modelo de Lamer e Dinegar proposto para o crescimento das nanopartículas [64]..... 12
Figura 5. Esquema ilustrativo das vias *top down* e *bottom up* para obtenção de nanopartículas [68]. 13
Figura 6. Métodos de síntese de nanocompósitos: I) Simples mistura dos componentes; II) Síntese das nanopartículas *in situ* e III) Polimerização de matriz *in situ* [77]..... 16
Figura 7. Esquema ilustrativo do preparo de nanocompósitos pela técnica de *casting*.. 20
Figura 8. Sistema de eletrofiação utilizado. 20
Figura 9. Os quatro estágios do processo de *spin coating* [97]. 21
Figura 10. Amostra inserida no meio líquido para teste de biodegradação. 24
Figura 11. Amostras inseridas na terra para teste de biodegradação no solo. 25
Figura 12. Reação de início da formação do peroxo complexo titânio. 29
Figura 13. Processo de preparo das nanopartículas de TiO_2 a partir do gel PCT. 30
Figura 14. MET das nanopartículas de TiO_2 método 4 de síntese. 32
Figura 15. Histograma distribuição do tamanho médio das nanopartículas. 33
Figura 16. Orientação cristalográfica da fase rutilo do TiO_2, a) um cristal; b) cristais aglomerados. 35
Figura 17. Difratograma de raios X das amostras de TiO_2. 36
Figura 18. Fotos ilustrativas dos filmes preparados pela técnica de *casting*. (a) PHBV; (b)PHBV/TiO_2 1%; (c) PHBV/TiO_2 2.5%, (d) PHBV/TiO_2 5%. 39
Figura 19. Espectro de infravermelho do PHBV e dos nanocompósitos. 40
Figura 20. Curvas DSC do 1° aquecimento do PHBV e nanocompósitos. 42
Figura 21. Curvas DSC do resfriamento do PHBV e dos nanocompósitos de PHBV/TiO_2. 43
Figura 22. Curvas DSC do 2° aquecimento do PHBV e nanocompósitos. 45
Figura 23. (a) curvas TGA e (b) DTG do PHBV e dos nanocompósitos PHBV/TiO_2. .. 46
Figura 24. Medidas de DMA para o PHBV puro e os nanocompósitos PHBV/TiO_2: (a) módulo de armazenamento, E'; (b) módulo de perda, E". 49
Figura 25. Medidas de DMA: Tan δ. 49

Figura 26. Amostras de PHBV, PHBV/TiO_2 1%, PHBV/TiO_2 2.5%, PHBV/TiO_2 5% antes (acima) e depois da fotodegradação. 52
Figura 27. FTIR do PHBV e dos nanocompósitos submetidos à fotodegradação. 53
Figura 28. Esquema da geração de espécies de oxigênio ativas na superfície do dióxido de titânio [64]..... 54
Figura 29. Perda de massa das amostras submetidas ao teste de biodegradação no meio líquido. 55
Figura 30. Amostras de PHBV submetidas ao ensaio de biodegradação no solo (0, 5, 10, 15 e 20 dias). 57
Figura 31. Detalhe da terra aderida na amostra. 57
Figura 32. Amostras do nanocompósito PHBV/TiO_2 1% submetidas ao ensaio de biodegradação no solo e controle. 57
Figura 33. Amostras do nanocompósito PHBV/TiO_2 2,5% submetidas ao ensaio de biodegradação no solo e controle. 58
Figura 34. Amostras do nanocompósito PHBV/TiO_2 5% submetidas ao ensaio de biodegradação no solo e controle. 58
Figura 35. Perda de massa das amostras submetidas ao teste de biodegradação no solo. 59
Figura 36. MEV eletrofiação a)PHBV; b)NC 1%; c)NC 2,5% e d) NC 5%. 61
Figura 37. MEV das amostras de eletrofiação do PHBV e dos nanocompósitos: (a) PHBV puro, (b) PHBV/TiO_2 1%, (c) PHBV/TiO_2 2,5%, (d) PHBV/TiO_2 5% e histogramas do diâmetro das fibras. 62
Figura 38. Viabilidade celular de células MEF cultivadas sobre amostras de PHBV modificado com nanopartículas de dióxido de titânio em diferentes concentrações e PHBV não modificado. Resultados expressos como % da viabilidade celular. 64
Figura 39. Filmes finos preparados pela técnica de *spin-coating* (a) PHBV; (b) PHBV/TiO_2 1%; (c) PHBV/TiO_2 2,5%, (d) PHBV/TiO_2 5%. 66
Figura 40. Imagens MEV da superfície de fratura das amostras de *spin coating* (a) PHBV; (b) PHBV/TiO_2 1%; (c) PHBV/TiO_2 2,5% e (d) PHBV/TiO_2 5%. 67
Figura 41. Microscopia da superfície das membranas de *spin-coating* A)PHBV; B)NC 1%; C)NC 2,5% e D)NC 5%. 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Planejamento fatorial da síntese do dióxido de titânio. 19
Tabela 2. Tamanho médio das nanopartículas de TiO_2 em função das diferentes condições de síntese..... 34
Tabela 3. Quantidade de fases anatase e rutilo. 37
Tabela 4. Domínio de coerência cristalográfica para alguns planos da anatase. 38
Tabela 5. Domínio de coerência cristalográfica para alguns planos do rutilo. 38
Tabela 6. Propriedades térmicas do PHBV e dos nanocompósitos. 41
Tabela 7. Resultados de TGA para o polímero puro e os nanocompósitos. 47
Tabela 8. Valores do módulo de armazenamento (E') do PHBV e dos nanocompósitos. 48
Tabela 9. Propriedades de amortecimento calculadas para o PHBV e para os nanocompósitos com diferentes teores de dióxido de titânio. 50
Tabela 10. Perda de massa das amostras de PHBV e dos nanocompósitos submetidos ao teste de biodegradação no meio líquido a 30°C sob 120 rpm de agitação. 56
Tabela 11. Perda de massa das amostras de PHBV e dos nanocompósitos submetidos ao teste de biodegradação no solo a 28°C. 59
Tabela 12. Espessura dos filmes poliméricos obtidos por *spin coating*. 67

LISTA DE ABREVIAÇÕES

PHBV – Poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)

HB – Hidroxibutirato

HV – Hidroxivalerato

PHB – Poli (hidroxibutirato)

PHA – Poli (hidroxialcanoatos)

PLA – Poli (ácido láctico)

PLGA – Poli (ácido láctico-co-glicólico)

PCL - Policaprolactona

PLLA – Poli (ácido-L-lático)

PMMA – poli(metilmetacrilato)

PCT – Peroxo complexo de titânio

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

HRTEM – Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução

DRX – Difração de raios-X

FTIR – Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

DSC – Calorimetria exploratória diferencial

TGA - Análise Termogravimétrica

DMA – Análise Dinâmico – Mecânica

NC – Nanocompósitos

DMF - Dimetilformamida

MEF – Fibroblasto embrionário de murinos

$\mathbf{T_m}$ **–** Temperatura de fusão

$\mathbf{T_c}$ **–** Temperatura de cristalização

$\mathbf{T_g}$ **–** Temperatura de transição vítrea

$\mathbf{T_{cc}}$ **–** Temperatura de cristalização a frio

ΔHm – Entalpia de fusão

ΔHc – Entalpia de cristalização

%C – Grau de cristalinidade

E' – Módulo de armazenamento

E" – Módulo de perda

Tan δ - Amortecimento

LA - Área sob o módulo de perda

TA - Área abaixo da curva da tan δ

Ea_{AV} – Energia de ativação

1. Introdução

O avanço da medicina proporcionou um aumento na expectativa de vida humana, e como consequência ocorre o aumento de doenças relacionadas à terceira idade. Destacando-se as doenças relacionadas com o tecido ósseo como a osteoporose, a perda de massa óssea por atrofia, o câncer, entre outras, como desgaste de cartilagem. O tratamento das perdas ósseas é realizado com enxertos, tais como os autógenos (do mesmo paciente), os alógenos (da mesma espécie), os xenoenxertos (de diferentes espécies) e os biomateriais. Um biomaterial pode ser considerado qualquer substância natural ou sintética, que não seja droga, podendo tratar, substituir ou aumentar, quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo [1–6]. O uso de biomateriais apresenta inúmeras vantagens das quais se destacam: redução da possibilidade de contaminação cruzada, redução do risco de rejeição, e quando o material é também biorreabsorvível, elimina uma segunda intervenção cirúrgica [5,6].

É interessante definir materiais biorreabsorvíveis e bioabsorvíveis. Segundo Vert et al. [7], biorreabsorvíveis são materiais poliméricos que mostram degradação através da diminuição do tamanho e são eliminados por rotas metabólicas do organismo. Bioabsorvível são materiais poliméricos que podem se dissolver em fluido corpóreo sem clivagem da cadeia macromolecular.

Quando a estrutura biológica de um órgão ou tecido não pode ser reparada, a alternativa viável para o restabelecimento das funções normais do paciente é repô-la com um implante feito de um biomaterial [1]. Em função do tempo de permanência no corpo humano, os implantes podem ser classificados em permanentes ou temporários. Implantes permanentes quase sempre geram fenômenos crônicos de inflamação, sendo uma resposta tipicamente benigna a um corpo estranho, mas que podem conduzir a complicações clínicas mais severas, como a contração dos tecidos. Dentre os materiais utilizados como implantes, os polímeros apresentam grande potencial, pois são, geralmente, fáceis de produzir, manusear e apresentam características mecânicas semelhantes aos dos materiais biológicos [2].

Inicialmente, os biomateriais foram desenvolvidos para que permanecessem inertes no organismo. Sendo assim, os estudos se voltaram para a forma de se prevenir ou minimizar as reações teciduais indesejáveis. Atualmente, os novos polímeros são concebidos para que haja uma efetiva interação com os tecidos, provocando respostas

fisiológicas como crescimento e/ou diferenciação celular no sítio de implantação [2]. Os implantes temporários, confeccionados de polímeros biorreabsorvíveis, ganharam uma importância crescente na área médica, sendo utilizados em um amplo número de aplicações no corpo humano, tais como: suturas cirúrgicas [8], sistemas para liberação controlada de drogas [9], *stents* [10] e dispositivos ortopédicos [11], que atualmente fazem parte do cotidiano dos centros cirúrgicos no mundo inteiro. A ideia da reconstrução de órgãos e tecidos criados em laboratório é amplamente difundida e investigada [5,6].

A técnica, conhecida como Engenharia de Tecidual, consiste na regeneração de órgãos e tecidos vivos, por meio do recrutamento de tecido do próprio paciente, que são dissociados em células e cultivados sobre suportes biológicos ou sintéticos, conhecidos como *scaffolds* (suportes, matrizes tridimensionais, arcabouços, estruturas, etc), para então serem reinseridos no paciente. Como uma ciência multidisciplinar, os trabalhos envolvem conhecimentos das áreas de biologia, ciências da saúde, química, de engenharia e ciência dos materiais [12,13].

Apesar do avanço tecnológico no desenvolvimento de novos materiais, ainda existe uma escassez em biomateriais, biorreabsorvíveis e/ou biodegradáveis. Para atender a necessidade de aumentar a qualidade de vida, diretamente relacionada ao envelhecimento da população, esses materiais devem ser capazes de guiar processos de restauração da funcionalidade dos tecidos afetados, além de serem biocompatíveis, ou seja, não conduzirem a processos danosos ao organismo. Assim, à medida que o tecido é formado, não haveria a necessidade da presença do biomaterial. Esta ideia de conduzir o processo de regeneração do tecido levou ao estabelecimento da engenharia tecidual, que por sua vez, força o estabelecimento de novas estratégias de criação de novos biomateriais.

Para a engenharia tecidual são utilizados suportes biorreabsorvíveis ou biodegradáveis que tenham a taxa de absorção controlada, além de exibirem propriedades mecânicas e físicas controladas sobre condições desejadas. Estes suportes são formados por polímeros biorreabsorvíveis ou biodegradáveis, devido à similaridade química e estrutural. Entretanto, reabsorções de diferentes tipos de polímeros podem ocorrer dependendo das interações das espécies e da adesão intermoleculares, as quais induzem um diferente aspecto no ataque hidrolítico e quebra que irão caracterizar mudanças nos efeitos do comportamento da degradação final.

Dentre os polímeros biodegradáveis visando aplicações biológicas, os mais estudados são: policaprolactona [14], poli(ácido lático) [15], dentre outros [16]. Os PHA - poli(3-hidroxialcanoatos) são compostos por uma série de poliésteres oticamente ativos que possuem comportamento semelhante à de polímeros convencionais. Desta família, o polímero mais estudado é o poli(3-hidroxibutirato) (PHB) [17–19]. Mas o poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) está se tornando um dos mais promissores polímeros biodegradáveis. O PHBV é um copolímero semicristalino de cadeia linear, que apresenta unidades hidroxibutirato (HB), em maior proporção, e unidades hidroxivalerato (HV) em menor proporção. Assim como os demais PHA, o PHBV é produzido por um grande número de bactérias.

O interesse nesse copolímero se baseia no fato dele apresentar melhores propriedades mecânicas e físicas se comparado ao homopolímero PHB [20]. O PHBV possui um menor ponto de fusão, menor grau de cristalinidade, maior ductilidade, flexibilidade, facilidade para moldagem e maior janela de processamento em relação ao PHB [21]. Dessa forma, devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e as semelhanças com as propriedades dos termoplásticos convencionais, o PHBV possui um grande potencial de aplicação na área médica, como matriz de sistemas de liberação controlada de drogas, suturas, suporte para crescimento de tecidos, próteses e seringas [22–24].

Contudo, o material de implante em substituição ao osso, além de ser biocompatível, também deve possuir a resistência biofuncional, mecânica e química necessária para suportar as cargas impostas. E neste sentido, a utilização de materiais nanocompósitos entre polímeros e nanopartículas de cerâmicas biocompatíveis possibilita a associação da flexibilidade dos materiais poliméricos com a resistência mecânica à compressão das cerâmicas, tudo isso se associando a biocompatibilidade necessária para ambas as fases. Além disso, a presença de uma segunda fase nanométrica, como o dióxido de titânio, pode melhorar a bioatividade, pois devido à presença de grupos hidroxila superficiais (OH) podem facilitar as interações intermoleculares quando aplicados em meios biológicos. Estas características favorecem a adesão celular na superfície dos substratos, dando melhores condições aos processos de osseoindução, de osseointegração e da reparação de tecidos ósseos [25,26].

Existe uma relação entre a hidrofilicidade do substrato e a adesão celular. A inserção de nanopartículas de dióxido de titânio promove um aumento da hidrofilicidade da superfície da matriz. Dentro de certos parâmetros, substratos mais

hidrofílicos aumentam a interação da matriz polimérica com as células e consequentemente melhoram sua integração ao tecido ósseo [14,27,28]. Deste modo, a adesão celular é de extrema importância para a ciência dos biomateriais. Além disso, atribui-se à camada de dióxido de titânio formada naturalmente na superfície dos implantes de titânio à sua biocompatibilidade e osseointegração, pois esta camada proporciona a nucleação superficial da hidroxiapatita [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$], que é o constituinte mineral do osso, e desta forma favorece a integração óssea. Este favorecimento deve-se aos grupos hidroxila superficiais do dióxido de titânio, que apresentam carga superficial negativa atraindo os íons cálcio iniciando assim a nucleação da hidroxiapatita [29,30].

Os biomateriais contendo dióxido de titânio apresentam alta pureza, trazendo baixo risco de reação imunológica ou tóxico, infecções ou degradação proteica. Contudo, apresentam uma baixa resistência à tração, ao impacto e a fadiga, embora altas resistências possam ser conseguidas controlando-se o grau de porosidade e espessura do implante [31,32]. As nanopartículas de dióxido de titânio quando utilizada como reforço em materiais poliméricos, com formato de bastões e fibras, permite que sejam acentuados suas vantagens, tais como biocompatibilidade, inércia química, resistência à corrosão e alta resistência à compressão, e diminua suas desvantagens, por exemplo, baixa resistência ao impacto, alta densidade e dificuldade de fabricação de formatos complexos [33].

Neste projeto, foi proposto a preparação de nanocompósitos de PHBV com nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2) visando sua aplicação como *scaffolds* para serem empregados em engenharia tecidual. As vantagens deste tipo de material são inúmeras, uma vez que o PHBV seria facilmente degradado nos organismos, e as nanopartículas de TiO_2 catalisaria o processo de osseointegração. Adicionalmente, os nanocompósitos promoveriam um aumento da adesão e proliferação de células no *scaffold*.

2. Revisão de Literatura

2.1. Polímeros Biodegradáveis

O impacto ecológico gerado pela grande quantidade de resíduos poliméricos lançados ao meio ambiente faz com que se torne necessária a combinação de alternativas tecnológicas complementares como reciclagem, incineração e biodegradação [34,35]. Porém, a reciclagem ou a incineração constituem de métodos difíceis e/ou economicamente inviáveis, ou de grande impacto ambiental. No que se refere a este problema, a biodegradação surge como uma técnica promissora, estimulando o estudo e o desenvolvimento de novos materiais que sejam funcionais enquanto em uso, mas que após o período útil possam ser degradados em condições ambientais [36]. Isto porque, os polímeros derivados de produtos petroquímicos são resistentes à degradação microbiana. O excessivo tamanho molecular é um dos principais responsáveis pela resistência química à biodegradação e pela sua permanência no solo por um longo tempo [37].

Deste modo, os problemas gerados pelo grande consumo de polímeros convencionais derivados do petróleo têm impulsionado o desenvolvimento da produção e aplicação de polímeros biodegradáveis. A biodegradabilidade de um material é definida como sendo a capacidade dele em ser decomposto pela ação de agentes vivos, como microrganismos. Bactérias e fungos são os principais agentes no processo de biodegradação na natureza [31]. Muitos polímeros biodegradáveis, sintéticos ou naturais foram propostos e testados para aplicações industriais, entre os quais, destacam-se os poli(hidroxialcanoatos) (PHA), uma série de poliésteres opticamente ativos que possuem comportamentos semelhantes aos termoplásticos convencionais. Os PHA ganharam um interesse particular devido sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e, principalmente, devido sua semelhança com os termoplásticos convencionais [38].

Os PHA são sintetizados por uma série de microrganismos como reserva intracelular de carbono e energia. O seu acúmulo se dá no citoplasma da célula sob a forma de grânulos. A quantidade de grânulos pode chegar a 90% em peso de célula seca, e sua produção ocorre por meio de fermentação sob condições restritas de alimentação [31,32,39]. A primeira determinação da composição de um PHA ocorreu em 1927, no trabalho de um cientista francês, Maurice Lemoigne. Foi em um bacilo de

solo que a degradação anaeróbica de um material desconhecido resultou na excreção do ácido 3-hidroxibutirato. Lemoigne identificou esse material desconhecido como sendo um homopoliéster de hidroxiácido, 3-hidroxibutirato, ou poli(3-hidroxibutirato) (PHB) descrevendo-o, experimentalmente como um material de reserva [18,19,40].

O PHB poli(3-hidroxibutirato) encontra-se nas bactérias aeróbicas e nas cianobactérias [41]. Tal polímero, em condições apropriadas de cultivo bacteriano, é acumulado na forma de grânulos intracelulares (Figura 1), os quais podem ser separados e removidos após a lise celular gerando uma resina com propriedades semelhantes às dos plásticos petroquímicos, com a vantagem de ser biodegradado no ambiente por microrganismos nele existente [42].

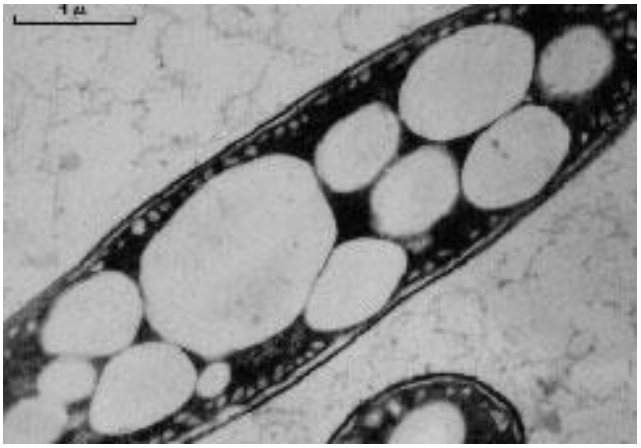


Figura 1. Grânulos de PHB no interior da célula [41].

Posteriormente, em 1972 foi isolado um poliéster com propriedades físicas e químicas similares àquelas do PHB. Análises posteriores revelaram a presença do ácido 3-hidroxivalerato (3HV) e 3-hidroxibutirato [31,35]. O PHBV, poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) é um copolímero semicristalino de cadeia linear, que apresenta unidades hidroxibutirato (HB) em maior proporção, e unidades hidroxivalerato (HV) em menor proporção (Figura 2). Assim como os demais PHA, o PHBV é produzido por um grande número de bactérias [43,44].

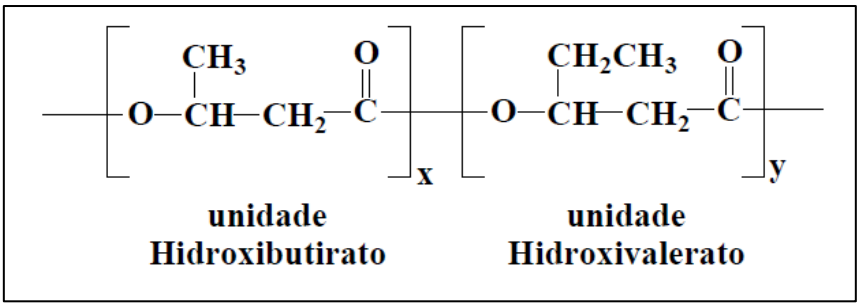


Figura 2. Fórmula estrutural do poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato).

O interesse nesse copolímero baseia-se no fato dele apresentar melhores propriedades mecânicas e físicas se comparado ao homopolímero PHB [20]. O PHBV possui menor ponto de fusão, menor grau de cristalinidade, maior ductilidade, flexibilidade, facilidade para moldagem e maior janela de processamento em relação ao PHB [21,31,43]. O PHBV é disponível comercialmente e tem propriedades físicas e mecânicas comparáveis a de termoplásticos convencionais, como as poliolefinas, polietileno (PE) e polipropileno (PP) [19,24].

Dessa forma, devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e às semelhanças com os termoplásticos convencionais, o PHBV possui um alto potencial de aplicação na área médica/odontológica. A velocidade de degradação do PHBV é mais lenta que de outros polímeros biodegradáveis como o poli(ácido láctico) (PLA) e o poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), sendo portanto adequado para utilização em implantes [24]. O PHBV apresenta melhores propriedades em relação ao PHB, principalmente, com relação à redução da fragilidade [45], pois a aplicabilidade do PHB também é limitada em relação aos polímeros convencionais devido ao seu alto grau de cristalinidade, baixa resistência ao impacto, baixa elongação, estreita janela de processamento [44,46] e custo relativamente alto [47].

Estudos estão sendo realizados com o intuito de melhorar as propriedades mecânicas do PHBV e/ou diminuir seu custo, viabilizando assim sua aplicação industrial. Entre muitos trabalhos estão a adição de agentes plastificantes [20], a produção de blendas, incluindo misturas com outros polímeros naturais, como policaprolactona (PCL), poli(ácido-L-lático) (PLLA), amido e celulose [18,48] e também com polímeros sintéticos polivinilfenol [43], polietileno oxidado e polipropileno oxidado [39], blendas com borracha natural [44], entre outros. Outra solução para este problema seria a incorporação de cargas na matriz polimérica, o que contribui frequentemente, no caso de termoplásticos, para obtenção de um preço mais

competitivo e geralmente um aumento das propriedades térmicas e mecânicas [45,47,49].

2.2 Dióxido de Titânio

O dióxido de titânio (TiO_2), também conhecido como titânia [50], é um reforço inorgânico de baixo custo, quimicamente estável e não tóxico. É uma substância muito utilizada como pigmento branco [51] em filtros solares, tintas, pomadas e pasta de dente [52]. É um material polimorfo, possui três formas cristalinas: anatase (tetragonal), rutilo (tetragonal) e bruquita (ortorrômbica). Sendo que as fases mais comuns são a anatase e rutilo que podem ser produzidas comercialmente [51], e são tipicamente mais comuns no produto da síntese inorgânica e principais constituintes do nanocristal de dióxido de titânio [53]. Rutilo é a única fase estável, enquanto as fases anatase e bruquita são fases metaestáveis que se transformam em rutilo quando aquecidas. A transformação de fase anatase-rutilo não ocorre em uma temperatura definida pelo fato de não existir um equilíbrio de fases envolvido [51]. As estruturas anatase e rutilo do dióxido de titânio estão apresentadas na Figura 3.

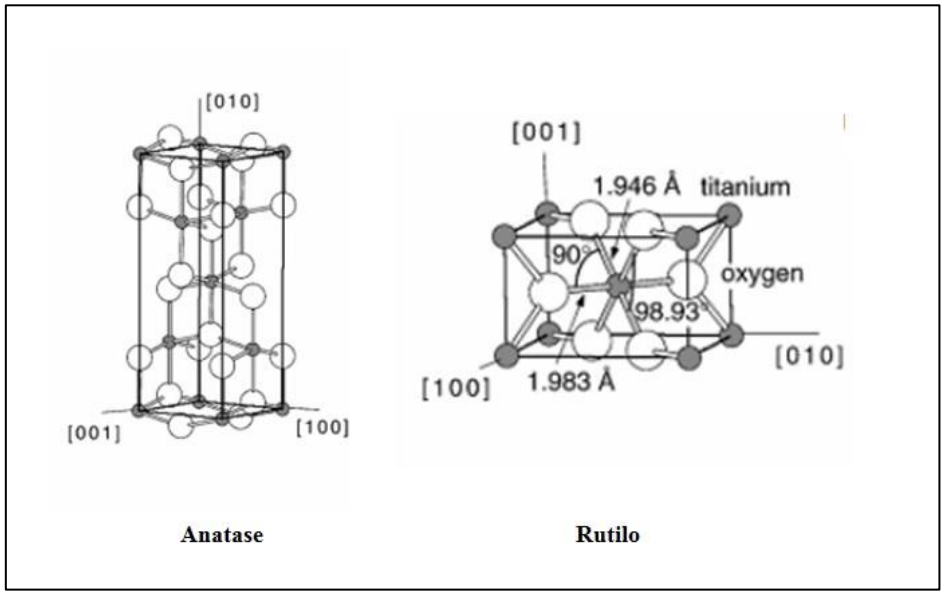


Figura 3. Estruturas cristalinas do dióxido de titânio [51].

Este material semicondutor tem se tornado um grande atrativo por ser eficaz na atividade fotocatalítica, particularmente para foto-oxidação de poluentes orgânicos. [50]. Para esta aplicação, espera-se que, com dióxido de titânio, o contaminante

orgânico seja degradado produzindo gás carbônico, água e ânions minerais derivados do poluente [54].

O princípio de funcionamento do dióxido de titânio como fotocatalisador baseia-se na geração do par elétron-lacuna positiva, através da absorção de energia. A fonte de energia mais utilizada é a luz UV. Sob irradiação, os elétrons da banda de valência recebem energia suficiente para transpor a lacuna de energia do TiO_2 e podem, desta forma, serem transferidos para a banda de condução. As lacunas positivas são forte agentes oxidantes e são responsáveis pela mineralização de vários compostos orgânicos. [55].

As diferentes fases apresentam comportamentos diferentes em relação às reações de fotocatálise, devido a suas propriedades de superfície, isso afeta as suas capacidades de transferência de elétrons e o potencial redox de portadores de carga fotoinduzidas [56]. Rutilo possui uma superfície onde a dissociação de moléculas adsorvidas é muito mais fácil do que a anatase [50]. A fase anatase possui a maior atividade fotocatalítica, usada como fotocatalisador devido a sua eficiência e baixo custo. Geralmente a fase bruquita é instável e de baixo interesse para essa aplicação [57]. A transformação da fase anatase-rutilo termodinamicamente estável durante o aquecimento, é geralmente associado ao aumento do tamanho do cristalito e redução nas áreas específicas de superfície, o que irá diminuir a sua atividade fotocatalítica [58].

Existem muitos diferentes métodos de síntese das nanoestruturas do dióxido de titânio [52]. Um deles é o método hidrotérmico, que é realizado em frascos autoclavaveis sob controle de temperatura e/ou pressão com reação em solução aquosa. A temperatura pode ser elevada acima do ponto de ebulição da água atingindo a pressão de saturação de vapor. Muitos grupos de pesquisa têm usado esse método para preparar nanopartículas de TiO_2. Por exemplo, Yang e colaboradores [59], obtiveram nanopartículas de dióxido de titânio por meio do tratamento hidrotérmico de precipitados de titânio com peptizantes e precursor com água. Os autores observaram que o agente peptizante hidróxido de tetra alquilamônio e sua concentração influenciam na morfologia final das partículas, no geral, na mesma concentração de peptizante, o tamanho da partícula diminui com o aumento do tamanho da cadeia carbônica, isso pode estar atribuído aos diferentes graus de alcalinidade dos peptizantes.

Zhou e colaboradores [60], mostraram que o pH é também importante para o controle da fase cristalina e morfologia das nanopartículas. A fração da fase anatase aumenta com o aumento gradual do pH, enquanto a fase rutilo é formada sob baixo pH.

Com isso conseguiram obter uma nanoestrutura de dióxido de titânio no formato de flor com tamanho aproximado de 400-500 nm, formado de nanobastões levemente empacotados, devido ao processo de síntese utilizado com $TiCl_3$ e PSS (poliestireno sulfonato).

Costa et al. [61], propuseram o método Pechini para a síntese de nanopós de dióxido de titânio, eles obtiveram citrato de titânio por meio da reação entre ácido cítrico e isopropóxido de titânio e posteriormente foi adicionado etileno glicol para promover a polimerização pela reação de poliesterificação. Após a polimerização, formou-se uma resina viscosa que foi levada a mufla a 400°C. Após essa etapa, o material foi desaglomerado por moagem e peneirado, resultando nos pós de dióxido de titânio.

Apesar do estudo intensivo do dióxido de titânio em diversos campos de pesquisa, o seu uso em aplicações biomédicas é relativamente novo. Apenas em meados dos anos 2000 suas publicações e citações começaram a crescer exponencialmente [56]. O seu uso tem se tornado frequentemente adotado como em implantes, por exemplo. Recentemente, Kim e colaboradores [62] fabricaram *scaffold* constituído de fibroína de seda e dióxido de titânio pelo processo de lixiviação de sal, e descobriram que adição de dióxido de titânio ajudou a diminuir o inchaço e o tamanho de poro do material, o que é um resultado positivo para o uso de seda como implante, sem implicar nenhum efeito tóxico as células. Já o grupo de Khaled [63] sintetizou nanocompósitos de PMMA/TiO_2 a partir do titânio inseridos na matriz polimérica utilizando ácido metacrílico, e apresentaram uma melhoria nas propriedades elásticas que poderiam ser utilizados em aplicações médico/odontológicas.

2.2.1 Mecanismo de formação das nanopartículas

Para que os nanocompósitos sejam preparados é necessário que a síntese das nanopartículas seja realizada com um controle de forma, tamanho, composição, estrutura, além de que, elas não se aglomerem. O processo de crescimento de um cristal ocorre pela etapa da nucleação seguida do crescimento, que são etapas que dão as características às nanopartículas [64].

A nucleação ocorre quando a solução precursora está supersaturada, o que leva o sistema a um mínimo de energia na sua configuração. Os núcleos se originam por meio da coalescência das espécies presentes no meio reacional, assim então ocorre a

migração de moléculas ou íons do soluto para a superfície do núcleo, iniciando a etapa de crescimento [64]. Existem dois tipos de nucleação: nucleação homogênea e nucleação heterogênea. Na nucleação homogênea o próprio movimento dos átomos e moléculas resulta no ordenamento dos mesmos. Por outro lado, na nucleação heterogênea, esse ordenamento é catalisado pela presença de heterogeneidades [65].

O crescimento das nanopartículas é controlado por difusão e pode ser entendido pela teoria clássica da nucleação que envolve processos termodinâmicos com transformação de fases. O modelo proposto por Lamer e Dinegar [66] (Figura 4) explica a formação de nanopartículas monodispersas obtidas em uma reação homogênea e ilustra três fases de formação das nanopartículas: supersaturação da solução, nucleação e crescimento. Para obtenção de amostras monodispersas é necessário que as etapas de nucleação e crescimento ocorram de forma separadas e deve-se evitar que novas etapas de nucleação ocorram durante a etapa de crescimento (curva I). Quando a supersaturação é atingida na solução, há uma tendência de os átomos do soluto diminuírem a área superficial por meio de agrupamento formando *clusters* (curva II). Estes *clusters* crescem de forma uniforme através da difusão de solutos da solução para a superfície até que sejam atingidas as condições de equilíbrio. A nucleação se inicia então após a solução estar supersaturada. O final da etapa de nucleação e início da etapa de crescimento inicia logo após o início da nucleação, a curva de densidade de núcleos sofre uma inflexão, pois há o esgotamento do soluto. Durante a etapa de crescimento há o consumo do soluto até que a concentração esteja abaixo da supersaturação. Nesse processo, as nanopartículas maiores crescem pelo consumo das menores, por meio da dissolução das partículas menores e deposição dos íons da solução na superfície das partículas maiores (curva III) [64,67].

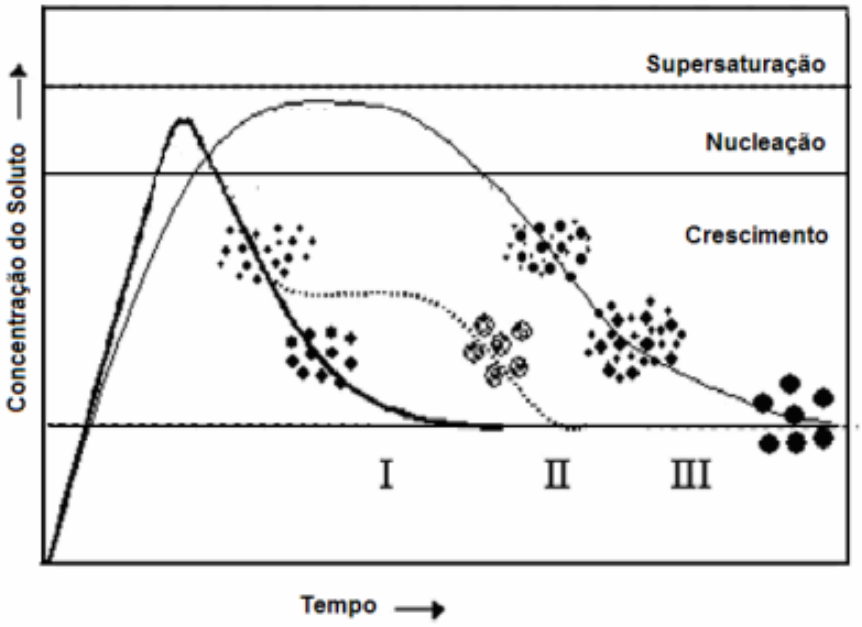


Figura 4. Modelo de Lamer e Dinegar proposto para o crescimento das nanopartículas [64].

2.3 Método de síntese das nanopartículas

Nanopartículas podem ser obtidas por meio de duas diferentes rotas de síntese: *top down* e *bottom up* (Figura 5). No método *top down*, ocorre a manipulação do material em escala macroscópica (*bulk*) e por meio de processos físicos, esse material é quebrado até que se formem partículas na escala nanométrica [68]. Os métodos típicos para obtenção de nanopartículas via *top down* é feito por atrito, moagem e/ou litografia [69].

Através do método de *bottom up* é possível obter um maior controle na forma e no tamanho final da nanopartícula obtida, além de que é possível obter nanopartícula com tamanho inferior comparado ao método *top down*. Esse método utiliza precursores moleculares ou atômicos, utilizado normalmente para síntese química e biológica de nanopartículas [68].

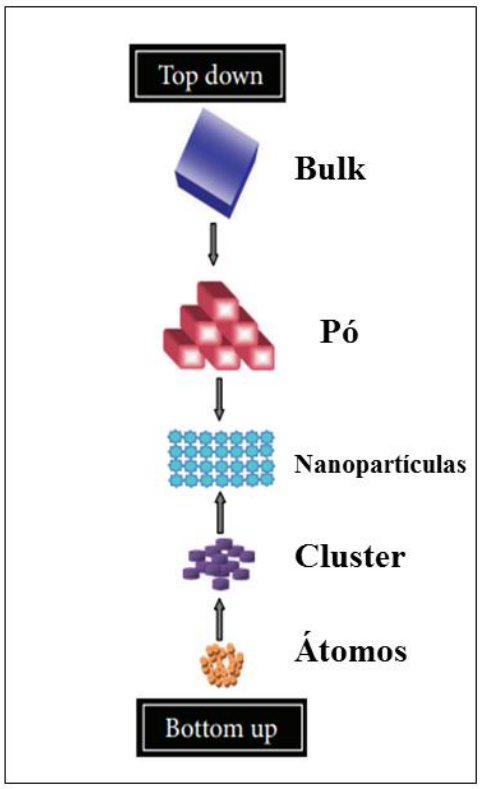


Figura 5. Esquema ilustrativo das vias *top down* e *bottom up* para obtenção de nanopartículas [68].

A vantagem de obter partículas na escala nanométrica, é a sua elevada área específica, quando comparada ao material em escala macro. Nanopartículas de TiO_2 são bem dispersas em soluções devido a sua elevada área superficial, e isso é muito importante no desenvolvimento de materiais nanocompósitos em estudos de nanotoxicologia, pois as propriedades de dispersão das nanopartículas podem afetar a eficiência do transporte de gases em testes toxicológicos *in vitro* e *in vivo* [70], além do transporte de nutrientes e biomoléculas.

2.4 Nanocompósitos poliméricos

Um material compósito, natural ou sintético, pode ser descrito como todo aquele que é formado por duas ou mais fases separadas por uma interface, de tal forma que algumas das suas propriedades sejam modificadas como resultado da interação destas

distintas fases [71]. Este comportamento sinérgico entre as fases constituintes do material compósito pode ser tanto positiva (resultando no aumento da intensidade de uma dada propriedade) quanto negativa (com redução da intensidade de uma propriedade). O benefício de se inibir ou intensificar uma dada propriedade depende do tipo de aplicação que se espera dar a este material compósito.

Com o advento da nanotecnologia, que pode ser entendida como a criação, manipulação e exploração de materiais com escala nanométrica, um dos focos da nanotecnologia em polímeros é a obtenção de nanocompósitos [72]. O termo nanocompósitos foi introduzido por Roy e colaboradores [73] para designar materiais compósitos contendo mais de uma fase sólida, nos quais a fase dispersa apresenta uma das suas dimensões em escala nanométrica. Nesta escala, mesmo em pequenas quantidades, a presença destes reforços inorgânicos promovem melhorias nas propriedades mecânicas, térmicas, e físico-químicas dos polímeros em comparação aos polímeros puros e aos tradicionais compósitos poliméricos [74]. A dispersão em nível nanométrico aumenta a área de contato entre o reforço e a matriz polimérica, melhorando a compatibilidade entre as mesmas, e podendo originar materiais com maior resistência mecânica, maior estabilidade térmica ou com propriedades ópticas, magnéticas ou elétricas melhoradas quando comparadas aos compósitos tradicionais [75–77]. Tudo isso mantendo ou melhorando as características de processabilidade dos polímeros [78], possibilitando o uso destes materiais pela indústria [79].

Os nanocompósitos costumam ser classificados pelo tipo de nanopartículas incorporadas, que variam desde típicas esferas até fibras ou placas bidimensionais de espessura nanométrica, como aquelas conseguidas através do exfoleamento de argilas [49,71]. Diversas nanopartículas estão atualmente sendo utilizadas no desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos, como por exemplo, partículas em que as três dimensões encontram-se em escala nanométrica, como sílica e dióxido de titânio; outras em que duas dimensões estão na ordem de nanômetros (nanofibras, nanobastões e nanotubos de carbono), e ainda nanopartículas lamelares, em que apenas a espessura encontra-se na faixa de alguns nanômetros, enquanto que seu comprimento e largura podem estar na faixa de micrômetros (montmorilonita, mica, hidróxidos duplos lamelares) [80]. O efeito que cada nanopartícula exerce na matriz polimérica difere em função da sua área superficial, que é determinada pela razão de aspecto (razão entre o comprimento e diâmetro) e suas características químicas (tipo e quantidade de grupos funcionais disponíveis para interagir com o polímero) [76,78]. A estrutura e as

propriedades dos nanocompósitos poliméricos são afetadas por diferentes parâmetros, tais como tipo e teor de nanopartículas, afinidade polímero/nanopartículas, tipo de processamento e grau de dispersão na matriz [73,74,81].

Quando se trata dos nanocompósitos utilizando o PHB e PHBV como matriz, destacam-se alguns tipos de partículas como, por exemplo, fluoromica [82], caulinita [83], nanotubos de carbono [84,85], fosfato de cálcio [86], hidroxiapatita [87,88], óxido de zinco [89], hidróxidos lamelares [90,91] e *nanowhiskers* de celulose [92,93]. Diferentes comportamentos foram observados, como: melhoria nas propriedades mecânicas, propriedades de barreira, melhor processabilidade, diminuição na cristalinidade, entre outras. Contudo, deve-se atentar ao fato que o reforço inorgânico adicionado em um polímero biodegradável não pode interferir de forma drástica na biodegradabilidade e/ou na biocompatibilidade do material final [37,94].

2.4.1 Métodos de síntese de nanocompósitos

Por se tratar de uma área nova dentro da ciência dos materiais, ainda não existe uma classificação inteiramente aceita ou representativa dos métodos empregados para a síntese de nanocompósitos de matriz polimérica. Porém, existe uma classificação bem simples que divide os métodos de síntese em três classes principais [77] (Figura 6):

I) Simples mistura dos componentes;
II) Síntese das nanopartículas *in situ*;
III) Polimerização de matriz *in situ*.

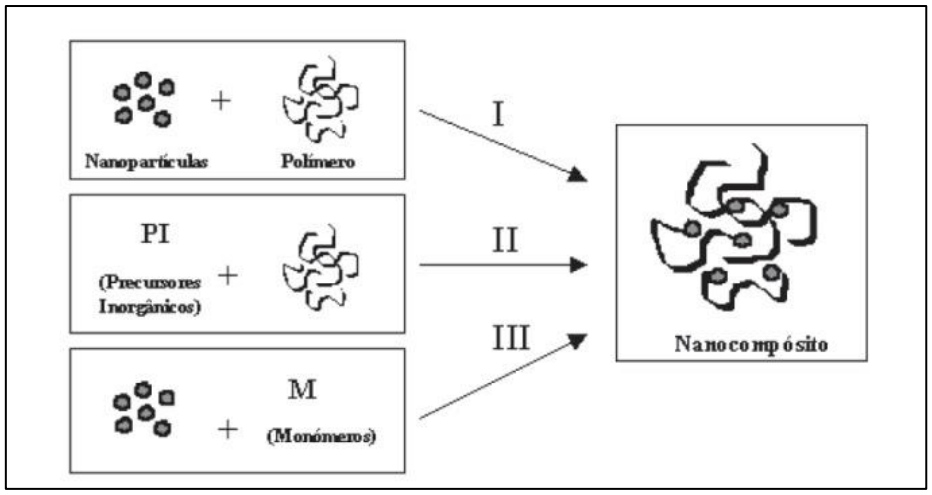


Figura 6. Métodos de síntese de nanocompósitos: I) Simples mistura dos componentes; II) Síntese das nanopartículas *in situ* e III) Polimerização de matriz *in situ* [77].

A simples mistura dos componentes é o método mais utilizado na preparação de compósitos e consiste em dissolver o polímero em um solvente apropriado e depois acrescentar as partículas nanométricas. Após a evaporação do solvente, obtém-se o filme polimérico do nanocompósito desejado.

Os materiais preparados segundo a síntese das nanopartículas *in situ* geralmente apresentam ligações químicas entre os componentes, formando um material mais homogêneo e com maior consistência. Basicamente consiste em sintetizar a nanocarga através de um precursor orgânico na presença do polímero.

A síntese da matriz polimérica *in situ* consiste em controlar a síntese do polímero na presença de nanopartículas orgânicas. Essa técnica possibilita um rigoroso controle sobre as propriedades físicas e químicas da matriz, além de obter uma distribuição uniforme da carga sobre ela [64].

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo principal preparar nanocompósitos de PHBV com nanopartículas de dióxido de titânio a fim de obter materiais biocompatíveis para a utilização como *scaffolds* em engenharia tecidual em aplicações médico/odontológicas.

3.2 Objetivos Específicos

Dentre os objetivos específicos incluem:

i. Obter nanopartículas de dióxido de titânio sintetizadas pelo método hidrotérmico.
ii. Estudar a influência das condições de síntese das nanopartículas, como temperatura e tempo, na sua morfologia final.
iii. Obter nanocompósitos de PHBV com as nanopartículas de dióxido de titânio inseridas por meio da simples mistura dos componentes, eletrofiação e *spin-coating*.
iv. Caracterizar o comportamento térmico e termo-mecânico dos nanocompósitos obtidos.
v. Estudar o crescimento de células utilizando os nanocompósitos preparados como substrato.

4. Materiais e Métodos

4.1 Materiais

O poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) utilizado neste trabalho possui massa molar M_w = 230.000 g.mol^{-1} com 15% de unidade de hidroxivalerato (HV) e foi fornecido pela PHB Industrial. Os reagentes foram utilizados conforme recebido. O clorofórmio, o isopropóxido de titânio IV ($Ti(OCH(CH_3)_2)_4$ e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram adquiridos por Sigma Aldrich.

4.2 Síntese das nanopartículas de dióxido de titânio

As nanopartículas de dióxido de titânio foram sintetizadas por meio da hidrólise hidrotérmica do gel de peroxo complexo de titânio (PCT), a partir da reação entre isopropóxido de titânio IV ($Ti(OCH(CH_3)_2)_4$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2, 30% em volume). Num processo típico de síntese, 2,84 g de isopropóxido de titânio foi adicionado lentamente a 11,3 g de peróxido de hidrogênio na proporção molar entre H_2O_2:Ti de 10:1, sob agitação constante num banho de gelo, para evitar a decomposição do H_2O_2. Posteriormente o volume da solução é ajustado a 100 mL com água deionizada, e o sistema é ligado a um refluxo para evitar a evaporação e a solução então permanece sob refluxo a 80°C por 15 minutos, originando um gel amarelo estável por várias semanas [95].

Uma alíquota de 10 g do gel foi adicionada a 90 mL de água deionizada, colocado em um frasco de autoclave, levado para estufa com temperatura e tempo controlados, precipitando as nanopartículas de TiO_2 através da desestabilização térmica do gel PCT. Após, esta etapa a dispersão coloidal contendo as nanopartículas foi seca em estufa a 90°C para a retirada das nanopartículas. As condições de preparo foram otimizadas através do planejamento fatorial.

O planejamento fatorial foi realizado para mapear o sistema com um número reduzido de experimentos, pois existem inúmeras variáveis que influenciam nas propriedades finais das nanopartículas preparadas [96]. Desde modo, é possível verificar a real influência de cada variável no preparo dos materiais, além de correlacionar suas interações sobre as propriedades das nanopartículas. O planejamento utilizado foi um

2^2, com duas variáveis (tempo e temperatura) totalizando de quatro experimentos. A variação de tempo utilizado foi de 24 horas ou de 48 horas, e a variação da temperatura é de 95°C e 120°C, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Planejamento fatorial da síntese do dióxido de titânio.

Experimento	Tempo (horas)	Temperatura (°C)
1	24	95
2	48	95
3	24	120
4	48	120

4.3 Preparação dos nanocompósitos

4.3.1 Processamento por *Casting*

Os filmes de PHBV e dos nanocompósitos de PHBV/TiO_2 foram preparados pelo método de dispersão dos componentes em clorofórmio (Figura 7). As soluções foram preparadas pela dissolução do polímero em clorofórmio (15% m/v) com agitação e aquecimento durante uma hora. Após, quantidades apropriadas de dióxido de titânio foram adicionadas em cada solução e agitadas por mais uma hora, para a garantia da homogeneidade dos nanocompósitos. Foram preparados nanocompósitos com 1%, 2,5% e 5% m/m de nanopartículas/PHBV. A solução então foi vertida em placa de petri até completa evaporação do solvente a temperatura ambiente, formando então os filmes.

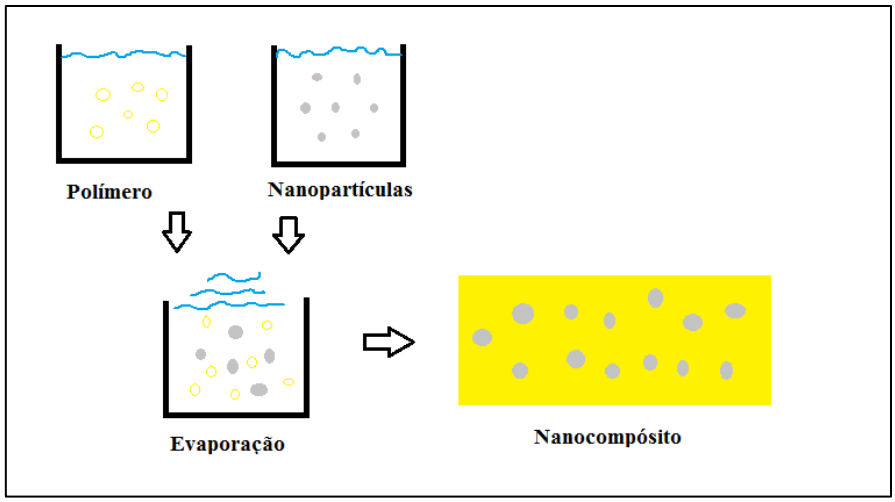


Figura 7. Esquema ilustrativo do preparo de nanocompósitos pela técnica de *casting*.

4.3.2 Processamento por Eletrofiação

No preparo de mantas, a solução de PHBV e dos nanocompósitos foram eletrofiadas utilizando o sistema de eletrofiação rotatório, mostrado na Figura 8.

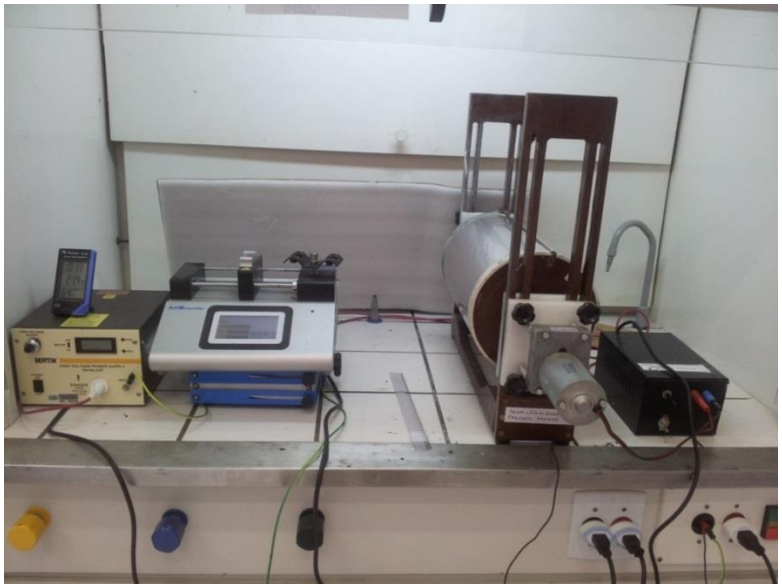


Figura 8. Sistema de eletrofiação utilizado.

O equipamento utilizado na técnica de eletrofiação consiste em uma fonte de alta tensão da marca Bertan, modelo 230-R, uma seringa contendo a solução polimérica, uma agulha (diâmetro 0,7 mm), um coletor rotativo e uma bomba dosadora da marca KDS Scientific, modelo Legato 200, que controla o fluxo de saída da solução

polimérica. Essa técnica é baseada na aplicação de uma alta tensão entre a ponta de prova de uma agulha e um alvo aterrado. A agulha é conectada a uma seringa que contém a solução polimérica. A gota da solução na extremidade da agulha é submetida a um potencial onde ocorre a formação de nanofibras no alvo que está em constante rotação, formando a manta.

No processo de eletrofiação, o PHBV e os nanocompósitos foram dissolvidos em clorofórmio com agitação e aquecimento durante 24 horas. Após, foi adicionado dimetilformamida (DMF) na solução e agitado por mais 24 horas. A solução final é composta 18% m/v PHBV em uma mistura de 90/10 clorofórmio/DMF [89]. Os parâmetros utilizados neste processo foram: voltagem de 20 kV, a uma temperatura média de 23°C, com uma distância da ponta da agulha até o coletor de 10 cm, taxa de alimentação de 0,5 $ml.min^{-1}$ e a rotação do coletor de 60 rpm.

4.3.3 Processamento por *Spin Coating*

A técnica de *spin coating* consiste em depositar gotas da solução polimérica em um substrato em rotação. Esse processo apresenta quatro estágios, como mostrado na Figura 9.

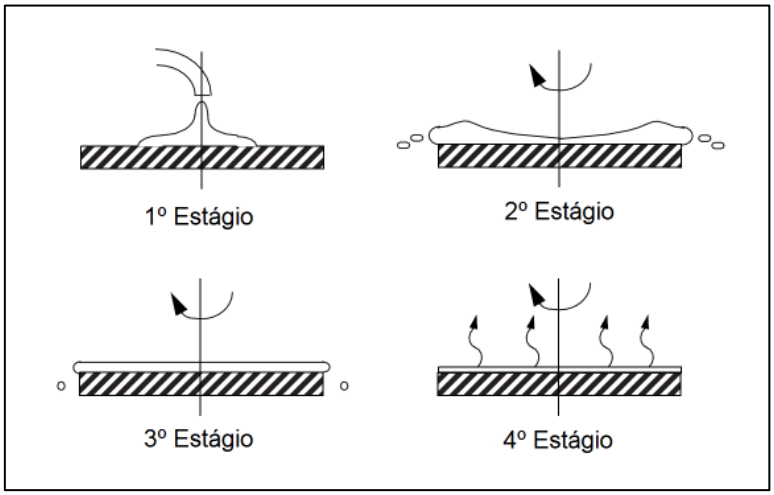


Figura 9. Os quatro estágios do processo de *spin coating* [97].

O primeiro estágio é a deposição da solução polimérica, preferencialmente no centro de um substrato parado ou com baixa rotação. O segundo estágio do processo é a aceleração do substrato até atingir a velocidade final de rotação. A força centrífuga cria

uma onda e a solução flui do centro para as extremidades do substrato produzindo uma camada uniforme. O terceiro estágio ocorre quando o excesso de solvente é lançado do substrato e a resina se afina até que a viscosidade seja alta o bastante para cessar o escoamento. A partir de então, ocorre o quarto estágio com a evaporação do solvente e formação de um filme fino [97]. O filme fino formado por essa técnica pode ser chamado de nanomembrana. A definição de nanomembrana provoca certa confusão, pois pode ser definida como uma estrutura natural ou sintética que possui espessura na ordem de nanômetros e também pode ser representada como uma membrana porosa com espessura na ordem de micrometros, mas é micro ou nano porosa. Assim, a existência e dimensão do poro são utilizadas para identificar a membrana como um todo, ao invés da espessura. [98].

Os parâmetros importantes nesta técnica para a obtenção de um filme homogêneo são a viscosidade da solução, o tempo e a velocidade de rotação.

Esta técnica foi utilizada neste trabalho para o preparo de filmes poliméricos finos e uniformes utilizando um *spin coater* Laurell, modelo WS-650-MZ-23NPP. A solução (12% m/v) polimérica foi depositada em um substrato planar de vidro com rotação de 2000 rpm durante 40 segundos a temperatura ambiente.

4.4 Fotodegradação

O efeito de radiação ultravioleta nas propriedades do PHBV e dos nanocompósitos foi estudado. As amostras no formato de filmes 2,0 cm x 2,0 cm foram expostas a radiação UV em uma câmara contendo uma lâmpada fluorescente UV de 20W, de modo que ficaram distante 20 cm da lâmpada. O tempo total de exposição foi de 312 horas.

4.5 Testes de biodegradação

Para simular a ação do meio ambiente e determinar a taxa de biodegradabilidade foram realizados ensaios laboratoriais nas amostras de PHBV e dos nanocompósitos. As amostras foram imersas em uma solução mineral com microorganismos presentes no solo e também foram inseridas na terra, nos testes de biodegradação em meio líquido e biodegradação no solo, respectivamente, como descrito a seguir:

4.5.1 Teste de biodegradação em meio líquido

O ensaio de biodegradação em meio líquido foi realizado por meio de uma solução mineral com microorganismos presentes no solo, como descrito por Hong et. al. [99]. A primeira etapa consiste na extração de microorganismos presentes no solo. A terra (West Garden – Artigos para jardim) foi encharcada com água a uma concentração de 0,7 $g.L^{-1}$ que permaneceu em repouso durante uma hora. Após isso, o sistema foi filtrado para remover partículas suspensas.

A segunda etapa é a preparação do meio de cultura para crescimento de bactérias. Uma solução água destilada com extrato de malte, extrato de levedura e glicose na concentração de 1,0 $g.L^{-1}$ é autoclavada a 121°C durante 20 minutos. O filtrado da primeira etapa é adicionado 40% em volume a esta solução que foi mantida sob agitação a 130 rpm e 32°C. Após 24h, quatro alíquotas de 1,0 mL foram retiradas da suspensão de bactérias, para a determinação da concentração de massa seca de bactérias presentes na solução, filtradas em membrana Millipore 0,22 μm, secas a 80°C e pesadas.

Para realização do teste, também foi preparado 1,2 L de uma solução mineral contendo 3,72 g de Na_2HPO_4, 3,18 g de KH_2PO_4, 0,0576 g de $MgSO_4.7H_2O$, 0,36 g de NH_4Cl e 1200 μL de uma segunda solução contendo 0,05 g de $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2.6H_2O$, 0,013 g de $ZnSO_4.7H_2O$, 0,013 g de $MnCl_2.4H_2O$, 0,0005 g de $CuSO_4.5H_2O$, 0,0005 g de $NaB_4O_7.10H_2O$ em 250 ml 1M de HCl.Em tubos Falcon de 50 mL foram adicionados 20 mL de solução mineral e 0,74 mL da suspensão de bactérias e as amostras dos filmes produzidos por *casting* com tamanhos de 2,0 cm x 1,5 cm (Figura 10). Os tubos foram colocados em uma incubadora com agitação (Innova 44) a 120 rpm e 30°C. Em períodos de 48h, os corpos de prova eram retirados do meio líquido e lavados com água destilada, e então secos no dessecador durante uma hora. A biodegradabilidade foi determinada por perda de massa do material em contato com o meio.

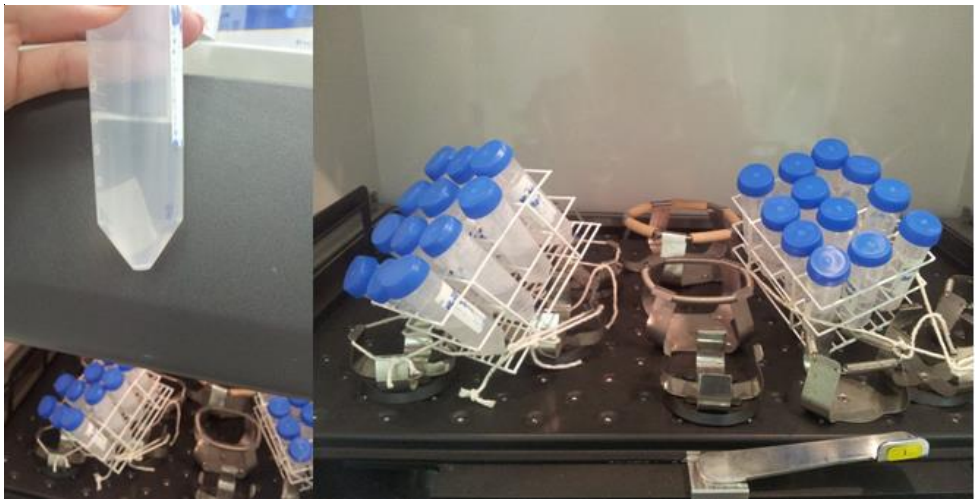


Figura 10. Amostra inserida no meio líquido para teste de biodegradação.

A permanência do corpo de prova apenas em solução mineral poderia resultar na perda de massa decorrente da degradação física do material, por esse motivo, foram feitas amostras controle imersas em solução mineral estéril nas mesmas condições de realização do ensaio (120 rpm e 30°C).

4.5.2 Teste de biodegradação no solo

Para o estudo da biodegradação no solo, as amostras dos filmes de PHBV e dos nanocompósitos produzidas pela técnica de *casting*, com tamanhos de 2,0 cm x 1,5 cm, foram enterradas em tubos Falcon contendo terra vegetal (West Garden – Artigos para jardim), por um período de no máximo 20 dias. O experimento foi feito com controle de temperatura e de umidade do solo e o teste foi realizado em triplicata.

Primeiramente, foi analisada a umidade da terra vegetal utilizada. Para isso, uma pequena quantidade de terra foi pesada e levada para estufa a 100°C por 24 horas. Após esse período, a terra foi pesada novamente.

O cálculo da umidade do solo foi feita da seguinte maneira:

$$\text{Umidade (a): } a = \frac{\text{terra umida} - \text{terra seca}}{\text{Total terra}} \qquad (1)$$

O segundo passo foi analisar a capacidade de retenção de água pela terra. Uma pequena quantidade de terra foi colocada em um recipiente, com um furo embaixo dentro de outro recipiente com água e deixou por alguns minutos até encharcar a terra.

A terra do recipiente foi retirada e seca em estufa por 24 horas a 100°C. Após esse período, a terra foi pesada novamente.

Cálculo da capacidade de retenção de água pelo solo:

$$\text{Capacidade de retenção (x): } x = \frac{\text{terra molhada} - \text{terra seca}}{\text{terra seca}} \qquad (2)$$

Por fim, para a realização do teste, as amostras e a terra vegetal peneirada foi colocada dentro de tubos Falcon (Figura 11). Também foi adicionado água em cada tubo afim ter um ajuste da umidade em 60% da capacidade de retenção.

Figura 11. Amostras inseridas na terra para teste de biodegradação no solo.

As três últimas amostras foram utilizadas como branco (amostra controle), não as colocando para realização da biodegradação. Todas as amostras foram fotografadas antes de iniciar o teste de biodegradação. Os tubos foram fechados e lacrados, a fim de não ocorrer a troca gasosa com o meio e colocados em estufa a 28°C. Em um intervalo de cinco dias, todos os tubos foram retirados da estufa e permaneceram uma hora em troca gasosa e retornaram para estufa 28°C. As amostras a serem analisadas foram lavadas com água destilada, colocadas no dessecador e pesadas. A biodegradabilidade foi determinada por perda de massa das amostras em contato com a terra.

4.6 Ensaio de crescimento de células

4.6.1 Cultivo celular

As células de fibroblasto embrionário de murinos (MEF) foram descongeladas e cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm^2, contendo meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco), gentamicina (Gibco) (0,025 g/L), estreptomicina/penicilina (Gibco) (0,1 g/L) e enriquecido com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), em uma estufa a 37ºC em atmosfera úmida com 5% de CO_2. Após atingirem confluência, foi realizada a quantificação da viabilidade celular pelo método de exclusão por Azul de Tripan. As células inviáveis ficaram coradas e as demais permaneceram incolores e foram contadas em Câmara de Neubauer.

4.6.2 Teste de proliferação celular

Para o ensaio de proliferação celular, empregou-se o método colorimétrico de redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo tetrazolium (MTT). Os poços da própria placa de poliestireno foram utilizados como controle positivo. As amostras das mantas de PHBV puro e as amostras preparadas com nanopartículas de dióxido de titânio a 1%, 2.5% e 5% foram cortadas em formato arredondado de modo a preencher toda a área do poço. As amostras foram dispostas em 4 colunas, em 4 placas estéreis de poliestireno de 96 poços, separadas de acordo com o intervalo de tempo nos quais foram analisadas (24, 48, 72 e 96 horas). Para os tempos de 24h e 48h foram inoculados 50µL de concentrado celular ($1x10^3$ células/mL) diretamente sobre as amostras, e o mesmo se fez para os tempos de 72h e 96h, utilizando a concentração de $1x10^2$ células/mL. Todos os poços receberam 100µL de DMEM na sequência e foram incubados a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO_2. O meio de cultura foi substituído a cada 24h. Transcorridos os tempos experimentais, os poços foram lavados com DMEM. Após a lavagem, foram adicionados 100µL de MTT (2mg/mL) em cada poço, seguindo-se de um período de incubação de 3 horas nas mesmas condições citadas. Posteriormente, o MTT foi retirado e cada poço foi preenchido com 150µL do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos precipitados de formazan. Por último, realizou-se a leitura da absorbância no comprimento de onda 540 nm, em equipamento Synergy H1 da BioteK, através do qual foi possível mensurar a quantidade de formazan produzida, diretamente proporcional à atividade metabólica e ao número de células vivas.

4.7 Caracterizações

4.7.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A morfologia das nanopartículas de dióxido de titânio foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão em um microscópio Philips modelo CM 120, com filamento termo-iônico de LaB6 (alto brilho), voltagem de aceleração de 120 kV e resolução pontual de 1,7Å. As amostras foram depositadas em uma grade de cobre coberta com uma fina camada de carbono.

4.7.2 Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM)

A microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução foi utilizada para analisar a orientação cristalográfica das nanopartículas de TiO_2 e as imagens foram realizadas em um microscópio JEM 3010 URP, com filamento termo-iônico de LaB_6 (alto brilho), voltagem de aceleração 300 kV e resolução pontual de 1,7 Å. As amostras foram depositadas em uma grade de cobre coberta com uma fina camada de carbono.

4.7.3 Difração de raios X (DRX)

As nanopartículas de dióxido de titânio foram caracterizadas por difração de raios X para a identificação das estruturas cristalinas, empregando um difratômetro Rigaku modelo DMax 2500PC (radiação Cu Kα) com $\lambda = 1{,}5406$ Å, operando na faixa de 2θ de 10° a 110°, com velocidade de passo de 0,01° e tempo de passo de 1s.

4.7.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

Os filmes de PHBV e dos nanocompósitos foram analisados por espectroscopia de infravermelho em um espectrômetro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) Shimadzu modelo – IRAffinity-1, com um acessório de ATR (ZnSe). As condições de operação foram na região de 500 a 4000 cm^{-1}, com 16 varreduras e resolução de 2 cm^{-1}.

4.7.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As medidas de calorimetria exploratória diferencial do PHBV e dos nanocompósitos foram analisadas por um analisador termogravimétrico com varredura térmica diferencial NETZSCH modelo DSC 204 Phoenix, tendo como referência uma "panelinha" vazia de alumínio em atmosfera de nitrogênio. As amostras dos filmes de PHBV e dos nanocompósitos foram primeiramente aquecidas de -20 a 200°C, mantido a essa temperatura por alguns minutos para apagar sua história térmica e então é resfriado a uma taxa de 10°/min.

4.7.6 Análise Termogravimétrica (TGA)

Para análise da degradação térmica do PHBV e dos nanocompósitos utilizou-se um analisador de termogravimetria (TGA) modelo TG 209F1 – Netzsch, com taxa de aquecimento de 20°C/minuto entre 30°C e 800°C a uma atmosfera de nitrogênio.

4.7.7 Análise Dinâmico – Mecânica (DMA)

As características viscoelásticas do PHBV e dos nanocompósitos foram medidas em um equipamento DMA 2980, TA instruments Q800, em uma freqüência de 1 Hz no modo de tensão. As medidas foram realizadas com as amostras em forma de filmes retangulares. As varreduras ocorreram na faixa de temperatura de -80 °C até 50 °C sob uma taxa de aquecimento de 2°C/min, com uma amplitude de 20 μm.

4.7.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As mantas eletrofiadas de PHBV e dos nanocompósitos foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura. Foi utilizado um microscópio Tescan – Vega3 xtw, com canhão de emissão de elétrons trabalhando a 10 kV. Para tanto, as amostras das mantas foram cortadas e coladas em fita de carbono para então serem colocadas sob o substrato. Posteriormente as amostras foram recobertas com ouro.

5. Resultados e discussões

5.1 Síntese das nanopartículas de dióxido de titânio

Existem muitos métodos para a produção de nanopartículas de dióxido de titânio, tais como: deposição química de vapor [100], oxidação de tetracloreto de titânio [101], síntese de chama [102]. Dentre as diversas técnicas existentes para produzir dióxido de titânio, foi utilizado neste trabalho, o tratamento hidrotérmico do gel PCT (peroxo complexo de titânio), pois este método proporciona a obtenção de nanopartículas coloidais estáveis com um bom controle da forma e tamanho. Durante a reação entre isopropóxido de titânio IV e peróxido de hidrogênio, foi observada a formação de uma solução amarela com formação de espuma (Figura 12), o que caracteriza o início da formação do peroxo complexo de titânio.

Figura 12. Reação de início da formação do peroxo complexo titânio.

A Figura 13 mostra o processo de preparo das nanopartículas de TiO_2 a partir do gel PCT. Uma alíquota de 10 g do gel foi retirada e colocada num frasco com 90 mL de água deionizada. Este frasco foi lacrado e levado para estufa a temperatura constante por algumas horas de acordo com o planejamento fatorial, precipitando assim as nanopartículas de TiO_2 pela desestabilização térmica do gel PCT. A dispersão coloidal contendo as nanopartículas foi transferida para um béquer e então levada para estufa a 90°C para remover as nanopartículas. As reações envolvidas na síntese das nanopartículas de TiO_2 estão separadas em duas etapas [103]:

Etapa 1: reação entre isopropóxido de titânio IV $Ti[OCH(CH_3)_2]_4$ e peróxido de hidrogênio H_2O_2 formando o gel PCT:

$Ti(OR)_4 + xH_2O \rightarrow Ti(OH)_x(OR)_{4-x} + xROH$

Onde $R= -CH(CH_3)_2$.

Esse complexo em solução reage entre si na segunda etapa levando a formação de Ti-O-Ti.

Etapa 2: reação de policondensação:

$(OR)_{4-x}(OH)_{x-1}Ti-OH + XO-Ti(OH)_x(OR)_{3-x} \rightarrow (OR)_{4-x}(OH)_{x-1}$ **Ti-O-Ti**$(OR)_{3-x}(OH)_x + XOH$

Onde $R= -CH(CH_3)_2$.

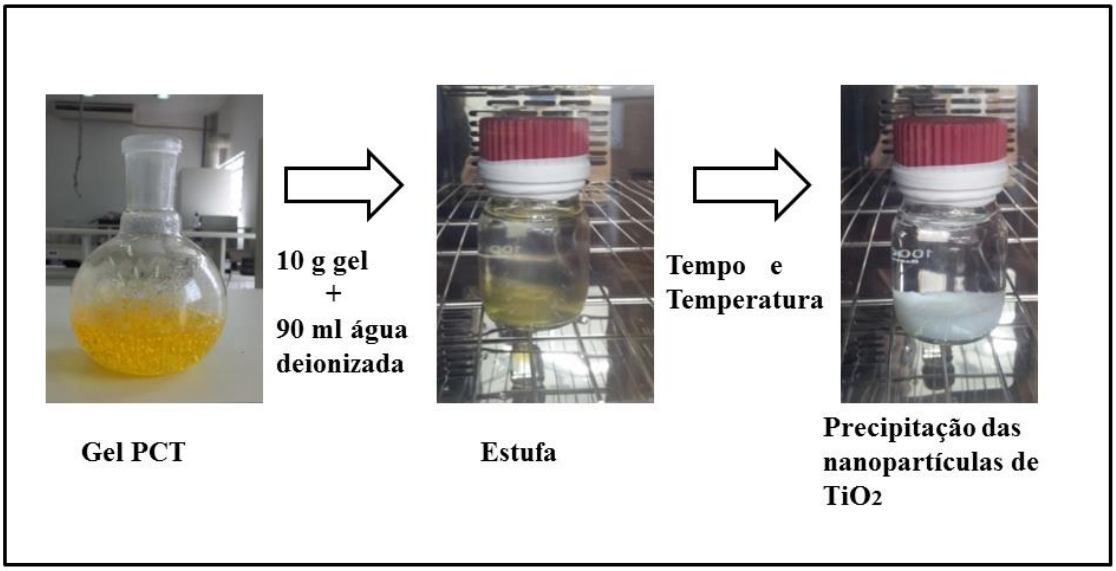


Figura 13. Processo de preparo das nanopartículas de TiO_2 a partir do gel PCT.

O planejamento fatorial foi feito para verificar a influência da temperatura e/ou do tempo nas características finais das nanopartículas, foram preparadas nanopartículas através de quatro diferentes condições:

1) 95°C durante 24 horas;
2) 95°C durante 48 horas;
3) 120°C durante 24 horas;
4) 120°C durante 48 horas.

As propriedades das nanopartículas de dióxido de titânio são função da estrutura cristalina, tamanho e morfologia e, portanto, dependente do método de síntese. Todas as nanopartículas obtidas foram caracterizadas morfologicamente por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e caracterizadas por difração de raios-X (DRX) para analisar as fases presentes no TiO_2, estes resultados estão apresentados e discutidos abaixo.

5.1.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET e Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução – HRTEM

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para análise da morfologia das nanopartículas de dióxido de titânio produzidas por meio da hidrólise hidrotérmica do gel peroxo complexo de titânio (PCT). A Figura 14 mostra a morfologia das nanopartículas obtidas. Observa-se a presença de nanopartículas na forma de bastão originados pela coalescência orientada das nanopartículas. O formato de bastão da fase rutilo do dióxido de titânio também pode ser obtido por meio de outras técnicas de síntese, como foi relatado por outros autores [104,105].

Como em todo material nanocompósito, suas propriedades dependem das propriedades individuais de cada componente, como a fração volumétrica dos constituintes, a morfologia de cada fase (arranjo espacial, dimensões) e das propriedades de interface. Além disso, três parâmetros são importantes para obtenção de um nanocompósito homogêneo: razão de aspecto (l/d) das nanopartículas, método de preparação dos nanocompósitos e os resultados das interações entre matriz polimérica e nanopartícula. Quando se tem nanopartículas no formato de bastão inseridas na matriz polimérica, há uma orientação das cadeias poliméricas [106]. Nanopartículas no formato de bastão permite a sua melhor dispersão na matriz de polímero, de modo a obter nanocompósitos mais homogêneos.

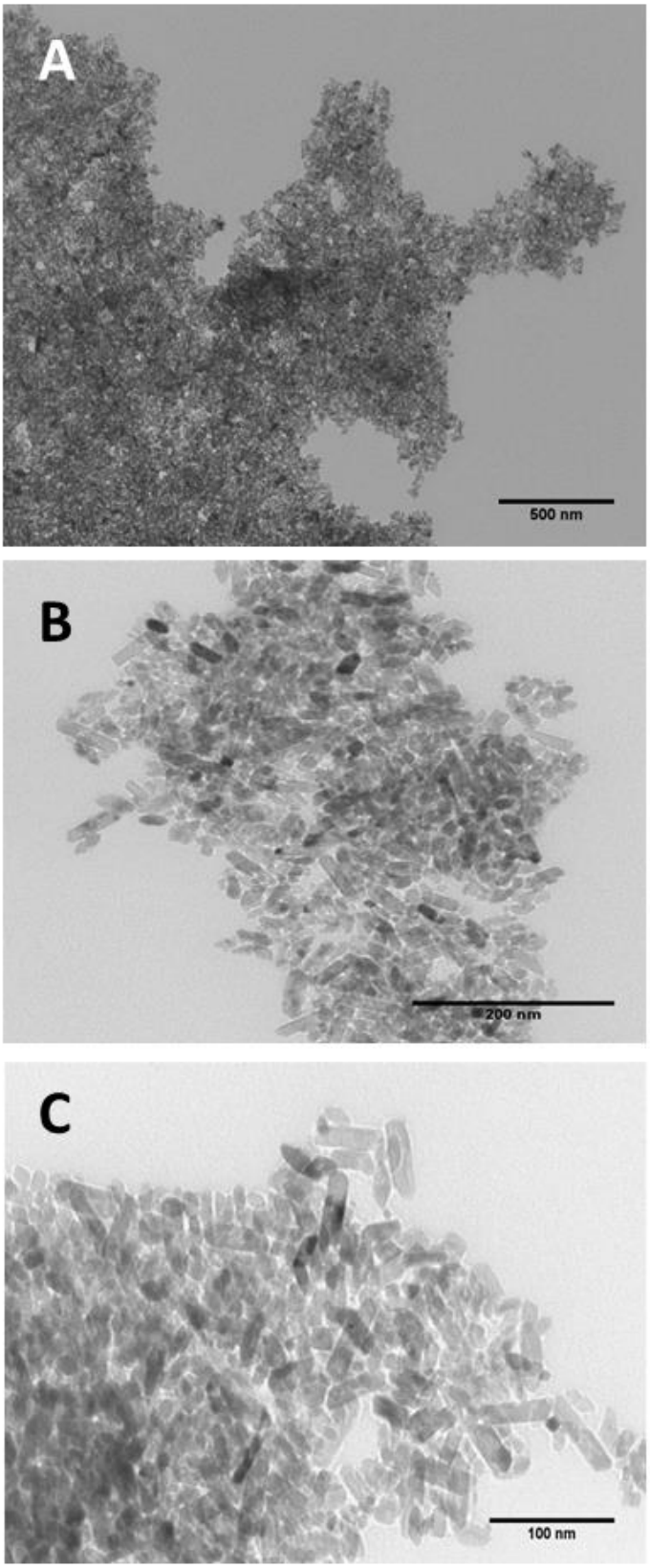


Figura 14. MET das nanopartículas de TiO_2 método 4 de síntese.

Com o auxílio de um software analisador de imagens (IMAGE J), pode-se calcular o diâmetro e comprimento médios dos nanobastões nas quatro condições experimentais. O histograma da Figura 15 mostra a distribuição do tamanho das nanopartículas do experimento 4 do planejamento fatorial.

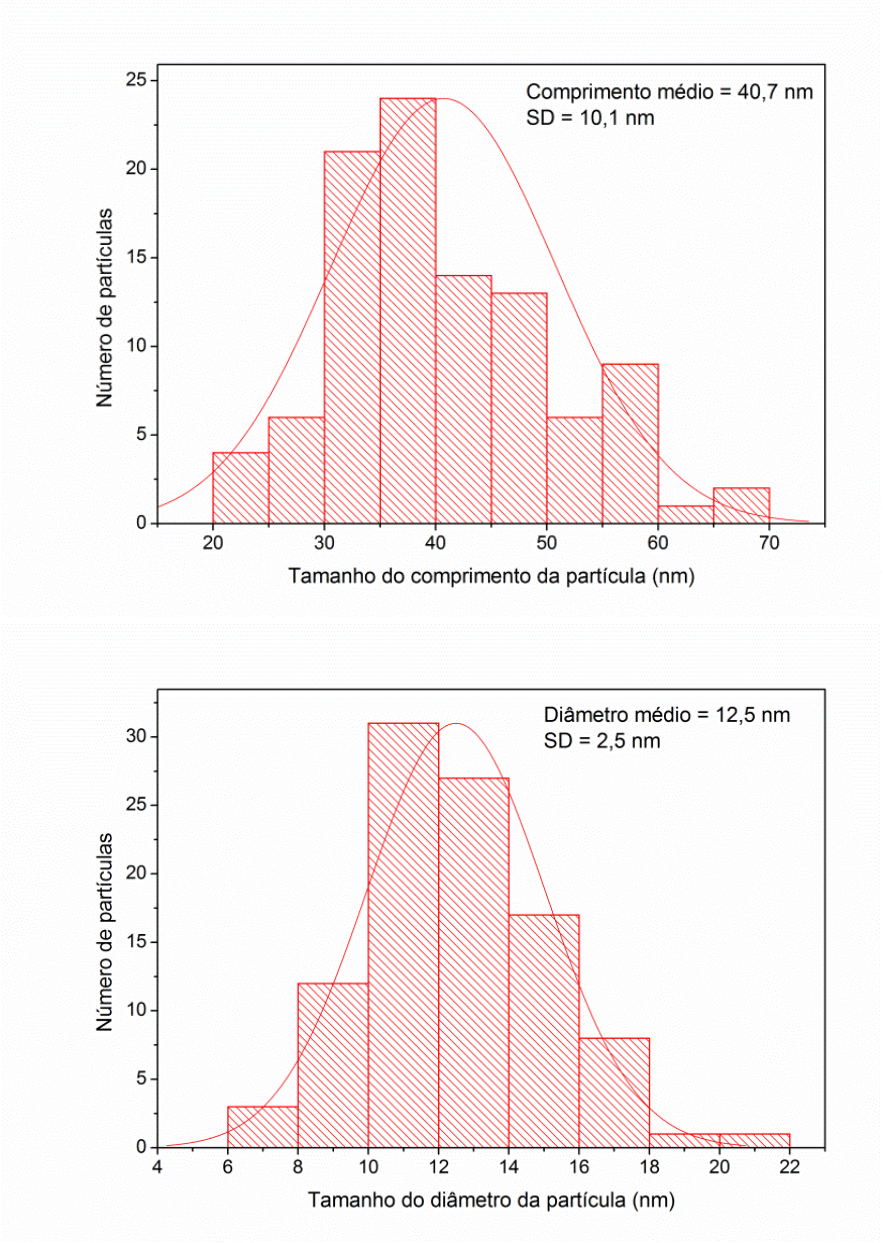


Figura 15. Histograma distribuição do tamanho médio das nanopartículas.

A variação do diâmetro e o comprimento médio calculado pela variação dos parâmetros de síntese encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Tamanho médio das nanopartículas de TiO_2 em função das diferentes condições de síntese.

Experimento	Tempo (horas)	Temperatura (°C)	Diâmetro (nm)	Comprimento (nm)
1	24	95	13,1	34,5
2	48	95	17,9	56,2
3	24	120	11,5	25,9
4	48	120	12,5	40,7

A partir dos resultados obtidos com o planejamento fatorial, pode-se inferir que o tempo e temperatura não influenciam significamente no diâmetro médio das nanopartículas finais obtidas, com exceção da nanopartículas 2. Porém, nota-se um aumento no comprimento dos nanobastões com o aumento do tempo, quando se mantem a temperatura de 34,5 nm para 56,2 nm a 95°C e 25,9 nm para 40,7 nm a 120°C, pois um maior tempo permitiu que as nanopartículas crescessem na sua direção preferencial.

Alguns estudos avaliam a morfologia do dióxido de titânio em função de algumas variáveis. Jeng et al. [107] utilizaram o método hidrotérmico para preparar filmes finos de TiO_2 a partir do dióxido de titânio em pó. Os autores notaram que a morfologia da superfície do filme é composta por nanobastões e que é possível controlar sua forma através da escolha adequada da partícula de dióxido de titânio inicial no processo hidrotérmico. Os autores obtiveram nanobastões mais finos e longos quando são utilizados partículas pequenas (14 nm) de TiO_2 e os nanobastões se tornam grossos e curtos quando grandes partículas de TiO_2 são usadas (100 nm).

O mecanismo de crescimento de nanocristais por orientação tem se destacado nos estudos como um passo comum no crescimento de nanocristais, esse mecanismo de orientação modifica a morfologia e, consequentemente, a distribuição de energia superficial [108]. A microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) permite obter imagens com informações sobre a orientação dos planos cristalográficos no material. Pode-se observar na Figura 16 que o dióxido de titânio na fase rutilo possui uma orientação cristalográfica em uma direção, referente a um crescimento preferencial nesta direção. A obtenção de estruturas alongadas ocorreu nas quatro condições de síntese e está provavelmente relacionada ao mecanismo de coalescência orientada [108]. As imagens obtidas por HRTEM permite a visualização mais clara dessa ocorrência.

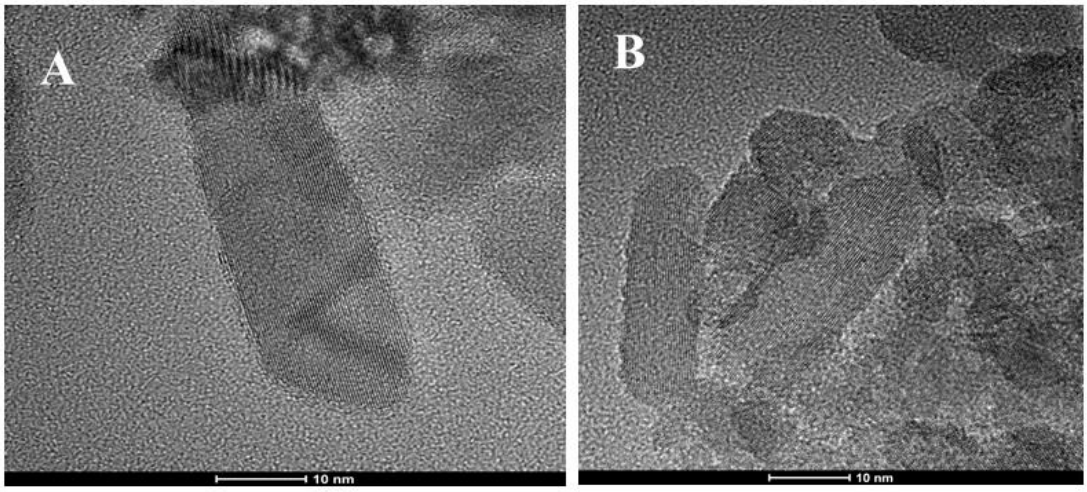


Figura 16. Orientação cristalográfica da fase rutilo do TiO_2, a) um cristal; b) cristais aglomerados.

5.1.2 Difração de Raios X – DRX

As nanopartículas de dióxido de titânio foram caracterizadas por difração de raios X (DRX) para identificação das fases cristalinas. A Figura 17 mostra o difratograma de raios X das quatro amostras de dióxido de titânio sintetizadas nas diferentes condições experimentais.

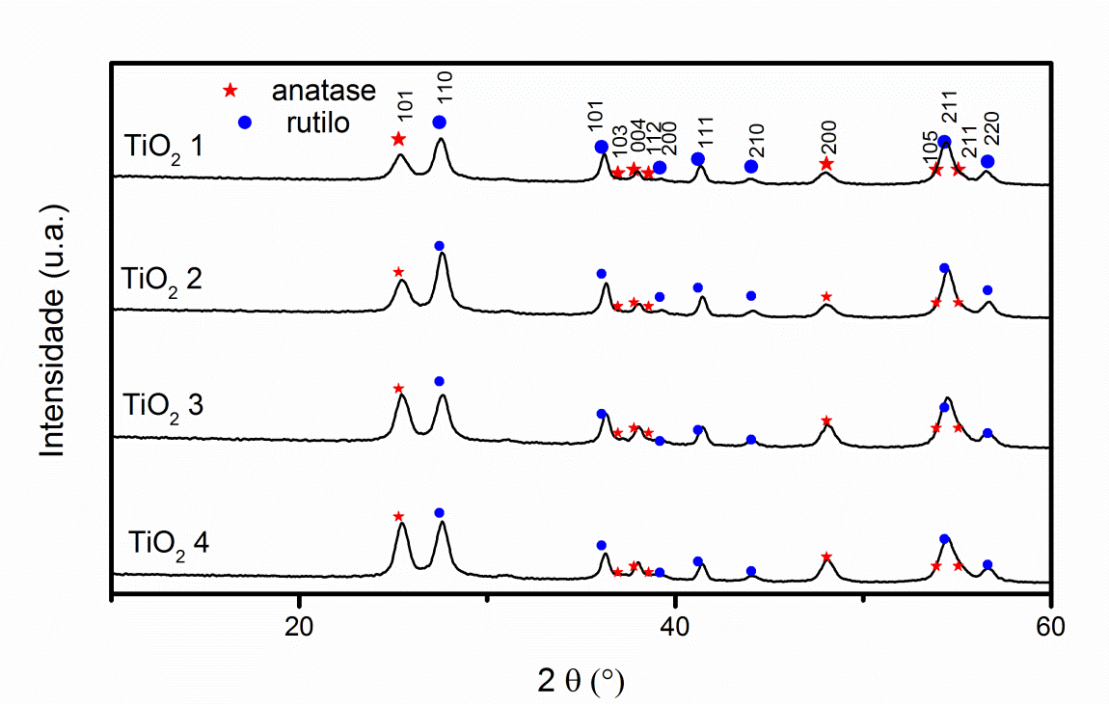


Figura 17. Difratograma de raios X das amostras de TiO_2.

Pode ser observado que foram obtidas nanopartículas cristalinas de TiO_2 com mistura das fases anatase e rutilo, para todas as condições síntese. As quantidades de cada fase cristalina presentes nas amostras estão apresentadas na Tabela 3 e foram calculadas com base nas áreas do pico (101) para a fase anatase (JCPDS # 21-1272), e do pico (110) para a fase rutilo (JCPDS # 21-1276), de acordo com a equação 3:

$$Xa = \left(\frac{Aa}{Aa+Ar}\right) * 100 \qquad (3)$$

Onde: Xa é a quantidade de fase anatase, Aa área do pico (101) anatase, Ar área pico (110) rutilo.

Tabela 3. Quantidade de fases anatase e rutilo.

	Condição Experimental		**Áreas dos picos**		**Quantidade de fases**	
Amostra	**Tempo (h)**	**Temperatura (°C)**	**(101) anatase**	**(110) rutilo**	**Anatase (Xa)**	**Rutilo (Xb)**
TiO_2 1	24	95	607,7	695,9	47%	53%
TiO_2 2	48	95	885,0	1217,0	42%	58%
TiO_2 3	24	120	787,7	778,8	50%	50%
TiO_2 4	48	120	1157,8	1147,6	50%	50%

Nota-se que quando a nanopartícula é preparada na maior temperatura (120°C), TiO_2 3 e TiO_2 4, a porcentagem de rutilo e anatase é igual (50% de cada fase), já quando a nanopartícula é preparada na temperatura de 95°C, TiO_2 1 e TiO_2 2, há maior concentração de rutilo em relação a fase anatase (53% e 58% da fase rutilo, respectivamente).

Utilizando a equação de Scherrer (equação 4) estimou-se o domínio de coerência cristalográfica para as nanopartículas.

$$dc = \frac{k\,\lambda}{\beta \cos \Theta} \qquad (4)$$

Onde: (d_c) é o domínio de coerência cristalográfica; (k) é uma constante; (λ) é o comprimento de onda da radiação na emissão dos raios X; (β) é a largura a meia altura do pico de difração e (Θ) é o ângulo de difração.

Os valores do domínio de coerência cristalográfica estimados pela equação de Scherrer, de alguns planos cristalográficos da fase anatase e da fase rutilo, do difratograma da Figura 17 das nanopartículas da condição 1 do planejamento fatorial, estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4. Domínio de coerência cristalográfica para alguns planos da anatase.

Plano	Domínio de Coerência Cristalográfica (nm)
101	8,7
200	9,0
204	11,9

Tabela 5. Domínio de coerência cristalográfica para alguns planos do rutilo.

Plano	Domínio de Coerência Cristalográfica (nm)
110	10,1
101	17,1
211	10,3
210	12,5

Os valores do domínio de coerência cristalográfica são praticamente os mesmos para as direções calculadas da fase anatase, indicando que não deve haver um crescimento preferencial em uma direção, ou seja, as nanopartículas nesta fase possivelmente possuem formato esférico. Já para a fase rutilo, os domínios de coerência cristalográfica variam bastante de acordo com a direção do plano cristalográfico, por esse motivo, observamos as nanopartículas no formato de bastão nas imagens obtidas por MET, pois há um crescimento preferencial em certa direção, obtendo o formato de bastão.

De acordo com as análises obtidas dos quatro diferentes tipos de dióxido de titânio obtidos em diferentes condições de síntese, o melhor TiO_2 a ser utilizado é o TiO_2 3 pois apresentou menor diâmetro e menor comprimento, portanto maior área de contato com a matriz polimérica.

5.2 Preparação dos nanocompósitos pela técnica de *Casting*

Uma das técnicas utilizadas neste trabalho para o preparo de filmes poliméricos foi técnica de *casting*, uma técnica que consiste na dispersão do polímero e da nanopartícula em solvente comum, no caso o clorofórmio, em placas de Petri. Essa técnica foi realizada depois da otimização da concentração da solução e da evaporação do solvente, uma vez que estes parâmetros são muito importantes para produção de

filmes homogêneos e sem fissuras. Inicialmente, a concentração de solução polimérica utilizada foi 20% (m/v) e os filmes foram colocados na capela para evaporação do solvente. Com essas condições, o resultado foi a obtenção de um filme com fissuras e quebradiço, além de que as nanopartículas se aglomeraram. A concentração da solução polimérica então foi reduzida para 15% (m/v). O polímero foi dissolvido em clorofórmio por meio de agitação e de aquecimento, durante trinta minutos, até completa dissolução. Depois, quantidades apropriadas de dióxido de titânio foram adicionadas a cada solução e agitou-se para promover a homogeneidade dos nanocompósitos. Os nanocompósitos foram preparados com concentrações de 1,0%, 2,5% e 5,0% m/m de nanopartículas/PHBV. O controle da espessura dos filmes produzidos por *casting* é uma etapa que exige atenção, para tanto, as placas de Petri foram niveladas e cobertas de maneira que o solvente evapora-se lentamente a fim de evitar fissuras nos mesmos.

A Figura 18 apresenta fotos dos filmes obtidos por *casting*. Nas condições de preparo adequadas de concentração da solução e evaporação do solvente, os filmes obtidos não apresentaram fissuras e a espessura média foi de 0,5 mm.

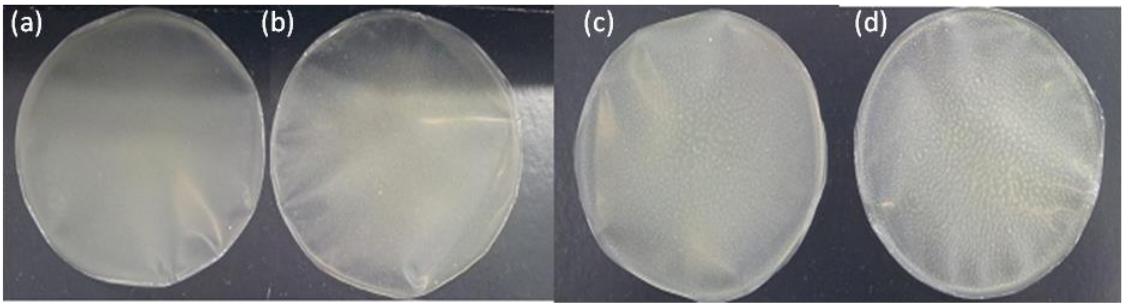


Figura 18. Fotos ilustrativas dos filmes preparados pela técnica de *casting*. (a) PHBV; (b)PHBV/TiO_2 1%; (c) PHBV/TiO_2 2.5%, (d) PHBV/TiO_2 5%.

5.2.1 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho – FTIR

Os filmes de PHBV e os nanocompósitos foram analisados por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), para se avaliar as interações das nanopartículas com a matriz polimérica.

A Figura 19 mostra os espectros de infravermelho dos materiais obtidos. No espectro do PHBV estão presentes as bandas atribuídas ás vibrações de alongamento do grupo C-O-C na faixa de 1245 - 1319 cm^{-1}. Em 1750 cm^{-1} é observado uma absorção

que é associada ao estiramento da ligação C=O do PHBV [109]. As bandas na região de 2960 – 3015 cm^{-1}, de 2925 – 2945 cm^{-1} e de 2865 – 2885 cm^{-1} estão associadas aos modos de estiramento assimétricos do CH_3, modos de estiramento anti-simétricos do CH_2 e aos modos de estiramento simétrico do CH_3, respectivamente. As bandas de 800 a 1500 cm^{-1} associadas à vibração de flexão do CH_3 e CH [110].

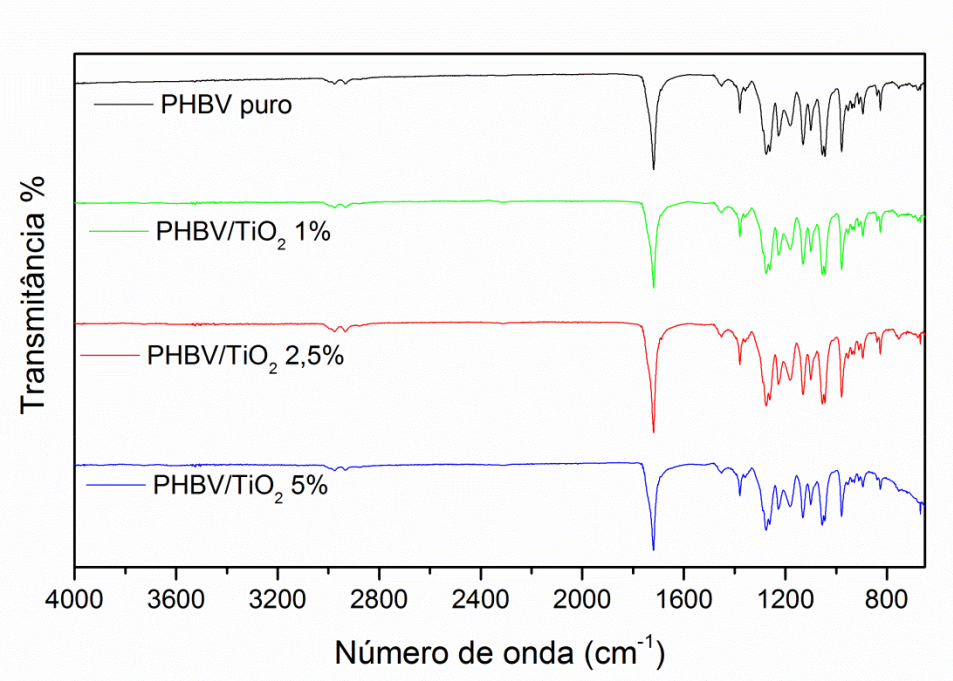


Figura 19. Espectro de infravermelho do PHBV e dos nanocompósitos.

A Figura 19 mostra também que os espectros dos nanocompósitos são bastante semelhantes ao do PHBV puro, porém nota-se um pico de absorção de 500-800cm^{-1} associado ao estiramento Ti-O-Ti [111]. Estes sinais estão de acordo com o descrito por Peng et al. [112], que estudaram nanocompósitos PET/TiO_2. Assim pode-se inferir que não houve interação química entre as nanopartículas e o polímero somente interações físicas.

5.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial - DSC

As propriedades térmicas como o comportamento de cristalização e de fusão do PHBV e dos nanocompósitos foram analisadas através do DSC. Foram avaliados os valores de temperatura de fusão (T_m), temperatura de cristalização (T_c), temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de cristalização a frio (T_{cc}), entalpia de fusão (ΔH_m),

entalpia de cristalização (ΔH_c) e o grau de cristalinidade (%C). O grau de cristalinidade foi calculado através da equação 5:

$$\%C = \frac{\Delta Hm - \Delta Hc}{\Delta H100\% * W} * 100 \qquad (5)$$

Onde: é conhecida a $\Delta H_{m100\%}$ teórico de um polímero hipoteticamente 100% cristalino. O valor de $\Delta H_{m100\%}$ utilizado foi de 146 J/g [113] para o PHBV e W é a fração em massa do PHBV na mistura.

A Tabela 6 mostra as propriedades térmicas do PHBV e dos nanocompósitos incluindo os resultados da cristalinidade (%C) calculados pela equação 3.

Tabela 6. Propriedades térmicas do PHBV e dos nanocompósitos**.**

	1° Aquecimento		**Resfriamento**		**2° Aquecimento**					
	T_m (°C)	**ΔH_m (J/g)**	**T_c (°C)**	**ΔH_c (J/g)**	**T_g (°C)**	**Tcc (°C)**	**T_m (°C)**	**ΔH_m (J/g)**	**ΔH_{cc} (J/g)**	**%C***
PHBV puro	172,3	50,2	54,1	2,3	-1,8	56,4	170,2	48,4	36,0	8,5
1% TiO_2	172,9	48,7	47,1	1,4	-3,4	55,1	170,0	46,6	36,1	7,3
2.5% TiO_2	172,8	47,1	54,7	2,6	-1,9	56,5	170,4	43,8	32,5	8,0
5% TiO_2	170,3	53,5	52,1	29,9	-7,0	46,8	169,0	52,8	16,7	26,0

As curvas de DSC obtidas apresentam picos de fusão, picos de cristalização e temperatura de transição vítrea, características de um polímero semi-cristalino. Para o PHBV puro observa-se dois picos de fusão, o primeiro a 157,8°C e o segundo a 172,5°C, como pode ser observado nas curvas do primeiro aquecimento, Figura 20. Picos de fusão duplos ou múltiplos podem ser decorrentes de fusão parcial, recristalização e refusão durante o aquecimento, polimorfismo, existência de morfologia cristalinas diferentes (espessura, distribuição, perfeição ou estabilidade lamelar), envelhecimento físico e/ou relaxação da fase amorfa rígida, ou espécies com massa molar diferentes [114]. De acordo com Casarin [94], para o polímero PHBV com porcentagem de valerato acima de 5%, a distribuição do mesmo nas cadeias poliméricas não é homogênea, ocorrendo uma variação de massa molar, e isso pode ser observado neste trabalho, pois o PHBV aqui utilizado possui 15% de HV. Por outro lado, Wang et al. [115] concluiu que o primeiro pico provavelmente está associado a nucleação homogênea do PHBV, que começa espontaneamente pela agregação das cadeias abaixo

do ponto de fusão, e o segundo pico provavelmente está associado a nucleação heterogênea do PHBV. Picos endotérmicos duplos do PHBV e seus nanocompósitos também foram reportados por outros autores, Lai et al [84], analisaram o comportamento de PHBV/MWNTs através do DSC e mostraram que a intensidade do pico de fusão varia com a taxa de aquecimento; para o PHBV puro o pico de fusão era superior com o aumento da taxa de aquecimento, mas, para o nanocompósito, o pico de fusão era mais baixo. Dagnon et al. [116] sugeriram que o pico duplo de fusão no primeiro aquecimento é devido a presença de duas fases cristalinas na amostra.

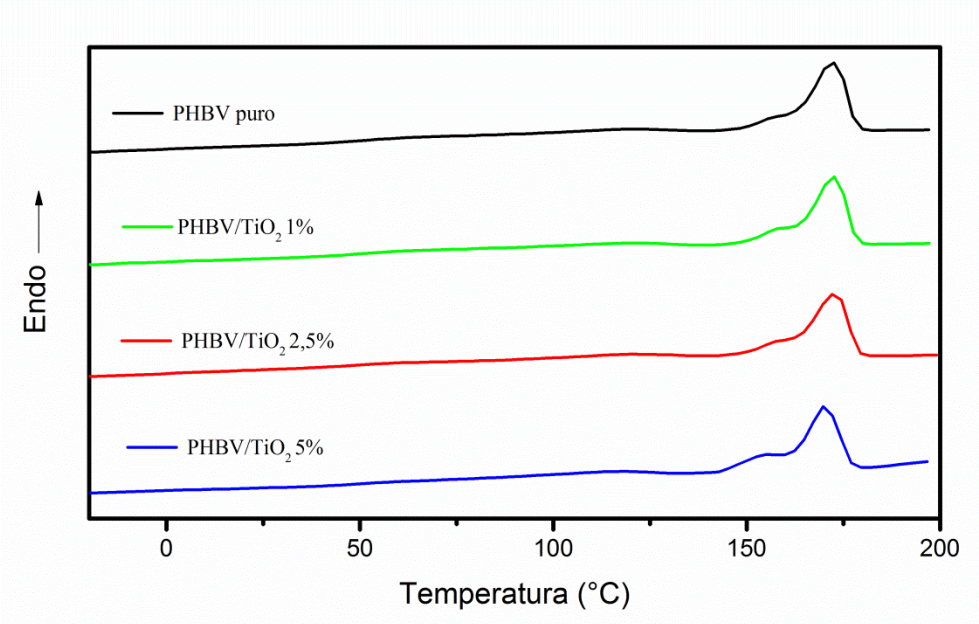


Figura 20. Curvas DSC do 1° aquecimento do PHBV e nanocompósitos.

A Figura 21 mostra o termograma do resfriamento, onde não são observados picos endotérmicos em nenhuma amostra. A temperatura de cristalização (Tc) pode ser observada a 54,1°C, 47,1°C, 54,7°C e 52,1°C para o PHBV e para os nancompósitos com 1, 2,5 e 5% de TiO_2, respectivamente e observa-se nenhuma mudança significativa neste parâmetro. Porém, a entalpia de cristalização (ΔH_c) do nanocompósito PHBV/TiO2 5% foi mais evidente e exibiu uma maior magnitude da curva comparada com outros nanocompósitos e com o PHBV puro, indicando que o TiO_2 possui efeito de nucleação na matriz polimérica. Geralmente a presença de nanopartículas pode ter grande influência no comportamento de cristalização da matriz polimérica. Dependendo do tamanho e da distribuição, a nanopartícula pode ter habilidade para nucleação, afetando a densidade de nucleação, o tamanho do esferulito e a cinética de cristalização,

bem como a fragilidade do polímero [96]. Liu et al., [118] estudaram o efeito da adição de argila no comportamento do nylon 6 através das curvas de resfriamento do DSC. Os autores verificaram que a forma e a temperatura dos picos dos nanocompósitos foram diferentes do polímero puro. A presença de argila aumentou a temperatura de cristalização do nylon 6 e diminuiu a largura do pico de cristalização. Pode ser concluído que a argila aumentou a taxa de cristalização e tem forte efeito de nucleação heterofásica no nylon 6.

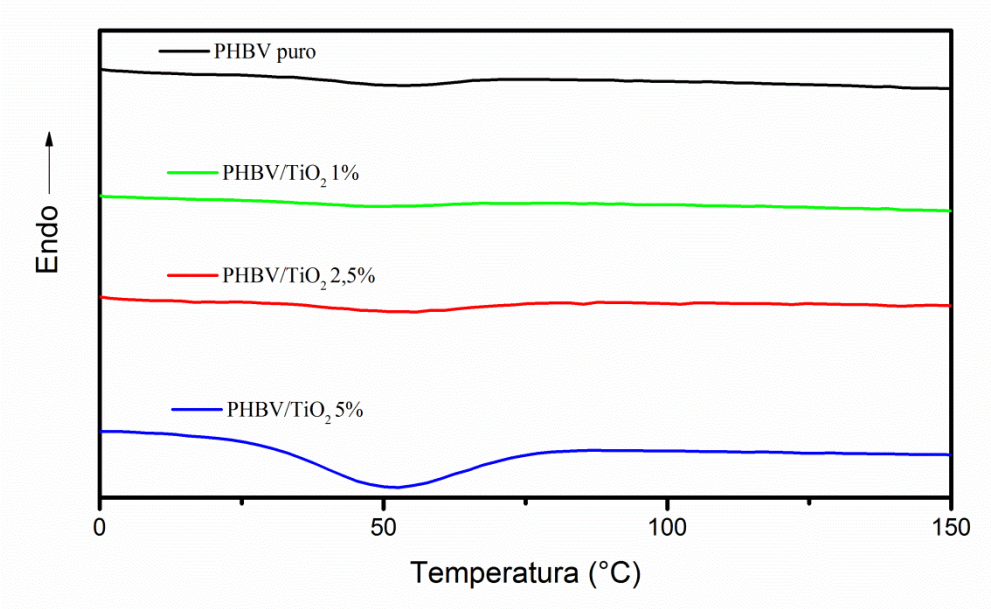


Figura 21. Curvas DSC do resfriamento do PHBV e dos nanocompósitos de PHBV/TiO_2.

A curva de segundo aquecimento está apresentada na Figura 22. Esse termograma, depois do resfriamento, mostrou um comportamento diferente comparado com o termograma de primeiro aquecimento. O pico de cristalização se dá no segundo aquecimento, pois a taxa de resfriamento permitiu uma nucleação lenta e consequentemente a formação de cristais no material. A temperatura de cristalização a frio (T_{cc}), medida no pico exotérmico, apareceu a baixas temperaturas: para o PHBV puro e nanocompósitos 1%, 2,5% e 5%, a T_{cc} foi 56,4°C, 55,1°C, 56,5°C e 46,8°C, respectivamente. Os valores de T_{cc} dos nanocompósitos deslocaram pouco para baixas temperaturas comparadas com o PHBV puro, isso pode ser atribuido ao fato que partes de PHBV cristaliza durante o processo de resfriamento com a presença das nanopartículas de TiO_2, o qual atua como agente nucleante para o resto do PHBV

cristalizar durante o segundo aquecimento. O mesmo comportamento foi encontrado por Wang et al. [119] no estudo de PHBV/GNSs.

O grau de cristalinidade (%C) foi calculado de acordo com a equação 3. O %C foi mais evidente com altas concentrações de dióxido de titânio, onde o %C aumentou de 8,5% no PHBV para 26% no nanocompósito PHBV/TiO_2 5%, indicando também que a nanopartícula agiu como nucleante, isso ocorre porque a nanopartícula pode ter grande influencia na cristalização da matriz polimérica. Dependendo do tamanho e da distribuição, a nanopartícula pode ter a habilidade de nucleação, afetando a densidade de nucleação, o tamanho do esferulito e a cinética de cristalização, e a fragilidade do polímero [117].

A temperatura de transição vítrea (T_g) do PHBV é analisada através de uma deflexão na curva do segundo aquecimento (Figura 22), e pode ser observada em torno de 0°C. Nota-se que com a incorporação de TiO_2 no polímero a Tg diminui, com 5% de nanopartícula incorporada, a Tg é -7°C, isso ocorre porque o dióxido de titânio favorece a mobilidade das cadeias poliméricas. Zhuang et al. [120] observaram um comportamento contrário, notaram um aumento na Tg dos nanocompósitos de PLA/TiO_2 em comparação ao polímero puro, isso porque as nanopartículas de dióxido de titânio restringiram a mobilidade da cadeia molecular do PLA, ou seja, ligações de hidrogênio foram formadas entre o grupo carbonila do PLA e o grupo hidroxi na superfície das partículas.

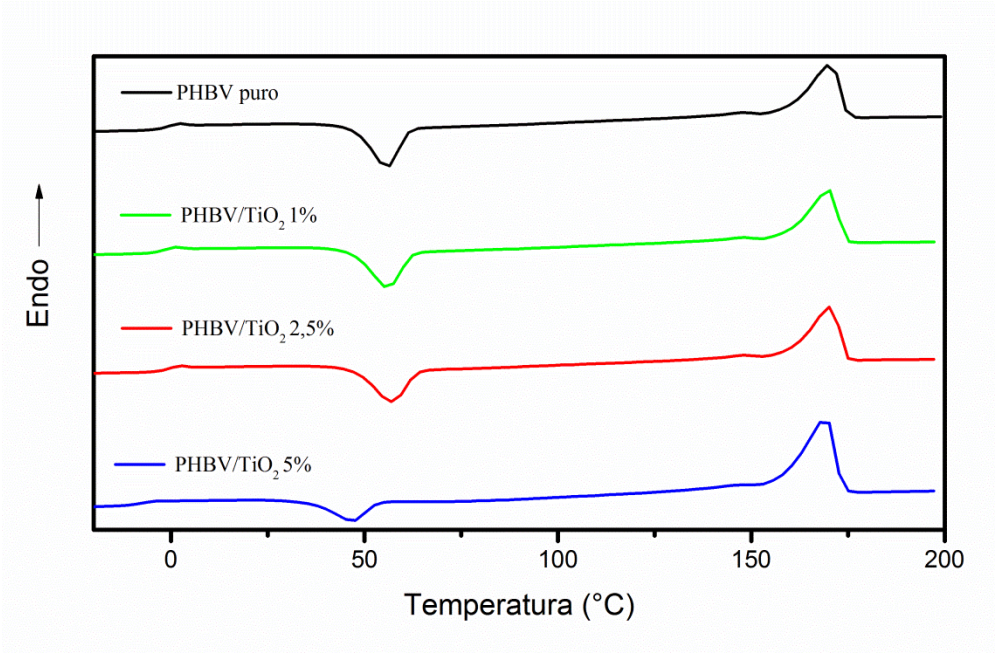


Figura 22. Curvas DSC do 2° aquecimento do PHBV e nanocompósitos.

A modificação da superfície das nanopartículas com agentes de acoplamento ou variando o pH, pode alterar as propriedades finais dos nanocompósitos, inclusive a Tg. Se uma superfície apresentar interação atrativa com os polímeros sua Tg irá aumentar, se não ocorrer interação a Tg não será afetada, e se a interação for repulsiva, a Tg irá diminuir. Como o comportamento nas interfaces é definido pelas interações energéticas, as propriedades interfaciais são um efeito entálpico, sendo que, os efeitos entrópicos desempenham um papel secundário. Assim, este processo é desfavorável entropicamente e que é compensado por um ganho de entalpia devido a um aumento dos contatos moleculares dispersos na superfície da nanopartícula [121]. Desse modo, pode-se dizer que os nanocompósitos aqui obtidos possivelmente possuem nanopartículas com interação repulsiva com o polímero, resultando na diminuição da Tg.

5.2.3 Análise Termogravimétrica - TGA

A influência das nanopartículas de dióxido de titânio na estabilidade térmica do PHBV foi analisada através das medidas de TGA. As curvas obtidas são mostradas na Figura 23. Observa-se na Figura 23(a) apenas um estágio no processo de degradação para todas as amostras. Nota-se que a temperatura de início de degradação térmica (T_{onset}), medida a 98% de perda de massa, dos nanocompósitos teve uma ligeira

diminuição em relação ao polímero puro, que foi de 283°C. Nota-se também uma queda na estabilidade térmica, em cerca de 3°C, sendo que a temperatura de máxima degradação térmica ($T_{máx}$) foi praticamente a mesma para os nanocompósitos com diferentes concentrações de dióxido de titânio. Já comparando os materiais a 60% de perda de massa, a temperatura para o PHBV é de 303°C, enquanto para os nanocompósitos com 1%, 2.5% e 5% tem uma pequena diminuição para 300, 297 e 300°C, respectivamente.

Nas curvas derivadas (DTG), mostraram picos únicos com um leve deslocamento para menores temperaturas com o aumento de teor de dióxido de titânio pode ser observado na Figura 23(b).

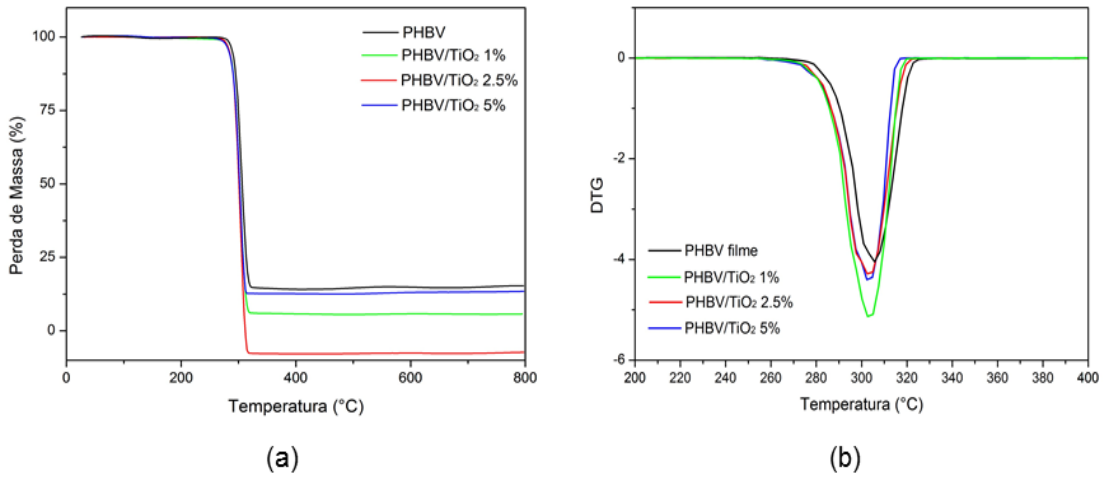


Figura 23. (a) curvas TGA e (b) DTG do PHBV e dos nanocompósitos PHBV/TiO_2.

Estão apresentados na Tabela 7 alguns parâmetros de degradação como a temperatura de degradação a 98% de perda de massa (T_{onset}), a temperatura a 60% de perda de massa ($T_{60\%}$) e a temperatura de máxima degradação térmica ($T_{máx}$) e pico DTG.

Tabela 7. Resultados de TGA para o polímero puro e os nanocompósitos.

Amostra	T_{onset} (°C)	$T_{60\%}$ (°C)	$T_{máx}$ (°C)	$DTG_{(pico)}$ (°C)
PHBV	283	303	305	305
PHBV/TiO_2 1%	275	300	302	302
PHBV/TiO_2 2.5%	278	297	302	302
PHBV/TiO_2 5%	275	300	302	302

Thiré et al. [122] estudaram as propriedades térmicas de nanocompósitos de PHBV com atapulgita organofílica. Observaram que o PHBV e os nanocompósitos apresentam um pico de degradação único, com perda máxima a 288,5°C. Com a presença da argila, as curvas de TGA são deslocadas para menores temperaturas, indicando uma diminuição na estabilidade térmica dos nanocompósitos comparados ao PHBV puro. A temperatura de início de degradação térmica (T_{onset}) foi mais afetada, uma vez que a diferença em relação ao polímero puro foi de -20°C. Os nanocompósitos aqui estudados neste trabalho também apresentaram o mesmo comportamento de apenas um único pico de degradação, porém não houve diminuição da estabilidade térmica dos nanocompósitos, uma vez que a T_{onset} e a temperatura a 60% de perda de massa foi praticamente a mesma para todas as amostras estudadas.

5.2.4 Análise Dinâmico – Mecânica - DMA

O comportamento mecânico das amostras dos filmes de PHBV e dos nanocompósitos foi realizada através de análises de DMA. Os resultados do DMA são definidos por três parâmetros: módulo de armazenamento (elástico) (E') que é a resposta elástica a deformação, ou seja, a habilidade do material em absorver energia; o módulo de perda (viscoso) (E") é a resposta plástica a deformação, isto é, a habilidade do material em dissipar energia; e a tan δ que é a relação entre E"/E', uma medida de capacidade de amortecimento do material.

Como uma tendência típica de materiais termoplásticos [123], o módulo de armazenamento (E') de todas as amostras diminui consideravelmente com o aumento da temperatura, como pode ser observado na Figura 24(a), devido ao aumento da mobilidade das cadeias poliméricas a temperaturas mais altas [124]. No entanto, para os nanocompósitos PHBV/TiO_2 2.5% e 5%, E' foi menor quando comparado ao E' do

polímero puro. Os valores de E' para o PHBV e nanocompósitos são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8. Valores do módulo de armazenamento (E') do PHBV e dos nanocompósitos.

Amostra	E' (MPa)*	E' (MPa)**
PHBV	1676	3766
PHBV/TiO_2 1%	1770	3826
PHBV/TiO_2 2.5%	1236	2982
PHBV/TiO_2 5%	1010	2293

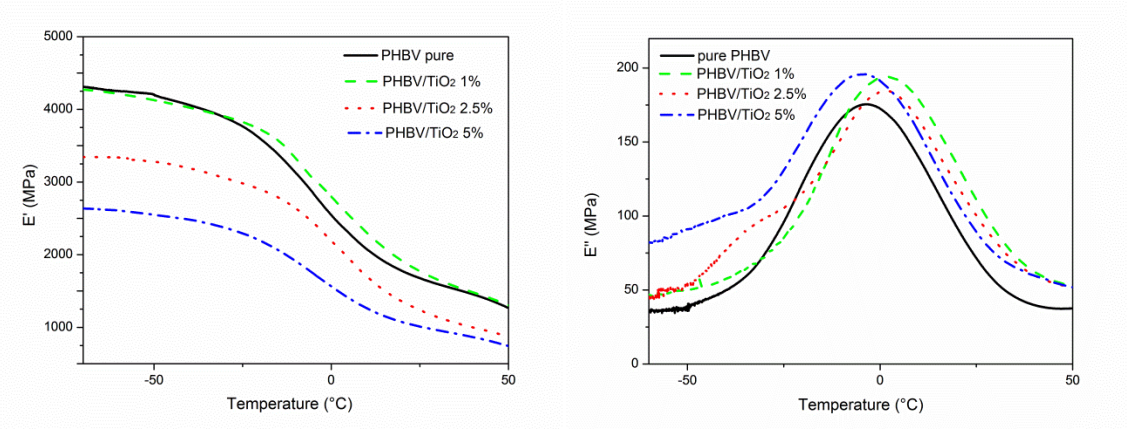
*valores de E' a 25°C
**valores de E' a -25°C

Silva e colaboradores [125] observaram o mesmo comportamento de redução no módulo de armazenamento de nanocompósitos de PLA/PEAD/TiO_2 em relação ao PLA puro. Os valores obtidos por eles para o módulo de armazenamento foram 3435 MPa e 1241 MPa para o PLA puro e para o nanocompósito PLA/PEAD/TiO_2, respectivamente. De acordo com as conclusões retiradas por eles, altas concentrações de nanopartículas na matriz polimérica podem formar aglomerados, produzindo pontos de ruptura na matriz polimérica, o que reduz a sua resistência mecânica. A aglomeração em altas concentrações de partículas leva a uma pequena transferência de tensão no compósito [126].

Melo et al. [124] estudou o comportamento termomecânico de compósitos de PHB com fibra de carnaúba com diferentes tratamentos na fibra. Foi observado através das análises que o módulo de armazenamento dos compósitos foi menor do que o do PHB puro em temperaturas menores que a T_g, porém maior, em temperaturas acima da T_g. Essa diminuição de E' pode estar associado a fraca adesão interfacial fibra-matriz. Através disso, pode-se dizer que os nanocompósitos aqui estudados também possuem um módulo de armazenamento menor em relação ao PHBV puro, possivelmente devido a má adesão entre a interface da nanopartícula e a matriz polimérica, ou devido a aglomeração de partículas que levou a uma transferência de tensão na matriz, diminuindo assim a resistência mecânica.

Observando o gráfico de módulo de perda (E"), Figura 24(b), nota-se dois picos na curva PHBV/TiO_2 2,5%, um relativo a transição vítrea e outro possivelmente devido a uma transição secundária. As relaxações secundárias são referentes a fase amorfa,

ocorrem em temperaturas inferiores a T_g e são classificadas em β, γ, δ. Essas relaxações envolvem movimentos moleculares localizados, pois abaixo da T_g a mobilidade das cadeias é reduzida [127].



(a) **(b)**

Figura 24. Medidas de DMA para o PHBV puro e os nanocompósitos PHBV/TiO_2: (a) módulo de armazenamento, E'; (b) módulo de perda, E''.

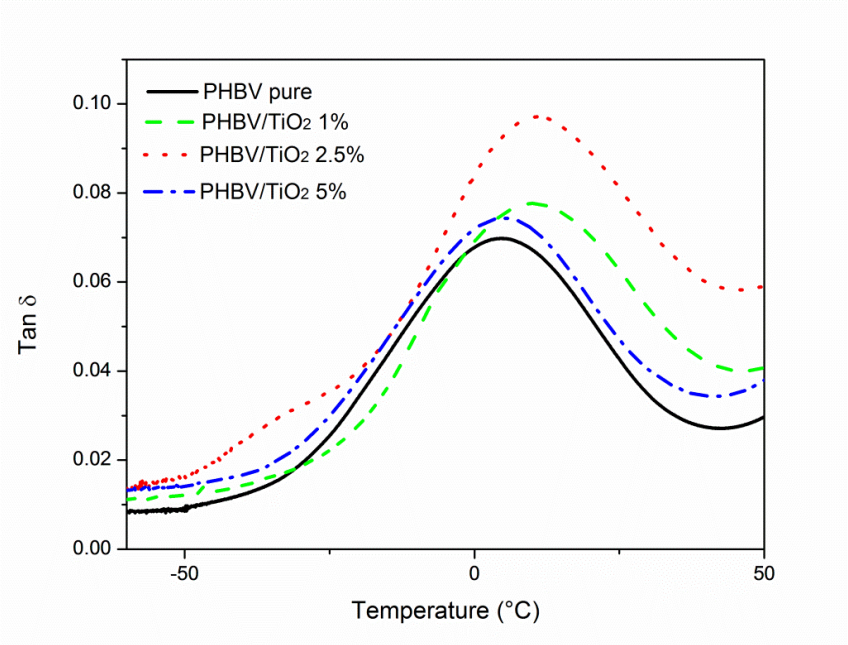


Figura 25. Medidas de DMA: Tan δ.

A tan δ, expressa pela relação entre E'' e E', leva em consideração a energia dissipada durante o ensaio dinâmico [123], também conhecida como fator de perda ou *damping*, ela expressa a capacidade do material em converter energia mecânica em calor [127].

Ainda não há na literatura um consenso de qual variável usar para determinar a temperatura de transição vítrea (T_g), contudo neste trabalho foi utilizado o máximo do pico na curva de tan δ para definir essa temperatura. Nota-se nas curvas de tan δ, Figura 25, que há um ligeiro deslocamento do pico relacionado a T_g para maiores temperaturas, com exceção do nanocompósito com 5%, que não apresentou um aumento na T_g devido a agregação de altas concentrações de nanopartícula na matriz polimérica. Comparando-se os resultados de T_g das medidas de DSC com as medidas de DMA, nota-se que há uma diminuição na T_g dos nanocompósitos com o aumento da inserção de dióxido de titânio nas medidas de DSC, e o oposto ocorre através das medidas de DMA, que apresentam maior sensibilidade, há um aumento na T_g com o aumento de concentração de nanopartícula.

A capacidade de amortecimento do PHBV e dos nanocompósitos foi avaliada a partir da área sob o pico da curva do módulo de perda (LA) e a partir da área sob o pico de tan δ (TA). O valor de LA é dado por:

$$LA = \int_{T_1}^{Tr} E'' \, dT = \frac{\left(E'_g - E'r\right) R.Tg^2\left(\pi/2\right)}{\left(E_a\right)_{AV}} \qquad (6)$$

Onde: E'_g e E'_r são o módulo de armazenamento antes e depois da Tg, respectivamente; e Tg é a temperatura de transição vítrea; T_1 e T_r são a temperatura abaixo e acima da Tg, respectivamente; $(E_a)_{AV}$ é a energia de ativação do processo de relaxação polimérico; R é a constante universal dos gases.

A T_g, a área abaixo da curva da tan δ (TA) e a área sob o módulo de perda (LA), além dos valores calculados para a energia de ativação do PHBV e dos diferentes nanocompósitos são mostradas na Tabela 9.

Tabela 9. Propriedades de amortecimento calculadas para o PHBV e para os nanocompósitos com diferentes teores de dióxido de titânio.

Amostra	Tg (°C)	LA (MPa.K)	TA (K)	Ea_{AV} (KJ. Mol^{-1})
PHBV	4,3	9513	3,87	310,2
PHBV/TiO_2 1%	9,8	11062	4,49	266,7
PHBV/TiO_2 2.5%	10,5	11112	5,95	227,5
PHBV/TiO_2 5%	5,0	12206	4,35	149,5

Como pode ser observado na Tabela 9, ocorreu um aumento na área sob a curva do módulo de perda (LA) e da tan δ em função da temperatura para o PHBV com o aumento no teor de dióxido de titânio nos nanocompósitos, mostrando um aumento nas propriedades de amortecimento dos nanocompósitos quando comparados ao polímero puro. Esse aumento na área sob a curva do módulo de perda ocorreu devido ao aumento na concentração dos grupos que apresentam elevada capacidade para dissipar energia mecânica em calor [121]. Além disso, pode-se observar que a energia de ativação diminui com o aumento da concentração de dióxido de titânio, indicando que a presença das nanopartículas de TiO_2 nos nanocompósitos diminui a energia para o processo de relaxação.

5.3 Estudo de Fotodegradação

O estudo de fotodegradação das amostras é importante para verificar a presença de reações químicas decorrentes da exposição dos filmes em luz ultravioleta artificial.

A Figura 26 mostra os filmes de PHBV e dos nanocompósitos antes e após 312 horas expostos a fotodegradação. Observou-se que após esse período, os filmes ficaram frágeis e quebradiços, além de terem mudado de cor, porém não houve variação da massa. De acordo com Sadi et al. [128] o PHB pode apresentar mudança na cor após exposição UV. Em seus estudos, corpos de prova injetados de PHB, anteriormente marrons, se tornaram completamente brancos após exposição UV. Análises mostraram que esse branqueamento não é resultado da formação de grupos cromóforos, mas provavelmente originário a partir da característica topológica das amostras expostas, que formam rachaduras na superfície do PHB, causando aumento da rugosidade do material.

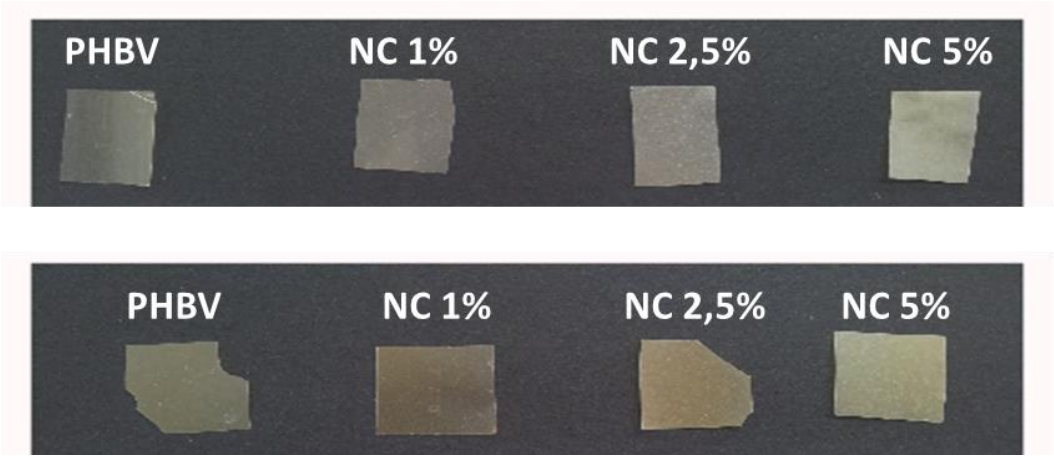


Figura 26. Amostras de PHBV, PHBV/TiO_2 1%, PHBV/TiO_2 2.5%, PHBV/TiO_2 5% antes (acima) e depois da fotodegradação.

As amostras submetidas a vários períodos de exposição foram caracterizadas por meio de medidas de espectroscopia de infravermelho. A Figura 27 mostra o espectro de infravermelho dos filmes de PHBV e dos nanocompósitos. Como pode ser observado, ocorreu uma variação na intensidade das bandas com o aumento do tempo de exposição à luz. Não foi observada a presença de novos picos correspondentes à presença de novas ligações químicas. Um comportamento similar pode ser observado em outro estudo [128], onde os picos característicos do PHB não apresentaram mudanças características após 12 semanas exposto a fotodegradação, porém também houve uma diferença nas intensidades do espectro das amostras não expostas e expostas que o autor afirma ser devido a diferença do tamanho da partícula dos materiais no disco de KBr.

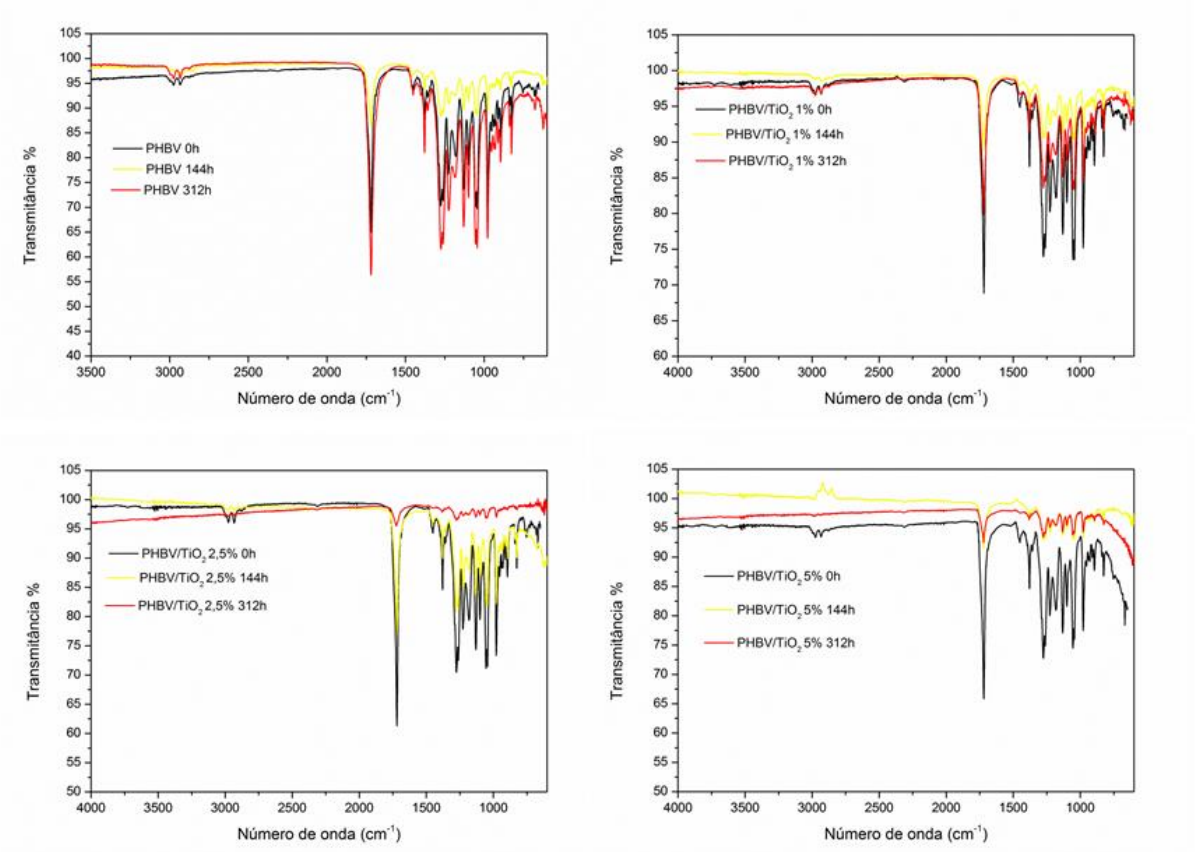


Figura 27. FTIR do PHBV e dos nanocompósitos submetidos à fotodegradação.

A fase anatase do dióxido de titânio é a estrutura mais ativa para fotodegradação [129]. Muitos pesquisadores argumentam que a fase rutilo é pouco fotoativa ou até mesmo que não possui atividade fotocatalítica [130]. Como foi verificado através das análises de DRX, a quantidade de anatase e rutilo obtida neste trabalho foi em média 50% para cada fase. Desse modo, acredita-se que a fotodegradação dos nanocompósitos foi influenciada pela concentração de anatase presente na amostra.

O dióxido de titânio pode causar efeito fotocatalítico gerando espécies oxidantes no meio, o que leva a degradação do polímero [131] (Figura 28).

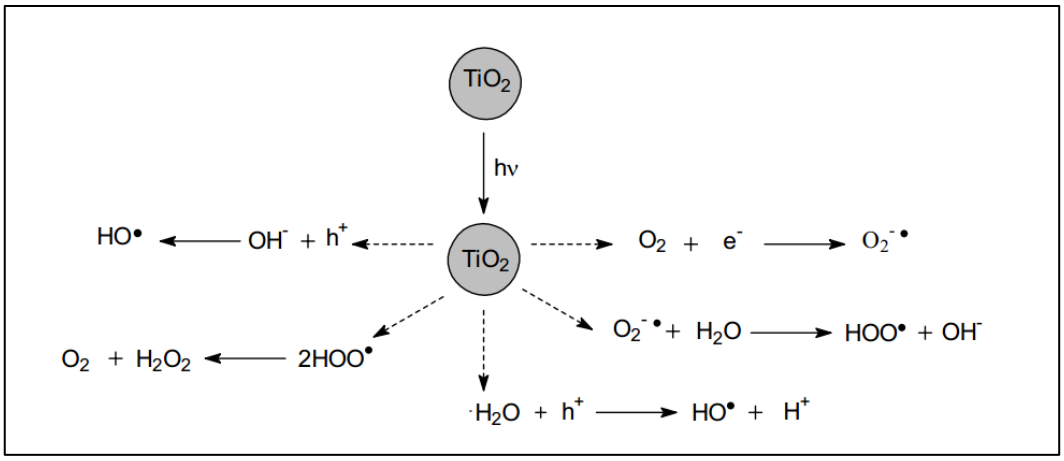


Figura 28. Esquema da geração de espécies de oxigênio ativas na superfície do dióxido de titânio [64].

A degradação fotocatalítica da matriz polimérica é iniciada por espécies ativas de oxigênio formadas na superfície do TiO_2. Essas espécies ativas atacam as da cadeia polimérica vizinha retirando os átomos de hidrogênio vizinho formando radicais carbônicos, com reações sucessivas que podem formar derivados carboxilados resultando na clivagem da cadeia [131].

5.4 Biodegradação em meio líquido

As amostras de PHBV e dos nanocompósitos foram submetidas ao ensaio de biodegradação em meio líquido com o intuito de simular a biodegradação que poderia ocorrer em seu destino final. As amostras foram imersas em tubos contendo uma solução mineral com microorganismos durante dez dias. A formação de biomassa nos corpos de prova de PHBV e dos nanocompósitos foi observada e se tornou mais espessa com o aumento do tempo de exposição ao meio líquido, isso indica o alto teor de proteína (extracelular e intracelular) presente no meio, que serve como alimento para o teste de degradação polimérica [132].

As amostras controles foram aquelas imersas apenas em solução mineral estéril sem a presença de microorganismos, pois a permanência da amostra nesta solução poderia resultar na perda de massa decorrente da degradação física do material, portanto as amostras controle servem para mostrar que a degradação ocorreu devido a ação dos microorganismos e não devido a ação física, como a agitação dos tubos.

A biodegradabilidade das amostras foi determinada pela perda de massa ao longo do tempo, como podem ser visualizadas na Figura 29.

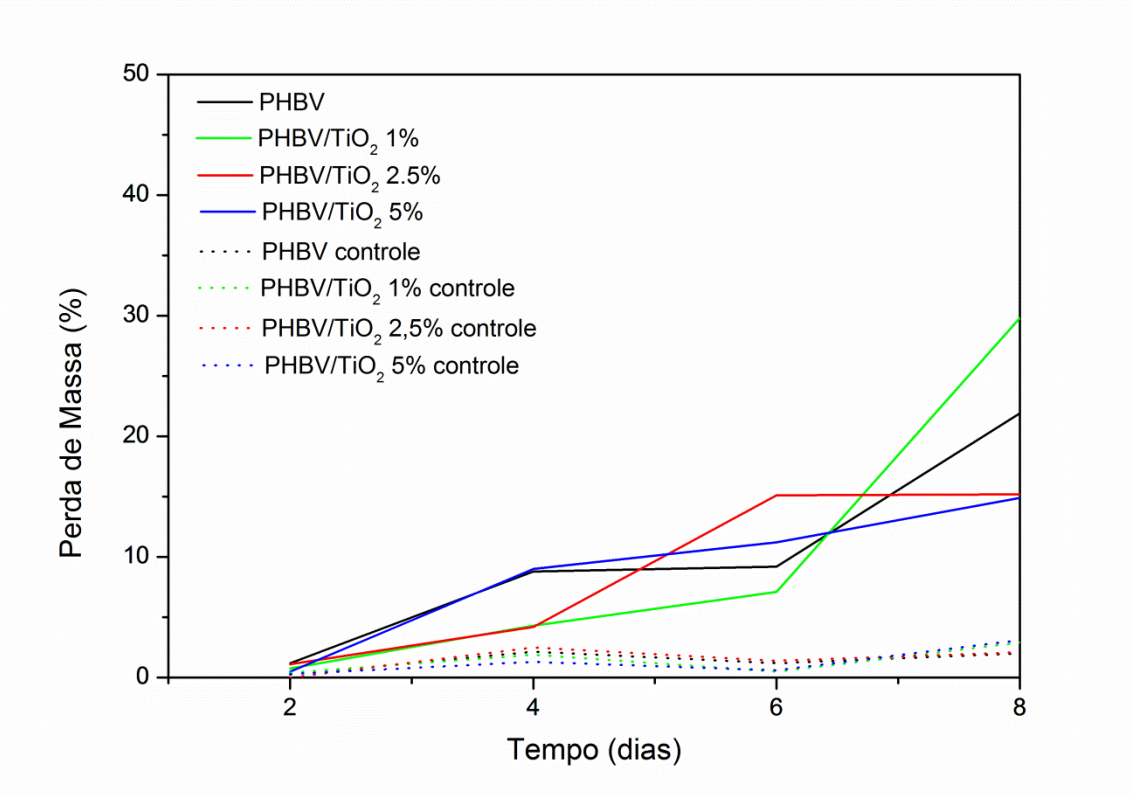


Figura 29. Perda de massa das amostras submetidas ao teste de biodegradação no meio líquido.

Pode-se observar que a perda de massa de todas as amostras controles permaneceu quase que constante ao longo do tempo, isso indica que a degradação decorrente de fatores físicos, tais como temperatura e agitação, não interfere de forma significativa no resultado da biodegradação dos materiais.

Os resultados mostraram alta atividade de degradação do polímero e dos nanocompósitos imersos em suspensão de bactérias, pois houve redução da massa dos filmes. A perda de massa máxima do PHBV puro alcançou 21,9% em 8 dias de incubação. Para o nanocompósito com 1% de TiO_2 a perda de massa após 8 dias foi 29,8%. Este resultado indica a elevada biodegradabilidade deste nanocompósito no período estudado, possivelmente relacionada a maior homogeneidade que o nanocompósito com 1% apresenta em relação aos demais nanocompósitos. A perda de massa está relacionada a fatores como tipo de microrganismo presente, áreas superficial da amostra, temperatura, pH, e disponibilidade de oxigênio e nutrientes presentes no

meio. Bucci et al [133], estudaram a biodegradação de embalagens de PHB. Em um meio contendo resíduo e esgoto, as amostras degradaram completamente em 90 dias.

Os valores de perda de massa das amostras de PHBV e dos nanocompósitos também estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Perda de massa das amostras de PHBV e dos nanocompósitos submetidos ao teste de biodegradação no meio líquido a 30°C sob 120 rpm de agitação.

	Perda de Massa (%)			
Amostra	**2 dias**	**4 dias**	**6 dias**	**8 dias**
PHBV	1,2	8,8	9,2	21,9
PHBV/TiO_2 1%	0,75	4,3	7,1	29,8
PHBV/TiO_2 2.5%	1,1	4,2	15,1	15,2
PHBV/TiO_2 5%	0,5	9,0	11,2	14,9

Estudos revelam que a perda de massa de materiais é resultado da atividade bacteriana, Luo e Netravali [132] atribuíram que a taxa de perda de massa de um filme de PHBV exposto às condições de compostagem é resultado de mudanças na atividade bacteriana. Assim, qualquer alteração na velocidade de perda de massa dos materiais possivelmente pode ser atribuída às mudanças na atividade bacteriana.

5.5 Biodegradação no solo

Para o estudo de biodegradação no solo, as amostras produzidas por *casting* foram enterradas em terra vegetal por um período de no máximo 20 dias. A cada 5 dias, uma amostra do material foi analisada pela determinação de perda de massa e fotografadas para verificar a ocorrência de alterações macroscópicas nas amostras ao longo do tempo de contato com o solo.

A Figura 30 mostra as amostras de PHBV que foram enterradas e retiradas a cada 5 dias de incubação em comparação ao controle (amostra não enterrada).

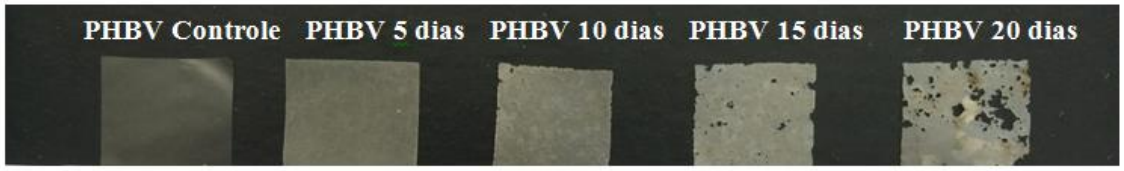


Figura 30. Amostras de PHBV submetidas ao ensaio de biodegradação no solo (0, 5, 10, 15 e 20 dias).

Quando retiradas do solo, todas as amostras apresentaram uma grande quantidade de terra aderida na superfície (Figura 31). Após a lavagem, foi possível observar a perda de algumas propriedades físicas do PHBV e dos nanocompósitos, como perda de brilho e rugosidade na superfície.

Figura 31. Detalhe da terra aderida na amostra.

O aspecto final das amostras dos nanocompósitos de PHBV com 1%, 2,5% e 5% de dióxido de titânio, além de seu aspecto inicial (amostras controle, não enterradas) pode ser observado nas Figuras 32, 33 e 34.

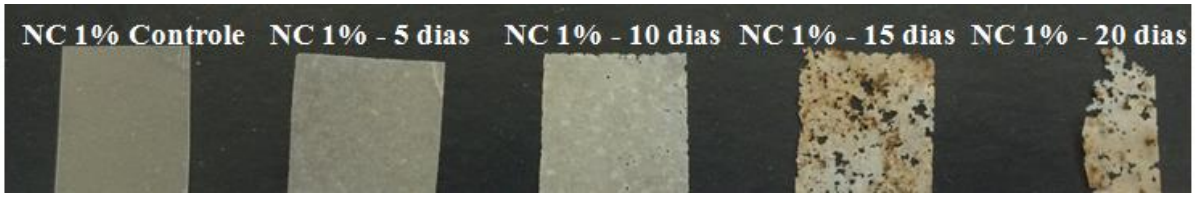


Figura 32. Amostras do nanocompósito PHBV/TiO_2 1% submetidas ao ensaio de biodegradação no solo e controle.

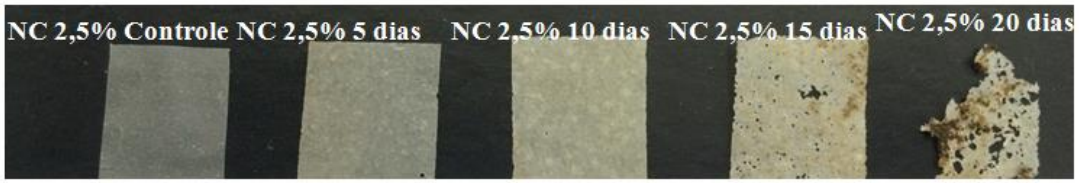


Figura 33. Amostras do nanocompósito PHBV/TiO_2 2,5% submetidas ao ensaio de biodegradação no solo e controle.

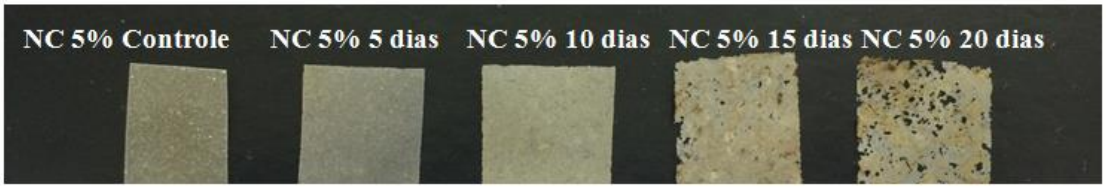


Figura 34. Amostras do nanocompósito PHBV/TiO_2 5% submetidas ao ensaio de biodegradação no solo e controle.

Nota-se que todas as amostras depois de cinco dias em contato com o solo não apresentaram mudanças macroscópicas significativas. A partir de 10 dias enterradas, as amostras começam a apresentar alguns pequenos furos, decorrentes do início do processo de degradação. Todas as amostras apresentaram um alto grau de degradação, fragilidade e perda de dimensões, após o período total de contato com o solo, os filmes claramente apresentaram mudanças morfológicas e estruturais depois de 20 dias enterrados no solo, o que caracteriza o processo de biodegradação. Essas mudanças são atribuídas à ação enzimática dos microorganismos do solo, o que causou uma reação oxidativa e/ou rearranjo na cadeia polimérica.

Além das análises macroscópicas, foi determinada também a perda de massa das amostras, comparando a massa inicial e final, para determinar a taxa de biodegradação. Analisando a Figura 35, pode-se perceber que conforme aumenta o tempo em contato da amostra com o solo, aumenta-se a quantidade de perda de massa do material, mas não de uma maneira proporcional. Na Tabela 11 estão apresentados os valores de perda de massa calculados. No final de 20 dias enterrados, a perda de massa média para o PHBV foi de 77,5%, enquanto para o nanocompósito com 5% de dióxido de titânio foi menor, 65,1%. A amostra que apresentou maior perda de massa foi do nanocompósito 2,5%, com 83,1%. As mudanças na morfologia das amostras são devido a ação enzimática de microorganismos no solo, o que causou reações oxidativas e/ou rearranjo na cadeia polimérica. A degradação de filmes poliméricos ocorre através do ataque microbiano,

que pode ser devido a ação de exo e/ou endo-enzimas e essa ação é influenciada pela cristalinidade e pela população microbiana no solo.

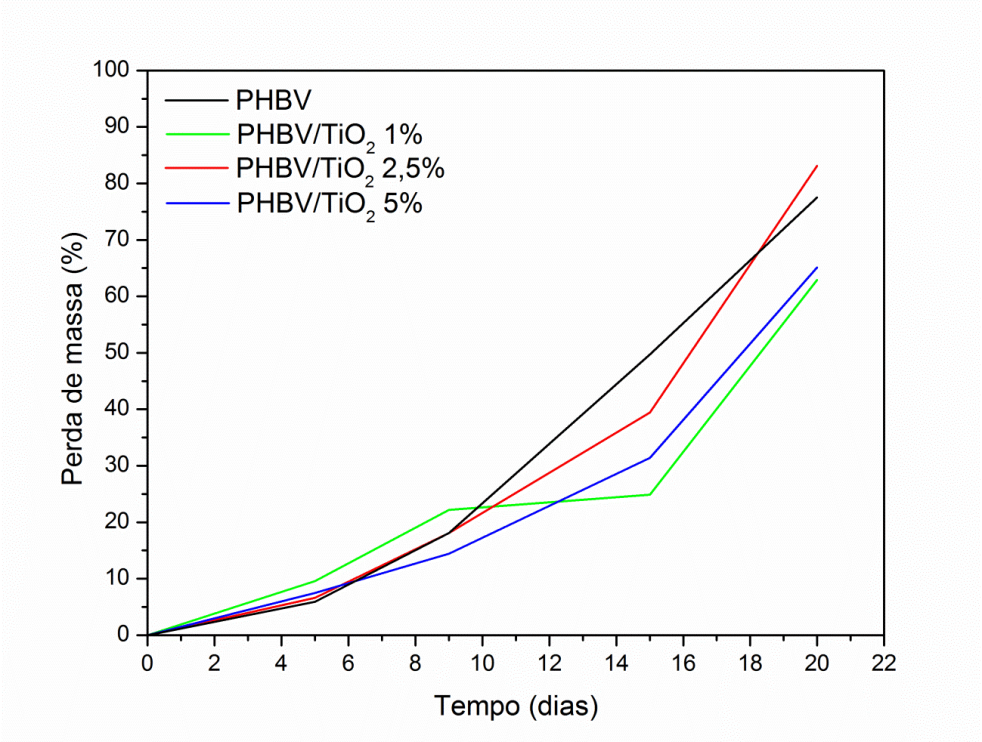


Figura 35. Perda de massa das amostras submetidas ao teste de biodegradação no solo.

Tabela 11. Perda de massa das amostras de PHBV e dos nanocompósitos submetidos ao teste de biodegradação no solo a 28°C.

	Perda de Massa (%)			
Amostra	**5 dias**	**10 dias**	**15 dias**	**20 dias**
PHBV	5,9	18,1	49,7	77,5
PHBV/TiO_2 1%	9,6	22,2	24,9	62,9
PHBV/TiO_2 2.5%	6,6	18,1	39,4	83,1
PHBV/TiO_2 5%	7,5	14,4	31,4	65,1

Alguns estudos relatam o tempo de degradação do PHBV no solo. Chinaglia et al. [134], enterraram PHBV puro no solo e notaram que após 30 dias ele se degradou completamente.

5.6 Eletrofiação

A segunda técnica utilizada neste trabalho para a preparação de PHBV e dos nanocompósitos foi a eletrofiação. Esta técnica é importante porque permite a produção de nanofibras contínuas que possuem uma área específica grande, formando uma rede com várias interconexões (manta) que facilitam a troca gasosa, o que possibilita a regeneração da pele danificada. As mantas eletrofiadas foram produzidas depois da otimização da viscosidade da solução polimérica, uma vez que a produção das mantas de boa qualidade, sem "gotas", é dependente desta variável, além de outras como distância da agulha ao coletor e voltagem aplicada.

De acordo com observações experimentais, o jato eletrofiado possui quatro regiões diferentes. A primeira é chamada de cone de Taylor, onde a gota submetida a um potencial é estirada até o formato aproximado de um cone. Na zona de transição, segunda região, a tensão de estiramento é pequena até atingir a o segmento linear, terceira região, caracterizada por uma alta tensão longitudinal. A instabilidade do jato é causada devido às tensões causadas pela força elétrica na superfície do jato leva a formação da região de espalhamento, quarta região [135].

O estudo da morfologia das mantas eletrofiadas foi feito pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A Figura 36 mostra a morfologia da manta eletrofiada com uma solução polimérica composta 15% m/v PHBV/clorofórmio, uma voltagem de 15 kV, distância da ponta da agulha até o coletor de 10 cm, taxa de alimentação de 0,5 mL/min e a velocidade de rotação do coletor de 60 rpm. As mantas foram analisadas sobre a folha de alumínio e colada em um adesivo de carbono dupla face para serem fixadas no porta amostra. Nota-se na Figura 36 a formação de aglomerados na forma de estruturas globulares em todas as amostras que são provavelmente devido a dissolução incompleta do polímero.

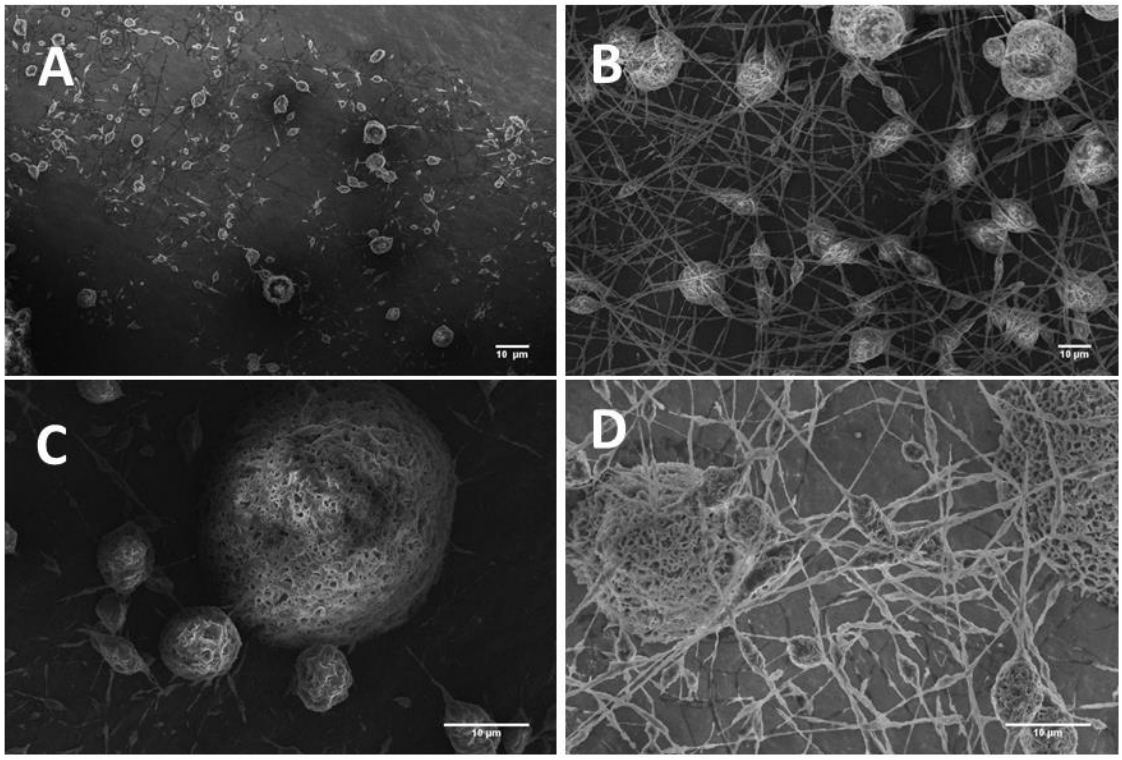


Figura 36. MEV eletrofiação a)PHBV; b)NC 1%; c)NC 2,5% e d) NC 5%.

Depois de ajustes nos parâmetros, as melhores condições de preparo encontradas foram: solução final é composta 18% m/v PHBV em 90/10 clorofórmio/DMF co-solvente, uma voltagem de 20 kV, distância da ponta da agulha até o coletor de 10 cm, taxa de alimentação de 0,5 mL/min e a velocidade de rotação do coletor de 60 rpm. As microscopias das mantas obtidas seguindo esses parâmetros estão apresentadas na Figura 37. Observa-se a formação de fibras finas contínuas e lisas tanto para o PHBV puro como para os nanocompósitos, além de que ainda pode se ver que algumas fibras são porosas, o que é de suma importância para o crescimento de células. Para a produção de tecidos para o corpo humano, os suportes poliméricos precisam ter alguns pré-requisitos, como porosidade elevada, uma química superficial que permita a adesão celular, além de possuir a mesma estrutura da matriz extracelular. As nanofibras obtidas pela eletrofiação possuem a mesma estrutura que as matrizes extracelulares naturais, desse modo, são candidatos ideais para a produção desse suporte [136]. Adicionalmente, pode ser observado que as nanopartículas estão distribuídas sobre as superfícies das fibras de PHBV, podendo ser verificadas como os pontos mais claros na micrografia.

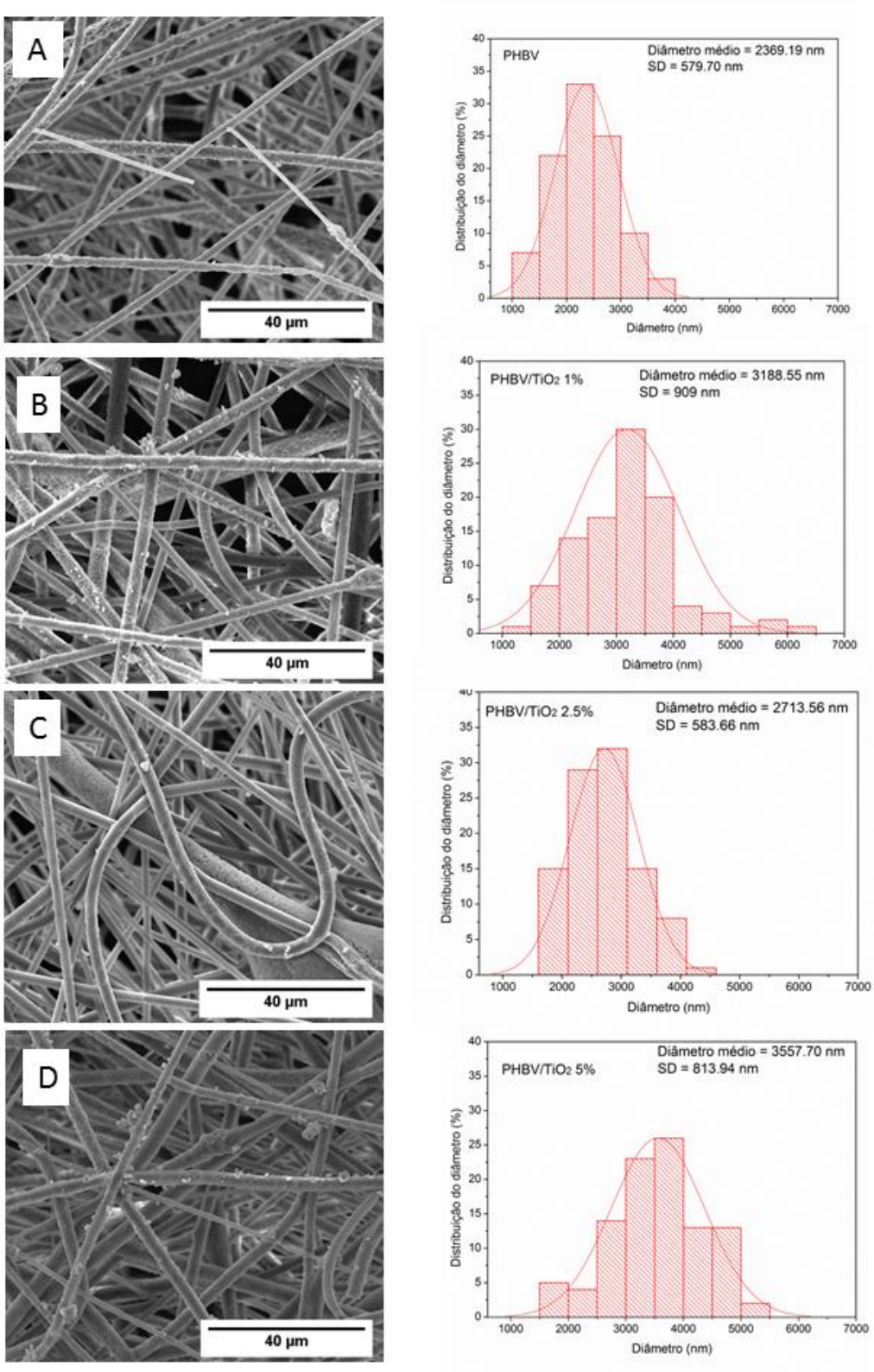


Figura 37. MEV das amostras de eletrofiação do PHBV e dos nanocompósitos: (a) PHBV puro, (b) PHBV/TiO_2 1%, (c) PHBV/TiO_2 2,5%, (d) PHBV/TiO_2 5% e histogramas do diâmetro das fibras.

A Figura 37 apresenta também os histogramas do diâmetro médio calculado para a espessura das fibras produzidas. O PHBV puro apresentou fibras uniformes com diâmetro médio de 2,37 ± 0,58 μm, a adição de dióxido de titânio no polímero resultou em fibras mais grossas com diâmetro de 3,19 ± 0,81 μm (PHBV/TiO_2 1%), 2,71 ± 0,58 μm (PHBV/TiO_2 2,5%) e 3,56 ± 0,81 μm (PHBV/TiO_2 5%). O aumento no diâmetro da fibra pode ser atribuído ao aumento na viscosidade da solução a ser eletrofiada quando nanopartículas são adicionadas, esse aumento na viscosidade requer mais energia para superar a tensão superficial na eletrofiação, formando fibras mais grossas [137].

5.7 Crescimento Celular

O efeito da superfície das amostras de PHBV modificado sobre a proliferação de células de fibroblastos foi avaliado em função do tempo, através do ensaio metabólico do MTT. Esse ensaio mede a habilidade da enzima mitocondrial desidrogenase na viabilidade celular em quebrar os anéis tetrazolium do MTT e formar cristais de formazan, que são impermeáveis à membrana celular e, portanto, são acumulados em células saudáveis [138].

Os valores de absorbância dos poços da placa contendo células incubadas com PHBV puro foram utilizados como 100% de viabilidade com a finalidade de analisar o efeito da presença das nanopartículas de dióxido de titânio sobre a proliferação celular. Assim, os valores de absorbância dos poços com células incubadas com amostras foram divididos pelo valor médio da absorbância dos poços incubados com PHBV puro e multiplicados por 100 (Equação 7). Os valores resultantes foram utilizados no cálculo de viabilidade média e desvio padrão apresentados na Figura 38.

$$\text{Viab. Amostra (\%)} = \frac{\text{Abs Amostra}}{\text{Media Abs PHBV}} \text{x } 100 \qquad (7)$$

Na Figura 38 são apresentadas as médias dos valores de viabilidade, obtidos após os tempos de 24h, 48h, 72h e 96h de cultivo de células sobre as amostras com diferentes proporções de PHBV e nanopartículas de dióxido de titânio.

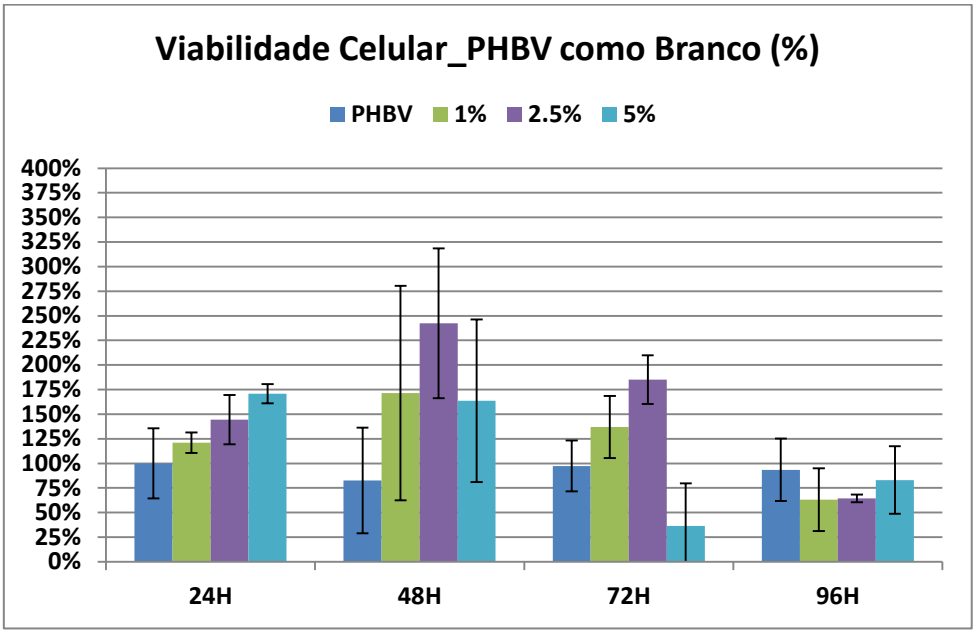


Figura 38. Viabilidade celular de células MEF cultivadas sobre amostras de PHBV modificado com nanopartículas de dióxido de titânio em diferentes concentrações e PHBV não modificado. Resultados expressos como % da viabilidade celular.

De uma maneira geral, foi observado que as células de MEF (fibroblasto embrionário de murinos) cultivadas sobre as mantas de PHBV apresentaram uma boa adesão e taxa de multiplicação sobre o material. No entanto, nota-se que durante o período de 24h o crescimento de células em todas as amostras foi maior em relação ao PHBV puro, além disso, o crescimento celular aumenta com o aumento da concentração de dióxido de titânio, indicando que a nanopartícula acelera a adesão e multiplicação celular. Acredita-se que esse aumento na viabilidade celular dos nanocompósitos se deve as modificações físico-químicas no polímero devido à inserção das nanopartículas, as quais modificaram a hidrofilicidade do PHBV [139]. Substratos mais hidrofílicos tendem a suportar uma melhor interação com a célula, assim, depois de aderidas, as células iniciam seu processo de espalhamento, divisão e produção de matriz extracelular nova [14]. Nos períodos de 48h e 72h, o crescimento celular sobre as amostras contendo 1% e 2,5% também foi superior ao crescimento celular observado para PHBV puro, mas a amostra com 5% não apresentou viabilidade celular significativamente diferente da amostra de PHBV puro. O mesmo resultado se repetiu para o período de 96h para todas as amostras, ou seja, neste período, a viabilidade celular diminui para todas as amostras comparadas com períodos mais curtos e os valores de viabilidade celular são equivalentes, considerando o desvio padrão para todas as amostras contendo ou não

nanopartículas. Acredita-se que neste período (96h), as células atingiram confluência no poço e com isso houve morte celular e/ou inibição do crescimento. Alguns estudos implicam que nanopartículas de TiO_2 podem ter efeito tóxico nas células [140,141]. A citotoxicidade das nanopartículas de TiO_2 foi também abordado por Abott et al. [142]. O fato para tal acontecimento é de que a resposta biológica causada por materiais em nanoescala pode ser diferente daquela causada por materiais em maior escala. O aumento na superfície reativa das nanopartículas de TiO_2 pode levar a agregação e desencadeamento de respostas imunes, o entupimento de vasos e artérias e acumulação nos órgãos associado com a filtração do sangue [143].

Em resumo, o teste de viabilidade celular sobre as mantas de PHBV realizado neste presente trabalho indicaram que a inserção de dióxido de titânio na matriz polimérica aumentou a proliferação celular. Deve ser ressaltado que a proliferação celular pôde ser avaliada uma vez que o número de células incubadas foi abaixo do valor de confluência (normalmente usado nos ensaios de citotoxicidade) e, portanto, as medidas de viabilidade celular após os períodos estudados permitiu avaliar a capacidade das células em se proliferar sobre cada tipo de amostra. O aumento da proliferação celular sobre as amostras contando nanopartículas pode ser resultado do aumento da área de contato entre a superfície e as células devido à morfologia da superfície, e consequentemente, propiciou uma maior área para a multiplicação celular e a adesão sobre o material. A modificação em níveis graduais da superfície dos polímeros de PHBV forneceu subsídios úteis no que se refere a estratégias de preparação de superfícies apropriada para aplicação em engenharia de tecidos.

5.8 *Spin coating*

Por fim, a terceira técnica utilizada neste trabalho para a fabricação dos nanocompósitos e do PHBV puro foi o *spin coating*, uma técnica utilizada para deposição de filmes finos e uniformes em um substrato planar. Assim como as demais técnicas de preparo de nanocompósitos, *casting* e eletrofiação, o preparo de membranas por *spin coating* foi feito depois do ajuste de alguns parâmetros como viscosidade da solução polimérica, tempo e velocidade de rotação do substrato. No entanto, a deposição da solução polimérica foi feita com o auxílio de uma pipeta numa placa de vidro, como velocidade de rotação (2000 rpm) e viscosidade da solução de 12%, a

temperatura ambiente. Após 40 segundo de rotação, o solvente evaporou e formaram-se os filmes que se destacaram facilmente do substrato de vidro, sem a necessidade de um polímero de sacrifício. Na Figura 39, podemos observar macroscopicamente que foram obtidos filmes finos e transparentes com homogeneidade morfológica sem furos ou bolhas visíveis, uma vez que foram encontrados os parâmetros certos para o processo.

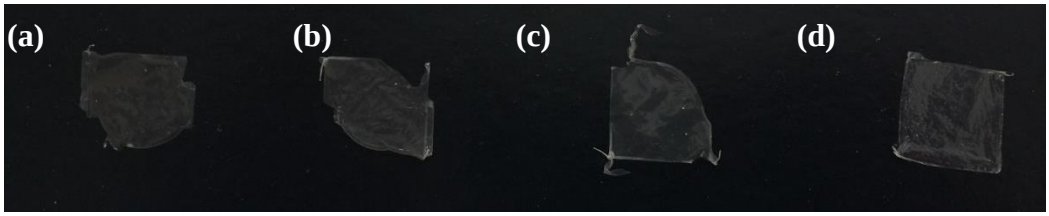


Figura 39. Filmes finos preparados pela técnica de *spin-coating* (a) PHBV; (b) PHBV/TiO_2 1%; (c) PHBV/TiO_2 2,5%, (d) PHBV/TiO_2 5%.

As espessuras dos filmes obtidos por essa técnica é de extrema importância para averiguar suas propriedades finais. Desse modo, a seção transversal das amostras foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura. Como as amostras são flexíveis e difíceis de quebrar, elas foram fraturadas no nitrogênio líquido e coladas num suporte perpendicularmente, de modo que os feixes de elétron do MEV poderiam ser focados na superfície do topo da amostra de uma forma mais viável. A Figura 40 apresenta a micrografia da seção transversal das amostras obtidas por *spin coating*.

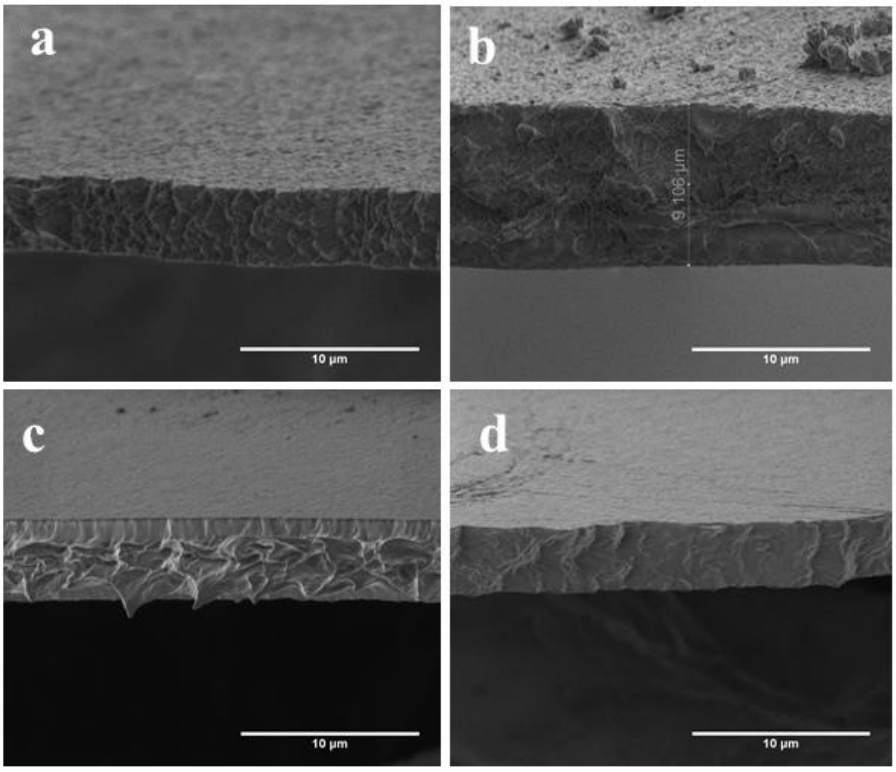


Figura 40. Imagens MEV da superfície de fratura das amostras de *spin coating* (a) PHBV; (b) PHBV/TiO_2 1%; (c) PHBV/TiO_2 2,5% e (d) PHBV/TiO_2 5%.

Através das imagens de MEV observa-se a formação de uma película extremamente fina na ordem de micrometros, por isso definimos aqui que os filmes finos produzidos são membranas. Na Tabela 12 estão apresentadas as espessuras obtidas para cada amostra obtida pela técnica do *spin coating*.

Tabela 12. Espessura dos filmes poliméricos obtidos por *spin coating*.

Amostra	**Espessura (µm)**
PHBV	4,395
PHBV/TiO_2 1%	9,106
PHBV/TiO_2 2,5%	4,590
PHBV/TiO_2 5%	3,788

Pode-se dizer que a diferença entre os valores da espessura das membranas pode estar associada ao volume e a viscosidade relativa das soluções precursoras utilizadas na deposição no substrato para a formação dos filmes. A espessura da membrana depende das propriedades da solução polimérica, taxa de evaporação do solvente (que por sua

vez depende da viscosidade do solvente, da pressão de vapor, da temperatura e da umidade local) e da velocidade de rotação [144]. Sendo que a velocidade de rotação é o fator mais importante nessa técnica. Autores relatam que um aumento na velocidade de rotação do substrato produz membranas mais finas, porém, com alta velocidade de rotação, as nanopartículas podem se remover do substrato, deixando apenas partículas grandes que provoca maior rugosidade da superfície [145].

Pich et al. [146] obtiveram filmes finos e transparentes de PHBV pela técnica de *spin coating*, eles então verificaram que a espessura do filme de PHBV aumentou de 700 nm para 5 μm, aumentando a concentração de PHBV na solução polimérica utilizando tolueno como solvente. Sabe-se que o solvente e as condições do *spin coating* podem afetar a agregação das cadeias poliméricas [147].

As análises de microscopia da superfície das membranas também foram feitas a fim de avaliar sua morfologia superficial e a presença de cavidades superficiais. Na Figura 41 nota-se a presença de pequenos aglomerados possivelmente associados as nanopartículas, além disso, pequenas fissuras ao longo da superfície podem ser presenciadas. Madrigal et al. [138], notaram que pequenas cavidades podem aparecer na superfície da nanomembrana e são atribuídas ao destacamento das nanopartículas aglomeradas. Por isso é muito importante controlar o tempo e a velocidade de rotação do processo a fim de evitar defeitos como este.

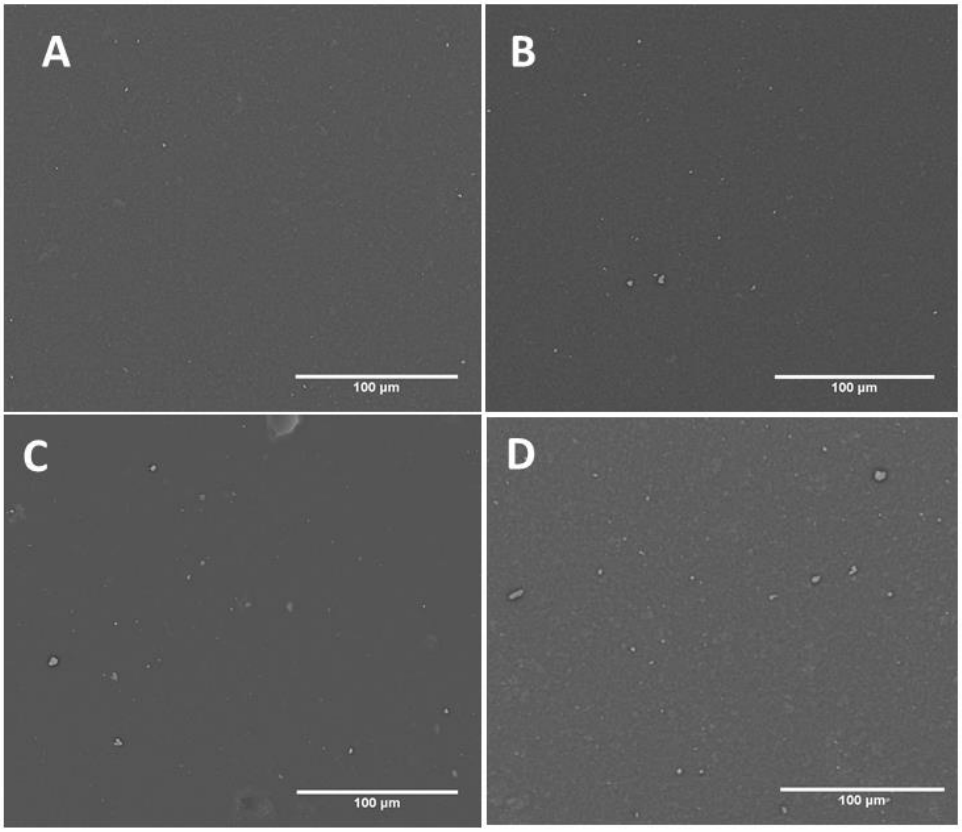


Figura 41. Microscopia da superfície das membranas de *spin-coating* A)PHBV; B)NC 1%; C)NC 2,5% e D)NC 5%.

Membranas produzidas por *spin coating* também podem ser utilizadas como suporte na engenharia de tecidos [138] [148]. Ela faz o papel de *scaffold* temporário que deve possuir propriedades mecânicas que se assemelham aquelas do osso natural e melhorar a adesão e crescimento celular, além do suporte físico para formação do novo osso [148]. Skarmoutsou et al. [148] estudaram o comportamento mecânico de revestimentos híbridos de diferentes composições químicas produzidos por *spin coating*, e concluíram que a estrutura híbrida constituída de 50% de material orgânico-inorgânico revela um bom comportamento mecânico e proliferação e crescimento celular, sugerindo ser um bom candidato para engenharia de tecidos.

O desenvolvimento de membranas sintéticas tem sido inspirado pelo fato de permitir o transporte seletivo de sais e oxigênio para as células assim como ocorre naturalmente nas membranas biológicas [149].

6. Conclusões

Foram obtidos nanocompósitos de PHBV com nanopartículas de TiO_2 com potencial para ser utilizados como *scaffolds* na engenharia tecidual.

Nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2) foram sintetizadas por meio do método hidrotérmico obtendo nanopartículas no formato de bastão com mistura de fases anatase e rutilo, confirmadas por meio das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e difração de raios-X. As nanopartículas apresentaram formato predominantemente de nanobastões com comprimento médio de 40 nm e diâmetro médio de 12 nm.

Foram preparados filmes poliméricos pela técnica de *casting* de PHBV puro e de nanocompósitos com as nanopartículas obtidas de dióxido de titânio, nas composições de 1%, 2,5% e 5% em massa. Esses materiais foram caracterizados por DSC, onde verificou-se que a inserção de dióxido de titânio diminui a temperatura de transição vítrea (Tg) do material. Porém houve um aumento na Tg quando observada através da técnica de DMA que é molecularmente mais sensível, mostrando que há uma interação entre as nanopartículas de TiO_2 e as cadeias poliméricas de PHBV. Análises de DMA também mostraram que ocorre uma diminuição na resistência mecânica (E') e um aumento nas propriedades de amortecimento dos nanocompósitos em relação ao PHBV puro. As análises de TGA mostraram que as nanopartículas não afetam a estabilidade térmica do PHBV uma vez que a temperatura de degradação foi praticamente a mesma para o PHBV e os nanocompósitos. Todos os nanocompósitos apresentaram espectro FTIR semelhantes ao do PHBV.

Os filmes de PHBV e dos nanocompósitos foram submetidos a ensaios de degradação. Estudos de fotodegradação mostraram que os filmes de PHBV e dos nanocompósitos se tornam mais fracos e quebradiços quando expostos a radiação UV. A taxa de biodegradabilidade dos materiais foi determinada através da perda de massa dos nanocompósitos durante os ensaios de biodegradação. Os ensaios de biodegradação em meio líquido mostraram uma elevada taxa de biodegradação dos materiais, sendo que o nanocompósito 1% alcançou a maior biodegradabilidade chegando a perder 29,8% de massa em 8 dias de incubação. Já no estudo de biodegradação em solo, concluiu-se que conforme aumenta o tempo em contato da amostra com o solo, aumenta-se a quantidade de perda de massa do material, o nanocompósito com 2,5% de TiO_2 alcançou a maior perda de massa, 83% no final de 20 dias enterrado no solo.

Também foram preparadas mantas poliméricas do PHBV e dos nanocompósitos através da técnica da eletrofiação rotatória que produziu nanofibras lisas e sem rugosidades observadas através da técnica da microscopia eletrônica de varredura. Essas mantas possuem qualidade ideal para o estudo de crescimento celular, pois são semelhantes a estrutura da matriz extracelular, o que permite as trocas gasosas e de nutrientes, favorecendo o crescimento celular. Então foi realizado o estudo de viabilidade celular nas mantas eletrofiadas, conclui-se que, de uma maneira geral, as células cultivadas sobre membranas de PHBV apresentaram adesão e taxa de multiplicação sobre o material, além de que pequenas concentrações de nanopartículas, 1% e 2,5% aumentam a viabilidade celular, quando comparadas ao polímero puro.

A técnica de *spin coating* foi utilizada para a produção de filmes finos, com espessura média de 5,7 μm. Pode-se dizer que a diferença entre os valores da espessura pode estar associada ao volume e a viscosidade relativa das soluções precursoras utilizadas na deposição dos filmes. Essas membranas também podem ser boas candidatas para uso na engenharia de tecidos por permitirem o transporte de oxigênio para as células.

Referências Bibliográficas

[1] H. Shin, S. Jo, A.G. Mikos, Biomimetic materials for tissue engineering, Biomaterials. 24 (2003) 4353.

[2] L.G. Griffith, Polymeric biomaterials, Acta Mater. 48 (2000) 263.

[3] K. Kaneto, M. Kaneko, Y. Min, A.G. MacDiarmid, "Artificial Muscle": Electromechanical actuators using polyaniline films, Synth. Met. 71 (1995) 2211.

[4] R.H. Baughman, Conducting polymer artificial muscles, Synth. Met. 78 (1996) 339.

[5] R. Langer, D. a Tirrell, Designing materials for biology and medicine., Nature. 428 (2004) 487.

[6] M.J. Lysaght, A.L. Hazlehurst, Tissue engineering: The end of the beginning, Tissue Eng. 10 (2004) 309.

[7] M. Vert, S.M. Li, G. Spenlehauer, P. Guerin, Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters, J. Mater. Sci. Mater. Med. 3 (1992) 432–446.

[8] R.K. Kulkarni, K.C. Pani, C. Neuman, F. Leonard, Polylactic acid for surgical implants, Arch. Surg. 93 (1966) 839.

[9] V.L. Tsang, S.N. Bhatia, Three-dimensional tissue fabrication., Adv. Drug Deliv. Rev. 56 (2004) 1635.

[10] T. Välimaa, S. Laaksovirta, Degradation behaviour of self-reinforced 80L/20G PLGA devices in vitro, Biomaterials. 25 (2004) 1225.

[11] C.G. Ambrose, T.O. Clanton, Bioabsorbable implants: Review of clinical experience in orthopedic surgery, Ann. Biomed. Eng. 32 (2004) 171.

[12] L.G. Griffith, G. Naughton, Tissue engineering - current challenges and expanding opportunities, Science. 295 (2002) 1009.

[13] R. Langer, J.P. Vacanti, Tissue Engineering, Science. 260 (1993) 920.

[14] A.R. Santos Jr, M.L.F. Wada, Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual, Polímeros Ciência E Tecnol. 17 (2007) 308.

[15] Y. Wan, D. Wen, Preparation and characterization of porous conducting poly(dl-lactide) composite membranes, J. Memb. Sci. 246 (2005) 193.

[16] L. Ghasemi-mobarakeh, M.P. Prabhakaran, M. Morshed, Application of conductive polymers , scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering, J. Tissue Eng. Regen. Med. 5 (2011) e17.

[17] R. V. Nonato, P.E. Mantelatto, C.E. V. Rossell, Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol, Appl. Microbiol. Biotechnol. 57 (2001) 1.

[18] A. El-hadi, R. Schnabel, E. Straube, G. Mu, Correlation between degree of crystallinity , morphology , glass temperature , mechanical properties and biodegradation of poly (3-hydroxyalkanoate) PHAs and their blends, Polym. Test. 21 (2002) 665.

[19] R.W. Lenz, R.H. Marchessault, Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology, Biomacromolecules. 6 (2005) 1.

[20] J.S. Choi, W.H. Park, Effect of biodegradable plasticizers on thermal and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate), Polym. Test. 23 (2004) 455.

[21] A.J. Anderson, E.A. Dawes, Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, Microbiol. Rev. 54 (1990) 450.

[22] I. Gursel, C. Balcik, Y. Arica, O. Akkus, N. Akkas, V. Hasirci, Synthesis and mechanical properties of interpenetrating networks of polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate and polyhydroxyethyl methacrylate, Biomaterials. 19 (1998) 1137.

[23] C.W. Pouton, S. Akhtarb, Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery, Adv. Drug Deliv. Rev. 18 (1996) 133.

[24] S.-G. Hu, C.-H. Jou, M.-C. Yang, Biocompatibility and antibacterial activity of chitosan and collagen immobilized poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid), Carbohydr. Polym. 58 (2004) 173.

[25] G.A. Somorjai, H. Frei, J.Y. Park, Advancing the frontiers in nanocatalysis, biointerfaces, and renewable energy conversion by innovations of surface techniques, J. Am. Chem. Soc. 131 (2009) 16589.

[26] K. Grandfield, S. Gustafsson, A. Palmquist, Where bone meets implant: The characterization of nano-osseointegration, Nanoscale. 5 (2013) 4302.

[27] J.L. Dewez, J.B. Lhoest, E. Detrait, V. Berger, C.C. Dupont-Gillain, L.M. Vincent, et al., Adhesion of mammalian cells to polymer surfaces: from physical chemistry of surfaces to selective adhesion on defined patterns, Biomaterials. 19 (1998) 1441.

[28] A.R. Santos, S.H. Barbanti, E.A.R. Duek, H. Dolder, R.S. Wada, M.L.F. Wada, Vero cell growth and differentiation on poly(L-lactic acid) membranes of different pore diameters, Artif. Organs. 25 (2001) 7.

[29] C.-M. Lin, S.-K. Yen, Biomimetic growth of apatite on electrolytic TiO_2 coatings in simulated body fluid, Mater. Sci. Eng. C. 26 (2006) 54.

[30] J.-H. Lee, S.-E. Kim, Y.-J. Kim, C.-S. Chi, H.-J. Oh, Effects of microstructure of anodic titania on the formation of bioactive compounds, Mater. Chem. Phys. 98 (2006) 39.

[31] O. Storz, H. Gasthuber, M. Woydt, Tribological properties of thermal-sprayed Magneli-type coatings with different stoichiometries, Surf. Coatings Technol. 140 (2001) 76.

[32] Q.L. Feng, F.Z. Cui, H. Wang, T.N. Kim, J.O. Kim, Infuence of solution conditions on deposition of calcium phosphate on titanium by NaOH-treatment, J. Cryst. Growth. 210 (2000) 735.

[33] D. Choi, K.G. Marra, P.N. Kumta, Chemical synthesis of hydroxyapatite/poly(ε-caprolactone) composites, Mater. Res. Bull. 39 (2004) 417.

[34] S.J. Huang, Polymer Wast Management - Biodegradation, incineration, and recycling, J. Macromol. Sci. - Pure Appl. Chem. A. 32 (1995) 593.

[35] G. Swift, Directions for environmentally biodegradable polymer research, Acc. Chem. Res. 26 (1993) 105.

[36] G. Braunegg, G. Lefebvre, K.F. Genser, Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects, J. Biotechnol. 65 (1998) 127.

[37] C.S.K. Reddy, R. Ghai, Rashmi, V.C. Kalia, Polyhydroxyalkanoates: An overview, Bioresour. Technol. 87 (2003) 137.

[38] M. Zinn, B. Witholt, T. Egli, Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate, Adv. Drug Deliv. Rev. 53 (2001) 5.

[39] D. Akmal, Biodegradation of microbial polyesters P(3HB) and P(3HB-co-3HV) under the tropical climate environment, Polym. Degrad. Stab. 80 (2003) 513.

[40] K. Sudesh, H. Abe, Y. Doi, Synthesis , structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters, Prog. Polym. Sci. 25 (2000) 1503.

[41] Disponível em: <https://estructurayfuncioncelularbacteriana.wikispaces.com/Pol%C3%ADmeros+carbonados+ de+reserva,+otras+incluisones+y+sustancias+de+reserv> Acesso em 06 de outubro de 2015, Estruct. Y Func. Cel. Bact. (n.d.).

[42] L. da Silva, M.F. Rodrigues, J.G. Gomez, Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/biodiversidade/bio15.htm> Acesso em 06 de outubro de 2015, Com Ciência. (n.d.).

[43] B. Fei, C. Chen, H. Wu, S. Peng, X. Wang, L. Dong, et al., Modified poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) using hydrogen bonding monomers, Polymer. 45 (2004) 6275.

[44] C.C. Han, J. Ismail, H.-W. Kammer, Melt reaction in blends of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and epoxidized natural rubber, Polym. Degrad. Stab. 85 (2004) 947.

[45] A. Dufresne, D. Dupeyre, M. Paillet, Lignocellulosic flour-reinforced poly(hydroxybutyrate-co-valerate) Composites, J. Appl. Polym. Sci. 86 (2002) 2145.

[46] W.J. Liu, H.L. Yang, Z. Wang, L.S. Dong, J.J. Liu, Effect of nucleating agents on the crystallization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), J. Appl. Polym. Sci. 86 (2002) 2145.

[47] M. Avella, M.E. Errico, R. Rimedio, P. Sadocco, Preparation of biodegradable polyesters/high-amylose-starch composites by reactive blending and their characterization, J. Appl. Polym. Sci. 83 (2002) 1432.

[48] B.M.P. Ferreira, C.A.C. Zavaglia, E.A.R. Duek, Films of PLLA/PHBV: Thermal, morphological, and mechanical characterization, J. Appl. Polym. Sci. 86 (2002) 2898–2906.

[49] W.H. Lo, J. YU, Effects of the energy dissipation rate and surface erosion on the biodegradation of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and its blends with synthetic polymers in an aquatic medium, J. Appl. Polym. Sci. 83 (2002) 1036.

[50] W. Su, J. Zhang, Z. Feng, T. Chen, P. Ying, C. Li, Surface phases of TiO_2 nanoparticles studied by UV Raman spectroscopy and FT-IR spectroscopy, J. Phys. Chem. 112 (2008) 7710.

[51] G.T. Saleiro, S.L. Cardoso, R. Toledo, J.N.F. Holanda, Avaliação das fases cristalinas de dióxido de titânio suportado em cerâmica vermelha, Cerâmica. 56 (2010) 162.

[52] X. Chen, S.S. Mao, Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications, Chem. Rev. 107 (2007) 2891.

[53] Y. Hu, H.-L. Tsai, C.-L. Huang, Effect of brookite phase on the anatase–rutile transition in titania nanoparticles, J. Eur. Ceram. Soc. 23 (2003) 691.

[54] A.A. Bernardes, Síntese e caracterização de materias SiO_2 - TiO_2 e sua aplicação na degradação fotocatalítica de herbicidas, Diss. Mestrado, Esc. Química E Aliment. Univ. Fed. Do Rio Gd. (2010).

[55] S.S. Silva, F. Magalhães, T.C. Sansiviero, Nanocompósitos semicondutores ZnO/TiO_2. Testes fotocatalíticos, Quim. Nov. 33 (2010) 85.

[56] T. Rajh, N.M. Dimitrijevic, M. Bissonnette, T. Koritarov, V. Konda, Titanium dioxide in the service of the biomedical revolution, Chem. Rev. (2014) A.

[57] A.C.F.M. Costa, M.A. Vilar, H.L. Lira, R.H.G.A. Kiminami, L. Gama, Síntese e caracterização de nanopartículas de TiO_2, Cerâmica. 52 (2006) 255.

[58] J. Sun, L. Gao, Q. Zhang, Synthesizing and comparing the photocatalytic properties of high surface area rutile and anatase titania nanoparticles, J. Am. Ceram. Soc. 82 (2003) 1677.

[59] J. Yang, S. Mei, J.M.F. Ferreira, Hydrothermal synthesis of TiO_2 nanopowders from tetraalkylammonium hydroxide peptized sols, Mater. Sci. Eng. C. 15 (2001) 183.

[60] J. Zhou, G. Tian, Y. Chen, J.-Q. Wang, X. Cao, Y. Shi, et al., Synthesis of hierarchical TiO_2 nanoflower with anatase-rutile heterojunction as Ag support for efficient visible-light photocatalytic activity, Dalton Trans. 42 (2013) 11242.

[61] a C.F.M. Costa, M. a Vilar, H.L. Lira, R.H.G. a Kiminami, L. Gama, U. Federal, et al., Síntese e caracterização de nanopartículas de TiO_2, Cerâmica. 52 (2006) 255–259.

[62] J.-H. Kim, F. a Sheikh, H.W. Ju, H.J. Park, B.M. Moon, O.J. Lee, et al., 3D silk fibroin scaffold incorporating titanium dioxide (TiO_2) nanoparticle (NPs) for tissue engineering, Int. J. Biol. Macromol. 68 (2014) 158–168.

[63] S.M. Khaled, R. Sui, P.A. Charpentier, A.S. Rizkalla, Synthesis of TiO_2 - PMMA nanocomposite: Using methacrylic acid as a coupling agent, Langmuir. 23 (2007) 3988–3995.

[64] T.M. Arantes, Incorporação por via coloidal de nanopartículas sintéticas em polímeros comerciais, Diss. Mestrado, Cent. Ciências Exatas E Tecnol. Dep. Química, Univ. Fed. São Carlos. (2009).

[65] S. Manrich, E.D. Zanotto, E.J. Hage, Aplicabilidade da teorica clássica de nucleação modificada (CD-CNT) à cristalização de polímeros, Polímeros Ciência E Tecnol. (1992) 15.

[66] V.K. LaMer, R.H. Dinegar, Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols, J. Am. Chem. Soc. 72 (1950) 4847.

[67] L.F. Gorup, Nanopartículas coloidas de ouro e prata e sua funcionalização com dibutil-dicalcogenetos, Diss. Mestrado, Univ. Fed. São Carlos, Cent. Ciência Exatas E Tecnol. Programa Pós Grad. Em Química. (2010).

[68] G. Madhumitha, S.M. Roopan, Devastated crops: Multifunctional efficacy for the production of nanoparticles, J. Nanomater. 2013 (2013) 1–12.

[69] X. Zhang, C. Sun, N. Fang, Manufacturing at nanoscale: Top-down , bottom-up and system engineering, J. Nanoparticle Res. 6. (2004) 125–130.

[70] K. Suttiponparnit, J. Jiang, M. Sahu, S. Suvachittanont, T. Charinpanitkul, P. Biswas, Role of surface area, primary particle size, and crystal phase on titanium dioxide nanoparticle dispersion properties, Nanoscale Res. Lett. 6 (2011) 27.

[71] U. Schubert, N. Husing, A. Lorenz, Hybrid inorganic-organic materials by sol-gel processing of organofunctional metal alkoxides, Chem. Mater. 7 (1995) 2010.

[72] P. Hoai, P. Maiti, M. Okamoto, T. Kotaka, N. Hasegawa, A hierarchical structure and properties of intercalated polypropylene/clay nanocomposites, Polymer. 42 (2001) 9633.

[73] R. Roy, S. Komarneni, D.M. Roy, Multi-phasic ceramic composites made by sol-gel technique, Mater. Res. Soc. Symp. Proc. 32 (1984) 1984.

[74] K.H. Wang, M.H. Choi, C.M. Koo, Y.S. Choi, I.J. Chung, Synthesis and characterization of maleated polyethylene / clay nanocomposites, Polymer. 42 (2001) 9819.

[75] K.I. Winey, R.A. Vaia, Polymer nanocomposites, MRS Bull. 32 (2007) 314.

[76] J. Oberdisse, Aggregation of colloidal nanoparticles in polymer matrices, Mater. Sci. (2005) 1.

[77] A.C.C. Esteves, A. Barros-timmons, T. Trindade, Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos, 27 (2004) 798.

[78] R. Krishnamoorrti, R.A. Vaia, Polymer Nanocomposites: synthesis, characterization and modeling, ACS Symp. (2001) 804.

[79] H. Wiebeck, J. Harada, Plásticos de engenharia, Ed. Artiliber, São Paulo. (2005).

[80] M. Alexandre, P. Dubois, Polymer-layered silicate nanocomposites : preparation , properties and uses of a new class of materials, Mater. Sci. Eng. 28 (2000) 1.

[81] D.R. Paul, L.M. Robeson, Polymer nanotechnology: Nanocomposites, Polymer. 49 (2008) 3187.

[82] P. Maiti, C.A. Batt, E.P. Giannelis, New biodegradable polyhydroxybutyrate/layered silicate nanocomposites, Biomacromolecules. 8 (2007) 3393.

[83] L. Cabedo, D. Plackett, E. Gime, Studying the degradation of polyhydroxybutyrate-co-valerate during processing with clay-based nanofillers, J. Appl. Polym. Sci. 112 (2009) 3669.

[84] M. Lai, J. Li, J. Yang, J. Liu, X. Tong, H. Cheng, The morphology and thermal properties of multi-walled carbon nanotube and poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) composite, Polym. Int. 53 (2004) 1479.

[85] G.-F. Shan, X. Gong, W.-P. Chen, L. Chen, M.-F. Zhu, Effect of multi-walled carbon nanotubes on crystallization behavior of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), Colloid Polym. Sci. 289 (2011) 1005.

[86] B. Duan, W.L. Cheung, M. Wang, Optimized fabrication of Ca-P/PHBV nanocomposite scaffolds via selective laser sintering for bone tissue engineering, Biofabrication. 3 (2011) 015001.

[87] B. Duan, M. Wang, W. Zhou, W. Cheung, Nonisothermal melt-crystallization behavior of calcium phosphate/poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanocomposite microspheres, Polym. Eng Sci. 51 (2011) 1580.

[88] J.Y. Baek, Z.C. Xing, G. Kwak, K.B. Yoon, S.Y. Park, L.S. Park, et al., Fabrication and characterization of collagen-immobilized porous PHBV/HA nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering, J Nanomater. 2012 (2012) 1.

[89] W. Yu, C.-H. Lan, S.-J. Wang, P.-F. Fang, Y.-M. Sun, Influence of zinc oxide nanoparticles on the crystallization behavior of electrospun poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanofibers, Polymer. 51 (2010) 2403–2409.

[90] S. Hsu, T. Wu, C. Liao, Isothermal crystallization kinetics of poly (3-hydroxybutyrate)/layered double hydroxide nanocomposites, Polym. Sci. Part B Polym. Phys. 44 (2006) 3337.

[91] S. Hsu, T. Wu, C. Liao, Nonisothermal Crystallization Behavior and Crystalline Structure of Poly (3-hydroxybutyrate)/ Layered Double Hydroxide Nanocomposites, Polym. Sci. Part B Polym. Phys. 45 (2007) 995.

[92] E. Ten, J. Turtle, D. Bahr, L. Jiang, M. Wolcott, Thermal and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/cellulose nanowhiskers composites, Polymer. 51 (2010) 2652–2660.

[93] E. Morelius, M. Wolcott, J. Holbery, Study of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/cellulose nanowhisker composites prepared by solution casting and melt processing, J. Compos. Mater. 42 (2008) 2629.

[94] R.G. Nitz, H. Semke, D. Landers, R. Mu, Reactive extrusion of polycaprolactone compounds containing wood flour and lignin, J. Appl. Polym. Sci. 81 (2001) 1972.

[95] C. Ribeiro, C. Vila, D.B. Stroppa, V.R. Mastelaro, J. Bettini, R.W. Luiz, et al., Anisotropic growth of oxide nanocrystals: insights into the rutile TiO_2 phase, J. Phys. Chem. 111 (2007) 5871–5875.

[96] B.B. Neto, I.S. Scarminio, R.E. Bruns, Como fazer experimentos, 3ª Ed., Ed. Da Unicamp. (2007) 2007.

[97] G.A. Luurtsema, Spin coating for rectangular substrates, Thesis - Master Sci. Eletr. Eng. Dep. Electr. Eng. Comput. Sci. Univ. California. (1997).

[98] J. Matovic, Z. Jakši, Nanomembrane: a new MEMS/NEMS building block, Micro Electron. Mech. Syst. 5 (2009) 61.

[99] L.W. Hong, J. Yu, Environmental factors and kinetics of microbial degradation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in an aqueous medium, J. Appl. Polym. Sci. 87 (2003) 205–213.

[100] J.A. Ayllón, A. Figueras, S. Garelik, L. Spirkova, J. Durand, L. Cot, Preparation of TiO2 powder using titanium tetraisopropoxide decomposition in a plasma enhanced chemical vapor deposition (PECVD) reactor, J. Mater. Sci. Lett. 18 (1999) 1319–1321.

[101] M.K. Akhtar, Y. Xiong, S.E. Pratsinis, Vapor synthesis of titania powder by titanium tetrachloride oxidation, AIche J. 37 (1991) 1561–1570.

[102] S.E. Pratsinis, Flame aerosol synthesis of ceramic powders, Prog. Energy Combust. Sci. 24 (1998) 197–219.

[103] P.D. Cozzoli, A. Kornowski, H. Weller, Low-Temperature Synthesis of Soluble and Processable Organic-Capped Anatase TiO_2 Nanorods, J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 14539.

[104] P. Leidich, O. Linker, M. Panthöfer, W. Tremel, Synthesis of single crystalline sub-micron rutile TiO_2 rods using hydrothermal treatment in acidic media, CrystEngComm. 16 (2014) 8486.

[105] R. Danish, F. Ahmed, N. Arshi, M.S. Anwar, B.H. Koo, Facile synthesis of single-crystalline rutile TiO_2 nano-rods by solution method, Trans. Nonferrous Met. Soc. China. 24 (2014) s152–s156.

[106] F.V. Pereira, E.L. de Paula, J.P. Mesquita, A. de A. Lucas, V. Mano, Bionanocompósitos preparados por incorporação de nanocristais de celulose em polímeros biodegradáveis por meio de evaporação de solvente, automontagem ou eletrofiação, Quim. Nova. X (2014) 1.

[107] M. Jeng, Y. Wung, L. Chang, L. Chow, Dye-sensitized solar cells with anatase TiO_2 nanorods prepared by hydrothermal method, Int. J. Photoenergy. 2013 (2013) 1.

[108] C. Ribeiro, C.M. Barrado, E.R. Camargo, E. Longo, E.R. Leite, Phase transformation in titania nanocrystals by the oriented attachment mechanism: The role of the pH value, Chem. Eur. J. 15 (2009) 2217.

[109] R. Yndira, C. Padilla, J. Matos, A. Tinoco, A.S. Lima, D.P. Silva, et al., Propriedades morfológicas e físico-químicas da lipase Candida rugosa imobilizada em poli (3-hidroxibutirato-co- hidroxivalerato), XVIII Simpósio Nac. Bioprocessos. (2011) 1–6.

[110] Q.-S. Liu, M.-F. Zhu, W.-H. Wu, Z.-Y. Qin, Reducing the formation of six-membered ring ester during thermal degradation of biodegradable PHBV to enhance its thermal stability, Polym. Degrad. Stab. 94 (2009) 18–24.

[111] N. Nakayama, T. Hayashi, Preparation and characterization of poly(l-lactic acid)/TiO2 nanoparticle nanocomposite films with high transparency and efficient photodegradability, Polym. Degrad. Stab. 92 (2007) 1255–1264.

[112] X. Peng, E. Ding, F. Xue, In situ synthesis of TiO2/polyethylene terephthalate hybrid nanocomposites at low temperature, Appl. Surf. Sci. 258 (2012) 6564–6570.

[113] S.A. Casarin, Blendas de PHBV e PCL para uso em dispositivos de osteossíntese, Tese Doutorado, Cent. Ciências Exatas E Tecnol. Univ. Fed. São Carlos. (2010).

[114] L.M.W.K. Gunaratne, R. a. Shanks, Multiple melting behaviour of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) using step-scan DSC, Eur. Polym. J. 41 (2005) 2980–2988.

[115] S. Wang, C. Song, G. Chen, T. Guo, J. Liu, B. Zhang, et al., Characteristics and biodegradation properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/organophilic montmorillonite (PHBV/OMMT) nanocomposite, Polym. Degrad. Stab. 87 (2005) 69.

[116] K.L. Dagnon, H.H. Chen, L.H. Innocentini-Mei, N. a. D'Souza, Poly[(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyvalerate)]/layered double hydroxide nanocomposites, Polym. Int. 58 (2009) 133–141.

[117] A. Buzarovska, A. Grozdanov, M. Avella, G. Gentile, M. Errico, Poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)/titanium dioxide nanocomposites: A degradation study, J. Appl. Polym. Sci. 114 (2009) 3118–3124.

[118] L. Liu, Z. Qi, X. Zhu, Studies on nylon 6/clay nanocomposites by melt-intercalation process, J. Appl. Polym. Sci. 71 (1999) 1133–1138.

[119] B. Wang, Y. Zhang, J. Zhang, Q. Gou, Z. Wang, P. Chen, et al., Crystallization behavior, thermal and mechanical properties of PHBV/graphene nanosheet composites, Chinese J. Polym. Sci. 31 (2013) 670–678.

[120] W. Zhuang, J. Liu, J.H. Zhang, B.X. Hu, J. Shen, Preparation , Characterization , and Properties of TiO_2/PLA Nanocomposites by In Situ Polymerization, Polym. Compos. (2009) 1074.

[121] T.M. Arantes, Modificação das Propriedades dos Polímeros Comerciais de SBR e NBR a Partir da Incorporação de Nanopartículas Sintéticas., Tese Doutorado, Cent. Ciências Exatas E Tecnol. Dep. Química, Univ. Fed. São Carlos. (2012).

[122] R.M.D.S.M. Thiré, L.C. Arruda, L.S. Barreto, Morphology and thermal properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/attapulgite nanocomposites, Mater. Res. 14 (2011) 340–344.

[123] S. Singh, A.K. Mohanty, T. Sugie, Y. Takai, H. Hamada, Renewable resource based biocomposites from natural fiber and polyhydroxybutyrate-co-valerate (PHBV) bioplastic, Compos. Part A Appl. Sci. Manuf. 39 (2008) 875–886.

[124] J.D.D. Melo, L.F.M. Carvalho, A.M. Medeiros, C.R.O. Souto, C.A. Paskocimas, A biodegradable composite material based on polyhydroxybutyrate (PHB) and carnauba fibers, Compos. Part B Eng. 43 (2012) 2827–2835.

[125] K.I.M. da Silva, Preparação de nanocompósitos de PLA/PEAD/TiO2 degradáveis, Trab. Conclusão Curso, Inst. Química, Univ. Do Rio Gd. Do Sul. (2011).

[126] S. Vidhate, L. Innocentini-mei, N.A.D. Souza, Mechanical and Electrical Multifunctional Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)— Multiwall Carbon Nanotube Nanocomposites, Polym. Eng Sci. 52 (2012) 1367–1374.

[127] S.N. Cassu, M.I. Felisberti, Comportamento dinâmico-mecânico e relaxações em polímeros e blendas poliméricas, Quim. Nov. 28 (2005) 255–263.

[128] R.K. Sadi, G.J.M. Fechine, N.R. Demarquette, Photodegradation of poly(3-hydroxybutyrate), Polym. Degrad. Stab. 95 (2010) 2318.

[129] V.Z. Roveri, V.R. de Mendonça, T.R. Giraldi, C. Ribeiro, Desenvolvimento e caracterização de filmes de TiO_2 para aplicação como fotocatalisadores em processos oxidativos avançados, Embrapa Instrumentação. (2010) 1–5.

[130] R.L. Ziolli, W.F. Jardim, Mecanismo de fotodegradação de compostos organicos catalisados por TiO_2, Quim. Nova. 21 (1989) 319–325.

[131] L. Zan, L. Tian, Z. Liu, Z. Peng, A new polystyrene-TiO2 nanocomposite film and its photocatalytic degradation, Appl. Catal. A Gen. 264 (2004) 237–242.

[132] S. Luo, A.. Netravali, A study of physical and mechanical properties of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) during composting, Polym. Degrad. Stab. 80 (2003) 59.

[133] D.Z. Bucci, L.B.B. Tavares, I. Sell, Biodegradation and physical evaluation of PHB packaging, Polym. Test. 26 (2007) 908–915.

[134] S.P.C. Gonçalves, S.M. Martins-Franchetti, D.L. Chinaglia, Biodegradation of the films of PP, PHBV and its blend in soil, J. Polym. Environ. 17 (2009) 280–285.

[135] R.G.F. Costa, J.E. De Oliveira, G.F. De Paula, E.S. De Medeiros, C. Ribeiro, L.H.C. Mattoso, et al., Eletrofiação de polímeros em solução. Parte I : Fundamentação Teórica, Polímeros. 22 (2012) 170.

[136] A.M. Goes, S. Carvalho, R.L. Oréfice, L. Avérous, T.A. Custódio, J.G. Pimenta, et al., Viabilidade Celular de Nanofibras de Polímeros Biodegradáveis e seus Nanocompósitos com Argila Montmorilonita, Polímeros. 22 (2012) 34.

[137] S.-J. Kang, L.D. Tijing, B. Hwang, Z. Jiang, H.Y. Kim, C.S. Kim, Fabrication and photocatalytic activity of electrospun nylon-6 nanofibers containing tourmaline and titanium dioxide nanoparticles, Ceram. Int. 39 (2013) 7143.

[138] M.M. Pérez-Madrigal, E. Armelin, L.J. del Valle, F. Estrany, C. Alemán, Bioactive and electroactive response of flexible polythiophene:polyester nanomembranes for tissue engineering, Polym. Chem. 3 (2012) 979.

[139] G. Ha, W. Yang, H. Roh, I. Lee, J. Koo, G. Hwan, et al., Plasma surface modification of poly (d ,l-lactic-co-glycolic acid) (65/35) film for tissue engineering, Surf. Coatings Technol. 193 (2005) 60.

[140] S.Q. Li, R.R. Zhu, H. Zhu, M. Xue, X.Y. Sun, S. De Yao, et al., Nanotoxicity of TiO2 nanoparticles to erythrocyte in vitro, Food Chem. Toxicol. 46 (2008) 3626.

[141] M. Khan, A.H. Naqvi, M. Ahmad, Comparative study of the cytotoxic and genotoxic potentials of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles, Toxicol. Reports. 2 (2015) 765.

[142] T.E. Abbott Chalew, K.J. Schwab, Toxicity of commercially available engineered nanoparticles to Caco-2 and SW480 human intestinal epithelial cells, Cell Biol. Toxicol. 29 (2013) 101.

[143] H. Arora, C. Doty, Y. Yuan, J. Boyle, K. Petras, B. Rabatic, et al., Titanium Dioxide Nanocomposites, 2007.

[144] D.B. Hall, P. Underhill, J.M. Torkelson, Spin Coating of Thin and Ultrathin Polymer Films, Polym. Eng. Sci. 38 (1998) 2039.

[145] P. Jayamurugan, V. Ponnuswamy, Y.V. Subba Rao, S. Ashokan, S. Meenakshisundar, Influence of spin coating rate on the thickness, surface modification and optical properties of water dispersed PPy composite thin films, Mater. Sci. Semicond. Process. 39 (2015) 205.

[146] A. Pich, N. Schiemenz, V. Boyko, H.J.P. Adler, Thermoreversible gelation of biodegradable polyester (PHBV) in toluene, Polymer. 47 (2006) 553.

[147] C.Y. Kwong, W.C.H. Choy, a B. Djurisic, P.C. Chui, K.W. Cheng, W.K. Chan, Poly(3-hexylthiophene): TiO_2 Nanocomposites for Solar Cell Applications, Nanotechnology. 15 (2004) 1156.

[148] A. Skarmoutsou, G. Lolas, C. a. Charitidis, M. Chatzinikolaidou, M. Vamvakaki, M. Farsari, Nanomechanical properties of hybrid coatings for bone tissue engineering, J. Mech. Behav. Biomed. Mater. 25 (2013) 48.

[149] M. Ulbricht, Advanced functional polymer membranes, Polymer. 47 (2006) 2217–2262.