

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE POLIÉSTERES  
BIODEGRADÁVEIS E BIORREABSORVÍVEIS PARA  
A UTILIZAÇÃO COMO MATRIZES  
TRIDIMENSIONAIS EM ENGENHARIA DE TECIDOS**

Douglas Gamba

Tese de Doutorado

Porto Alegre, Janeiro de 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DOUGLAS GAMBA

Tese apresentada como requisito parcial para  
a obtenção do grau de Doutor em Química

Prof. Dr. Cesar Liberato Petzhold  
Orientador

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patricia Pranke  
Co-orientadora

Porto Alegre, Janeiro de 2013.

A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre Novembro de 2008 e Janeiro de 2013. Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Síntese Orgânica e de Polímeros (SINPOL) do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e também junto ao grupo de Físico-Química de Polímeros do Max-Planck Institute for Polymer Research, localizado na cidade de Mainz, Alemanha, sob orientação do Professor Doutor Cesar Liberato Petzhold e co-orientação da Professora Doutora Patricia Pranke. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

**Comissão Examinadora:**



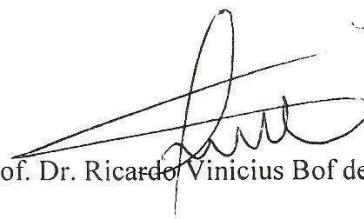
Prof. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek



Profa. Dra. Rosane Angélica Ligabue



Prof. Dr. Marco Antonio Ceschi



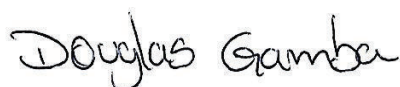
Prof. Dr. Ricardo Vinicius Bof de Oliveira



Prof. Dr. Cesar Liberato Petzhold  
(Orientador)



Profa. Dra. Patricia Helena Lucas Pranke  
(Coorientadora)



Douglas Gamba

Autor

*“Sabemos como é a vida: num dia dá tudo certo e no outro as coisas já não são tão perfeitas assim. Altos e baixos fazem parte da construção do nosso caráter. Afinal, cada momento, cada situação que enfrentamos em nossas trajetórias é um desafio, uma oportunidade única de aprender, de se tornar uma pessoa melhor. Só depende de nós, das nossas escolhas...”*

*Não sei se estou perto ou longe demais, se peguei o rumo certo ou errado. Sei apenas que sigo em frente, vivendo dias iguais de forma diferente. Já não caminho mais sozinho, levo comigo cada recordação, cada vivência, cada lição. E, mesmo que tudo não ande da forma que eu gostaria, saber que já não sou a mesma pessoa de ontem me faz perceber que valeu a pena. Procure ser uma pessoa de valor, em vez de procurar ser uma pessoa de sucesso. O sucesso é só a consequência.”*

*Albert Einstein*

## **Agradecimentos**

A toda a minha família, por sempre terem apoiado as minhas escolhas e por estarem presentes nos momentos mais difíceis.

À minha namorada Fernanda, pelo carinho, paciência, compreensão e apoio, que foram muito importantes para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cesar Liberato Petzhold, por todos os ensinamentos transmitidos durante estes 4 anos de trabalho e também por estimular, aconselhar, criticar e orientar de forma segura este trabalho até a sua conclusão.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patricia Pranke, minha co-orientadora, por ter “apresentado” a mim o empolgante e apaixonante campo de pesquisas em Engenharia de Tecidos.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Katharina Landfester e ao Dr. Clemens Weiss do Max-Planck Institute for Polymer Research, pela oportunidade da realização de parte desse trabalho em um dos mais importantes institutos de pesquisa em polímeros da Alemanha, além de proporcionar uma das melhores experiências da minha vida.

Aos meus colegas do laboratório K-215: Ana, Artur, Diego, Ginia, Janaína, Jessé, João Paulo, Juliana, Mariana, Marina, Melissa e Paula pelos favores prestados, pelos conhecimentos compartilhados, pela amizade adquirida e pelos momentos de desconcentração que fizeram com que o ambiente de trabalho se tornasse mais agradável.

Às colegas e amigas Ana Carolina e Paula, pelo auxílio durante a preparação das matrizes de microfibras através da técnica de *electrospinning* e pelas análises de microscopia eletrônica de varredura, respectivamente.

Ao amigo Vinicius Pistor e à amiga Ginia Brito, pelo auxílio durante a realização das análises dinâmico-mecânicas e de tensão  $\times$  deformação.

À farmacêutica Daniela Steffens, por ter conduzido os experimentos de adesão e viabilidade celular sobre as matrizes de nanofibras contendo um dos copolímeros sintetizados nesse trabalho.

À técnica Fabiana Grosser, pela realização dos experimentos de cromatografia por exclusão de tamanho e de espectroscopia de infravermelho.

Ao técnico Júlio Vaghetti, pela realização das análises de calorimetria exploratória diferencial.

Ao CNPq e à FINEP pelo apoio financeiro.

À CAPES pela bolsa concedida no país e ao programa PROBIAL pela bolsa concedida no exterior.

# Índice

<b>Lista de figuras</b> .....	xii
<b>Lista de esquemas</b> .....	xviii
<b>Lista de tabelas</b> .....	xix
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	xxi
<b>Resumo</b> .....	xxii
<b>Abstract</b> .....	xxiv
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Revisão Bibliográfica</b> .....	3
2.1 Engenharia de tecidos.....	3
2.2 Cultivos celulares .....	5
2.3 Tecido epitelial .....	7
2.4 Adesão celular .....	9
2.5 Biomateriais.....	10
2.5.1 Polímeros naturais .....	10
2.5.2 Polímeros sintéticos.....	12
2.5.3 Poli(ácido láctico).....	13
2.5.4 Metodologias empregadas para a síntese do poli(ácido láctico).....	15
2.5.4.1 Polimerização por abertura de anel.....	16
2.5.4.2 Polimerização em etapas.....	16
2.5.4.2.1 Polimerização por desidratação azeotrópica.....	18
2.5.4.2.2 Policondensação em estado fundido .....	20
2.6 Síntese de poliésteres funcionalizados .....	21
2.7 Método de fabricação de matrizes para engenharia de tecidos: <i>electrospinning</i> .....	26
2.7.1 Massa molecular do polímero .....	29
2.7.2 Concentração do polímero na solução .....	30

2.7.3 Viscosidade da solução polimérica.....	32
2.8 Modificação/ funcionalização de matrizes de poliésteres .....	32
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>36</b>
3.1 Objetivos gerais .....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
<b>4. Materiais e métodos .....</b>	<b>38</b>
4.1 Procedimentos experimentais .....	38
4.1.1 Síntese do poli(L-ácido lático) de alta massa molecular .....	38
4.1.1.1 Síntese de poli(L-ácido lático) a partir de solução aquosa de L-ácido lático .....	38
4.1.1.2 Obtenção do poli(L-ácido lático) de alta massa molecular (condição otimizada) .....	39
4.1.2 Obtenção e caracterização de matrizes obtidas por <i>electrospinning</i> utilizando <i>blendas</i> de poli(D,L-ácido lático) e poli(L-ácido lático) de diferentes massas moleculares .....	39
4.1.2.1 Preparação das matrizes de nanofibras de <i>blendas</i> de PDLLA/PLLA .....	40
4.1.2.2 Preparação dos filmes de <i>blendas</i> de PDLLA/PLLA .....	40
4.1.2.3 Degradação hidrolítica <i>in vitro</i> para as amostras de microfibras e filmes de PDLLA/PLLA.....	41
4.1.3 Síntese do poli(L-ácido lático- <i>co</i> -L-ácido málico) (PLLALMA) .....	41
4.1.3.1 Síntese do oligômero de poli(L-ácido lático) ( <i>o</i> -PLLA).....	41
4.1.3.2 Síntese do poli(L-ácido lático- <i>co</i> -DL-ácido málico) [24] .....	42
4.1.3.3 Síntese do poli(L-ácido lático- <i>co</i> -L-ácido málico) [26] (amostra RAM17).....	43
4.1.3.4 Determinação do índice de acidez para o poli(L-ácido lático- <i>co</i> -L-ácido málico) [26].....	43
4.1.3.5 Preparação das matrizes de nanofibras de <i>blendas</i> de PDLLA/PLLALMA .....	44
4.1.3.6 Preparação dos filmes de <i>blendas</i> de PDLLA/PLLALMA .....	44
4.1.3.7 Degradação hidrolítica <i>in vitro</i> para as nanofibras e filmes de PDLLA/PLLALMA .....	45
4.1.4 Síntese e polimerização de monômeros bifuncionais derivados do glicerol .....	45
4.1.4.1 Síntese do tosilato de glicerila [29].....	45



4.1.4.2 Síntese do 3-azido-propanodiol [35].....	46
4.1.4.3 Síntese do benzilato de glicerila [38].....	47
4.1.4.4 Síntese do poli(3-benzilglicerol- <i>co</i> -maleato) [39].....	48
4.1.4.5 Síntese do poli(3-benzilglicerol- <i>co</i> -succinato) [41].....	48
4.1.4.6 Reação de hidrogenólise do poliéster alifático [41] para a obtenção de [42] .....	49
4.1.4.7 Síntese do terpolímero poli( <i>L</i> -ácido láctico- <i>co</i> -3-benzilglicerol- <i>co</i> -succinato) [45] (procedimento para a RT01) .....	49
4.2 Caracterizações dos monômeros e dos polímeros sintetizados .....	50
4.2.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	50
4.2.2 Espectroscopia no infravermelho.....	51
4.2.3 Medidas de viscosidade .....	51
4.2.4 Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	51
4.2.5 Determinação de ângulo de contato.....	51
4.2.6 Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) .....	52
4.2.7 Análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	52
4.2.8 Ensaio mecânicos de tensão <i>versus</i> deformação .....	53
4.2.9 Análises dinâmico-mecânicas (DMA).....	53
4.3 Cultivo celular sobre os <i>scaffolds</i> de PDLLA/PLLALMA .....	53
4.3.1 Obtenção de células de polpa de dente decíduo.....	54
4.3.2 Cultura de células-tronco mesenquimais (CTMs) a partir de polpa de dente decíduo .....	54
4.3.3 Análise morfológica das culturas celulares.....	54
4.3.4 Análise imunofenotípica das células cultivadas .....	55
4.3.5 Diferenciação celular <i>in vitro</i> .....	55
4.3.6 Diferenciação osteogênica .....	55
4.3.7 Diferenciação adipogênica.....	55
4.3.8 Diferenciação condrogênica.....	56
4.3.9 Propriedades biológicas das matrizes de nanofibras.....	56

4.3.10 Adesividade celular.....	56
4.3.11 Avaliação de células metabolicamente ativas nas matrizes de nanofibras .....	57
4.3.12 Análise estatística.....	57
4.3.13 Análises de microscopia confocal.....	58
<b>5. Resultados e discussão .....</b>	<b>59</b>
5.1 Síntese de poli(L-ácido lático) de alta massa molecular .....	59
5.1.1 Análises térmicas para o poli(L-ácido lático) de alta massa molecular sintetizado.	68
5.2 Obtenção e caracterização de matrizes obtidas por <i>electrospinning</i> utilizando <i>blendas</i> de poli(D,L-ácido lático) e poli(L-ácido lático) de diferentes massas moleculares .....	70
5.2.1 Fabricação das matrizes de PDLLA/PLLA por <i>electrospinning</i> .....	71
5.2.2 Análises de ângulo de contato.....	75
5.2.3 Degradação hidrolítica das matrizes de microfibras e filmes de PDLLA/PLLA ....	77
5.2.4 Propriedades térmicas das matrizes de microfibras e filmes de PDLLA/PLLA.....	78
5.2.5 Análises de tensão <i>versus</i> deformação e dinâmico-mecânicas (DMA).....	85
5.3 Síntese do poli(L-ácido lático- <i>co</i> -L-ácido málico) (PLLALMA) .....	93
5.3.1 Propriedades térmicas dos copolímeros contendo ácido málico.....	103
5.3.2 Fabricação de <i>scaffolds</i> contendo o copolímero PLLALMA através de <i>electrospinning</i> .....	107
5.3.3 Caracterização da superfície das nanofibras e filmes contendo o PLLALMA: medidas de ângulo de contato e de infravermelho .....	110
5.3.4 Degradação hidrolítica das nanofibras e filmes contendo o copolímero PLLALMA .....	114
5.3.5 Propriedades térmicas das matrizes de nanofibras e filmes contendo o PLLALMA .....	115
5.3.6 Propriedades mecânicas: análises de tensão x deformação para as matrizes de micro/nanofibras e filmes de PDLLA/PLLALMA .....	121
5.3.7 Avaliação biológica .....	124
5.4 Síntese e polimerização de monômeros bifuncionais derivados do glicerol .....	130

<b>6. Conclusões.....</b>	<b>163</b>
<b>7. Referências.....</b>	<b>166</b>
<b>8. ANEXO 1 - ESPECTROS DE RMN DE <sup>1</sup>H E DE <sup>13</sup>C .....</b>	<b>175</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Reprodução da ilustração do chamado “Método Italiano” para restauração de nariz. Nesse procedimento, o enxerto utilizado no paciente era conectado a um de seus braços até que houvesse a completa vascularização do tecido.....	4
<b>Figura 2.</b> Ilustração para o procedimento de engenharia de tecidos. Primeiramente, há o isolamento de células saudáveis de um paciente (a), seguido de sua expansão <i>in vitro</i> (b). Essas células são implantadas em uma matriz polimérica ( <i>scaffold</i> ), juntamente com outras biomoléculas necessárias para o desenvolvimento do tecido (c). Após um período de organização tecidual (d), a matriz é implantada no local lesionado do paciente (e). Por fim, a matriz irá se degradar gradualmente, sendo substituída pelo novo tecido formado a partir das células implantadas. ....	6
<b>Figura 3.</b> Principais poliésteres utilizados em engenharia de tecidos. ....	13
<b>Figura 4.</b> Formas isoméricas para o ácido láctico. ....	14
<b>Figura 5.</b> Obtenção de um estereobloco de poli(ácido láctico) a partir da reação entre duas cadeias de isomerias distintas.....	15
<b>Figura 6.</b> Métodos sintéticos para a síntese do PLA. ....	15
<b>Figura 7.</b> Ilustração do mecanismo para a polimerização por etapas. O crescimento da cadeia do polímero ocorre de forma gradual pela reação das diferentes espécies presentes no meio reacional. ....	17
<b>Figura 8.</b> Condensador de refluxo do tipo Dean-Stark. ....	18
<b>Figura 9.</b> Modelo representativo de um experimento de <i>electrospinning</i> . Uma solução polimérica contida no interior da seringa é eletrofiada sob uma diferença de potencial e coletada em uma placa coletora. ....	28
<b>Figura 10.</b> Imagens de MEV mostrando a proliferação de queratinócitos e fibroblastos sobre uma matriz de microfibras de PLGA (75:25) após 7 dias (a) e a ampliação do corte transversal da matriz mostrando que houve apenas a expansão superficial das células sobre o <i>scaffold</i> (b) (reproduzido com permissão de Blackwood e colaboradores).....	29
<b>Figura 11.</b> Efeito sobre a morfologia de fibras obtidas por eletrofiação de polímeros de PMMA sintetizados com massas moleculares de a) 12.470 g.mol <sup>-1</sup> , b) 125.900 g.mol <sup>-1</sup> e c) 205.800 g.mol <sup>-1</sup> . Observa-se uma diminuição nos <i>beads</i> presentes na matriz com o aumento da massa molecular, ao mesmo tempo que ocorre um aumento no diâmetro das fibras (adaptado com permissão de Gupta e colaboradores).....	30

<b>Figura 12.</b> Imagens de microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo (FESEM) para fibras de (PET-co-PEI) em concentrações de a) 8 %, b) 12 %, c) 16 % e d) 20 %, onde observa-se a redução das imperfeições com o aumento da concentração da solução polimérica (adaptado com permissão de McKee e colaboradores).....	31
<b>Figura 13.</b> Imagens de MEV de <i>scaffolds</i> de nanofibras de (a) PLLA e (b,c) PLLA modificado com gelatina. Observa-se a acentuada proliferação de condrócitos ao longo das matrizes após 14 dias de cultivo (reproduzido de Chen e colaboradores). .....	34
<b>Figura 14.</b> Representação para as reações de policondensação azeotrópica do ácido láctico. .	38
<b>Figura 15.</b> Aparato utilizado para a obtenção de PLA de alta massa molecular.....	39
<b>Figura 16.</b> Cromatogramas de GPC para as reações de polimerização R08 e R09. ....	65
<b>Figura 17.</b> Termograma de TGA para o poli(L-ácido láctico) obtido da reação R08. ....	68
<b>Figura 18.</b> Termograma de DSC para o PLLA proveniente da reação R08 (segundo ciclo de aquecimento). .....	69
<b>Figura 19.</b> Imagens de microscopia óptica para as microfibras obtidas por eletrofiação de soluções de PDLLA com a) 6%, b) 8 %, c) 10 % e d) 12 % (m/V) de concentração. (aumento de 400x).....	72
<b>Figura 20.</b> Limites de viscosidade para as soluções empregadas para a eletrofiação. ....	73
<b>Figura 21.</b> Imagens de microscopia eletrônica de varredura das microfibras de PDLLA/ PLLA obtidas por eletrofiação: a) MF100, b) MF91, c) MF82, d) MF73, e) MF64 e f) MF55. ....	74
<b>Figura 22.</b> Gráficos de ângulo de contato de microfibras e filmes de <i>blendas</i> de PDLLA/PLLA.....	75
<b>Figura 23.</b> Gráficos de degradação hidrolítica para as matrizes de microfibras e filmes de <i>blendas</i> de PDLLA/PLLA.....	78
<b>Figura 24.</b> Termogramas de calorimetria exploratória diferencial para as matrizes de microfibras de <i>blendas</i> de PDLLA/PLLA. (1° aquecimento).....	79
<b>Figura 25.</b> Conformações helicoidais do poli(L-ácido láctico): a) conformação helicoidal gt; b) conformação helicoidal gg; c) conformação helicoidal tt; d) conformação helicoidal tg. (reproduzido com permissão de Meaurio e colaboradores) .....	80
<b>Figura 26.</b> Termogramas de DSC para as matrizes de microfibras de <i>blendas</i> de PDLLA/PLLA. (2° aquecimento) .....	82
<b>Figura 27.</b> Termogramas de calorimetria exploratória diferencial para os filmes de PDLLA/PLLA. (1° aquecimento) .....	84

<b>Figura 28.</b> Termogramas de DSC para os filmes de <i>blendas</i> de PDLLA/PLLA. (2° aquecimento).....	84
<b>Figura 29.</b> Curvas de tensão x deformação para as matrizes de microfibras e dos filmes de <i>blendas</i> de PDLLA/PLLA.....	86
<b>Figura 30.</b> Análises dinâmico-mecânicas para as matrizes de microfibras e filmes de <i>blendas</i> de PDLLA/PLLA.....	90
<b>Figura 31.</b> Gráfico mostrando as curvas de $\tan \delta$ para os filmes de PDLLA/PLLA.....	91
<b>Figura 32.</b> Estrutura molecular do DL-ácido málico.....	93
<b>Figura 33.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ para o oligômero de PLLA [22]. (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) ....	95
<b>Figura 34.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ para o poli(L-ácido láctico- <i>co</i> -DL-ácido málico) obtido a partir das reações de policondensação em tolueno. (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	97
<b>Figura 35.</b> Prováveis estruturas para o PLLAMA obtido por polimerização em etapas.....	99
<b>Figura 36.</b> Estrutura molecular do catalisador triflato de escândio.....	102
<b>Figura 37.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do copolímero PLLALMA [26]. (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) ..	102
<b>Figura 38.</b> Termogramas de DSC para os copolímeros de PLLALMA. (1° ciclo de aquecimento).....	104
<b>Figura 39.</b> Termogramas de DSC para os copolímeros de PLLALMA. (2° ciclo de aquecimento).....	105
<b>Figura 40.</b> Imagens de microscopia eletrônica de varredura das matrizes de PDLLA/PLLALMA: a) MFAM100, b) MFAM91, c) MFAM82 e d) MFAM73.....	109
<b>Figura 41.</b> Gráficos para as análises de ângulo de contato para as matrizes de micro/nanofibras e filmes de PDLLA/PLLALMA.....	110
<b>Figura 42.</b> Imagens capturadas durante a análise de ângulo de contato para a amostra MFAM73, mostrando a rápida absorção da gota de água sobre a superfície do <i>scaffold</i> .....	112
<b>Figura 43.</b> Espectros de infravermelho ATR para as matrizes de fibras de <i>blendas</i> de PDLLA/PLLALMA, onde se destacam algumas das bandas de absorção características para essa <i>blenda</i> .....	113
<b>Figura 44.</b> Gráficos de degradação hidrolítica para as matrizes de nanofibras e filmes de <i>blendas</i> de PDLLA/PLLALMA.....	114
<b>Figura 45.</b> Termogramas de DSC para as matrizes de micro/nanofibras de PDLLA/PLLALMA. (1° ciclo de aquecimento).....	116
<b>Figura 46.</b> Termogramas de DSC para as matrizes de micro/nanofibras de PDLLA/PLLALMA. (2° ciclo de aquecimento).....	118

<b>Figura 47.</b> Termogramas de DSC para os filmes de PDLLA/PLLALMA. (1° ciclo de aquecimento).....	119
<b>Figura 48.</b> Termogramas de DSC para os filmes de PDLLA/PLLALMA. (2° ciclo de aquecimento).....	120
<b>Figura 49.</b> Curvas de tensão $\times$ deformação para as matrizes de micro/nanofibras e filmes de PDLLA/PLLALMA.....	122
<b>Figura 50.</b> Contagem de células aderidas na superfície das matrizes MFAM100, MFAM73 e em relação ao grupo controle. Os dados mostraram que não houve diferença estatística entre os grupos ( $p=0,99$ ).....	125
<b>Figura 51.</b> Gráfico da análise de viabilidade celular realizada sobre as matrizes MFAM100 e MFAM73, em comparação com o grupo controle. ....	126
<b>Figura 52.</b> Imagens de microscopia eletrônica de varredura que mostra as matrizes MFAM100 (a e b) e MFAM73 (c e d) no primeiro e sétimo dia de cultivo celular. ....	127
<b>Figura 53.</b> Imagens de microscopia confocal para o cultivo celular das amostras do grupo controle (a,b, c – dia 1; j, k, l – dia 7), para a matriz de MFAM100 (d, e, f – dia 1; m, n, o – dia 7) e para a matriz MFAM73 (g, h, i – dia 1; p, q, r – dia 7). A coloração dos núcleos utilizou o corante DAPI, enquanto que os filamentos de actina foram marcados com faloidina conjugada com rodamina. ....	129
<b>Figura 54.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ para o tosilato de glicerila [29]. (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )....	132
<b>Figura 55.</b> Ilustração para um sistema do tipo ABX, observados em espectros de RMN. ...	132
<b>Figura 56.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do tosilato de glicerila [29] aquecido a 100 °C por 3 h, mostrando a decomposição térmica para o ácido <i>p</i> -toluenosulfônico. (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )...	134
<b>Figura 57.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do polímero [33]. (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) .....	135
<b>Figura 58.</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ que mostram a evolução da reação entre anidrido malêico [34] e tosilato de glicerila [29] na temperatura de 65 °C. (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	137
<b>Figura 59.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ para o composto [35]. (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	139
<b>Figura 60.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ para a reação entre [35] e [34]. (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ )	140
<b>Figura 61.</b> Sobreposição dos espectros de IV para o 3-azidopropanodiol [35] (ATR) e para o produto obtido da reação. (KBr) .....	141
<b>Figura 62.</b> Termogramas de TGA para o 3-azidopropanodiol [35] e o produto da reação com anidrido malêico.....	142
<b>Figura 63.</b> RMN de $^1\text{H}$ do glicerol protegido com benzila [38]. (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	143
<b>Figura 64.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do poli(3-benzilglicerol- <i>co</i> -maleato) [39]. (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	146

<b>Figura 65.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do poli(3-benzilglicerol- <i>co</i> -ácido succínico) [41]. (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	148
<b>Figura 66.</b> Termograma de DSC para o poliéster [41]. (2° ciclo de aquecimento).....	149
<b>Figura 67.</b> Conjunto de espectros de RMN de $^1\text{H}$ para as reações de hidrogenólise do poliéster [41]. (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$ ).....	151
<b>Figura 68.</b> Cromatogramas de GPC para as reações de acoplamento entre o PLLA [43] e o poliéster [41]. .....	154
<b>Figura 69.</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ para os produtos obtidos das reações de acoplamento. (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	156
<b>Figura 70.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -APT para o produto da reação RA04. (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	157
<b>Figura 71.</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ para as reações de obtenção do terpolímero [45]. .....	160
<b>Figura 72.</b> Termogramas de DSC para os terpolímeros sintetizados (referentes ao 2° ciclo de aquecimento). .....	161
<b>Figura 73.</b> Análise termogravimétrica para os terpolímeros da tabela 23 e para o polímero [41]. .....	162
<b>Figura 74.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ para o tosilato de glicerila [29]. (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )....	176
<b>Figura 75.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -APT para o tosilato de glicerila [29]. (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	177
<b>Figura 76.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ para o azido-propanodiol [35]. (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	178
<b>Figura 77.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -APT para o azido-propanodiol [35]. (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	179
<b>Figura 78.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ para o benzilato de glicerila [38]. (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	180
<b>Figura 79.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -APT para o benzilato de glicerila [38]. (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	181
<b>Figura 80.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ para o poli(3-benzilglicerol- <i>co</i> -maleato) [39]. (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	182
<b>Figura 81.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -APT para o poli(3-benzilglicerol- <i>co</i> -maleato) [39]. (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	183
<b>Figura 82.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ para o poli(3-benzilglicerol- <i>co</i> -succinato) linear [41]. (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	184
<b>Figura 83.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -APT para o poli(3-benzilglicerol- <i>co</i> -succinato) linear [41]. (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	185
<b>Figura 84.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ para o terpolímero [45] da reação RST01. (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	186



<b>Figura 85.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -APT para o terpolímero [45] da reação RST01. (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	187
<b>Figura 86.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ para o copolímero [26]. (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ).....	188
<b>Figura 87.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -APT para o copolímero de PLLALMA [26]. (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) .....	189

## Lista de esquemas

<b>Esquema 1.</b> Rota sintética para a obtenção do poli(L-lactídeo- <i>co</i> - <i>RS</i> - $\beta$ -ácido málico).....	22
<b>Esquema 2.</b> Síntese do monômero cíclico [11], derivado do ácido glicólico. ....	23
<b>Esquema 3.</b> Obtenção do copolímero poli(hidroximetilglicolídeo- <i>co</i> - $\epsilon$ -caprolactona) [14] a partir da polimerização por abertura de anel iniciada por álcool benzílico e posterior remoção dos grupos protetores através de reação de hidrogenólise. ....	24
<b>Esquema 4.</b> Síntese de pré-polímeros a partir de diferentes diálcoois alifáticos e ácido cítrico. ....	25
<b>Esquema 5.</b> Síntese do poli(glicerol- <i>co</i> -sebacato) [20] a partir da reação entre o glicerol [18] e o ácido sebácico [19].....	26
<b>Esquema 6.</b> Polimerização em etapas para a obtenção do poli(L-ácido láctico) [22]. ....	59
<b>Esquema 7.</b> Síntese do poli(L-ácido láctico- <i>co</i> -DL-ácido málico) [24] através de polimerização por etapas.....	94
<b>Esquema 8.</b> Síntese do PLLALMA [26] a partir de uma solução aquosa de L-ácido láctico e de L-ácido málico.....	100
<b>Esquema 9.</b> Síntese do diol protegido [29] a partir do solketal [27].....	131
<b>Esquema 10.</b> Reações de polimerização do tosilato de glicerila [29] com o ácido fumárico [30] e ácido malêico [32], na presença do catalisador SnCl <sub>2</sub> . ....	133
<b>Esquema 11.</b> Reação de polimerização usando o anidrido malêico [34] e o diol [29]. ....	135
<b>Esquema 12.</b> Conversão do monotosilato de glicerila [29] no 3-azidopropanodiol [35].....	138
<b>Esquema 13.</b> Polimerização do azido-glicerol [35] na presença do anidrido malêico [34]..	139
<b>Esquema 14.</b> Proteção do solketal [27] com brometo de benzila, seguido de desproteção das hidroxilas em meio ácido para resultar no diol [38].....	143
<b>Esquema 15.</b> Reação de polimerização entre o benzilato de glicerila [38] e anidrido ou ácido malêico para a obtenção do poliéster [39].....	144
<b>Esquema 16.</b> Síntese de poli(3-benzilglicerol- <i>co</i> -ácido succínico) [41] a partir do 3-benzilglicerol [38] e do anidrido succínico [40]. ....	147
<b>Esquema 17.</b> Reação de hidrogenólise do poliéster [41] na presença de Pd/C e H <sub>2</sub> . ....	150
<b>Esquema 18.</b> Reação de acoplamento entre o poliéster [41] e o poli(L-ácido láctico) [43]. ..	152
<b>Esquema 19.</b> Síntese do terpolímero [45] a partir da reação de polimerização entre o L-ácido láctico, anidrido succínico e o 3-benzilglicerol. ....	158

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Exemplos de polímeros naturais frequentemente utilizados em engenharia de tecidos.....	11
<b>Tabela 2.</b> Resultados para as reações de polimerização do PLLA à 155 °C.....	60
<b>Tabela 3.</b> Reações para obtenção de poli(L-ácido láctico) de alta massa molar empregando diferentes condições.....	62
<b>Tabela 4.</b> Diâmetros médios das microfibras calculados a partir das imagens de MEV.....	75
<b>Tabela 5.</b> Valores de ângulo de contato para as matrizes de microfibras e filmes de PDLLA/PLLA.....	76
<b>Tabela 6.</b> Valores de entalpia de cristalização e de fusão das microfibras de <i>blendas</i> de PDLLA/PLLA.....	81
<b>Tabela 7.</b> Resultados obtidos para as análises de DSC das matrizes de microfibras de PLA.....	83
<b>Tabela 8.</b> Resultados obtidos para as análises de DSC dos filmes de PLA.....	85
<b>Tabela 9.</b> Valores de módulo, tensão máxima e de alongamento para as matrizes de microfibras e para os filmes de <i>blendas</i> de PDLLA/PLLA.....	87
<b>Tabela 10.</b> Valores de temperaturas de transição vítrea para as matrizes de microfibras e filmes de misturas de PDLLA/PLLA obtidos por análise dinâmico-mecânica.....	92
<b>Tabela 11.</b> Resultados das polimerizações entre o <i>o</i> -PLLA e DL-ácido málico em tolueno.....	96
<b>Tabela 12.</b> Polimerizações entre o oligômero de PLLA e DL-ácido málico sob vácuo.....	99
<b>Tabela 13.</b> Polimerizações utilizando solução aquosa de L-ácido láctico e L-ácido málico.....	101
<b>Tabela 14.</b> Valores de $T_g$ , $T_c$ e $T_m$ referentes ao segundo ciclo de aquecimento da análise de DSC para as diferentes amostras de PLLAMA.....	106
<b>Tabela 15.</b> Medidas de viscosidade para as <i>blendas</i> de PDLLA/PLLALMA.....	108
<b>Tabela 16.</b> Diâmetro médio para as matrizes de fibras de <i>blendas</i> de PDLLA/PLLALMA.....	109
<b>Tabela 17.</b> Valores para as entalpias de cristalização e de fusão das matrizes de micro/nanofibras de PDLLA/PLLALMA obtidas através de análise de DSC.....	117
<b>Tabela 18.</b> Resultados obtidos para as análises de DSC das matrizes de micro/nanofibras de PDLLA/PLLALMA.....	118
<b>Tabela 19.</b> Valores para as temperaturas de transição, de cristalização, de fusão e as entalpias de relaxação e de fusão para os filmes de PDLLA/PLLALMA obtidos por DSC.....	121
<b>Tabela 20.</b> Propriedades mecânicas para as <i>blendas</i> de matrizes de micro/nanofibras e filmes de PDLLA/PLLALMA.....	124

<b>Tabela 21.</b> Condições reacionais investigadas para a polimerização entre [29] e [34].....	136
<b>Tabela 22.</b> Condições reacionais empregadas para as polimerizações entre benzilato de glicerila [38] e ácido ou anidrido malêico.....	144
<b>Tabela 23.</b> Condições reacionais empregadas para reações de acoplamento entre o poli(3-benzilglicerol- <i>co</i> -succinato) [41] e poli(L-ácido láctico) [43].....	153
<b>Tabela 24.</b> Resultados obtidos para as reações de obtenção do terpolímero [45].....	159

## Lista de abreviaturas

$\delta$  = deslocamento químico em ppm

APT = do inglês, *Attached Proton Test*

ATR = refletância total atenuada

BnBr = brometo de benzila

CCD = cromatografia em camada delgada

$\text{CDCl}_3$  = clorofórmio deuterado

DCC = dicitloexilcarbodiimida

DMA = análise dinâmico-mecânica

DMAP = *N,N*-dimetilaminopiridina

DMF = *N,N*-dimetilformamida

DMSO = dimetilsulfóxido

$\text{DMSO-}d_6$  = dimetilsulfóxido deuterado

DSC = calorimetria exploratória diferencial

EDC = *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

$\text{Et}_2\text{O}$  = éter etílico

$\text{Et}_3\text{N}$  = trietilamina

$\text{EtOAc}$  = acetato de etila

$\text{EtOH}$  = etanol

GPC = cromatografia de permeação em gel

IV = infravermelho

$\text{MeOH}$  = metanol

MEV = microscopia eletrônica de varredura

$M_n$  = massa molecular numérica média

$M_w$  = massa molecular ponderal média

NHS = *N*-hidróxissuccinimida

PDI = polidispersidade

PDLLA = poli(D,L-lactídeo)

PLLA = poli(L-ácido láctico)

PLLALMA = poli(L-ácido láctico-*co*-L-ácido málico)

RMN = ressonância magnética nuclear

SEC = cromatografia por exclusão de tamanho

t.a.: temperatura ambiente

TFAA = anidrido trifluoroacético

TGA = análise termogravimétrica

THF = tetrahidrofurano

$\text{TsCl}$  = cloreto de *p*-toluenosulfonila

UV = ultravioleta

## Resumo

A engenharia de tecidos é um campo multidisciplinar que tem por objetivo o desenvolvimento de substitutos biológicos que possam ser empregados tanto na reparação, quanto na substituição de tecidos ou órgãos danificados. Entretanto, o sucesso no desenvolvimento desses substitutos depende diretamente da escolha do biomaterial a ser empregado para esse propósito. Os poliésteres alifáticos, tais como o poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) e seus copolímeros, são amplamente utilizados em pesquisas para aplicações em engenharia de tecidos. Entretanto, esses polímeros apresentam uma alta hidrofobicidade bem como a falta de grupos funcionais que possam interagir com o meio biológico. Nesse contexto, o presente trabalho investigou a síntese e caracterização de poliésteres contendo grupos funcionais que visam permitir uma melhor interação entre o material sintético e o meio biológico.

Primeiramente, um poli(L-ácido láctico) de alta massa molecular foi sintetizado através da polimerização em etapas, através de um processo alternativo ao empregado industrialmente. O procedimento envolveu a utilização de peneira molecular para a remoção do excedente de água do meio reacional e o polímero sintetizado apresentou uma  $M_w = 80.000 \text{ g.mol}^{-1}$  com polidispersidade de 2,5 nas condições otimizadas.

Em outro estudo, matrizes de microfibras obtidas por *electrospinning* e filmes de *blendas* de poli(D,L-lactídeo) de alta massa molecular (PDLLA) e de poli(L-ácido láctico) de baixa massa molecular (PLLA), com diferentes proporções entre os polímeros, foram preparadas e suas propriedades avaliadas. As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram a obtenção de matrizes de microfibras ausentes de imperfeições (sem *beads*). Os experimentos de ângulo de contato para as amostras mostraram que não houve mudanças na hidrofobicidade dos materiais em consequência da adição do PLLA à *blenda*. Os experimentos de degradação hidrolítica mostraram que a incorporação do PLLA aumentou a taxa de degradação dos materiais. As amostras de microfibras apresentaram um comportamento de polímeros amorfos, enquanto que os filmes mostraram-se semicristalinos a partir de análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC). Os ensaios de tensão *versus* deformação indicaram um aumento tanto no módulo de Young quanto nas tensões máximas de ruptura dos filmes, enquanto que para as microfibras estes efeitos não foram evidenciados.

A síntese de um copolímero contendo funções carboxila pendentes à cadeia principal foi realizada através da polimerização em etapas entre o L-ácido láctico e o L-ácido málico em

diversas proporções. O poli(L-ácido lático-co-L-ácido málico) (PLLALMA) sintetizado apresentou uma  $M_w = 6.700 \text{ g.mol}^{-1}$ , polidispersidade de 1,4 e uma incorporação de L-ácido málico à cadeia principal de 18 % em mol. As análises térmicas desse polímero mostraram uma natureza amorfa, com uma  $T_g$  em 43 °C. Esse polímero foi empregado na preparação de nanofibras e filmes, na forma de *blendas* com o PDLLA. Os ensaios de ângulo de contato mostraram que as matrizes de nanofibras tornaram-se completamente hidrofílicas quando quantidades superiores a 10 % de PLLALMA foram utilizadas na composição da *blenda*, mas nenhuma diferença foi observada para os filmes. Os ensaios de adesão celular para as matrizes de nanofibras contendo 30 % de PLLALMA adicionado à *blenda* mostraram que não houve diferença estatística entre essa matriz e o grupo controle. Os experimentos de viabilidade celular indicaram que não houve diferença estatística nas matrizes de nanofibras contendo o PLLALMA quando comparado ao grupo controle.

Por fim, poliésteres foram sintetizados a partir de monômeros derivados do glicerol. Os derivados sintéticos do glicerol contendo as funcionalidades azida e *p*-toluenosulfonila apresentaram-se termicamente instáveis para a utilização em polimerizações com diácidos ou seus derivados anidridos. A utilização de um derivado contendo um grupo benzila na estrutura do glicerol permitiu a obtenção do poli(3-benzilglicerol-co-succinato) linear com uma massa molecular ponderal média de  $61.000 \text{ g.mol}^{-1}$  e uma polidispersidade de 4,1. A análise térmica desse polímero mostrou uma  $T_g$  em  $-2,3 \text{ °C}$ , a qual seria adequada para aplicações em engenharia de tecidos. A tentativa de remoção dos grupos protetores através de reação de hidrogenólise com Pd/C resultou em uma fragmentação do polímero, o qual apresentou uma  $M_w = 5.600 \text{ g.mol}^{-1}$  e polidispersidade de 1,3. No intuito de melhorar as propriedades desse polímero foram sintetizados terpolímeros contendo L-ácido lático, 3-benzilglicerol e ácido succínico, mas apenas polímeros com baixas massas moleculares foram obtidos.

## Abstract

Tissue engineering is a multidisciplinary field which focuses on the development of biological substitutes to be employed in the restoration and substitution of damaged organs and tissue. However, the successful development of these substitutes is directly dependent on the choice of the biomaterial to be employed. Aliphatic polyesters, such as poly(lactic acid), poly(glycolic acid) and their copolymers have been widely used as biomaterials in tissue engineering but they show a high hydrophobicity and a lack of functional groups to interact with the biological medium. Considering this, the present work has investigated the synthesis and the characterization of polyesters containing functional groups capable of allowing better interaction among the synthetic material and the biological system.

Firstly, a poly(L-lactic acid) with high molecular weight was synthesized by step polymerization as an alternative for the industrial process. The procedure involved the use of a molecular sieve to remove the excess of water from the reaction medium and the synthesized polymer showed a  $M_w = 80,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  with a polydispersity of 2.5 in the best conditions investigated.

In another study, the properties of matrices of microfibers prepared by electrospinning and films from blends of a high molecular weight poly(D,L-lactide) (PDLLA) and a low molecular weight poly(L-lactic acid) (PLLA) in different ratios were evaluated. The images from scanning electron microscope (SEM) showed matrices of microfibers without beads. The contact angle measurements exhibited no changes in the hydrophilicity, due to the addition of PLLA to the blends for both specimens. The hydrolytic degradation experiments showed an increase in the degradation rate of the materials, which was caused by the addition of a low molecular weight PLLA. Differential scanning calorimetry analysis exhibited an amorphous behavior for the microfibers samples and a semi-crystalline behavior for the films. The *strain x stress* measurements indicated an increase in the Young modulus and in the maximum rupture strength for the films, while no changes were observed for the microfibers matrices.

The synthesis of a copolymer containing pendant carboxyl groups attached in the chain was performed through step polymerization from an aqueous solution of L-lactic acid and L-malic acid in different ratios. The synthesized poly(L-lactic acid-*co*-L-malic acid) presented a  $M_w = 6,700 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , polydispersity of 1.4 and an incorporation of L-malic acid of 18 % mol.



The thermal analysis for this polymer showed an amorphous behavior and a  $T_g = 43$  °C. This copolymer was employed in the preparation of nanofibers and films of blends with PDLA. The contact angle measurements for the nanofibers exhibited a hydrophilic feature when more than 10 % of PLLALMA was used in the blend, while no differences were observed for the films. The cell adhesion assay for the nanofiber matrix containing 30 % of PLLALMA showed no statistical differences between the matrix and the control group. The cell viability experiment indicated that there were no statistical differences in the cell expansion over the matrix containing the PLLALMA in comparison with the control group.

Finally, a copolymer from monomers derived from glycerol was synthesized. The derivative monomers from glycerol containing the functional groups azide and *p*-toluenesulfonyl were shown to be thermally unstable during the polymerization with diacids or anhydrides. However, the use of a derivative containing a benzyl group in the glycerol's structure allowed the synthesis of the linear poly(benzylglycerol-*co*-succinate) with a  $M_w = 61,000$  g.mol<sup>-1</sup> and a polydispersity of 4.1. The thermal analysis for this copolymer showed a  $T_g = -2.3$  °C, which is suitable for applications in tissue engineering. The attempt to remove the protecting groups of the polymer through hydrogenolysis in the presence of Pd/C resulted in polymer fragmentation with a  $M_w = 5,600$  g.mol<sup>-1</sup> and polydispersity of 1.3. In order to improve its properties, a terpolymer containing L-lactic acid, benzylglycerol and succinic acid was synthesized but with low molecular weight.

## 1. Introdução

Ao longo das últimas décadas, o interesse em pesquisas em engenharia de tecidos e medicina regenerativa aumentou significativamente e hoje representa um dos mais excitantes campos de pesquisa, cujo principal objetivo é encontrar tratamentos alternativos para a reposição ou reparação de tecidos ou órgãos. Atualmente, o transplante é o método de terapia mais comum para pacientes que convivem com o mau funcionamento de órgãos e/ou tecidos resultantes de acidentes ou doenças. Entretanto, esse procedimento é extremamente limitado pela dificuldade de se encontrar doadores compatíveis para a realização do mesmo, além dos problemas inerentes a uma possível rejeição do novo órgão/tecido implantado.

A base da engenharia de tecidos é a multidisciplinaridade, a qual integra conceitos das áreas de biologia, medicina, química, física e ciências dos materiais, a fim de produzir novos substitutos biológicos (biomateriais) que apresentem a função de restaurar ou manter o funcionamento normal do tecido.<sup>1</sup> O paradigma da engenharia de tecidos é o isolamento de células específicas de um paciente através de biópsia, seguido do crescimento e expansão dessas células em uma matriz tridimensional (*scaffold*) que mimetize as características da matriz extracelular. Após o cultivo das células em um ambiente precisamente controlado, a matriz tridimensional é implantada no local onde se encontra a lesão do paciente e, à medida que o novo tecido é formado, espera-se que essa matriz se degrade ao longo do tempo, dando lugar apenas ao novo tecido biológico.<sup>2</sup>

A engenharia de tecidos também oferece uma oportunidade única para investigação em laboratório dos aspectos da relação estrutura-propriedade que estão associados com a formação do novo tecido. A fim de alcançar com sucesso a regeneração de um órgão ou tecido danificado através desse princípio, diversos elementos críticos devem ser considerados, incluindo o material empregado para a fabricação dos suportes tridimensionais, a fonte de células empregadas para a regeneração do tecido, assim como a incorporação de biomoléculas que possuem a finalidade de induzir tanto o crescimento quanto a atividade celular.<sup>3</sup>

Os biomateriais empregados para a preparação das matrizes desempenham um importante papel na engenharia de tecidos. Esses devem, por exemplo, facilitar o transporte de células para locais específicos do organismo, definir e manter um espaço tridimensional para a formação dos novos tecidos de forma adequada e fornecer integridade estrutural temporária até que todo o tecido recém formado apresente propriedades mecânicas adequadas para suporte próprio.<sup>4</sup> O desenvolvimento de biomateriais para aplicações em engenharia de

tecidos está centralizado na capacidade que esse material possui em interagir com o ambiente celular que o rodeia através de reconhecimento biomolecular. As características desse microambiente celular, as quais incluem propriedades mecânicas, químicas e de topografia específicas, podem influenciar no destino da célula em se expandir, migrar ou diferenciar.

Os poliésteres estão sendo amplamente empregados como biomateriais em estudos para o desenvolvimento de substitutos biológicos em razão das suas características de biocompatibilidade e degradação para produtos de baixa toxicidade. No entanto, um aspecto importante a respeito das propriedades dos poliésteres é a falta de sítios ou grupos funcionais que possam promover o reconhecimento e a adesão celular. Desse modo, torna-se interessante a obtenção de polímeros biocompatíveis e bioreabsorvíveis que apresentem funcionalidades como grupos amino, hidroxila e carboxila em sua estrutura. Esses grupos funcionais são capazes de favorecer as interações entre a célula e a matriz polimérica através de, por exemplo, ligações de hidrogênio e de Van der Waals, resultando em uma maior adesão e expansão celular.

A seguir, serão discutidos alguns dos principais aspectos envolvidos no desenvolvimento de novos biomateriais com aplicação em engenharia de tecidos.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1 Engenharia de tecidos

A restauração de tecidos e órgãos trata-se de um antigo sonho da humanidade. Lesões, doenças e malformações congênitas sempre estiveram presentes no cotidiano humano. Porém, a possibilidade de reconstituição desses órgãos permitiria que as pessoas continuassem a viver como se nunca houvessem passado por algum desses traumas em suas vidas. Os primeiros registros a respeito do tema foram descritos em textos sânscritos há cerca de 3.500 anos, onde o Rei Ravana, da Índia, determinou a reconstrução nasal da bela Sur Punakha, deliberadamente amputado pelo Príncipe Lakshmana como uma forma de punição.<sup>5,6</sup>

Desde então, houve diversos registros históricos relatando principalmente a utilização de metodologias para a restauração de nariz utilizando enxertos de peles, muitas delas baseadas nos antigos ensinamentos hindus.<sup>7</sup> Entretanto, apesar de representarem um significativo avanço para a medicina da época, tais procedimentos encontraram muitas resistências à sua utilização, em grande parte por causa dos dogmas da igreja, os quais pregavam que as cirurgias interferiam na “integridade da obra de Deus”. Até mesmo pessoas consideradas intelectuais, como Voltaire ridicularizaram alguns dos métodos propostos, como o chamado “Método Italiano”, descrito no livro de Gaspare Tagliacozzi de 1597, intitulado *De Curtorum Chirurgia per Insitionem* (Cirurgia de mutilados através de enxertos), ilustrado na figura 1.<sup>8</sup>

Após um longo período de resistências e oposições, a revitalização dos procedimentos para enxerto de pele na Europa ocorreu com a publicação de dois trabalhos em 1794, onde ambos descreviam uma significativa melhoria do método de Tagliacozzi, o qual era demasiadamente complexo. Nesse novo processo, a pele era retirada da parte frontal da testa do paciente e utilizada como substituto do tecido lesionado na região nasal.<sup>8</sup> A partir da publicação desses trabalhos, diversos estudos foram realizados na tentativa de melhorar as técnicas empregadas para a substituição de tecido epitelial lesionado.<sup>9</sup> Além disso, começaram a surgir estudos que visavam não apenas a restauração ou substituição do tecido epitelial, mas de qualquer órgão ou tecido do corpo humano. Assim, os significativos avanços da ciência permitiram que, em 1954, o primeiro transplante de rim bem-sucedido entre humanos pudesse ser realizado.<sup>10</sup> Esse marco da medicina contemporânea representou uma

esperança para milhares de pacientes que possuíam algum tipo de malformação congênita, doença ou lesões causadas por acidentes, uma vez que os métodos convencionais de tratamento até então desenvolvidos mostravam-se limitados.



**Figura 1.** Reprodução da ilustração do chamado “Método Italiano” para restauração de nariz. Nesse procedimento, o enxerto utilizado no paciente era conectado a um de seus braços até que houvesse a completa vascularização do tecido.<sup>8</sup>

Atualmente, o transplante de órgãos representa o método de terapia mais comum para a grande maioria dos pacientes que necessitam de substituição e/ou restauração de tecidos e órgãos. A terapia através de transplantes, embora seja bem sucedida na maioria das vezes, possui muitas restrições como, por exemplo, a dificuldade de encontrar doadores compatíveis com o paciente para a realização do procedimento.<sup>1</sup> Além disso, problemas relacionados ao sistema imunológico do paciente podem resultar em rejeição crônica do tecido ou órgão implantado em virtude da incompatibilidade, resultando, conseqüentemente, no aparecimento de processos inflamatórios e até mesmo necrose na região dos novos implantes.<sup>11</sup> Outro limitante ao transplante de um órgão é o fato do mesmo se tratar de um procedimento bastante invasivo, levando, muitas vezes ao óbito do paciente em razão de complicações da cirurgia de reposição do órgão.

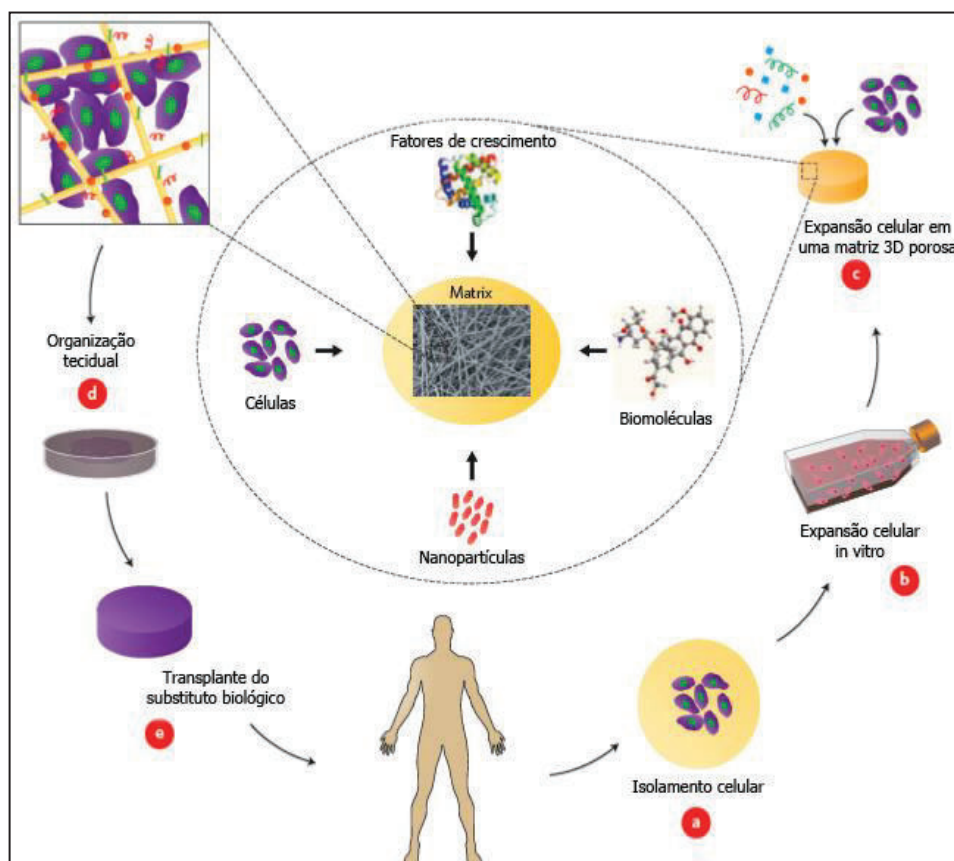
A busca por terapias alternativas aos transplantes fez surgir o campo da engenharia de tecidos, também denominada medicina regenerativa. Essa representa uma das mais interessantes e promissoras áreas da ciência, na qual pesquisadores das ciências biológicas, química, física, engenharia e ciência dos materiais buscam o desenvolvimento de substitutos biológicos que possam ser utilizados na restauração, substituição ou melhoramento das funções de tecidos e órgãos.<sup>12,13</sup>

O procedimento empregado na engenharia de tecidos requer uma estrutura tridimensional que mimetize a matriz extracelular humana. Essa estrutura irá desempenhar a função da matriz extracelular como um suporte para a expansão celular durante a formação do novo tecido, além de atuar como um reservatório para moléculas bioativas, tais como fatores de crescimento celular e nutrientes.<sup>14</sup> Uma breve descrição dessa metodologia pode ser visualizada na figura 2. A formação de um novo tecido pode ocorrer em dois ambientes, *in vivo* e *in vitro*. O primeiro consiste em implantar a matriz, contendo ou não células semeadas em sua estrutura, no local lesionado do paciente com o objetivo de corrigir o defeito existente utilizando a capacidade de regeneração do corpo do paciente. O cultivo de um novo tecido *in vitro* também é realizado através do emprego de *scaffolds* onde, inicialmente, propicia-se o crescimento celular sobre esta matriz em um ambiente controlado (bioreatores) e, após a completa expansão destas células neste material, o *scaffold* é transplantado no paciente.<sup>15</sup>

## 2.2 Cultivos celulares

A maioria das abordagens da engenharia de tecidos envolve o isolamento de células saudáveis do próprio paciente. Após a coleta dessas células, as etapas seguintes constituem-se de purificação, seleção, isolamento e, por fim, a sua expansão em um ambiente *in vitro*, onde podem se replicar para a formação de colônias que serão utilizadas na construção do tecido funcional.<sup>16</sup>

Todavia, para que essas células possam se organizar em um tecido ou órgão é necessário que estímulos externos sejam aplicados. Esses estímulos (mecânicos, elétricos, estruturais e químicos) são mediados por moléculas proteicas, chamadas de fatores de crescimento, que regulam a migração celular, a morfogênese (processo de transformação celular) e a proliferação celular.<sup>16</sup>



**Figura 2.** Ilustração para o procedimento de engenharia de tecidos.<sup>17</sup> Primeiramente, há o isolamento de células saudáveis de um paciente (a), seguido de sua expansão *in vitro* (b). Essas células são implantadas em uma matriz polimérica (*scaffold*), juntamente com outras biomoléculas necessárias para o desenvolvimento do tecido (c). Após um período de organização tecidual (d), a matriz é implantada no local lesionado do paciente (e). Por fim, a matriz irá se degradar gradualmente, sendo substituída pelo novo tecido formado a partir das células implantadas.<sup>18</sup>

Por fim, as células são dispostas em monocamadas na presença de fatores de crescimento e de nutrientes, onde vão se multiplicar e proceder à formação do novo tecido ou órgão, o qual pode ser orientado e suportado dentro de uma matriz, dependendo do procedimento empregado.<sup>16</sup>

Apesar desse modelo de implante com células retiradas do próprio paciente, ser utilizado há algum tempo, o emprego de células-tronco é cada vez mais crescente.<sup>19</sup> As



células-tronco apresentam duas importantes características que as distingue dos demais grupos de células: possuem a capacidade de auto-renovação (fazem cópias de si mesmas) e possuem a habilidade de originar diversos tipos de células do corpo humano (diferenciação).<sup>20,21</sup>

De acordo com a origem e as propriedades biológicas, as células-tronco podem ser classificadas em embrionárias ou adultas. As células-tronco embrionárias são derivadas da camada interna de um embrião (em um estágio chamado de blastocisto) e são capazes de originar os mais de 200 tipos de tecidos diferentes do corpo humano. As células-tronco adultas, por sua vez, estão contidas em órgãos ou tecidos já formados e são responsáveis pela manutenção da integridade desses tecidos.<sup>22,23</sup>

Uma vez que as células-tronco podem fornecer um suprimento praticamente ilimitado de células, há um grande número de aplicações para essa metodologia de implante celular, as quais pode-se destacar a regeneração de tecidos cartilagosos,<sup>24,25</sup> ósseos,<sup>24,26</sup> de córneas,<sup>27,28</sup> fígado,<sup>29</sup> rins,<sup>30,31</sup> coração,<sup>32,33</sup> sistema nervoso (neurônios e medula espinhal)<sup>34,35</sup> e tecido epitelial<sup>36,37</sup>, entre outros.

### **2.3 Tecido epitelial**

A pele representa a primeira barreira de defesa contra influências externas como distúrbios mecânicos, radiação UV e agentes microbianos patogênicos, além de prevenir a perda excessiva de fluidos corporais e atuar como um importante termoregulador.<sup>37</sup> Por causa da ocorrência de traumas, como queimaduras ou doenças crônicas, a perda de tecido epitelial tem se tornado um problema clínico de grande magnitude e milhões de pessoas padecem dessa adversidade anualmente. Há muitos tratamentos atualmente disponíveis, incluindo transplante, cirurgia reconstrutiva e compressas.<sup>38</sup> Entretanto, um dos principais desafios encontrados para o tratamento de pacientes apresentando quadro de lesão do tecido epitelial é a escassez de doadores quando o defeito excede à 50-60 % da área total do corpo, além de possíveis quadros de rejeição.<sup>37</sup> Em casos de queimaduras até 50% da área total do corpo, a pele saudável restante do paciente pode ser usada como enxerto da área lesionada. No entanto, quando o paciente tem mais do que 50% do corpo queimado, apenas peles doadas de bancos de peles (insuficientes para atender a população) ou substitutos cutâneos adequados poderão



evitar o provável óbito do paciente, em virtude de complicações decorrentes da extensa queimadura.

Nas últimas décadas, diversos substitutos de tecido epitelial como Integra<sup>®</sup>, Apligraf<sup>®</sup> e Dermagraft<sup>®</sup> foram desenvolvidos. No entanto, muitos problemas encontrados como efeito de regeneração limitado e cicatrizes residuais ainda são os principais obstáculos para realizar a reparação completa do tecido danificado.<sup>38</sup> Além disso, a maioria dos substitutos cutâneos são desenvolvidos com produtos derivados de matéria animal, o que pode oferecer riscos aos pacientes. O xenotransplante (uso de tecidos entre espécies diferentes) pode provocar rejeição ou transmissão de microrganismos não patogênicos em animais, mas que possam vir a conferir patogenicidade em humanos. Adicionalmente, praticamente nenhum substituto cutâneo disponível no mercado prevê o seu uso como biomaterial para o crescimento de células humanas do próprio paciente ou provenientes de bancos de células-tronco compatíveis. Por fim, os preços dos mesmos são impraticáveis para o Sistema Único de Saúde, não só no Brasil, mas também para os sistemas de saúde pública de qualquer país desenvolvido.

Os maiores desafios a respeito do desenvolvimento de substitutos apropriados para o tratamento de lesões do tecido epitelial são: (i) a exibição imediata das funções de barreira protetiva após o implante; (ii) a vascularização apropriada dos implantes; e (iii) a construção de matrizes que apresentem todos os elementos necessários para ocorra a formação do novo tecido (biocompatibilidade, proporcionar a adesão e proliferação celular, propriedades mecânicas adequadas e degradação para produtos de baixa toxicidade).<sup>37</sup>

Dessa maneira, um grande número de publicações a respeito de pesquisas envolvendo engenharia de tecidos destinados à restauração de tecido epitelial tem sido reportados.<sup>39-41</sup> Como exemplo, Liu e colaboradores prepararam uma matriz contendo polímeros naturais como quitosana, gelatina e ácido hialurônico.<sup>42</sup> Por causa da elevada solubilidade desses polímeros em água, os autores utilizaram EDC e NHS como agentes de reticulação, uma vez que estes reagentes não são incorporados no interior da estrutura reticulada e a uréia gerada como subproduto é facilmente removida com água. A matriz foi obtida através da técnica de liofilização, utilizando água como solvente, e apresentou uma estrutura bastante porosa, de acordo com imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). O cultivo de fibroblastos e queratinócitos na superfície desta matriz mostrou um aumento significativo na proliferação celular em relação ao controle, indicando uma boa biocompatibilidade da matriz com as células.

## 2.4 Adesão celular

O estudo do comportamento e diferenciação celular induzidos pela estrutura, composição e presença de elementos biológicos nos suportes é de fundamental importância quando se trata de regeneração de órgãos e tecidos. O aprimoramento das propriedades das matrizes e das técnicas de cultivo celular visam otimizar a reprodução dos tecidos e órgãos em toda sua complexidade.<sup>43</sup>

A primeira etapa de interação entre a célula e o suporte depende da capacidade de ancoragem (adesão) destas células sobre a superfície do material. O sucesso dessa primeira etapa influenciará as respostas subsequentes das células e tecidos, bem como a capacidade das células de se proliferarem e diferenciarem em contato com o implante. A adesão celular a um biomaterial é mediada por diferentes tipos de proteínas receptoras e está relacionada a dois fenômenos diferentes: (i) fase de anexação, a qual envolve eventos como ligações físico-químicas entre as células e o material por forças iônicas, forças de van der Waals, eletrostáticas e ligações de hidrogênio e que ocorrem de forma rápida; e (ii) fase de adesão, a qual envolve a interação de diversas moléculas biológicas, como proteínas de matriz extracelular, proteínas de membrana celular e do citoesqueleto.<sup>44,45</sup>

As células não interagem diretamente com a superfície dos biomateriais, mas sim com uma camada de biomoléculas extracelulares pré-adsorvidas na matriz, as quais são compostas por proteínas da matriz extracelular. A capacidade adesiva dos conjuntos de receptores dessas proteínas celulares depende das características hidrofílicas e hidrofóbicas dos biomateriais empregados.<sup>46</sup> Quando ocorre o contato entre um meio sintético considerado hidrofílico e o meio biológico, haverá inicialmente a formação de uma monocamada de água em sua superfície, seguida da adsorção das proteínas em uma série complexa de eventos. Para o caso de materiais hidrofóbicos, as proteínas irão se aderir irreversivelmente à superfície da matriz em razão da desidratação da interface substrato-célula, associada à ausência da monocamada de água. Isso pode levar a um rearranjo da conformação da proteína, refletindo no balanço das interações entre as proteínas e a superfície do material, ocasionando uma desestabilização conformacional da mesma, impedindo a interação com os receptores celulares.<sup>46,47</sup>

## 2.5 Biomateriais

O sucesso no desenvolvimento de matrizes tridimensionais para a restauração de tecidos está diretamente dependente da escolha do polímero a ser empregado para este propósito. O polímero deve possuir características que sejam capazes de reproduzir o ambiente da matriz extracelular encontrado nos tecidos. As matrizes extracelulares são compreendidas por vários tipos de macromoléculas formadas por aminoácidos e açúcares, sendo responsáveis por manterem as células unidas e controlarem a estrutura do tecido. Além disso, regulam a função celular, permitindo a difusão de nutrientes, metabólitos e fatores de crescimento.<sup>2</sup> Sendo assim, os materiais a serem utilizados como *scaffolds* devem apresentar biocompatibilidade, biodegradação para produtos não-tóxicos, suportar o crescimento e proliferação celular e apresentar propriedades mecânicas apropriadas.

Os materiais utilizados como suportes para auxiliar no desenvolvimento das células são também chamados de biomateriais, os quais podem ser definidos como todos os materiais que realizem a interface com um sistema biológico e cujo objetivo é tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo.<sup>48</sup> O pré-requisito essencial para que esse material seja classificado como biomaterial é a sua biocompatibilidade, ou seja, a capacidade deste material de apresentar uma resposta apropriada a uma aplicação específica, com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas, quando em contato com os tecidos vivos ou fluidos orgânicos.<sup>49</sup>

Os biomateriais podem ser divididos em quatro classes de materiais: metais, compostos cerâmicos, polímeros naturais e polímeros sintéticos, sendo estas duas últimas as mais estudadas para aplicações destinadas à engenharia de tecidos.

### 2.5.1 Polímeros naturais

Os primeiros casos documentados sobre engenharia de tecidos envolveram a utilização de biomateriais derivados de fontes naturais.<sup>50</sup> Os polímeros naturais são tipicamente biocompatíveis, além de serem hidrolítica e enzimaticamente biodegradáveis. A principal vantagem em sua utilização consiste na presença de moléculas biofuncionais, as quais

contribuem para a adesão, proliferação e diferenciação celular.<sup>49</sup> Alguns dos principais polímeros naturais mais utilizados em engenharia de tecidos estão contidos na tabela 1.

**Tabela 1.** Exemplos de polímeros naturais frequentemente utilizados em engenharia de tecidos.

<b>Polímero</b>	<b>Aplicações em matrizes para engenharia de tecidos</b>
Colágeno <sup>51</sup>	Tendões, cartilagem, ligamentos, pele, ossos,
Gelatina <sup>52-55</sup>	Ossos, músculo cardíaco, cartilagem, tecido vascular,
Quitosana <sup>51</sup>	Ossos, tendões, ligamentos, cartilagem, tecido nervoso e vascular.
Ácido hialurônico <sup>51</sup>	Traquéia, cartilagem articular, cartilagem nasal, epitélio respiratório, tecido vascular e tecido nervoso.
Fibrina <sup>51,56</sup>	Tecido cardíaco, tecido vascular, ossos, tecido epitelial, tecido nervoso.
Seda <sup>57-59</sup>	Ossos, tecido epitelial, cartilagem, ligamentos, tecido vascular e tecido nervoso.
Alginato <sup>51</sup>	Ossos, cartilagem, córneas, fígado, pâncreas, tecido nervoso, tecido vascular e tecido conectivo.
Elastina <sup>51</sup>	Cartilagem, tecido vascular

Apesar de possuírem propriedades biológicas interessantes, a modificação química ou física de polímeros naturais é de difícil realização, podendo apresentar desafios na perspectiva de utilização destes materiais na engenharia de tecidos. Por serem facilmente degradados, via hidrólise ou catálise enzimática, a alta taxa de degradação desses polímeros pode restringir a sua aplicação *in vivo*. Além disso, as características estruturais e físicas desses polímeros não permitem que os mesmos possuam propriedades mecânicas apropriadas para a utilização como substitutos biológicos. Outra desvantagem na utilização de polímeros naturais é a sua limitada disponibilidade, pois estes materiais são sintetizados a partir de mecanismos biológicos complexos, os quais são difíceis de serem reproduzidos em laboratório e/ou adaptados para a escala industrial.<sup>60</sup>

## 2.5.2 Polímeros sintéticos

Os polímeros sintéticos biodegradáveis oferecem muitas vantagens sobre outros materiais para o desenvolvimento de *scaffolds* para engenharia de tecidos. Algumas delas incluem o menor custo, a fácil preparação e a habilidade de conciliar propriedades físicas e cinéticas (como resistência mecânica, hidrofiliabilidade e biodegradação) para que sejam adaptadas a diversas aplicações. Além disso, os polímeros sintéticos também são atrativos em virtude da possibilidade de serem preparados de diferentes maneiras, com características morfológicas e grupos funcionais desejáveis ao crescimento celular.<sup>61,62</sup>

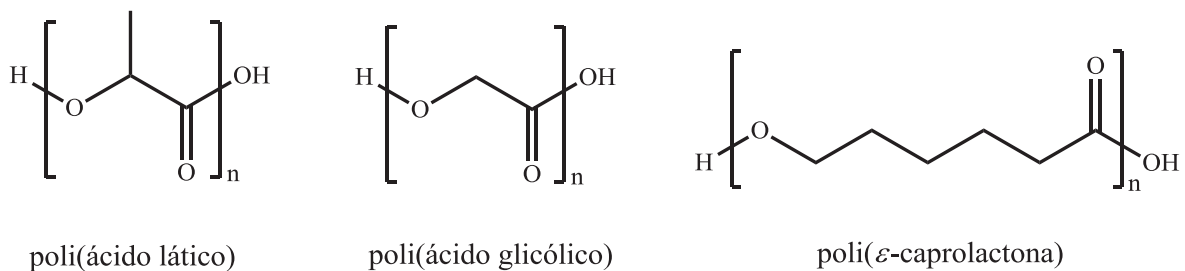
Diversos polímeros sintéticos tem sido investigados como biomateriais para uso em engenharia de tecidos, incluindo polifosfazenos, polianidridos, poliacetais, poliortoésteres, polifosfoésteres, policarbonatos, poliuretanas, poliamidas e poliésteres.<sup>51</sup> Entretanto, dentre todos esses polímeros, os poliésteres alifáticos são os polímeros sintéticos biodegradáveis de maior destaque para o uso em aplicações biomédicas. Os poliésteres são polímeros termoplásticos contendo ligações ésteres alifáticas e hidroliticamente lábeis em sua estrutura. Embora todos os poliésteres sejam degradáveis, apenas aqueles com cadeias alifáticas razoavelmente curtas entre as ligações ésteres, são capazes de se degradarem no intervalo de tempo requerido para a maioria das aplicações médicas.

Apesar de sua excelente biocompatibilidade, os poliésteres apresentam algumas propriedades inconvenientes para a sua utilização como substitutos biológicos. Por causa da característica bastante hidrofóbica, o tempo de degradação para estes materiais torna-se elevado. Esse fato inviabiliza o seu emprego em algumas aplicações como, por exemplo, substituição de tecido epitelial, o qual requer uma rápida regeneração do tecido lesionado. Além disso, a alta hidrofobicidade também impede a difusão de nutrientes através da matriz polimérica, impossibilitando a migração e proliferação das células para o interior do *scaffold* e comprometendo a interação das células e proteínas com o biomaterial.<sup>63,64</sup>

Outro aspecto importante a respeito das propriedades dos poliésteres é a falta de sítios ou grupos funcionais para o reconhecimento e adesão celular. Sabe-se que as interações entre as células e o seu ambiente de crescimento decorrem de processos de biorechecimento, ou seja, interações específicas entre os receptores localizados na superfície da célula com os seus respectivos ligantes dispostos na matriz de crescimento. Essas interações são importantes uma vez que proporcionam maior adesão celular à matriz polimérica, auxiliando na expansão do

tecido celular sobre o material. Desse modo, torna-se interessante a obtenção de polímeros que apresentem funcionalidades em sua cadeia principal, como grupos amino, hidroxila e/ou carboxila, para promover o aumento de interações entre célula e matriz polimérica.<sup>65-67</sup> Além disso, a disponibilidade desses sítios ativos permite uma posterior funcionalização da matriz através da introdução de outras biomoléculas (amino ácidos, nucleotídeos, ácidos nucleicos, polipeptídeos, etc.) para criar um ambiente favorável ao desenvolvimento celular.

Os poliésteres mais empregados em estudos e aplicações clínicas para substituição e/ou restauração de tecidos e órgãos são o poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli( $\epsilon$ -caprolactona), copolímeros e *blendas* destes materiais (figura 3). Entretanto, um número significativo de publicações destaca o poli(ácido láctico) como um excelente e promissor biomaterial destinado ao emprego em engenharia de tecidos, principalmente em razão de algumas de suas características como degradabilidade, propriedades mecânicas e ocorrência natural de seu monômero, o que não ocorre, por exemplo, com a  $\epsilon$ -caprolactona.



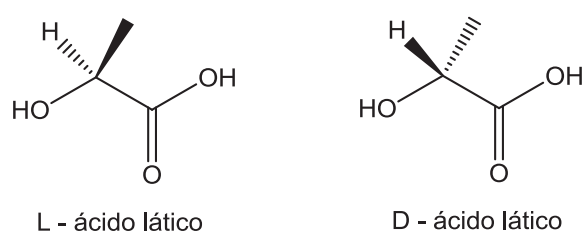
**Figura 3.** Principais poliésteres utilizados em engenharia de tecidos.

### 2.5.3 Poli(ácido láctico)

O poli(ácido láctico) (PLA) é um poliéster alifático derivado de fontes renováveis, principalmente amidos e açúcares. Em consequência do seu alto custo de produção, baixa disponibilidade e limitada massa molecular, os principais usos do PLA, até a última década, eram limitados a aplicações médicas, como dispositivos de implantes, suturas internas, liberação controlada de fármacos e, mais recentemente, em engenharia de tecidos.<sup>68</sup> Entretanto, com os novos avanços obtidos na tecnologia de produção do PLA, está sendo possível aumentar a gama de aplicações para esse polímero em razão das boas propriedades

ópticas, físicas, mecânicas e de barreira de aromas quando comparados aos materiais existentes.<sup>69</sup>

A unidade repetitiva do PLA, o ácido láctico (ácido 2-hidróxipropanóico) é um hidróxi ácido contendo um carbono assimétrico que pode existir em duas configurações opticamente ativas (figura 4) ou na forma de mistura racêmica. Ambos os enantiômeros D- e L- são produzidos a partir de fermentação de uma fonte de carboidratos realizada por bactérias. Contudo, quando sintetizado através de métodos químicos, uma mistura racêmica é obtida.<sup>69</sup>



**Figura 4.** Formas isoméricas para o ácido láctico.

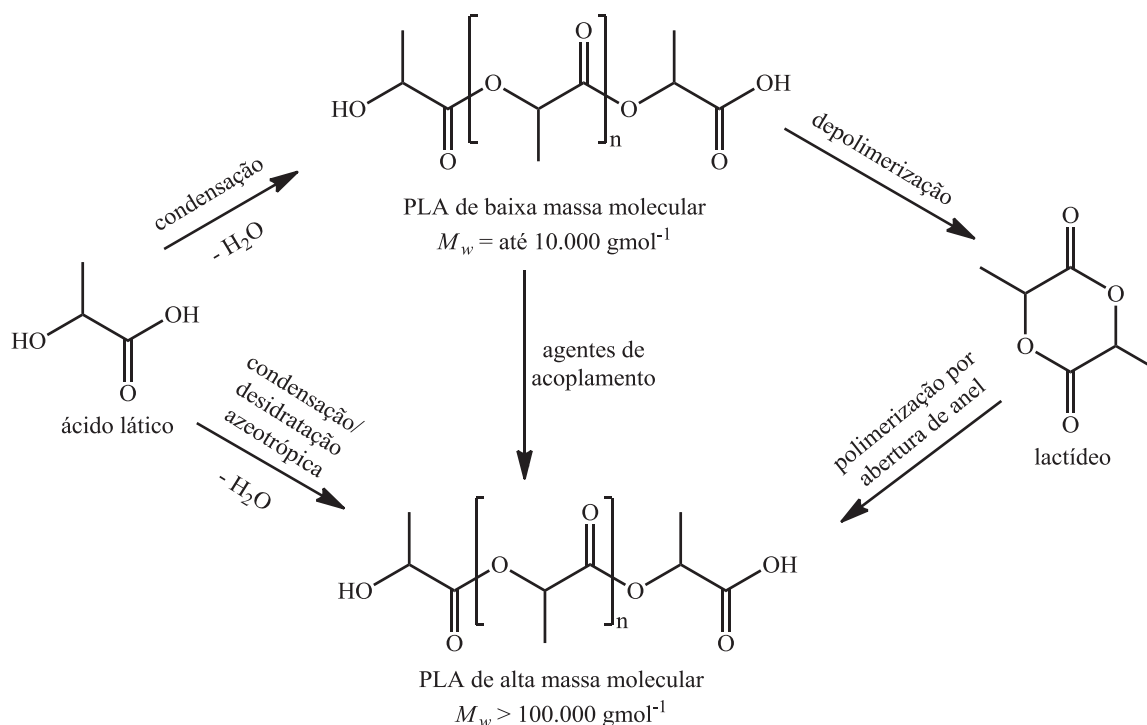
As propriedades do PLA, como temperaturas de fusão e de transição vítrea, resistência mecânica e cristalinidade, dependem da proporção de seus isômeros ópticos presentes no polímero, o que permite a obtenção de diferentes tipos de poli(ácido láctico), cada um contendo os requerimentos necessários para a sua aplicação. Polímeros contendo uma composição de isômero L- em sua estrutura superior a 93 % são semicristalinos, enquanto que entre 50-93% são estritamente amorfos.<sup>70</sup> Além disso, a temperatura de fusão pode variar de 130 °C a 180 °C enquanto a temperaturas de transição vítrea pode variar de 50 °C a 80 °C. As propriedades mecânicas do PLA também podem mudar significativamente com o aumento da sua cristalinidade.<sup>71</sup> Todavia, propriedades diferenciadas para o poli(ácido láctico) podem ser obtidas quando esse polímero é sintetizado na forma de um estereobloco. Essa metodologia permite a obtenção de um polímero com temperatura de fusão de até 220 °C (figura 5).<sup>72</sup>



**Figura 5.** Obtenção de um estereobloco de poli(ácido láctico) a partir da reação entre duas cadeias de isomerias distintas.

### 2.5.4 Metodologias empregadas para a síntese do poli(ácido láctico)

A síntese do PLA pode ser descrita através de duas principais metodologias: polimerização em etapas (policondensação) e polimerização por abertura de anel (figura 6). A polimerização do ácido láctico por condensação utiliza, geralmente, uma solução aquosa do monômero, sob a influência ou não de um catalisador e altas temperaturas. O polímero obtido possui, geralmente, uma baixa massa molecular, apresentando-se como um material bastante quebradiço, com total ausência de propriedades mecânicas para a maioria das aplicações. A polimerização por abertura de anel, no entanto, utiliza o dímero cíclico do ácido láctico, chamado de lactídeo, para a obtenção de poli(lactídeo) de alta massa molecular.



**Figura 6.** Métodos sintéticos para a síntese do PLA.



#### **2.5.4.1 Polimerização por abertura de anel**

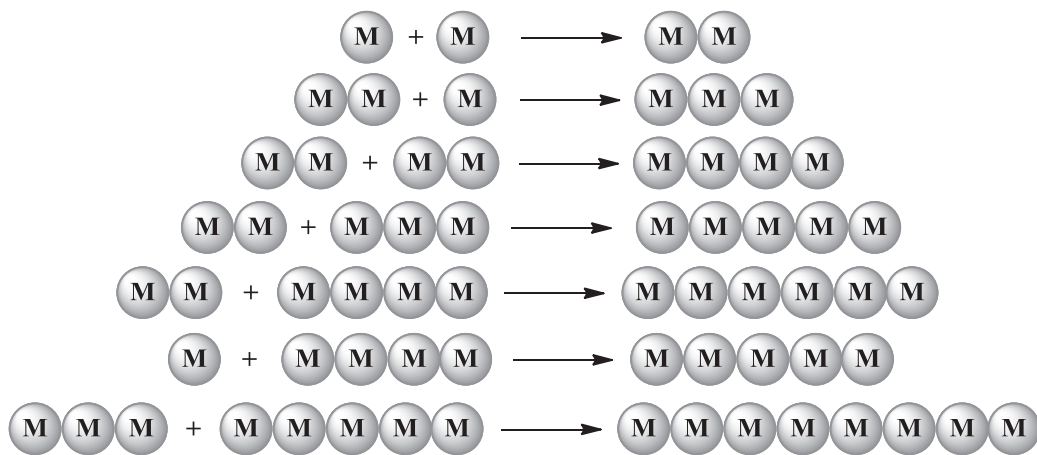
A polimerização por abertura de anel é uma polimerização em cadeia que, como o próprio nome diz, utiliza, monômeros cíclicos, geralmente contendo heteroátomos, para a obtenção de macromoléculas.<sup>73</sup> Nesse contexto, a síntese do PLA através desta metodologia é realizada pelo emprego do monômero cíclico do ácido láctico, chamado lactídeo (figura 6). Esse monômero é obtido a partir da depolimerização de poli(ácido láctico) de baixa massa molecular sob pressão reduzida, resultando em uma mistura de isômeros D-, L- e DL- (meso). A polimerização por abertura de anel do lactídeo foi demonstrada pela primeira vez por Carothers em 1933, mas apenas em 1954 o processo foi otimizado pela DuPont para a obtenção de PLA de alta massa molar, após o desenvolvimento de metodologias mais eficientes para a purificação do lactídeo.<sup>74</sup> Apesar de ser a metodologia mais empregada atualmente para a produção de PLA, a polimerização por abertura de anel do lactídeo ainda apresenta um custo elevado para o produto final, em parte em virtude das diversas etapas necessárias para a obtenção e purificação do monômero cíclico. Sendo assim, a busca por alternativas que minimizem o custo final para este polímero é de grande interesse para a indústria.

#### **2.5.4.2 Polimerização em etapas**

A obtenção do poli(ácido láctico) através da polimerização em etapas caracteriza-se pelo lento aumento da massa molecular do polímero, havendo apenas um único mecanismo de reação para a sua formação. No processo de polimerização em etapas, também conhecida como policondensação, um monômero bifuncional misto, como é o caso do ácido láctico, ou uma quantidade equimolar de dois monômeros bifuncionais diferentes (um diol e um diácido, por exemplo) são necessários para a formação de um polímero linear. A reação de polimerização procede pela reação individual dos grupos funcionais presentes nos monômeros com a conseqüente liberação de uma molécula menor, geralmente água, resultante da condensação destes dois monômeros.<sup>75</sup>

De modo oposto ao observado para as reações em cadeia, onde a quantidade de iniciador empregada irá corresponder ao número de cadeias propagantes do polímero na reação, não há um controle sobre o crescimento das cadeias na polimerização em etapas. A

figura 7 mostra uma percepção do caráter aleatório que ocorre durante esse tipo de polimerização, onde  $\text{M}$  corresponde a uma unidade de monômero. Inicialmente, dois monômeros reagem entre si para a formação de um dímero. Esse dímero, por sua vez, pode reagir com outro dímero presente no meio reacional e formar um tetrâmero, ou reagir com um outro monômero, para a formação de um trímero. O tetrâmero e o trímero procedem através da reação entre eles mesmos, um com o outro, ou com os dímeros e monômeros ainda presentes no sistema. A polimerização prossegue de forma gradual e com a massa molecular do polímero aumentando continuamente ao longo do tempo.<sup>76</sup>



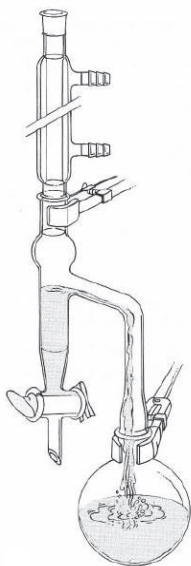
**Figura 7.** Ilustração do mecanismo para a polimerização por etapas. O crescimento da cadeia do polímero ocorre de forma gradual pela reação das diferentes espécies presentes no meio reacional.

A síntese do poli(ácido láctico) a partir dessa metodologia é relativamente simples e pode ser realizada através da presença ou não de catalisadores. Entretanto, uma das desvantagens para esse processo é que o PLA obtido da polimerização em etapas apresenta uma baixa massa molecular, o que o torna não-utilizável para a maioria das aplicações.<sup>74</sup> A baixa massa molecular obtida é uma consequência do equilíbrio ocorrido durante a reação de polimerização entre o polímero sintetizado e a água resultante da reação da esterificação entre as funções hidroxila e carboxila da molécula de ácido láctico. Para superar esse equilíbrio e direcionar a reação para a formação de poli(ácido láctico) de alta massa molecular, faz-se necessário a utilização de técnicas para a remoção da água presente na reação. Os processos mais empregados para a remoção da água das reações de policondensação do ácido láctico são

a utilização de solventes orgânicos aplicando o princípio de destilação azeotrópica e o emprego de sistemas de pressão reduzida em polimerizações onde o polímero encontra-se em estado fundido.<sup>77</sup>

#### 2.5.4.2.1 Polimerização por desidratação azeotrópica

A polimerização do ácido láctico empregando a técnica de desidratação azeotrópica utiliza os princípios de equilíbrio líquido-vapor entre dois ou mais componentes, nesse caso a água eliminada durante a reação e um solvente orgânico, o qual possui uma determinada composição em uma temperatura definida. As reações de polimerização por condensação/desidratação azeotrópica geralmente utilizam um sistema Dean-Stark para remoção de água do sistema reacional (figura 8), a qual pode ser realizada empregando diversos tipos de solventes apróticos.<sup>78</sup>



**Figura 8.** Condensador de refluxo do tipo Dean-Stark.

A síntese de PLA a partir da desidratação azeotrópica está frequentemente associada à obtenção de um polímero de baixa massa molecular. Proikakis e colaboradores estudaram a polimerização do D,L-ácido láctico sem a utilização de catalisadores, no intuito de observar a capacidade autocatalítica da reação.<sup>79</sup> Entretanto, os resultados obtidos pelos pesquisadores

mostraram que os polímeros apresentavam massas moleculares viscosimétricas médias na faixa de 800 à 3.500 g.mol<sup>-1</sup>. Poli(L-ácido láctico) de baixa massa molecular também foi sintetizado por Takasu e colaboradores empregando o procedimento de desidratação de uma solução aquosa de L-ácido láctico com o auxílio de solventes orgânicos.<sup>80</sup> Utilizando catalisadores de escândio, os autores obtiveram polímeros com massas moleculares numéricas médias de até 11.000 g.mol<sup>-1</sup> e polidispersidade de 1,5 em 48 horas de reação. Contudo, quando os autores empregaram vácuo para a remoção da água presente na reação, polímeros com massas moleculares de até 73.000 g.mol<sup>-1</sup> foram sintetizados.

Um dos trabalhos mais importantes para a síntese do poli(ácido láctico) empregando a metodologia de desidratação azeotrópica foi publicado por Ajioka e colaboradores.<sup>81-83</sup> Esse processo é composto por duas etapas: na primeira, uma solução aquosa de L-ácido láctico é submetida à desidratação azeotrópica através do emprego de um solvente aprótico, utilizando um sistema de refluxo do tipo Dean-Stark. Na segunda etapa, o sistema Dean-Stark é removido e substituído por um tubo contendo peneira molecular, pelo qual o solvente circula e retorna ao meio reacional. O trabalho desses autores avaliou, ainda, o comportamento de diferentes catalisadores na polimerização do ácido láctico, como ácidos próticos, metais, óxidos metálicos, haletos metálicos e sais de ácidos orgânicos, além de diversos solventes orgânicos. Os resultados mostraram que foi possível a obtenção de polímeros de PLLA com massas moleculares abrangendo faixas de 50.000 à 300.000 g.mol<sup>-1</sup>. Entretanto, apesar de altas massas moleculares serem obtidas para os polímeros, o processo descrito pelos autores não deixa claro como ocorre a passagem do solvente orgânico pela peneira molecular e nem se a peneira molecular empregada é submetida a algum processo de secagem antes de sua utilização. Essa metodologia foi empregada pela empresa Mitsui Toatsu Chemicals para a obtenção de poli(L-ácido láctico) de alta massa molar entre os anos de 1995 e 2003, quando a produção através desta metodologia foi interrompida.<sup>84</sup>

Outra abordagem para a síntese do poli(ácido láctico), a partir da desidratação azeotrópica de uma solução aquosa de ácido láctico, foi realizada por Kim e colaboradores.<sup>85</sup> Nesse trabalho, os autores avaliaram o efeito de catalisadores de estanho, antimônio, lantanídeo e titânio, sobre a massa molecular do PLA. A reação consistiu em uma policondensação azeotrópica utilizando solventes como *m*-xileno e metóxi-benzeno, em processos utilizando ou não peneira molecular para remoção de pequenas quantidades de água presentes no meio reacional, semelhante ao trabalho de Ajioka e colaboradores. A partir desse

procedimento, obteve-se polímeros com massas moleculares de até  $33.000 \text{ g.mol}^{-1}$ , bem abaixo do reportado por Ajioka e colaboradores.

#### **2.5.4.2.2 Policondensação em estado fundido**

Uma outra estratégia para a obtenção de polímeros de poli(ácido láctico) de alta massa molecular envolve a utilização de pressão reduzida para a remoção da água de eliminação presente durante a reação de polimerização. Esse processo é, geralmente, realizado através de duas etapas, onde a primeira consiste na obtenção de um oligômero de PLA de baixa massa molecular (também chamado de pré-polímero). Em seguida, esse oligômero é submetido a uma policondensação no estado fundido, sendo aquecidos a temperaturas ligeiramente superiores ao seu ponto de fusão, na presença ou não de catalisadores e sob pressão reduzida.<sup>86</sup>

Com base neste mesmo princípio, Chen e colaboradores sintetizaram o poli(L-ácido láctico) de alta massa molecular no estado fundido.<sup>87</sup> Primeiramente, uma solução aquosa de L-ácido láctico foi desidratada com o auxílio de um fluxo de nitrogênio por 1 h a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ . Em seguida, o catalisador tetrabutóxido de titânio (IV) foi adicionado e a temperatura elevada para  $180 \text{ }^\circ\text{C}$ , mantendo-se o sistema por mais 3 horas sob fluxo de nitrogênio. Após este período, a pressão foi reduzida para 1 torr em um tempo total de 7 horas e a reação permaneceu nestas condições de temperatura e pressão por mais 40 horas. Ao final do processo o polímero foi solubilizado em clorofórmio e precipitado em metanol, obtendo-se um polímero com massa molecular ponderal média de  $130.000 \text{ g.mol}^{-1}$  e polidispersidade de 3,3. Uma observação realizada pelos autores foi a racemização parcial do polímero em decorrência da alta temperatura empregada durante o processo.

Moon e colaboradores reportaram trabalhos empregando o uso de pressão reduzida para a obtenção de um oligômero de poli(L-ácido láctico) (*o*-PLLA) seguido do aumento da massa molecular do polímero, também à pressão reduzida.<sup>88,89</sup> Em seus experimentos, oligômeros de PLLA com massas moleculares de  $570 \text{ g.mol}^{-1}$  foram obtidos a partir de uma solução aquosa com concentração de 90 % de L-ácido láctico, através de desidratação à pressão reduzida por 6 horas a  $150 \text{ }^\circ\text{C}$ . Em seguida, os oligômeros de PLLA (*o*-PLLA) foram aquecidos a  $180 \text{ }^\circ\text{C}$  sob um vácuo de 10 torr por até 30 horas, na presença de catalisadores de estanho, ferro,

zinco, alumínio, titânio e ácidos próticos, como ácido *p*-toluenossulfônico. Os polímeros obtidos apresentaram massas moleculares entre 11.000 e 50.000 g.mol<sup>-1</sup>. Assim como observado no trabalho de Chen e colaboradores,<sup>87</sup> os autores relataram a racemização parcial dos polímeros.

Achmad e colaboradores, entretanto, mostraram a possibilidade de obtenção do poli(L-ácido láctico) na ausência de catalisadores, solventes ou iniciadores, sugerindo que o próprio grupo carboxila atue como um ativador de outro grupo carboxila do polímero.<sup>90</sup> Em seus experimentos, uma solução aquosa de L-ácido láctico foi desidratada à pressão atmosférica e 150 °C por 2,5 horas, seguida da oligomerização desse monômero em diferentes pressões por 2,5 horas e polimerização a vácuo em temperaturas que variaram entre 150 e 250 °C. Na condição otimizada, obteve-se o poli(L-ácido láctico) com uma massa molecular de 90.000 g.mol<sup>-1</sup>, utilizando um vácuo de 10 mmHg e temperatura de 200 °C por 90 horas. Contudo, o rendimento para esta condição foi de apenas 34 %, havendo a formação de uma significativa quantidade de lactídeo (cerca de 35 %).

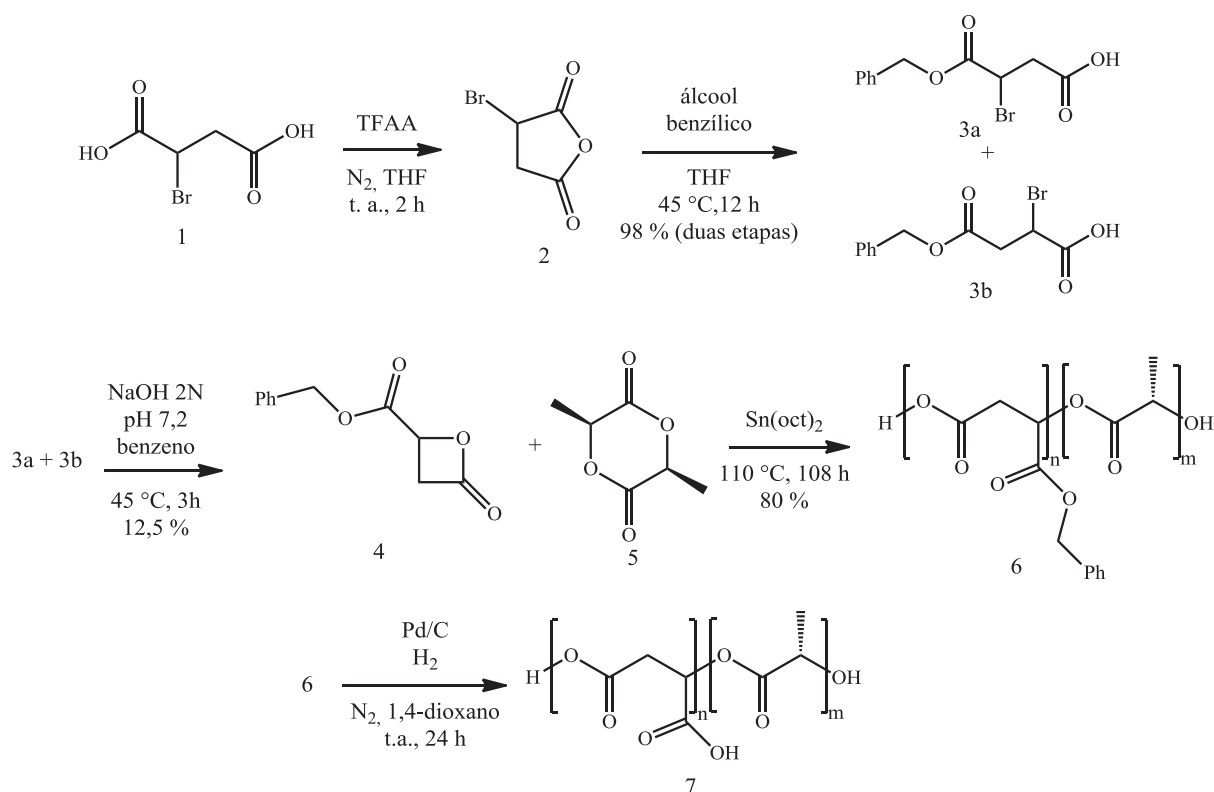
## **2.6 Síntese de poliésteres funcionalizados**

A utilização dos poliésteres como biomateriais para a fabricação de matrizes para engenharia de tecidos deve-se principalmente a sua excelente biocompatibilidade com o meio celular. Entretanto, problemas como alta hidrofobicidade e falta de sítios ativos em sua estrutura para reconhecimento e adesão celular, bem como uma posterior imobilização de outras biomoléculas, precisam ser solucionados para que esses materiais adquiram características aproximadas daquelas encontradas na matriz extracelular. Assim, a funcionalização desses materiais torna-se inevitável para o aprimoramento de suas propriedades.<sup>63</sup> Entretanto, essa estratégia requer a elaboração de uma rota sintética com o menor número de etapas possível e otimizada para a obtenção dos melhores rendimentos, para que esta seja utilizada na elaboração de substitutos biológicos comercialmente viáveis.

A síntese de poliésteres funcionalizados para aplicações biomédicas pode ser realizada por polimerização por abertura de anel, através do emprego de lactonas sinteticamente modificadas, ou por meio de policondensação direta. A primeira estratégia é a mais empregada, uma vez que a polimerização por abertura de anel permite a obtenção de

poliésteres de altas massas moleculares, utilizando monômeros cíclicos com diferentes tamanhos de anel, contendo ou não grupos protetores.<sup>91-94</sup> Todavia, há poucos trabalhos na literatura sobre a obtenção de poliésteres a partir da polimerização em etapas, a qual utiliza monômeros de hidróxi-ácidos ou misturas de dióis e diácidos funcionalizados. O maior inconveniente desse método são as altas temperaturas e os longos tempos de reação requeridos, o que pode levar à reações paralelas, como a racemização de centros quirais. Além disso, a massa molecular alcançada é muito baixa em comparação aos polímeros obtidos por abertura de anel.<sup>95</sup> A seguir serão mostrados alguns exemplos para estas duas metodologias e as principais características dos polímeros sintetizados.

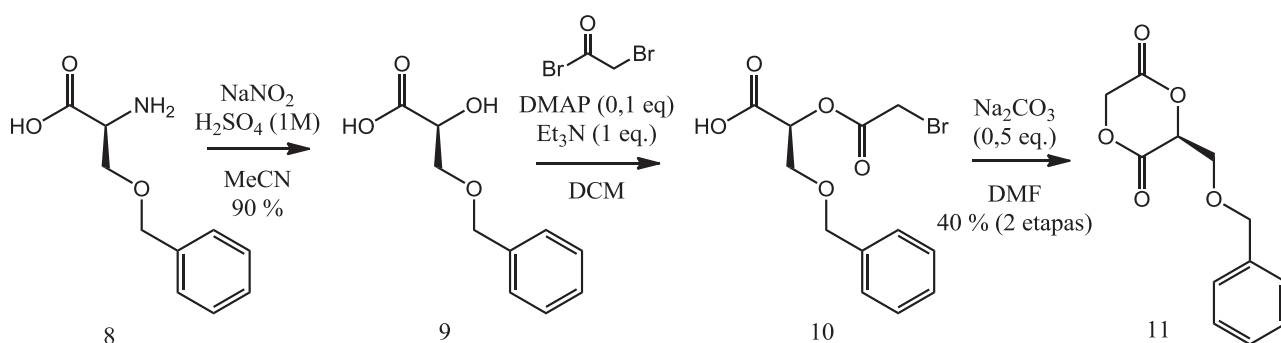
A obtenção de poliésteres através de polimerização por abertura de monômeros cíclicos funcionalizados foi investigada por He e colaboradores.<sup>96,97</sup> Nesse trabalho, os autores realizaram a síntese do copolímero poli(L-lactídeo-*co*-*RS*- $\beta$ -ácido málico), contendo grupos carboxila pendentés na cadeia do polímero (esquema 1).



**Esquema 1.** Rota sintética para a obtenção do poli(L-lactídeo-*co*-*RS*- $\beta$ -ácido málico).

O procedimento consistiu, primeiramente, na síntese do monômero cíclico [4] a partir do ácido bromo succínico [1], em um rendimento total de apenas 12,5 %. Em seguida, o monômero [4] foi copolimerizado com o L-lactídeo [5] através de polimerização por abertura de anel na presença de octoato de estanho (II) (0,1 % m/m). O polímero resultante [6] contendo o ácido carboxílico protegido pelo grupo benzila foi então submetido à hidrogenólise para remoção deste grupo protetor, resultando no poli(L-lactídeo-*co*-*RS*- $\beta$ -ácido málico) [7]. Análises de ângulo de contato mostraram que houve uma significativa redução em comparação com o poli(L-lactídeo), indicando claramente o aumento da hidrofobicidade do polímero a partir da introdução de um grupo funcional que possui maior afinidade com a água. Contudo, as análises de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) realizadas para esse polímero mostraram, como esperado, que a desproteção resultou na diminuição da massa molecular do polímero.

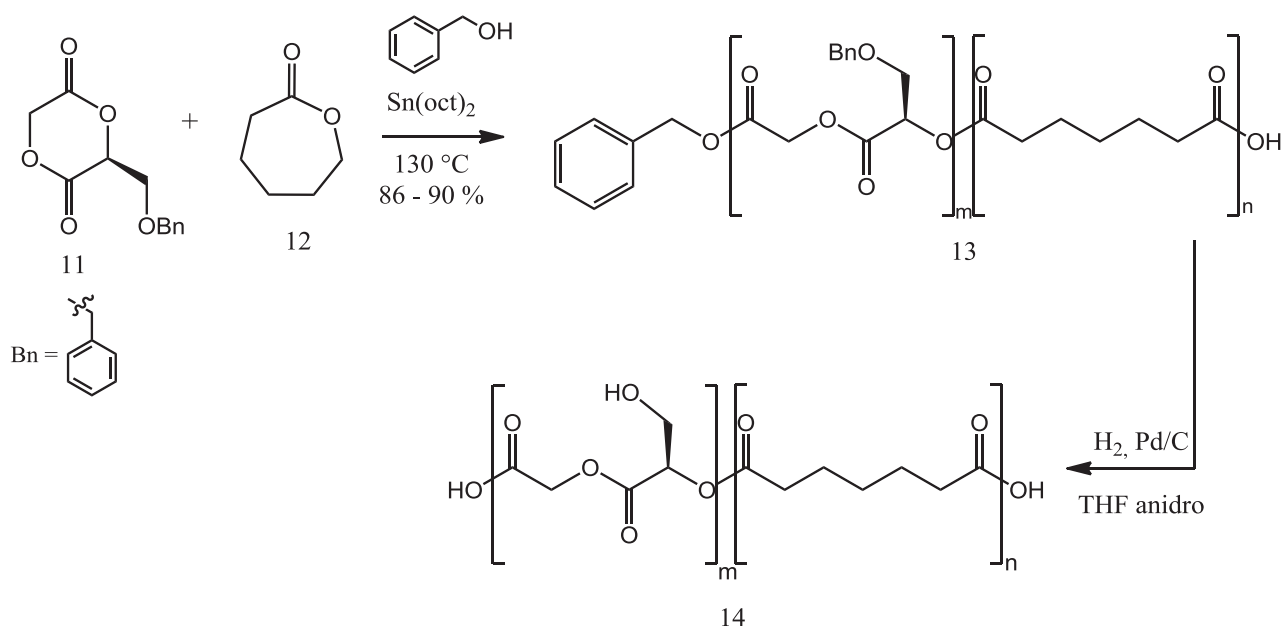
Em outro exemplo empregando a polimerização por abertura de anel para a obtenção de poliésteres funcionalizados, Seyednejad e colaboradores sintetizaram um copolímero de ácido glicólico e  $\epsilon$ -caprolactona contendo grupos hidroxila pendentes na cadeia do copolímero.<sup>98,99</sup> Primeiramente, os autores prepararam o monômero cíclico [11], um derivado sintético do ácido glicólico, através da metodologia de Leemhuis e colaboradores (esquema 2).<sup>100</sup> A reação entre a L-serina protegida [8] e nitrito de sódio resultou na formação do hidróxido ácido [9] em 90 % de rendimento, seguido da substituição acílica deste intermediário ao brometo de 2-bromopropionila para a formação do haleto ácido [10]. A ciclização deste composto na presença de carbonato de sódio resultou na obtenção do monômero cíclico [11] em um rendimento de 36 % após 3 etapas.



**Esquema 2.** Síntese do monômero cíclico [11], derivado do ácido glicólico.



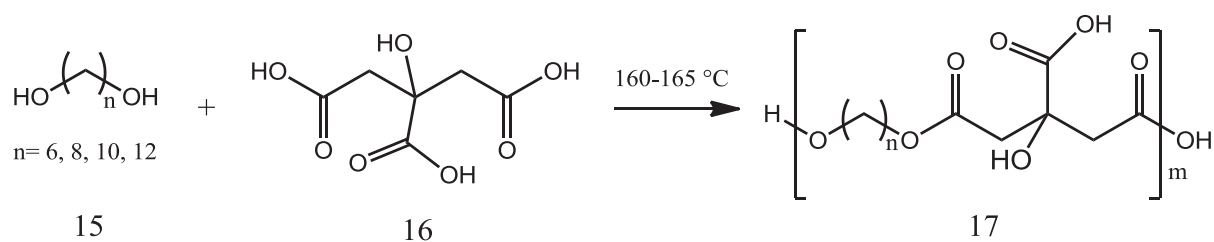
Em seguida, esse monômero foi copolimerizado com a  $\epsilon$ -caprolactona [12], empregando álcool benzílico como iniciador e octoato de estanho (II) como catalisador, a uma temperatura de 130 °C (esquema 3). Os dois monômeros foram utilizados em diversas proporções e os rendimentos para o copolímero protegido [13] abrangeram uma faixa de 86 a 90 %, com massas moleculares ponderais médias da ordem de 37.000 - 68.000 g.mol<sup>-1</sup>. A remoção dos grupos protetores para a obtenção do poli(hidróximetilglicolídeo-*co*- $\epsilon$ -caprolactona) [14] foi realizada pela reação de hidrogenólise empregando hidrogênio molecular e catalisador de Pd/C em THF anidro, a qual removeu não apenas os grupos protetores ao longo da cadeia do copolímero, mas também o iniciador presente na extremidade da cadeia. Os rendimentos dessa etapa não foram mostrados pelos autores e foi observada uma queda da massa molecular deste copolímero funcionalizado para uma faixa entre 32.000 e 58.000 g.mol<sup>-1</sup>.



**Esquema 3.** Obtenção do copolímero poli(hidróximetilglicolídeo-*co*- $\epsilon$ -caprolactona) [14] a partir da polimerização por abertura de anel iniciada por álcool benzílico e posterior remoção dos grupos protetores através de reação de hidrogenólise.

Os poucos trabalhos encontrados na literatura sobre a síntese de poliésteres funcionalizados a partir da reação de polimerização em etapas não utilizam, em sua grande maioria, de estratégias sintéticas para a obtenção de monômeros funcionalizados para a sua posterior polimerização. Ao invés disso, empregam diretamente monômeros polifuncionais

para a síntese de poliésteres, os quais apresentam, geralmente, baixas massas moleculares. Um exemplo disso foi publicado por Yang e colaboradores para a síntese de elastômeros utilizando ácido cítrico [16] e diferentes diálcoois alifáticos [15] (esquema 4).<sup>101</sup> Embora o tempo do processo não tenha sido informado, as reações foram conduzidas sob altas temperaturas e fluxo de  $N_{2(g)}$ , na ausência de catalisadores e de solventes. Um pré-polímero com  $M_w = 1.088 \text{ g.mol}^{-1}$  contendo diversos grupos carboxila em sua estrutura foi obtido utilizando 1,8-octanodiol (não foram informadas as massas moleculares para os outros polímeros com diferentes dióis). Em seguida, os autores realizaram processos de cura nesses pré-polímeros para a obtenção dos elastômeros, em tempos que abrangeram períodos de 2 a 14 dias e temperaturas de 37 a 120 °C. Esse processo permitiu que polímeros reticulados com alongamentos de até 370 % fossem obtidos. A avaliação biológica para estes elastômeros mostraram que o crescimento e a viabilidade foram semelhantes ou superiores quando comparados com o poli(L-ácido láctico).

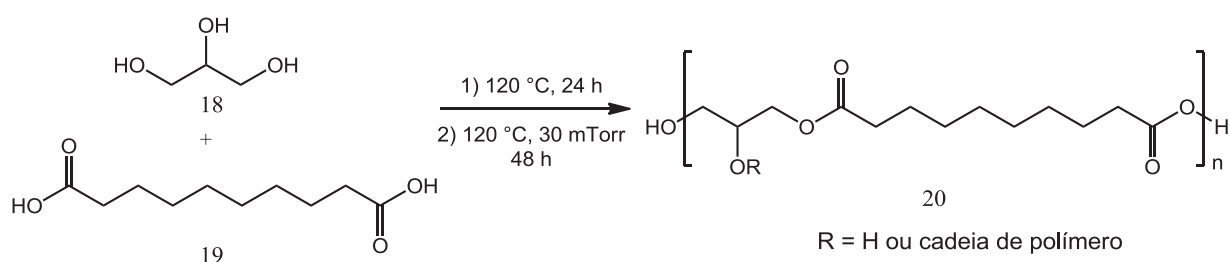


**Esquema 4.** Síntese de pré-polímeros a partir de diferentes diálcoois alifáticos e ácido cítrico.

Estratégia semelhante foi adotada por Yao e colaboradores para a preparação de copolímeros contendo L-ácido láctico, ácido cítrico e polietilenoglicol (PEG).<sup>102</sup> Nesse trabalho, os autores realizaram a copolimerização entre o L-ácido láctico e o ácido cítrico em condições de policondensação a vácuo, obtendo um copolímero com  $M_w = 5.400 \text{ g.mol}^{-1}$  e polidispersidade de 3. Em seguida, este copolímero foi utilizado na polimerização com o PEG ( $M_n = 10.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ), obtendo-se um copolímero multibloco com  $M_w = 76.000 \text{ g.mol}^{-1}$  e polidispersidade 3,5. Análises térmicas mostraram que o material apresentava um comportamento semi-cristalino, com uma temperatura de transição vítrea próximo a 21 °C.

Em 2002, Wang e colaboradores sintetizaram um interessante poliéster com características adequadas para utilização em aplicações biomédicas.<sup>103</sup> Esse material consiste

em um copolímero obtido a partir da policondensação entre o glicerol [18] e o ácido sebácico [19] em duas etapas e na ausência de catalisadores e/ ou solventes (esquema 5). Por ser um material parcialmente reticulado, a massa molecular relativa entre as reticulações ( $M_c$ ) foi calculada em cerca de  $18.000 \text{ g.mol}^{-1}$ . Análises de DSC mostraram dois picos de cristalização para este polímero, em  $-52 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ , e duas temperaturas de fusão em  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente. Nenhuma transição vítrea foi observada acima de  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ , temperatura limite de operação do aparelho, o que sugere que o copolímero é completamente amorfo na temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , sendo ideal para aplicações médicas. Uma vez que os monômeros empregados na síntese deste copolímero são totalmente biocompatíveis, este elastômero tem sido investigado por diversos pesquisadores em aplicações para engenharia de tecidos como, por exemplo, tecidos cardíacos, vasculares, nervosos e cartilagosos, entre outros.<sup>104</sup>



**Esquema 5.** Síntese do poli(glicerol-*co*-sebacato) [20] a partir da reação entre o glicerol [18] e o ácido sebácico [19].

Além dos exemplos citados, outros trabalhos na literatura a respeito da síntese de poliésteres destinados às aplicações biomédicas a partir da polimerização em etapas envolvem a utilização de aminoácidos,<sup>105</sup> derivados de açúcares,<sup>106</sup> substratos antimicrobianos,<sup>107</sup> entre outros. Além disso, diversos artigos de revisão bibliográfica com enfoque na preparação de poliésteres biodegradáveis podem ser encontrados.<sup>108,109</sup>

## 2.7 Método de fabricação de matrizes para engenharia de tecidos: *electrospinning*

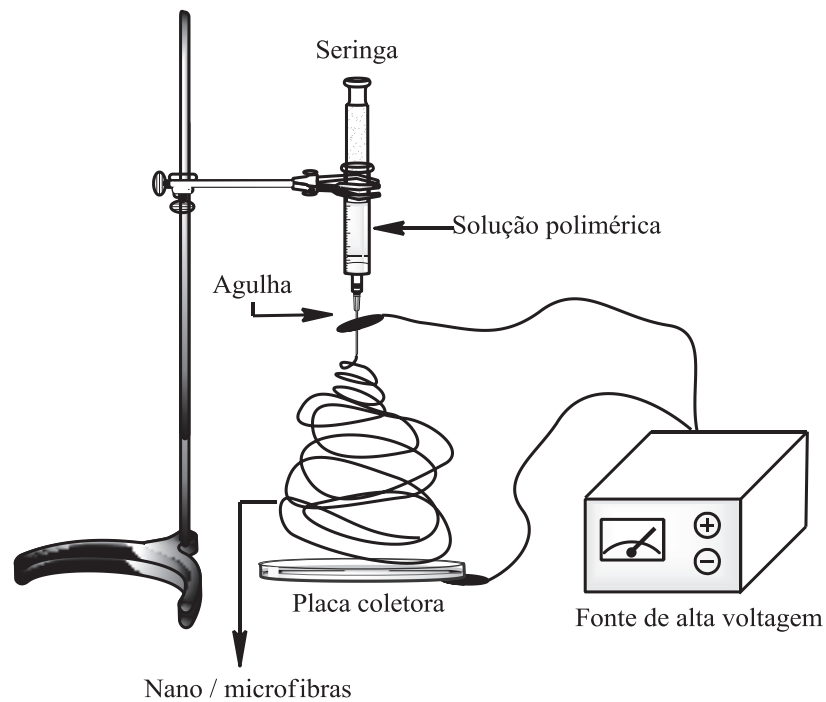
A importância no desenvolvimento de matrizes para engenharia de tecidos não consiste apenas na escolha correta do polímero a ser utilizado, mas também na metodologia

empregada na sua preparação. Características como interconectividade, tamanho de poro, micro/macroporosidade e rugosidade estimulam e influenciam a resposta celular frente ao material, mas também são responsáveis, por exemplo, pelo controle da troca de nutrientes e da difusão das células para o interior da matriz. Assim, diferentes técnicas podem ser utilizadas para produzir arquiteturas tridimensionais destinadas à restauração de tecidos e órgãos, como evaporação de solvente, remoção de sais, separação de fases, liofilização, entre outras.<sup>110</sup>

Dentre as metodologias mais empregadas para a fabricação de *scaffolds*, a técnica de eletrofiação (em inglês, *electrospinning*) tem sido amplamente utilizada, pela qual torna-se possível a construção de matrizes tridimensionais a partir de nano/microfibras poliméricas, apresentando resultados bastante promissores. Embora o conceito de *electrospinning* seja conhecido há mais de 80 anos, apenas nos anos 90 tornou-se um tópico de grande interesse para a produção de fibras em escala nanométrica. Através desse método é possível obter fibras cujo diâmetro pode variar desde alguns nanômetros até poucos micrômetros, dependendo das condições empregadas.<sup>111</sup>

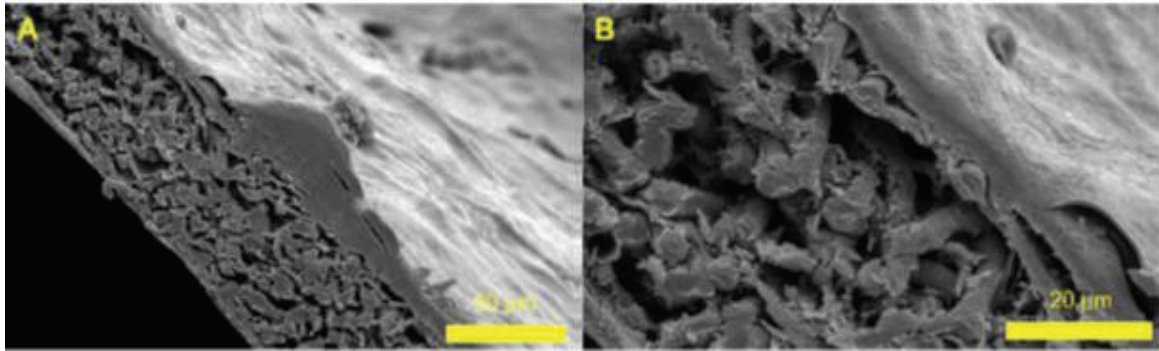
Há três componentes básicos que constituem o processo de *electrospinning*: uma fonte de alta voltagem, um tubo/seringa contendo um pequeno capilar (ou agulha) e uma base metálica coletora (figura 9). Uma solução contendo o polímero (ou o polímero no estado fundido) é bombeada através do capilar sob a influência do campo elétrico gerado a partir da fonte, o qual irá causar uma deformação na gota da solução polimérica. Então, um jato muito fino emerge do capilar de forma acelerada contra a placa metálica que funciona como um eletrodo e deposita-se sobre esta placa na forma de uma fibra polimérica em razão da evaporação do solvente durante o processo.<sup>112</sup>

Uma ampla variedade de polímeros sintéticos e naturais tem sido utilizada para eletrofiação, destinados a estudos em engenharia de tecidos, como poli (ácido láctico) e seus copolímeros, poli( $\epsilon$ -caprolactona), poliuretanas, colágeno, ácido hialurônico, quitosana, entre muitos outros, além de *blendas* destes polímeros.<sup>113-115</sup>



**Figura 9.** Modelo representativo de um experimento de *electrospinning*. Uma solução polimérica contida no interior da seringa é eletrofiada sob uma diferença de potencial e coletada em uma placa coletora.

Como exemplo de aplicação, Blackwood e colaboradores prepararam microfibras do copolímero poli(ácido lático-*co*-ácido glicólico) (PLGA) com diferentes proporções entre os monômeros, para o desenvolvimento de materiais para substituição e/ou restauração de tecido epitelial.<sup>116</sup> Os polímeros foram solubilizados em diclorometano e eletrofiados sob uma diferença de potencial de 15 kV entre os eletrodos. Em seguida, queratinócitos e fibroblastos foram cultivados sobre as matrizes de PLGA, as quais apresentaram uma expansão essencialmente superficial sobre a matriz, como mostrado nas imagens obtidas por MEV (figura 10). A baixa proliferação dessas células para o interior da matriz poderia ser um indicativo da alta hidrofobicidade apresentada por estes materiais, bem como a falta de sítios de reconhecimento celular para a expansão das mesmas através do *scaffold*.



**Figura 10.** Imagens de MEV mostrando a proliferação de queratinócitos e fibroblastos sobre uma matriz de microfibras de PLGA (75:25) após 7 dias (a) e a ampliação do corte transversal da matriz mostrando que houve apenas a expansão superficial das células sobre o *scaffold* (b) (reproduzido com permissão de Blackwood e colaboradores).<sup>116</sup>

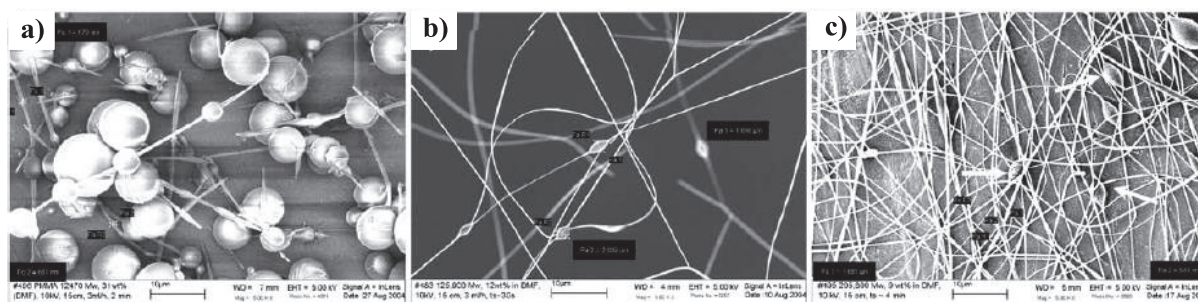
Diversos parâmetros podem influenciar a formação das fibras, como parâmetros que envolvem a solução polimérica a ser eletrofiada (massa molecular do polímero, concentração, viscosidade, tensão superficial e condutividade), fatores de processamento (voltagem aplicada, fluxo da solução, tipo de coletor empregado, distância entre a agulha e o coletor) e fatores ambientais (temperatura e umidade).<sup>113</sup> Para fins de compreensão deste trabalho, os parâmetros relacionados à solução polimérica (massa molecular do polímero, concentração e viscosidade) serão vistos com maiores detalhes a seguir.

### 2.7.1 Massa molecular do polímero

A massa molecular do polímero empregado para eletrofiação pode afetar a morfologia das fibras, uma vez que esta influencia diretamente a viscosidade necessária para a formação das estruturas fibrosas. A utilização de polímeros com baixas massas molares frequentemente ocasionam a formação de imperfeições nas fibras, as quais são chamadas de *beads*. Os *beads* ocorrem por instabilidades na solução polimérica, havendo um rompimento capilar dessa solução e formação das imperfeições.<sup>117</sup> Para o caso de soluções de polímeros com baixas massas moleculares, o rompimento capilar ocorre pela falta de entrelaçamentos entre as cadeias de polímero. Para polímeros com altas massas moleculares, no entanto, os

entrelaçamentos ocorrem mesmo em baixas concentrações, os quais são suficientes para a obtenção de fibras.<sup>118</sup>

A massa molecular do polímero também pode afetar o diâmetro das fibras. Gupta e colaboradores sintetizaram polímeros de poli(metacrilato de metila) (PMMA) com diferentes massas moleculares e investigaram a influência da massa molecular na morfologia das fibras obtidas.<sup>119</sup> A figura 11 mostra as micrografias dos polímeros com diferentes massas moleculares, eletrofiadas sob uma mesma diferença de potencial e mesma concentração. Observa-se que o aumento da massa molecular de (a) para (b) ocasionou o desaparecimento quase completo das imperfeições (*beads*) e fibras com pequenos diâmetros foram obtidas. Contudo, para polímeros com massas moleculares superiores (c), observa-se um aumento no diâmetro das fibras.



**Figura 11.** Efeito sobre a morfologia de fibras obtidas por eletrofição de polímeros de PMMA sintetizados com massas moleculares de a)  $12.470 \text{ g.mol}^{-1}$ , b)  $125.900 \text{ g.mol}^{-1}$  e c)  $205.800 \text{ g.mol}^{-1}$ . Observa-se uma diminuição nos *beads* presentes na matriz com o aumento da massa molecular, ao mesmo tempo que ocorre um aumento no diâmetro das fibras (adaptado com permissão de Gupta e colaboradores).<sup>119</sup>

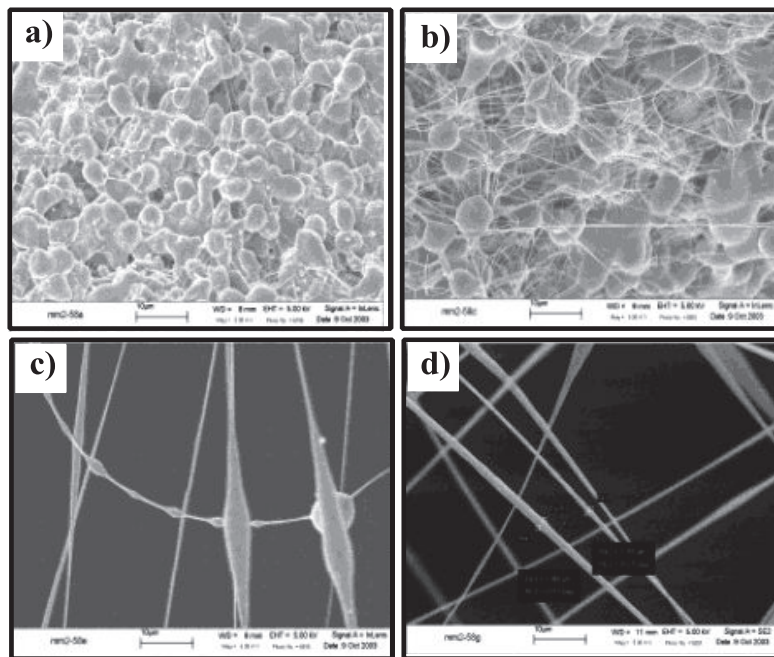
## 2.7.2 Concentração do polímero na solução

A formação de fibras durante o processo de *electrospinning* requer uma concentração de solução mínima para que os entrelaçamentos entre as cadeias possam ocorrer. Alguns trabalhos da literatura mostram que para soluções com baixas concentrações de polímero em solução, uma mistura de fibras com presença de *beads* é obtida. À medida que a concentração aumenta, o formato dos *beads* se altera para uma forma alongada e, por fim, em fibras.<sup>119</sup> Esse



comportamento foi registrado por McKee e colaboradores durante as suas investigações para as condições de eletrofição de copolímeros de poli(tereftalato de etileno-*co*-isofталato de etileno) (PET-*co*-PEI).<sup>120</sup> Os autores observaram uma diminuição na quantidade de *beads* presentes nas matrizes à medida que a concentração do copolímero em solução foi aumentada de 8% para 20 % (figura 12). Esse efeito, como dito anteriormente, deve-se principalmente à formação de entrelaçamentos entre as cadeias do copolímero em solução.

Assim como as baixas concentrações de polímero em solução podem resultar na ocorrência de imperfeições ao longo das fibras, a utilização de soluções com concentrações elevadas não é recomendada, uma vez que a elevação da viscosidade, em razão do aumento da concentração dificulta o controle do fluxo da solução.<sup>121</sup>



**Figura 12.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo (FESEM) para fibras de (PET-*co*-PEI) em concentrações de a) 8 %, b) 12 %, c) 16 % e d) 20 %, onde observa-se a redução das imperfeições com o aumento da concentração da solução polimérica (adaptado com permissão de McKee e colaboradores).<sup>120</sup>



### 2.7.3 Viscosidade da solução polimérica

A viscosidade é definida como uma propriedade física que caracteriza a resistência de um fluido ao escoamento e, assim, desempenha um papel importante na determinação do tamanho e da morfologia das fibras poliméricas obtidas durante a eletrofição. De modo semelhante ao enunciado nas seções anteriores, baixas viscosidades implicam em uma descontinuidade na formação das fibras, enquanto que uma solução com alta viscosidade dificulta a sua ejeção através da agulha e/ou capilar durante o processo. Há um grande número de trabalhos publicados, empregando diferentes sistemas poliméricos, mostrando a forte dependência da viscosidade da solução com a sua concentração, incluindo poli(L-ácido láctico)<sup>122</sup>, poli(ácido láctico-co-ácido glicólico),<sup>123</sup> poli(óxido de etileno),<sup>124</sup> poli(álcool vinílico),<sup>125</sup> poliestireno,<sup>126</sup> entre outros.

### 2.8 Modificação/ funcionalização de matrizes de poliésteres

As características superficiais das matrizes de poliésteres empregadas para engenharia de tecidos são cruciais para que haja adesão e afinidade celular adequadas. No que se refere à estrutura química desses poliésteres, sabe-se que a maioria desses materiais não apresenta grupos funcionais que poderiam proporcionar uma melhor interação entre a matriz e as células, como grupos hidroxila, amino e carboxila, apenas para citar alguns exemplos. Além disso, é conhecido o fato de que a interação entre as células e os seus ambientes ocorre através de mecanismos de bioreconhecimento, como as interações entre as integrinas (receptores localizados na superfície das células) e proteínas de adesão da matriz extracelular (fibronectina, vitronectina, laminina e colágeno).<sup>65</sup> Assim, por causa da ausência daqueles grupos funcionais na estrutura dos poliésteres, não seria possível a funcionalização covalente destas matrizes de poliésteres com essas proteínas de bioreconhecimento celular. Outro aspecto importante das matrizes de poliésteres é a alta hidrofobicidade apresentada por estes materiais, o que dificulta a difusão de nutrientes através da matriz e pode, também, iniciar processos de coagulação sanguínea na superfície da matriz. Portanto, um balanço ideal entre a hidroflicidade e a hidrofobicidade é desejada para a construção de matrizes para aplicações biomédicas.<sup>127</sup>

A fim de adequar as propriedades das matrizes de poliésteres de modo a proporcionar uma melhor interação com o meio biológico, diversas pesquisas tem sido realizadas no intuito de modificar a superfície das matrizes de poliésteres que não possuem sítios de reconhecimento celular como, por exemplo, o poli(ácido lático) e seus copolímeros.<sup>12</sup> Há, basicamente, duas metodologias atualmente utilizadas para a funcionalização dos poliésteres: (i) modificação química da superfície da matriz para a exposição e/ou introdução de grupos funcionais no polímero; ou (ii) modificação das propriedades das matrizes através da utilização de *blendas* entre estes poliésteres e outros polímeros, naturais ou sintéticos.<sup>128</sup>

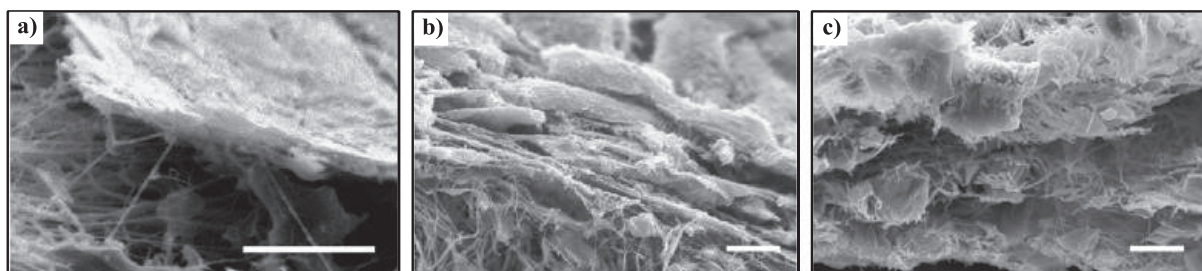
Estratégias para a modificação química superficial de matrizes de poliésteres envolvem, frequentemente, a utilização de uma solução de NaOH para proporcionar a hidrólise das ligações éster da cadeia do polímero e, conseqüentemente, a exposição de grupos carboxila e hidroxila na superfície do material.<sup>129</sup> Park e colaboradores realizaram a hidrólise superficial de uma matriz de PLGA com uma solução 1M de NaOH e avaliaram a sua influência no cultivo de condrócitos sobre a superfície dessa matriz.<sup>130</sup> Os resultados mostraram que houve um significativo aumento no número de células presentes na superfície da matriz, assim como um aumento da função celular, ou seja, um aumento da produção de proteínas intracelulares, como colágeno, em decorrência da presença destes grupos funcionais na superfície da matriz. Essa metodologia também foi empregada na funcionalização de filmes de poli( $\epsilon$ -caprolactona) com a sequência peptídica RGD (Arginina[R]-Glicina[G]-Ácido aspártico[D]), a qual é reconhecida como a sequência peptídica responsável pela adesão celular mediada por integrinas.<sup>131,132</sup> Após o tratamento com uma solução de NaOH, o peptídeo foi imobilizado na superfície do filme pelo emprego de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e *N*-hidróxi-succinimida (NHS). Os resultados de experimentos de adsorção de soros de proteínas sobre os filmes mostraram que ocorreu a adesão destas proteínas em virtude das interações com o peptídeo RGD.

Outra alternativa para a hidrólise de matrizes de poliésteres é a realização de reações de aminólise, ou seja, o rompimento das ligações ésteres do material através do emprego de uma diamina. Esse procedimento foi empregado por Zhu e colaboradores para a imobilização de fibronectina à superfície de uma matriz de nanofibras de poli(L-ácido lático-*co*- $\epsilon$ -caprolactona), em estudos para regeneração de epitélio esofágico.<sup>133</sup>

Apesar dessas técnicas se mostrarem bastante efetivas na funcionalização de matrizes de poliésteres, as mesmas podem resultar em efeitos indesejáveis nas características das matrizes,

como perda das propriedades mecânicas, aumento na taxa de degradação dos polímeros e geração de resíduos tóxicos para as células.<sup>128</sup> A fim de evitar resíduos, ou outros problemas relacionados à modificação dos poliésteres através desses processos, diversos autores estão utilizando o tratamento com plasma para a funcionalização da superfície de *scaffolds*.<sup>134-136</sup>

Essa metodologia permite a introdução de funcionalidades como ácido carboxílico, hidroxila e amina, a partir da interação de espécies quimicamente ativas (O<sub>2</sub>, ar, N<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>) geradas pela descarga de um feixe de plasma sobre a superfície do polímero. Essa metodologia foi empregada recentemente por Chen e Su em estudos para a obtenção de substitutos de tecidos cartilagosos, após a modificação da superfície de matrizes de nanofibras de poli(L-ácido láctico) com plasma de O<sub>2</sub> e posterior imobilização de gelatina utilizando EDC como agente de acoplamento.<sup>137</sup> Os resultados mostraram que a expansão de condrócitos ao longo da matriz foi estatisticamente significante a partir do 14º dia de cultura celular, além da proliferação das células para o interior das matrizes, como pode ser observado a partir das imagens obtidas por MEV (figura 13).



**Figura 13.** Imagens de MEV de *scaffolds* de nanofibras de (a) PLLA e (b,c) PLLA modificado com gelatina. Observa-se a acentuada proliferação de condrócitos ao longo das matrizes após 14 dias de cultivo (reproduzido de Chen e colaboradores).<sup>137</sup>

Apesar dos bons resultados obtidos através dessa metodologia de funcionalização das matrizes por plasma, a formação desses grupos funcionais está restrita à penetração do feixe de plasma a apenas alguns nanômetros de profundidade.<sup>138</sup> Além disso, o emprego dessa técnica requer a utilização de um forno de plasma destinado ao tratamento de superfície de materiais.

Uma vez que é de grande interesse que a funcionalização de matrizes destinadas à engenharia de tecidos ocorra tanto na superfície, quanto no interior dos *scaffolds*, a utilização de *blendas* (misturas físicas) entre polímeros com diferentes características representa uma alternativa aos métodos de hidrólise e tratamento com plasma. Os polímeros utilizados em combinações apresentam a vantagem de diversificação das propriedades mecânicas da amostra, bioatividade, hidrofiliabilidade e de degradação dessas amostras.<sup>139</sup>

Um grande número de trabalhos encontrados na literatura utilizam *blendas* de poliésteres com polímeros naturais, como quitosana,<sup>140</sup> amido<sup>141</sup> e gelatina,<sup>142</sup>, entre outros. Contudo, são poucos os trabalhos que demonstram a utilização de polímeros funcionalizados sintetizados em laboratório em *blendas* com outros poliésteres, assim como a avaliação de suas propriedades para o emprego em engenharia de tecidos.<sup>143,144</sup>

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivos gerais

A proposta central deste trabalho consiste na síntese e caracterização de poliésteres biocompatíveis e bioreabsorvíveis para o uso como suportes celulares na regeneração de tecido epitelial. A síntese desses polímeros foi fundamentada na importância do desenvolvimento de novos biomateriais que apresentem funcionalidades em sua estrutura para a aplicação como substitutos biológicos na engenharia de tecidos, empregando monômeros que apresentem uma baixa toxicidade ao organismo vivo.

#### 3.2 Objetivos específicos

Para alcançar a meta central deste trabalho, os seguintes objetivos específicos foram realizados:

- Sintetizar um poli(L-ácido láctico) de alta massa molecular utilizando o princípio de polimerização em etapas como um método alternativo ao empregado atualmente na produção industrial desse polímero;
- Avaliar o efeito da adição de um poli(L-ácido láctico) de baixa massa molecular a um poli(D,L-lactídeo) de alta massa molecular em matrizes de *blendas* desses polímeros obtidos pela técnica de *electrospinning*;
- Sintetizar e caracterizar o poli(L-ácido láctico-*co*-L-ácido málico);
- Utilizar o poli(L-ácido láctico-*co*-L-ácido málico) em *blendas* com um poli(D,L-lactídeo) para a construção de matrizes tridimensionais através do método de *electrospinning*;
- Avaliar a adesividade e viabilidade de células-tronco mesenquimais cultivadas sobre as matrizes de poli(L-ácido láctico-*co*-L-ácido málico)/poli(D,L-lactídeo);
- Sintetizar e caracterizar poliésteres contendo monômeros derivados do glicerol.

A síntese dos poliésteres levou em consideração a utilização de monômeros provenientes de fontes naturais e renováveis. Além disso, a degradação desses materiais desencadeados por processos hidrolíticos e/ou enzimáticos devem resultar em subprodutos que apresentem uma baixa toxicidade para o corpo humano, a fim de evitar processos inflamatórios causados pela rejeição do sistema imunológico.

A principal característica dos polímeros sintetizados é a presença de grupos funcionais polares pendentes à cadeia principal, os quais podem conferir ao material propriedades de adesão celular, além da possibilidade de funcionalização com outras biomoléculas de interesse para o desenvolvimento de materiais que mimetizem a matriz extracelular.

## 4. Materiais e métodos

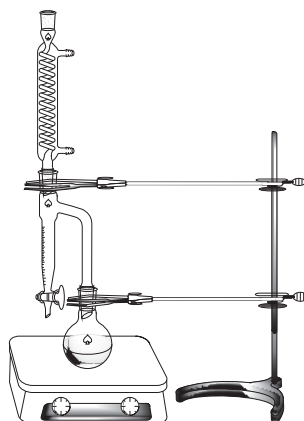
### 4.1 Procedimentos experimentais

#### 4.1.1 Síntese do poli(L-ácido láctico) de alta massa molecular

Os procedimentos experimentais contidos nesse estudo foram realizados no Laboratório de Síntese Orgânica e de Polímeros (SINPOL), localizado junto ao Instituto de Química da UFRGS.

##### 4.1.1.1 Síntese de poli(L-ácido láctico) a partir de solução aquosa de L-ácido láctico<sup>85</sup>

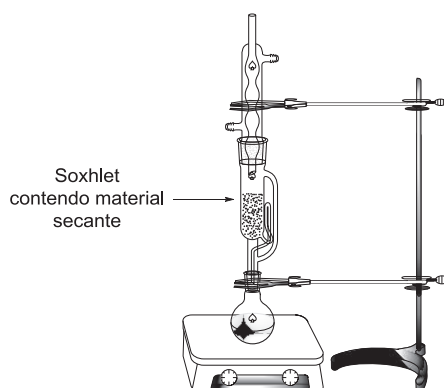
Em um balão de fundo redondo contendo uma solução aquosa (85 %) de L-ácido láctico (1 g de monômero; 11,1 mmol;  $d = 1,21 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Vetec<sup>®</sup>) foram adicionados 10 mL de xileno (Vetec<sup>®</sup>) e 20 mg de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,2 % m/m, Vetec<sup>®</sup>). Um condensador de refluxo do tipo Dean-Stark foi acoplado ao balão da reação e preenchido internamente com o solvente da reação (figura 14). Em seguida, a temperatura do sistema foi elevada para 155 °C por 20 horas e agitação magnética. Então, o solvente foi concentrado à metade do volume inicial e o polímero foi precipitado pela adição de 20 mL de etanol. Após filtração a vácuo e lavagens com pequenas porções de etanol, o polímero foi seco em estufa a 50 °C para remoção completa do solvente. A massa molecular do polímero foi determinada por análise de cromatografia por exclusão de tamanho.



**Figura 14.** Representação para as reações de policondensação azeotrópica do ácido láctico.

#### 4.1.1.2 Obtenção do poli(L-ácido lático) de alta massa molecular (condição otimizada)

A um balão de fundo redondo adicionou-se 10 g de poli(L-ácido lático) sintetizado no item 4.1.1.1 ( $M_w \sim 8.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ), 50 mL de xileno anidro (Vetec<sup>®</sup>) e 20 mg de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,2 % m/m, Vetec<sup>®</sup>). A secagem do solvente ocorreu por meio de refluxo na presença de sódio metálico durante aproximadamente 2 horas sob atmosfera inerte. Um extrator do tipo Soxhlet equipado com um condensador de refluxo foi acoplado ao balão da reação e preenchido internamente com peneira molecular, previamente desidratada a 230 °C e alto-vácuo por 3 horas (figura 15). Em seguida, a temperatura do sistema foi elevada para 170 °C por 48 horas e agitação magnética. O polímero foi precipitado pela adição de 50 mL de etanol, o qual foi filtrado a vácuo e lavado com pequenas porções de etanol. Em seguida, o polímero foi seco em estufa a 50 °C para remoção completa do solvente. A massa molecular do polímero foi determinada por análise de cromatografia por exclusão de tamanho.



**Figura 15.** Aparato utilizado para a obtenção de PLA de alta massa molecular.

#### 4.1.2 Obtenção e caracterização de matrizes obtidas por *electrospinning* utilizando *blendas* de poli(D,L-ácido lático) e poli(L-ácido lático) de diferentes massas moleculares

Os procedimentos experimentais contidos nesse estudo foram realizados no Laboratório de Síntese Orgânica e de Polímeros (SINPOL), localizado junto ao Instituto de Química da UFRGS.



#### 4.1.2.1 Preparação das matrizes de microfibras de *blendas* de PDLLA/PLLA

Para a produção de matrizes de microfibras de PDLLA/PLLA, os polímeros de alta e baixa massa molecular (PDLLA,  $M_w = 160.000 \text{ g.mol}^{-1}$ , e PLLA,  $M_w = 8.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) foram solubilizados em uma mistura de diclorometano : etanol absoluto (8 : 2) em concentrações totais que variaram de 10 a 18 % (m/v), utilizando balões volumétricos de 10 mL para a sua preparação. A proporção de PLLA adicionado à blenda variou de 0 a 50 % da massa total de polímero empregado e foram identificadas como MF100 (100 % de PDLLA, sem a adição de PLLA), MF91 (contendo 10 % da massa total de polímero composta de PLLA), MF82, MF73, MF64 e MF55 (com 50 % da massa total de polímero composta de PLLA). A eletrofiação foi realizada em um aparelho de *electrospinning* e as soluções poliméricas foram carregadas em seringas de vidro de 10 mL contendo uma agulha de 0,7 mm de diâmetro interno (22 G1). Os parâmetros de eletrofiação foram estabelecidos com soluções de PDLLA onde as melhores condições apresentaram uma diferença de potencial de 13 kV, à 15 cm de um coletor estático de alumínio, empregando uma taxa de vazão da solução de  $3,8 \text{ mL.h}^{-1}$ . Assim, todas as demais soluções de blendas de PDLLA/PLLA foram eletrofiadas sob estas condições. Após a eletrofiação, todas as amostras foram secas a vácuo por 24 horas, à temperatura ambiente e estocadas em dessecadores até o momento das análises.

#### 4.1.2.2 Preparação dos filmes de *blendas* de PDLLA/PLLA

As proporções empregadas para os dois polímeros foram as mesmas utilizadas para a preparação das microfibras de PDLLA/PLLA. Os filmes foram preparados a partir da dissolução de 1 grama de amostra em 5 mL de diclorometano. Após a completa solubilização dos polímeros, as soluções foram dispostas em placas de *Petri* e os filmes resultantes da evaporação do solvente foram secos por 24 horas à temperatura ambiente e mais 24 horas a vácuo sendo, posteriormente, estocados em dessecadores até o momento das análises.

### **4.1.2.3 Degradação hidrolítica *in vitro* para as amostras de microfibras e filmes de PDLA/PLLA<sup>145,146</sup>**

Primeiramente preparou-se uma solução salina de tampão fosfato a partir da dissolução de uma mistura composta de 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em um béquer contendo 800 mL de água deionizada. Após a dissolução completa de todos os reagentes o pH da solução foi ajustado com uma solução 1M de HCl (em caso de ultrapassagem do valor de pH 7,4, utilizar solução 1M de NaOH para ajustar esse valor). Após o ajuste de pH, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 1 litro e o volume foi ajustado.

As amostras de fibras e filmes foram acomodadas em tubos de ensaio contendo 30 mL da solução salina de tampão fosfato (pH 7,4). Os tubos foram colocados em uma incubadora termostatizada de agitação orbital, modelo TE-420 (*Tecnal*), e mantidos a 37 °C por 28 dias, a uma rotação de 120 rpm. Em intervalos de tempo de 4 dias, uma porção de cada amostra foi removida dos tubos e o meio contendo o tampão fosfato foi renovado, no intuito de evitar uma redução de pH da solução por causa dos produtos de degradação. As alíquotas removidas foram lavadas diversas vezes com água destilada e secas a 37 °C por 12 horas antes de serem submetidas à análises de cromatografia por exclusão de tamanho para avaliação da perda de massa molecular das amostras.

### **4.1.3 Síntese do poli(L-ácido lático-co-L-ácido málico) (PLLALMA)**

Os procedimentos experimentais contidos nesse estudo foram realizados no Laboratório de Síntese Orgânica e de Polímeros (SINPOL), localizado junto ao Instituto de Química da UFRGS.

#### **4.1.3.1 Síntese do oligômero de poli(L-ácido lático) (*o*-PLLA)**

A um balão de fundo redondo contendo uma solução aquosa (85 %) de L-ácido lático (30 g de monômero; 333 mmol;  $d = 1,21 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) foram adicionados 300 mL de xileno e 600 mg de SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,2 % m/m). Um condensador de refluxo do tipo Dean-Stark foi

acoplado ao balão da reação e preenchido internamente com o solvente da reação. Em seguida, a temperatura do sistema foi elevada para 155 °C por 5 horas e agitação magnética. Então, o solvente foi removido por destilação, seguido de mais 3 horas sob alto vácuo e temperatura de 120 °C para remoção completa do solvente. A massa molecular do oligômero foi determinada por análise de cromatografia por exclusão de tamanho e, por causa da sua baixa massa molecular, não foi realizada precipitação deste produto.

#### 4.1.3.2 Síntese do poli(L-ácido láctico-co-DL-ácido málico) [24]

Procedimento empregando desidratação azeotrópica (amostra RAM03)

A um balão contendo 1 g de oligômero de PLLA ( $M_n = 830 \text{ g.mol}^{-1}$ , 1,2 mmol) foram adicionados 161 mg (1,2 mmol) de DL-ácido málico (Synth<sup>®</sup>), 2 mg de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,2% m/m), 2 mg de ácido *p*-toluenosulfônico (0,2 % m/m, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) e 8 mL de tolueno (Nuclear<sup>®</sup>). Ao balão da reação foi acoplado um sistema de refluxo do tipo Dean-Stark e o sistema foi aquecido a 130 °C por 24 horas. Então, o solvente foi reduzido à metade do volume inicial e o polímero foi isolado por meio de precipitação em etanol. Após filtração a vácuo e lavagens com pequenas porções de etanol, o copolímero foi seco em estufa a 40 °C para remoção completa do solvente. O polímero foi caracterizado por análise de cromatografia por exclusão de tamanho para determinação de sua massa molecular e calorimetria exploratória diferencial para determinação de suas propriedades térmicas.

Procedimento empregando alto vácuo (amostra RAM09)

A um balão contendo 1 g de oligômero de PLLA ( $M_n = 830 \text{ g.mol}^{-1}$ , 1,2 mmol) foram adicionados 161 mg (1,2 mmol) de DL-ácido málico, 2 mg de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,2% m/m) e 2 mg de ácido *p*-toluenosulfônico (0,2 % m/m). Ao balão da reação foi acoplada uma saída para linha de alto-vácuo e o sistema foi aquecido a 130 °C por 6 horas. Após este período, o polímero foi isolado por meio de precipitação em etanol. Após filtração a vácuo e lavagens

com pequenas porções de etanol, o copolímero foi seco em estufa a 40 °C para remoção completa do solvente. O polímero foi caracterizado por análise de cromatografia por exclusão de tamanho e calorimetria exploratória diferencial.

#### 4.1.3.3 Síntese do poli(L-ácido láctico-co-L-ácido málico) [26] (amostra RAM17)

A uma solução aquosa 85 % de L-ácido láctico (25 g, 278 mmol) foram adicionados 7,44 g (55,5 mmol) de L-ácido málico (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) e 65 mg do catalisador triflato de escândio (III) (0,2 % m/m, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). Ao balão da reação foi acoplada uma saída para uma bomba de alto vácuo e o sistema foi inicialmente aquecido a 70 °C e mantido a esta temperatura por 2 horas para remoção da água em excesso proveniente da solução aquosa de L-ácido láctico. Em seguida, a temperatura foi elevada 10 °C a cada 30 minutos até 130 °C e o sistema foi mantido nesta temperatura por mais 20 horas. O polímero obtido foi caracterizado por GPC, DSC, e ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-APT.

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 5,5 (m, 1H); 5,21 (m, 1H); 4,99 (m, 1H); 3,16-2,59 (m,2H); 1,46 (m, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C-APT (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 171,3-163,8; 98,2; 93,8; 35,1; 16,5.

#### 4.1.3.4 Determinação do índice de acidez para o poli(L-ácido láctico-co-L-ácido málico) [26]

O copolímero [26] (500 mg) foi solubilizado em 25 mL de acetona e titulado com uma solução base padronizada de NaOH com concentração de 0,1216 mol.L<sup>-1</sup>, utilizando o indicador azul de bromofenol para determinação do ponto de neutralização. O procedimento foi realizado por 3 vezes e a média dos volumes utilizados para a titulação do copolímero foi empregada para a determinação do índice de acidez (IA).

#### 4.1.3.5 Preparação das matrizes de nanofibras de *blendas* de PDLLA/PLLALMA

A preparação das matrizes utilizou o mesmo procedimento para os *scaffolds* de *blendas* de PDLLA/PLLA. Os polímeros PDLLA e PLLALMA foram solubilizados em uma mistura de diclorometano : etanol absoluto (8 : 2) em concentrações totais que variaram de 10 à 12 % (m/v), utilizando balões volumétricos de 10 mL para a sua preparação. A proporção de PLLA adicionado à blenda variou de 0 a 30 % da massa total de polímero empregado e foram identificadas como MFAM100 (sem a adição do copolímero [26]), MFAM91, MFAM82 e MFAM73 (com 30 % da massa total de polímero composta de [26]). A eletrofiação foi realizada em um aparelho de *electrospinning* e as soluções poliméricas foram carregadas em seringas de vidro de 5 mL contendo uma agulha de 0,7 mm de diâmetro interno (22 G1). Os parâmetros de eletrofiação foram estabelecidos com soluções de PDLLA onde as melhores condições apresentaram uma diferença de potencial de 13 kV, à 15 cm de um coletor estático de alumínio, empregando uma taxa de vazão da solução de 3,8 mL.h<sup>-1</sup>. Assim, todas as demais soluções de *blendas* de PDLLA/PLLA foram eletrofiadas sob estas condições. Após a eletrofiação, todas as amostras foram secas a vácuo por 24 horas, à temperatura ambiente e estocadas em dessecadores até o momento das análises.

#### 4.1.3.6 Preparação dos filmes de *blendas* de PDLLA/PLLALMA

As proporções empregadas para os dois polímeros foram as mesmas utilizadas para a preparação das microfibras de PDLLA/PLLALMA. Os filmes foram preparados a partir da dissolução de 1 grama de amostra em 5 mL de uma mistura diclorometano : etanol absoluto (95 : 5). Após a completa solubilização dos polímeros, as soluções foram dispostas em placas de *Petri* e os filmes resultantes da evaporação do solvente foram secos por 24 horas à temperatura ambiente e mais 24 horas sob vácuo, sendo posteriormente estocados em dessecadores até o momento das análises.

#### 4.1.3.7 Degradação hidrolítica *in vitro* para as nanofibras e filmes de PDLLA/PLLALMA<sup>145,146</sup>

A solução salina de tampão fosfato utilizada nesse ensaio foi preparada conforme descrito no item 4.1.2.3. As amostras de fibras e filmes foram acomodadas em tubos de ensaio contendo 30 mL da solução salina de tampão fosfato (pH 7,4). Os tubos foram colocados em uma incubadora termostaticada de agitação orbital, modelo TE-420 (*Tecnal*), e mantidos a 37 °C por 18 dias, a uma rotação de 120 rpm. Em intervalos de tempo de 3 dias, uma porção de cada amostra foi removida dos tubos e o meio contendo o tampão fosfato foi renovado, no intuito de evitar uma redução de pH da solução por causa dos produtos de degradação. As alíquotas removidas foram lavadas diversas vezes com água destiladas e secas a 37 °C por 12 horas antes de serem submetidas à análises de cromatografia por exclusão de tamanho para avaliação da perda de massa molecular das amostras.

#### 4.1.4 Síntese e polimerização de monômeros bifuncionais derivados do glicerol

Os procedimentos experimentais contidos nesse estudo foram realizados no Max-Planck Institute for Polymer Research, Alemanha, e também no Laboratório de Síntese Orgânica e de Polímeros (SINPOL), localizado junto ao Instituto de Química da UFRGS.

##### 4.1.4.1 Síntese do tosilato de glicerila [29]

A uma solução contendo 2 g (15,13 mmol) de solketal [27] (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) em 40 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Vetec<sup>®</sup>) foram adicionados 5,77 g (30,26 mmol) de cloreto de *p*-toluenosulfonila, seguido da adição de 5,36 g (52,96 mmol) de trietilamina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) e de 185 mg (1,51 mmol) de DMAP (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). A reação foi conduzida à temperatura ambiente por 18 horas sob agitação magnética. Em seguida, a mistura reacional foi diluída com 40 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, lavada sucessivamente com uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (30 mL) e água (30 mL). Após a secagem sob NaSO<sub>4</sub> (Nuclear<sup>®</sup>), o solvente foi removido em evaporador rotatório e o produto bruto obtido foi submetido à etapa seguinte sem qualquer tipo de purificação (95 % de rendimento bruto). O intermediário sintético [28] foi então submetido à

hidrólise ácida do anel isopropilideno na presença de uma mistura THF/ 1M HCl (3 : 1; 50 mL, Vetec<sup>®</sup>), à temperatura ambiente por 16 horas. A reação foi finalizada pela adição de uma solução saturada de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (30 mL) a 0 °C, seguido de diluição com 50 mL de Et<sub>2</sub>O (Nuclear<sup>®</sup>). A fase orgânica foi lavada com uma solução saturada de NaCl (40 mL), seca sob Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e o solvente removido em evaporador rotatório. O produto residual foi purificado em coluna cromatográfica de sílica-gel, utilizando hexano : EtOAc (2 : 8) como eluente (CCD = hexano : EtOAc; 3 : 7), fornecendo 2,64 g do tosilato de glicerila [29] em 71 % de rendimento após duas etapas.

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7,81 (*d*, *J*= 8,4 Hz, 2H); 7,38 (*d*, *J*= 8,1 Hz, 2H); 4,09 (*dd*, *J*= 5,4; 1,7 Hz, 2H); 3,96 (*qt*, *J*= 5,0 Hz, 1H); 3,66 (*ddd*, *J*= 27,3; 11,6; 4,7 Hz, 2H); 2,62 (*s*, 2H); 2,47 (*s*, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C-APT (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 145,2; 132,4; 130 (2); 127,9 (2); 70,7; 69,6; 62,7; 21,6.

#### 4.1.4.2 Síntese do 3-azido-propanodiol [35]

A uma solução de 2 g (8,12 mmol) de tosilato de glicerila [29] em 20 mL de DMF anidro (Acros<sup>®</sup>) foram adicionados 1,6 g (24,4 mmol) de NaN<sub>3</sub> (Vetec<sup>®</sup>) sob atmosfera inerte. A temperatura foi elevada para 60 °C e o sistema permaneceu sob agitação magnética por 24 horas. O excesso de azida de sódio foi extinto pela adição de uma solução 1 M HCl (10 mL) e diluída com acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com água (20 mL) e solução saturada de NaCl (20 mL) e as fases aquosas combinadas foram extraídas com acetato de etila (3x 20 mL, Nuclear<sup>®</sup>). As fases orgânicas foram combinadas e secas sob Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Após a remoção do solvente à pressão reduzida, o produto bruto residual foi purificado por cromatografia em sílica-gel, utilizando hexano : EtOAc (2 : 8) como eluente (CCD = hexano : EtOAc; 3 : 7), fornecendo 710 mg (6,06 mmol) do diol [35] em 75 % de rendimento.

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 3,90 (*m*, 1H); 3,66 (*ddd*, *J* = 29,4; 11,5; 4,9 Hz, 2H); 3,41 (*dd*, *J* = 5,7; 1,5 Hz, 2H); 3,26 (*s*, 2H).

RMN  $^{13}\text{C}$ -APT (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  71; 64,1; 53,6.

#### 4.1.4.3 Síntese do benzilato de glicerila [38]

Solketal [27] (5 g, 37,83 mmol) dissolvido em 100 mL de THF anidro (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) foi lentamente adicionado sobre 5,5 g de uma dispersão de 60 % de NaH (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) em óleo mineral (previamente lavado com hexano para remoção desse óleo mineral) a 0 °C. Após 10 minutos de agitação, BnBr (9,7 g, 56,74 mmol, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) dissolvido em 25 mL de THF anidro foi lentamente adicionado à suspensão, a 0 °C. O banho de gelo foi removido após 30 min. e a mistura reacional permaneceu sob agitação por 16 horas à temperatura ambiente. Em seguida, o excesso de NaH foi eliminado pela lenta adição de MeOH (Chromasolv<sup>®</sup>) sobre a reação à 0 °C. Após a remoção do solvente, o resíduo foi dissolvido com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL, Chromasolv<sup>®</sup>), lavado com água deionizada (2x 25 mL) e a fase aquosa resultante foi extraída com três porções de 30 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . As fases orgânicas foram combinadas, lavadas com solução saturada de NaCl e seca sob  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . O solvente foi removido à pressão reduzida e o produto bruto [37] remanescente foi utilizado na etapa seguinte sem qualquer purificação. Esse intermediário foi então submetido às condições de hidrólise ácida mediante ao emprego de 250 mL de uma mistura THF/1M HCl (3 : 1) por 18 horas à temperatura ambiente e agitação magnética. Então, uma solução saturada de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (100 mL) foi lentamente adicionada a 0 °C e permanecendo sob agitação por 10 minutos. Éter dietílico (150 mL) foi adicionado e a fase aquosa foi extraída com três porções de 100 mL de  $\text{Et}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). As fases orgânicas foram combinadas, lavadas com uma solução saturada de NaCl, seca sob  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e o solvente removido em evaporador rotatório. O óleo residual foi purificado por cromatografia em sílica-gel utilizando hexano : EtOAc (2 : 8) como eluente (CCD = hexano : EtOAc; 3 : 7), fornecendo 6,1 g (33,48 mmol) do monômero [38] em 88 % de rendimento após duas etapas.

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,41 – 7,25 (m, 5H); 4,54 (s, 2H); 3,95 – 3,80 (m, 1H); 3,64 (*ddd*,  $J = 25,8; 11,4; 4,6$  Hz; 2H); 3,64 (*ddd*,  $J = 13,5; 9; 5,1$  Hz; 2H); 2,86 (s, 2H).



**RMN <sup>13</sup>C-APT (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  137,8; 128,6 (2); 128; 127,9 (2); 73,7; 71,9; 70,8; 64,2.

#### 4.1.4.4 Síntese do poli(3-benzilglicerol-*co*-maleato) [39]

Benzilato de glicerila [38] (300 mg, 1,65 mmol) e anidrido malêico [34] (162 mg, 1,65 mmol, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) foram adicionados a um balão de fundo redondo na presença de SnCl<sub>2</sub> (1 mg, 0,2 % m/m, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) e sob atmosfera inerte. A temperatura do sistema foi elevada para 80 °C e a reação prosseguiu nesta temperatura por 3 horas, seguido do aumento da temperatura para 100 °C por mais 2 horas. Em seguida, uma bomba de vácuo foi acoplada ao balão da reação e a temperatura foi elevada para 120 °C, permanecendo nessas condições por até 30 horas. O viscoso produto obtido foi caracterizado por RMN de <sup>1</sup>H e GPC. Obs: o mesmo procedimento foi empregado para a polimerização com o ácido malêico [32].

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  7,46-7,15 (m, 5H); 6,98-6,71 (m, 2H); 5,47-5,10 (m, 1H); 4,73-4,18 (m, 4H); 3,80-3,40 (m, 2H)

**RMN <sup>13</sup>C-APT (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  164,3; 137,5; 133,4; 128; 73,4; 71,2; 70,5; 68,5; 67,8; 66,3; 63,4.

#### 4.1.4.5 Síntese do poli(3-benzilglicerol-*co*-succinato) [41]

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 300 mg (1,65 mmol) do benzilato de glicerila [38], 165 mg (1,65 mmol) de anidrido succínico [40] (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) e 5 mL de tolueno, na presença de 1 mg do catalisador SnCl<sub>2</sub> (0,2 % m/m). Ao balão da reação foi adaptado um condensador de refluxo do tipo Dean-Stark, o qual foi preenchido com tolueno. A seguir, a temperatura do sistema foi elevada para 120 °C, permanecendo nestas condições por 5 horas. Então, aumentou-se novamente a temperatura para 140 °C e a reação prosseguiu por mais 15 horas. Depois disso, o solvente foi removido por destilação e o produto viscoso remanescente foi submetido ao aquecimento a 150 °C sob um vácuo de  $\pm$  100 Pa por 20 horas

e mais 15 horas na mesma temperatura sob um vácuo de  $\pm 9$  Pa. O produto final obtido apresentou-se bastante viscoso e de coloração amarela, em um rendimento de 86 %.

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  7,31-7,15 (m, 5H); 5,2-5,09 (m, 1H); 4,44 (*d*,  $J = 3,3$  Hz, 2H); 4,2 (m, 2H); 3,5 (*d*,  $J = 5,1$  Hz, 2H); 2,53 (*t*,  $J = 10,2$  Hz, 4H).

**RMN  $^{13}\text{C}$ -APT (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  171,8; 137,7; 128,5 (2); 127,9; 127,8 (2); 73,4; 70,6; 68,0; 63,0; 29,0; 28,8.

#### 4.1.4.6 Reação de hidrogenólise do poliéster alifático [41] para a obtenção de [42]

A remoção dos grupos protetores foi realizada pela adição de 97 mg do catalisador de Pd/C 10 % (30 % em massa em relação ao polímero, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) a uma solução de 325 mg do poliéster [41] dissolvido em 10 mL de THF (Vetec<sup>®</sup>). O sistema foi mantido sob borbulhamento com  $\text{H}_2$ , temperatura ambiente e agitação magnética por 24 horas. Em seguida, o catalisador foi removido com o auxílio de uma pipeta Pasteur contendo sílica, a coluna foi lavada com THF e o solvente foi removido à pressão reduzida, resultando na obtenção de um óleo incolor.

#### 4.1.4.7 Síntese do terpolímero poli(*L*-ácido láctico-*co*-3-benzilglicerol-*co*-succinato) [45] (procedimento para a RT01)

A um balão de fundo redondo foram adicionados 304 mg (1,66 mmol) do diol [38] e 167 mg (1,66 mmol) de anidrido succínico [40], sob atmosfera inerte. A temperatura do sistema foi elevada para 80 °C e os reagentes permaneceram sob agitação magnética por 3 horas. Então, uma solução aquosa 85 % de *L*-ácido láctico [21] (300 mg, 3,33 mmol) foi adicionada ao balão da reação e a temperatura foi aumentada para 100 °C. A mistura foi mantida nesta temperatura por 15 horas e sob um fluxo de argônio passando pelo sistema para remover os vapores de água do interior da reação. Em seguida, a temperatura foi elevada para 150 °C, removeu-se o fluxo de argônio e acoplou-se uma bomba de vácuo ao balão da reação. Após

20 horas, o processo foi encerrado e o produto [45], de coloração amarela, foi obtido em um rendimento em massa de 67 %.

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  7,39-7,19 (m, 5H); 5,32-5,14 (m, 1H); 5,14-4,97 (m, 1H); 4,57-4,42 (m, 2H); 4,42-4,08 (m, 2H); 3,65-3,43 (m, 2H); 2,76-2,49 (m, 4H); 1,61-1,32 (m, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C-APT (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  171,8; 137,8; 128,5 (2); 127,9; 127,7 (2); 73,1; 70,4; 68,8; 67,9; 62,8; 29,0; 28,8; 16,8.

## 4.2 Caracterizações dos monômeros e dos polímeros sintetizados

### 4.2.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C foram obtidos a 300 MHz e 75 MHz, respectivamente, em tubos de 5 mm de diâmetro interno, utilizando os espectrômetros *Varian VNMRS* e *Varian INOVA* (Instituto de Química, UFRGS). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) estão relacionados em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS), utilizado como padrão interno para os espectros de hidrogênio e aos solventes CDCl<sub>3</sub> e DMSO-*d*<sub>6</sub>. As multiplicidades foram colocadas entre parênteses e foram atribuídas como: *s* = singleto; *d* = dubleto; *t* = tripleto; *qt* = quintupleto; *dd* = duplo dubleto; *ddd* = duplo duplo dubleto e *m* = multiplete. Além disso, constam nas atribuições o número de hidrogênios deduzido da integral relativa e a constante de acoplamento (*J*) em Hertz (Hz).

#### **4.2.2 Espectroscopia no infravermelho**

Os espectros de absorção no infravermelho foram registrados na forma de filme líquido e pastilha de KBr, utilizando-se os aparelhos *Mattson Galaxy Series FT – IR 3000*, modelo 3020, e *Perkin Elmer Spectrum One* (Instituto de Química, UFRGS). Os espectros de infravermelho por refletância atenuada (ATR-FT) foram registrados em um aparelho *Bruker Alpha* (Laboratório Multiusuário de Análise Térmica, LAMAT, UFRGS).

#### **4.2.3 Medidas de viscosidade**

O método de preparação das soluções de *blendas* de PDLLA/PLLA seguiu o mesmo protocolo para a preparação das soluções para eletrofiação. As viscosidades das soluções foram mensuradas em um viscosímetro digital DV-II+ PRO (*Brookfield*, SINPOL, UFRGS) e os resultados estão expressos como viscosidade centipoise (cP). Todas as medidas foram realizadas a 25 °C e 100 rpm.

#### **4.2.4 Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

As matrizes de micro e de nanofibras foram caracterizadas em um microscópio eletrônico de varredura, modelo JSM-6060 (*JEOL*), localizado no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Física da UFRGS. As matrizes foram fixadas em uma fita condutora de carbono, recobertas com ouro e analisadas com uma aceleração de 10 kV. O diâmetro médio e o desvio padrão foram calculados após 100 medidas de cada amostra utilizando o software de imagem ImageJ.

#### **4.2.5 Determinação de ângulo de contato**

Os ângulos de contato para as matrizes de microfibras e filmes de PDLLA/PLLA e de nanofibras e filmes de PDLLA/PLLALMA foram realizados pelo método de deposição de

uma gota de água deionizada de 4 a 6  $\mu\text{L}$  sobre a superfície das amostras. A gota foi observada diretamente com um microscópio Olympus Bx-41, enquanto as imagens eram digitalmente capturadas através de uma câmera digital de 1,4 megapixels. O ângulo de contato para todas as amostras foi medido em um intervalo de 0 a 120 segundos e os valores reportados são médias aritméticas de 15 medidas utilizando diferentes áreas de cada amostra, obtidas a partir do software Surftens 3.0.

#### **4.2.6 Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)**

A massa molecular dos polímeros sintetizados, bem como a degradação de matrizes de fibras e filmes, foi avaliada por cromatografia de permeação em gel. A massa molecular ponderal média ( $M_w$ ) e a distribuição de massas molares ( $M_w/M_n$ ) foram determinadas em relação a padrões de poliestireno e foram realizadas em um aparelho GPCmax VE2001 (*Viscotek*) equipado com detector de índice de refração, localizado junto à Central Analítica do Instituto de Química da UFRGS. As amostras foram solubilizadas em THF e filtradas em filtros de PVDF com diâmetro de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  e analisadas à 45  $^{\circ}\text{C}$ , utilizando THF como eluente a uma vazão de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

#### **4.2.7 Análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

As medidas de calorimetria exploratória diferencial foram realizadas em um aparelho modelo Q20 (*TA Instruments*, LAMAT, UFRGS). Em torno de 10 mg de amostra foram empregadas em cada análise, as quais foram pesadas em panelas herméticas de alumínio e aquecidas de -20  $^{\circ}\text{C}$  a 200  $^{\circ}\text{C}$ , a uma taxa de aquecimento de 20  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Após o resfriamento até -20  $^{\circ}\text{C}$  (taxa de 20  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ), as amostras foram aquecidas novamente de -20  $^{\circ}\text{C}$  a 220  $^{\circ}\text{C}$  empregando a mesma taxa de aquecimento anterior. Todas as varreduras foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio.

Observação: para as análises térmicas dos poliésteres sintetizados a partir de derivados do glicerol foi empregado uma faixa de temperatura de -60  $^{\circ}\text{C}$  a 200  $^{\circ}\text{C}$ , sob as mesmas taxas de aquecimento e resfriamento descritas anteriormente.

#### **4.2.8 Ensaio mecânico de tensão *versus* deformação**

Os testes de tensão *x* deformação foram conduzidos em um aparelho de DMA Q800 (*TA Instruments*), localizado junto ao anexo do prédio K do Instituto de Química da UFRGS. Os testes foram realizados sobre amostras retangulares de matrizes de microfibras e filmes de PDLLA/PLLA e de nanofibras e filmes de PDLLA/PLLALMA, os quais foram dispostos em suportes do tipo *cantilever*, em uma temperatura constante de 37 °C, tempo de estabilização de 5 minutos e tensão de 0,5 N.min<sup>-1</sup> até 18 N. O tamanho médio das amostras foi de 25 x 6 x 0,15 (comprimento x largura x espessura, em milímetros).

#### **4.2.9 Análises dinâmico-mecânicas (DMA)**

As análises dinâmico-mecânicas foram conduzidas em um aparelho de DMA Q800 (*TA Instruments*), localizado junto ao anexo do prédio K do Instituto de Química da UFRGS. Os testes foram realizados com amostras retangulares de matrizes de microfibras e filmes de PDLLA/PLLA, os quais foram dispostos em suportes do tipo *cantilever* em modo de tensão. Para todas as amostras analisadas utilizou-se uma deformação inicial de 0,1 %, sob uma frequência oscilatória de 1 Hz e amplitude de 1 µm. A faixa de temperatura investigada variou de 0 °C até o escoamento das amostras, sob uma taxa de aquecimento de 3 °C.min<sup>-1</sup>. As dimensões dos espécimes foram aproximadamente de 25 x 6 x 0,15 (comprimento x largura x espessura, em milímetros).

#### **4.3 Cultivo celular sobre os *scaffolds* de PDLLA/PLLALMA**

Os ensaios biológicos do presente trabalho foram realizados no Laboratório de Hematologia e Células-tronco da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

### **4.3.1 Obtenção de células de polpa de dente decíduo**

Os dentes utilizados nos experimentos foram obtidos da Faculdade de Odontologia da UFRGS. Para o isolamento das células, a polpa foi separada cuidadosamente do tecido dentário com o auxílio de uma colher de dentina no fluxo laminar. Na sequência, a manipulação do tecido pulpar removido foi realizada semelhante ao processamento descrito por Bernardi e colaboradores.<sup>147</sup> (obtenção do material biológico aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, cadastrado no projeto n° 19273). Resumidamente, a polpa foi mantida em contato com uma solução de colagenase a 0,2% (Gibco®) por 60 minutos e, em seguida, após centrifugação, a suspensão de células resultante foi semeada em 1 poço de uma placa de 12 poços.

### **4.3.2 Cultura de células-tronco mesenquimais (CTMs) a partir de polpa de dente decíduo**

Para iniciar o cultivo, as células foram cultivadas em placas de cultura e mantidas em incubadora umidificada a 5% CO<sub>2</sub> e 37°C por 24 h, quando as células não aderentes foram removidas por troca de meio. As trocas subsequentes foram realizadas a cada 3 a 4 dias. Para a proliferação de células aderentes, as células foram mantidas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Sigma-Aldrich®) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina (Gibco®) e 0,45 µg/mL de gentamicina.

Ao atingirem cerca de 90% de confluência, as culturas primárias foram lavadas com PBS e, em seguida, uma solução de 0,25% de tripsina (Sigma-Aldrich®) foi adicionada à garrafa por aproximadamente 5 min a 37°C para soltar as células da superfície plástica. As células então foram ressuspensas em meio de cultura e plaqueadas em novas garrafas para expansão. Passagens subsequentes foram realizadas de forma idêntica.

### **4.3.3 Análise morfológica das culturas celulares**

A presença das células aderentes, assim como sua confluência foram rotineiramente observadas em microscópio invertido de contraste de fase Olympus.

#### **4.3.4 Análise imunofenotípica das células cultivadas**

A presença de marcadores de células mesenquimais e ausência de células hematopoéticas foi avaliada através de citometria de fluxo, usando-se o equipamento FACSAria (BD Biosciences), e a análise foi realizada através do *software* FACSDiva (BD Biosciences). Para a avaliação da presença ou ausência de marcados, 10.000 eventos foram adquiridos. Foram utilizados os marcadores CD90, CD29, CD45, CD73, CD34, CD44, HLA-DR, STRO-1, CD 184 e CD146, marcados com o fluorocromo PE ou FITC, todos da marca BD Biosciences. A presença das moléculas foi avaliada utilizando-se 5 µL de anticorpo monoclonal anti-humano para cada uma das moléculas. Além disso, para a análise foram selecionadas somente as células vivas, por exclusão, através da marcação com o corante 7-Aminoactinomycin D (7AAD). Após a incubação das células com os anticorpos por 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro, as células foram lavadas e ressuspensas em 1 mL de PBS para retirada de anticorpos não ligados. Em seguida, foi procedida a centrifugação e a retirada de aproximadamente do sobrenadante e então feita a marcação com o 7AAD.

#### **4.3.5 Diferenciação celular *in vitro***

A diferenciação em tipos celulares mesenquimais, necessária para a confirmação da identidade da população obtida, foi testada na quinta passagem. Ensaios de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica foram realizados de acordo com os protocolos a seguir.

#### **4.3.6 Diferenciação osteogênica**

Para a diferenciação osteogênica, as células foram cultivadas por 3 a 4 semanas em meio contendo soro fetal bovino (10%), dexametasona ( $10^{-8}$  M), ácido ascórbico 2-fosfato (5 µg/ml) e β-glicerofosfato (10mM). A deposição de matriz mineralizada foi observada por coloração com Alizarin Red S em pH 4,2.

#### **4.3.7 Diferenciação adipogênica**



Para a diferenciação adipogênica, as células foram cultivadas por 3 a 4 semanas em meio Iscove's contendo 20% de plasma humano sem plaquetas, dexametasona ( $10^{-7}$  M), 2,5 µg/mL Insulina, 5 µM indometacina, 5 µM rosiglitazona dissolvido em DMSO e 10 um/mL de heparina sódica. O meio foi trocado a cada 3-4 dias e as células foram fixadas quando apresentaram adipogênese, com 4% paraformaldeído.

#### **4.3.8 Diferenciação condrogênica**

Para a diferenciação condrogênica, as células aderentes foram cultivadas em meio de diferenciação durante 21 dias. O meio é constituído de DMEM e suplementado com 15 mM Hepes, 6,25 µg/mL de insulina, 10 ng/mL TGF-β1 e 50 nM da solução de ácido ascórbico-2 fosfato (AsAP). O meio foi trocado a cada 3-4 dias e as células foram fixadas no dia 21, com 4% paraformaldeído. A condrogênese foi demonstrada pela coloração com *Alcian Blue*.

#### **4.3.9 Propriedades biológicas das matrizes de nanofibras**

Para a realização dos testes descritos a seguir, as matrizes poliméricas foram utilizadas afixadas em lamínulas de vidro com 1,5 cm de diâmetro. As lamínulas foram distribuídas em poços de placas de cultivos celulares de 24 poços e previamente esterilizadas por luz ultravioleta (524nm) por 120 minutos em capela de fluxo laminar. Nos testes biológicos foi realizada comparação com um grupo controle, correspondente a células semeadas diretamente nos poços de cultura de poliestireno.

#### **4.3.10 Adesividade celular**

A adesividade celular foi avaliada através de coloração histoquímica. Foram utilizadas 30.000 células por matriz e os grupos testes e controle foram avaliados em triplicata. A análise foi realizada nas células obtidas de polpa de dentes decíduos, tendo sido utilizadas 3 culturas primárias diferentes. No experimento, as células integradas às matrizes celulares foram coradas com DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*), um marcador de núcleo celular, após 6 horas de semeadura nos *scaffolds*. Decorridas as 6 horas de experimento, as células foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% e coradas com DAPI 5µg/mL em PBS por 1

minuto. Após diversas lavagens com PBS 1X, para a retirada do excesso de corante, foram realizadas fotografias em 9 pontos aleatoriamente escolhidos em cada matriz com aumento de 400x. Depois de realizada a contagem do número das células nas fotografias, a soma de células por tipo de matriz foi avaliada e o resultado expresso como a soma de células nos nove campos, aleatoriamente selecionados sobre a superfície.

#### **4.3.11 Avaliação de células metabolicamente ativas nas matrizes de nanofibras**

O número de células metabolicamente ativas foi avaliado por um ensaio colorimétrico, utilizando o reagente (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (WST-8) (Sigma-Aldrich®), em triplicata, nos dias 1, 4 e 7 após a semeadura das células nas matrizes poliméricas. Um total de 30.000 células foi semeado por matriz em placas de 24 poços, tendo sido utilizadas três culturas primárias diferentes. Após decorrido o tempo de experimento, com trocas de meio a cada 3 a 4 dias, as células foram incubadas com 10 µL da solução de WST-8 em 200 µL de meio de cultura, por poço de cultivo, durante 2h. Após, o sobrenadante foi transferido para poços de placas de cultura de 96 poços e a absorbância foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm. A leitura da absorbância foi realizada no equipamento Wallac EnVision (*Perkin Elmer*). Somente as células viáveis são capazes de reduzir o WST-8 a um composto laranja solúvel em água aumentando, dessa forma, a absorbância da amostra.

#### **4.3.12 Análise estatística**

Os resultados para o ensaio de adesão e viabilidade celular foram representados através de médias e desvio padrão. O teste de viabilidade celular foi avaliado por análises de medidas repetidas a dois fatores: tempo e grupo (Hotelling) e como pós-teste foi utilizado Tukey.

As análises de adesão foram avaliadas por ANOVA (One Way) e como pós-teste foi utilizado o teste de Tukey. Para critérios de decisão foi utilizado o nível de significância de 5%. Os resultados foram gerados pelo programa SPSS 16.

#### **4.3.13 Análises de microscopia confocal**

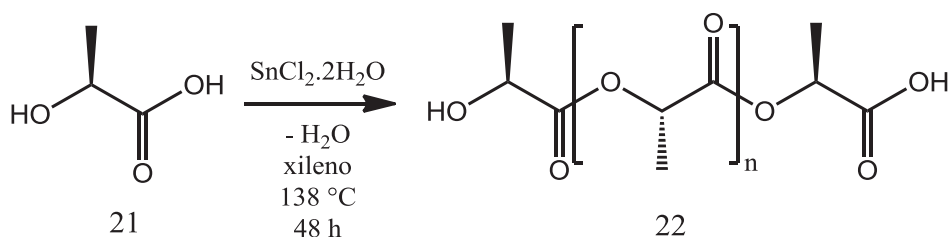
A morfologia das células sobre as matrizes foi observada através de microscopia confocal. As células foram plaqueadas em uma densidade de 30.000 células por matriz e também foram semeadas em poços controles (células diretamente no poço da placa de cultura). Após 1 e 7 dias de incubação, as matrizes e poço controle foram lavados com PBS 1x, fixados com paraformaldeído 4% por 30 minutos e posteriormente foram permeabilizados com Triton X-100 0,1% por 10 minutos. Em seguida, foi realizada a coloração com 50 µg/mL de faloidina conjugada com rodamina por 40 minutos, a fim de evidenciar os filamentos de actina do citoesqueleto celular. Após coloração com faloidina, as amostras foram lavadas com tampão PBS 1x e coradas com 0,5 mg/mL de DAPI durante 2 minutos. Utilizando-se microscópio confocal Olympus FV1000, fotografias de imagens representativas das diferentes amostras foram obtidas no em aumento de 10x. A partir dessas imagens, foram obtidas imagens com zoom digital de 3x em algumas regiões das matrizes e poço controle.

## 5. Resultados e discussão

### 5.1 Síntese de poli(L-ácido láctico) de alta massa molecular

O poli(ácido láctico) pode ser utilizado tanto para a construção de matrizes destinadas à engenharia de tecidos, quanto para aplicações visando a substituição de polímeros provenientes de fontes não-renováveis. Assim, a importância comercial desse polímero estimulou o início de estudos para obtenção de PLA de alta massa molar, superior a 50.000 g.mol<sup>-1</sup>, modificando alguns dos procedimentos existentes na literatura. Deste modo, utilizando o princípio da polimerização por etapas, investigou-se a obtenção desse polímero a partir de uma solução aquosa de L-ácido láctico empregando a metodologia de desidratação azeotrópica, sendo este procedimento baseado no trabalho de Kim e colaboradores.<sup>85</sup>

Dessa maneira, uma solução aquosa de L-ácido láctico [21] foi submetida à desidratação azeotrópica em xileno, na presença do catalisador SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O e aquecido a 138 °C por 48 horas (esquema 6). O resultado da análise de cromatografia por exclusão de tamanho mostrou uma massa molecular ponderal média de 8.400 g.mol<sup>-1</sup> e polidispersidade de 1,4.



**Esquema 6.** Polimerização em etapas para a obtenção do poli(L-ácido láctico) [22].

Esse resultado difere daquele publicado no trabalho de Kim e colaboradores, onde o PLLA foi sintetizado com uma massa molar de 30.000 g.mol<sup>-1</sup> utilizando o mesmo procedimento. Sendo assim, um novo experimento foi realizado, no qual a temperatura do sistema foi elevada para 155 °C e alíquotas foram retiradas em 5, 10, 20 e 30 horas, em uma

tentativa de otimizar o tempo total de reação. Os resultados referentes a esta investigação estão contidos na tabela 2.

**Tabela 2.** Resultados para as reações de polimerização do PLLA à 155 °C.

Alíquota	Tempo (h)	$M_w$ (gmol <sup>-1</sup> )	$M_w/M_n$
1	5	1.540	2,0
2	10	3.840	1,7
3	20	7.940	1,1
4	30	8.070	1,1

Os resultados apresentados na tabela 2 mostram que a massa molecular do polímero aumenta gradualmente com o tempo e atinge um valor de equilíbrio em  $t = 20$  horas. Isso se deve à saturação do xileno com a água proveniente da solução aquosa de L-ácido lático e da eliminação decorrente da reação, o que reduz a capacidade do solvente de remover azeotropicamente esta água do meio reacional, impedindo o deslocamento do equilíbrio para a formação do polímero de alta massa molar. A obtenção de polímeros de alta massa molecular através de polimerização em etapas ocorre somente a altas conversões ( $p > 0,9999$ ) e, por essa razão, apenas um deslocamento efetivo do equilíbrio da reação permite o aumento da cadeia polimérica. Para o caso do PLLA, a presença de água na reação, mesmo em pequenas proporções, pode resultar em hidrólise do polímero. Assim, a elaboração de um sistema que permita a remoção efetiva da água do meio reacional se faz necessária.

Uma vez que a utilização de xileno para remover a água contida na reação via destilação azeotrópica não foi satisfatória, decidiu-se empregar um processo no qual um agente secante é utilizado no sistema da reação. As zeólitas (aluminossilicatos) possuem uma microestrutura porosa que permite a adsorção de moléculas no interior de seus poros. Essas zeólitas possuem ocorrência natural mas, para fins comerciais, são sintetizadas com tamanhos de poros que variam de 3 a 200 Å de diâmetro e, em razão de sua característica de retenção de moléculas menores, são chamadas de peneiras moleculares. As peneiras moleculares vem sendo empregadas na indústria desde 1954 em processos de desidratação/purificação de solventes, gases e matérias-primas.<sup>148</sup> As mais utilizadas são aquelas com diâmetro de poro de 3 Å, ideais para retenção de moléculas de água, cujo tamanho é calculado em 2,75 Å.<sup>149</sup>

Sabendo que a quantidade de água presente durante o processo de desidratação azeotrópica é bastante elevada, seria necessária a utilização de um grande volume de zeólita

para que esta água pudesse ser removida da reação, o que inviabilizaria o procedimento em escala de laboratório. Desse modo, o procedimento para o uso de peneiras moleculares como adsorventes de água na obtenção de PLLA de alta massa molar precisou ser realizado em duas etapas: (i) síntese e isolamento de um PLLA de baixa massa molecular, empregando o procedimento de desidratação azeotrópica em xileno; (ii) aumento da massa molecular do polímero através da utilização de peneira molecular para a remoção da água ainda presente na reação.

A evolução do aumento da massa molar do polímero foi realizada através de análise de GPC. Diferentes parâmetros foram investigados, como temperatura, catalisador, tempo de reação, material secante e concentração de monômero no meio reacional, os quais estão contidos na tabela 3. O rendimento  $R$  das reações foi calculado segundo a fórmula

$$R = \frac{m_{final}}{m_{inicial} \times 0,8} \times 100$$

onde o fator 0,8 corresponde ao valor da massa molecular da unidade repetitiva do PLA dividido pela massa molar do monômero.<sup>90</sup>

Primeiramente, peneira molecular (3 Å) foi empregada como agente secante sem nenhum tipo de tratamento térmico. A temperatura da reação foi de 185 °C e concentração de monômero na reação de 10 % (m/V) (R01). O aumento da massa molecular do polímero foi verificado a partir das alíquotas extraídas a cada 24 horas da reação, em um tempo total de 96 horas. As condições experimentais investigadas mostraram que houve um pequeno aumento de massa molecular do polímero em relação ao valor inicial, mas abaixo da expectativa de obtenção de um PLLA com alta massa molar.

Em virtude da provável presença de umidade no interior de seus poros da peneira molecular, dois experimentos foram realizados com diferentes condicionamentos para essa peneira molecular, no intuito de aumentar a absorção de água presente no meio reacional. A remoção de água dos poros da zeólita empregando alto-vácuo por 3 horas resultou em um considerável aumento na massa molecular do poli(L-ácido lático), de acordo com as análises de GPC (R02). Entretanto, quando a desidratação da peneira molecular foi realizada pelo tratamento térmico a 130 °C por 3 horas em estufa comum, houve um significativo aumento na massa molecular do PLLA de (R03). Esse resultado evidencia a importância do tratamento térmico que deve ser realizado nesta zeólita antes de utilizá-la em reações de policondensação, uma vez que o aumento da massa molecular do polímero deve-se

**Tabela 3.** Reações para obtenção de poli(L-ácido láctico) de alta massa molar empregando diferentes condições.

<b>Entrada</b>	<b>Catalisador</b>	<b>T (°C)</b>	<b>t (h)</b>	<b>Secante (secagem)</b>	<b>Conc. (%)</b>	<b>M<sub>w</sub>(g.mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>PDI</b>	<b>Rend. (%)</b>
<b>R01</b>	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	185	96	Peneira molecular (sem tratamento térmico)	10	19.400	1,1	75
<b>R02</b>	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	185	96	Peneira molecular (T ambiente sob vácuo)	10	32.600	1,5	70
<b>R03</b>	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	185	96	Peneira molecular (estufa comum a 130 °C por 3h)	10	58.500	1,1	76
<b>R04</b>	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	170	96	Peneira molecular (T ambiente sob vácuo)	10	37.300	1,2	73
<b>R05</b>	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	170	72	Peneira molecular (sem tratamento térmico)	10	54.470	1,3	73
<b>R06</b>	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	170	72	Peneira molecular (T ambiente sob vácuo). Troca da peneira a cada 24 horas	10	20.930	1,4	72
<b>R07</b>	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	170	72	Peneira molecular (alto-vácuo a 230 °C por 3h). Trocada a cada 24 horas.	10	20.800	1,5	70
<b>R08</b>	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	170	72	Peneira molecular (alto-vácuo a 230 °C por 3h).	50	78.660	2,5	81
<b>R09</b>	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	170	72	Peneira molecular (alto-vácuo a 230 °C por 3h).	80	52.800	2,0	80
<b>R10</b>	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O/ PTSA	170	72	Peneira molecular (alto-vácuo a 230 °C por 3h).	50	48.970	1,8	80
<b>R11</b>	Ti(OBu) <sub>4</sub>	170	72	Peneira molecular (alto-vácuo a 230 °C por 3h).	50	32.690	1,5	79
<b>R12</b>	Sc(OTf) <sub>3</sub>	170	72	Peneira molecular (alto-vácuo a 230°C por 3h)	50	25.720	1,5	76
<b>R13</b>	Sc(OTf) <sub>3</sub>	170	72	Peneira molecular (alto-vácuo a 230°C por 3h)	50	31.520	1,6	72
<b>R14</b>	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	170	72	Alumina (alto-vácuo a 230°C por 3h)	10	64.000	2,9	81
<b>R15</b>	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	170	72	Alumina no meio reacional	10	18.800	2,9	54
<b>R16</b>	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	170	72	Alumina em esferas (alto-vácuo a 230°C por 3h)	50	14.340	1,3	53
<b>R17</b>	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	170	72	Sílica (alto-vácuo a 230°C por 3h)	10	26.770	1,4	63
<b>R18</b>	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	170	72	Sulfato de sódio (alto-vácuo a 230°C por 3h)	50	8.160	2,4	57

principalmente ao deslocamento do equilíbrio da reação decorrente da remoção da água presente no processo.

Apesar desse bom resultado, o rendimento médio das reações foi de 74 %, indicando uma possível hidrólise do PLLA em razão da presença de água, ao catalisador, ou a alta temperatura empregada no procedimento, o que poderia levar à formação de subprodutos como lactídeo e oligômeros de menor massa molecular. Assim, uma reação a 170 °C foi realizada com a finalidade de reduzir esta possível hidrólise em razão da temperatura e utilizando uma peneira molecular com secagem apenas em alto vácuo (R04). O resultado de GPC mostrou uma sensível melhora na massa molecular quando comparado à reação anterior utilizando o mesmo tratamento para a peneira molecular (R02), mas não foi observada uma mudança significativa no rendimento final do produto. De qualquer modo, a utilização de uma temperatura inferior à usada anteriormente e sem diminuição de rendimento representou um bom resultado, o qual foi estabelecido para as reações seguintes.

O emprego de xileno anidro na reação foi investigado com o objetivo de diminuir a presença de água no sistema (R05). Para efeitos comparativos, a peneira molecular não foi submetida a nenhum tratamento antes de sua utilização e, para evitar a entrada de umidade no sistema, um tubo secante contendo sílica foi acoplado à saída do condensador de refluxo. O resultado apresentado na tabela 3 para essa reação mostra que a utilização de solvente anidro contribuiu significativamente para o aumento da massa molecular do produto final, sem perda de rendimento e em um menor tempo de reação. A partir dessa observação, todas as demais reações foram realizadas na presença de xileno anidro e estabelecendo o limite de 72 horas para o tempo total.

A água eliminada durante a polimerização poderia levar a uma saturação da peneira molecular, uma vez que o tempo de reação é longo. Sendo assim, dois experimentos foram realizados no intuito de evitar essa saturação da peneira molecular. Nesse processo, a peneira molecular foi trocada a cada 24 horas, e a diferença entre as duas reações está diferindo no tratamento térmico empregado para cada uma (R06 e R07). Entretanto, surpreendentemente não houve aumento da massa molecular do polímero final em ambas as reações, mesmo empregando um novo processo de secagem da peneira molecular (R07). O fato de realizar a troca do secante durante o processo poderia permitir a entrada de umidade ambiente para a reação, mas dificilmente haveria



uma absorção de água a ponto de resultar em uma possível hidrólise da cadeia polimérica em crescimento. Sendo assim, na ausência de uma explicação mais plausível, decidiu-se por não realizar procedimentos envolvendo a troca da peneira molecular durante as reações.

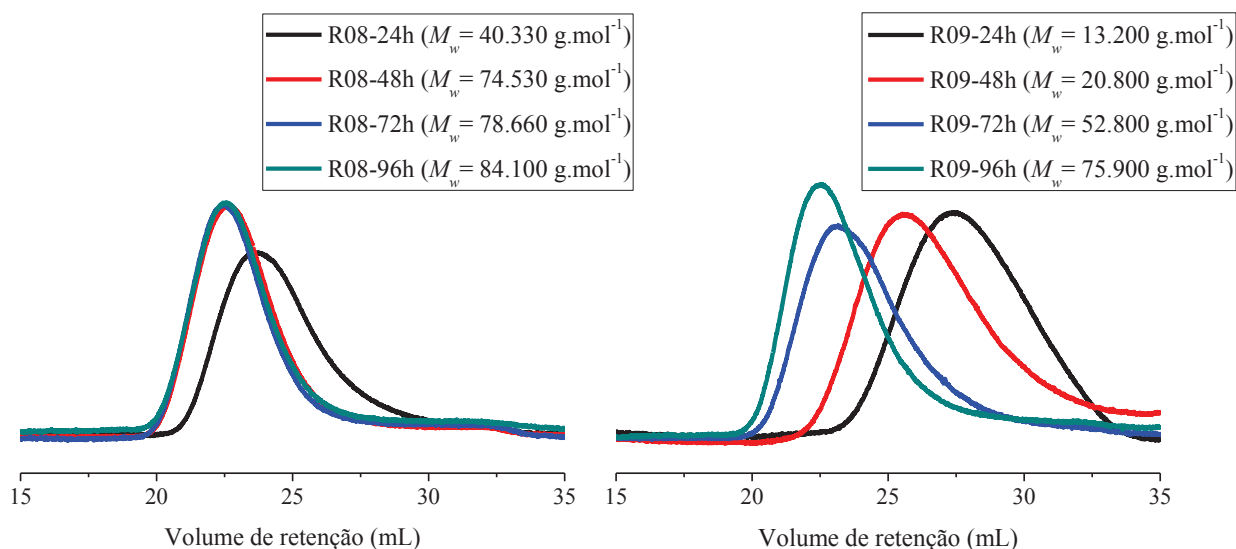
Outro experimento foi conduzido a fim de verificar a eficiência da secagem da peneira molecular em alto vácuo e alta temperatura (R08). Para isso, o processo de secagem da peneira molecular foi realizado a 230 °C durante 3 horas, utilizando uma bomba de alto-vácuo para remover a umidade adsorvida na zeólita. Além disso, a concentração de monômero na reação foi elevada para 50 %, aumentando a probabilidade dos grupos terminais do polímero reagirem e, em razão disso, gerando polímeros com uma maior massa molecular. A análise de GPC para a alíquota de 72 horas mostrou uma massa molecular ponderal média de cerca de 79.000 g.mol<sup>-1</sup>, com polidispersão de 2,5. Esse resultado mostrou que o emprego de uma condição mais drástica para a secagem da peneira, assim como um aumento na concentração do monômero na reação, possibilitou a obtenção de poli(L-ácido lático) de alta massa molar.

A alta polidispersidade observada é característica da polimerização em etapas, resultante de variações estatísticas e de reatividade das cadeias do polímero em crescimento. Porém, o início da saturação do meio reacional com a água resultante da polimerização poderia causar a hidrólise de cadeias mais longas, assim como a ocorrência de reações de ciclização, que também podem contribuir para o aumento da polidispersidade da amostra. Entretanto, essa alta distribuição pode alterar algumas das propriedades desse polímero, uma vez que as cadeias menores presentes na amostra atuariam como plastificantes, ocasionando um possível incremento nas suas propriedades mecânicas, assim como o melhoramento na processabilidade do polímero.

A utilização de uma concentração de 80 % do monômero no meio reacional resultou em uma redução na massa molecular do polímero final, bem como uma pequena redução na polidispersidade, quando comparado com a reação anterior (R09). Esse resultado poderia estar associado a uma baixa disponibilidade de solvente para promover um arraste mais eficiente das moléculas de água presentes no sistema.

Uma comparação entre os procedimentos R08 e R09 pode ser verificada através dos cromatogramas de GPC em diferentes tempos de reação, utilizando o detector por

índice de refração (figura 16). O tempo máximo estabelecido para esses experimentos foi de 72 horas. Contudo, a fim de verificar se havia alguma mudança na massa molecular do polímero, os mesmos foram conduzidos até 96 horas de reação. Os resultados mostraram que para a reação R08, o estado de equilíbrio é alcançado em 48 horas, pois não há um crescimento significativo da massa molecular do polímero após este período. Entretanto, observou-se durante a reação R09 que a massa molecular do PLLA sintetizado alcança um valor próximo ao encontrado em R08, mas apenas em 96 horas de reação. Esse resultado corrobora as afirmações anteriores, ou seja, que uma concentração de 50 % do polímero em solução beneficia tanto a taxa de polimerização quanto o aumento da massa molecular do produto final. A remoção da água da reação acima dessa concentração não é tão efetiva e o aumento da massa molecular do produto ocorre de modo mais lento. Desse modo, a concentração de 50 % de polímero em solução foi adotada para as reações posteriores.



**Figura 16.** Cromatogramas de GPC para as reações de polimerização R08 e R09.

Os experimentos seguintes consistiram na variação do catalisador empregado para a polimerização (R10, R11, R12 e R13). Há diversos trabalhos na literatura abordando a utilização de diferentes catalisadores para a obtenção de PLLA de alta massa molecular.<sup>150</sup> Entretanto, apenas três sistemas de catalisadores foram abordados em nossos estudos. O primeiro consistiu no emprego de ácido *p*-toluenosulfônico (PTSA)

como co-catalisador da reação, juntamente com cloreto estanoso diidratado. A finalidade da utilização desse co-catalisador (um ácido prótico) seria aumentar a capacidade do catalisador ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) em ser um grupo retirador de elétrons. Com isso, ao se coordenar com os grupos carboxila da cadeia em crescimento do PLLA, haverá uma maior deficiência eletrônica neste carbono, aumentando a possibilidade da adição de uma hidroxila para a formação do respectivo éster.

Esse sistema já havia sido reportado em trabalhos anteriores para a catálise de reações para obtenção de PLLA.<sup>151</sup> O emprego do sistema  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / PTSA para as melhores condições até então observadas, promoveu o aumento da massa molar do PLLA para cerca de  $50.000 \text{ g mol}^{-1}$  (R10). Apesar do bom resultado obtido, a diminuição da massa molecular em relação à reação anterior (R08) pode ser atribuída ao aumento da acidez do meio reacional, em consequência da presença do co-catalisador, ocasionando a hidrólise da cadeia do poliéster.

A utilização de  $\text{Ti}(\text{OBu})_4$  resultou em um discreto aumento da massa molar do PLLA até 72 horas de reação (R11). Observou-se ainda que o meio reacional adquiriu uma coloração bastante escura, em comparação com a utilização de outros catalisadores. O catalisador de tetrabutóxido de titânio não parece ser adequado para essas reações, uma vez que o mesmo é bastante sensível à presença de umidade, decompondo-se em  $\text{TiO}_2$  e butanol. Portanto, a eliminação de água para o meio reacional durante as reações de policondensação para a obtenção de PLLA poderia resultar na decomposição do catalisador. Além disso, o butanol gerado a partir dessa decomposição poderia reagir com o ácido carboxílico da cadeia de PLLA, o que resultaria na interrupção do crescimento da cadeia polimérica.

O catalisador triflato de escândio caracteriza-se por possuir grupos fortemente retiradores de elétrons em sua estrutura, auxiliando na ativação da carboxila em reações de policondensação. Assim, dois experimentos foram conduzidos utilizando esse catalisador, variando a quantidade empregada em cada reação. Para ambos os casos, tanto na reação utilizando uma quantidade de 0,2 % (R12), quanto para a reação com 0,1 % (R13), não houve um grande aumento na massa molecular do polímero. Esses resultados podem estar associados ao fato de que a elevada acidez deste catalisador pode promover uma hidrólise mais rápida do poliéster no meio reacional.

Uma vez que o melhor catalisador empregado foi o  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , outros materiais secantes foram utilizados na tentativa de reduzir a quantidade de água eliminada durante a reação, a fim de deslocar o equilíbrio para a formação de PLLA de alta massa molecular. Esses materiais também foram submetidos às mesmas condições de secagem otimizadas para a peneira molecular. O primeiro substituto da peneira molecular investigado foi alumina neutra (óxido de alumínio) e a análise de cromatografia por exclusão de tamanho mostrou a obtenção de um poli(ácido lático) com massa molecular ponderal média de cerca de  $64.000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  e uma polidispersidade de 2,9 (R14). Esse resultado superou as expectativas quanto à utilização da alumina como agente secante, pois não há estudos abrangendo a absorção de água por parte deste material. Entretanto, a circulação do solvente através do extrator Soxhlet ficou prejudicada em razão da alumina ser bastante particulada, o que ocasionou a retenção de quase todo o solvente no extrator Soxhlet e, por consequência, a ausência de solvente na reação. Na tentativa de solucionar esse problema, a alumina foi utilizada diretamente no meio reacional e também no formato de esferas dentro do extrator Soxhlet, com diâmetro médio de 2 mm (R15 e R16). Para ambos os casos, não foi observado um grande aumento da massa molecular do polímero final, além de ser observada uma significativa redução no rendimento da reação.

O fato de não terem sido encontrados estudos na literatura a respeito da utilização de alumina como material adsorvente, não permitiu esclarecer o motivo pelo qual foi observado o aumento da massa molecular do PLLA para a reação R14. Uma hipótese seria o fato de que a presença de poros nos grãos de alumina poderiam permitir a retenção de parte da água presente durante o processo, em um mecanismo semelhante ao reconhecido para a peneira molecular.

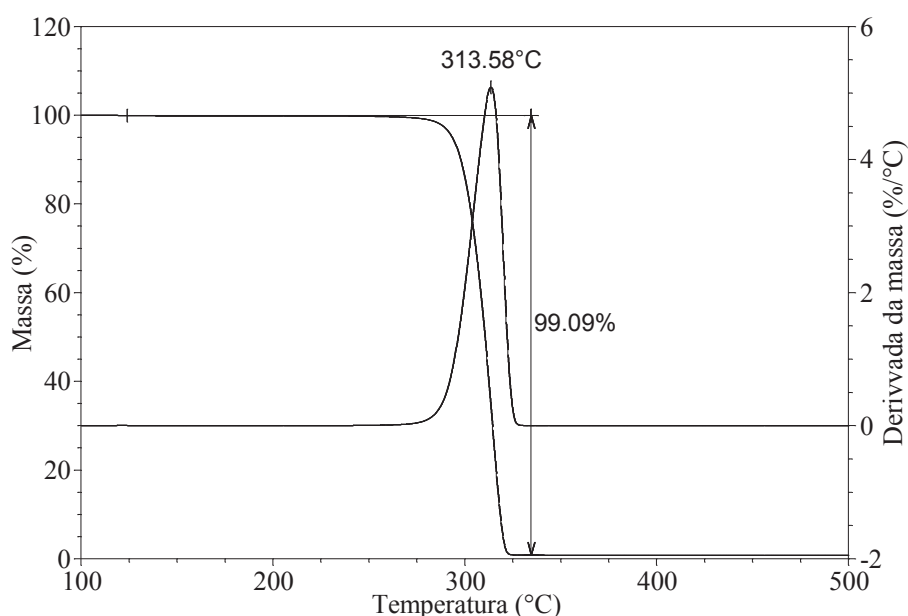
Além da alumina foram utilizados, ainda, sílica gel e sulfato de sódio como secantes para a reação de polimerização do PLLA (R17 e R18). Contudo, mais uma vez não foi observado um aumento significativo da massa molar do PLA utilizando esses materiais.

A partir dos resultados obtidos com os experimentos da tabela 3, as melhores condições encontradas para a obtenção de poli(L-ácido lático) de alta massa molar empregaram um pré-polímero de PLLA como material de partida, na presença do ácido de Lewis  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , xileno anidro como solvente da reação e uma temperatura de  $170 \text{ }^\circ\text{C}$ . A concentração do pré-polímero em solução foi estabelecida em 50 % e a remoção da água resultante da reação de condensação foi realizada através da utilização de peneira molecular. Para uma melhor

eficiência na retirada da água do meio, a peneira molecular foi submetida a uma desidratação térmica a 230 °C por 3 horas sob alto-vácuo. Apesar de um longo tempo de reação ser necessário, o poli(L-ácido láctico) foi sintetizado com uma massa molecular próxima à 75.000 g.mol<sup>-1</sup> em 48 horas de reação, de acordo com análises de GPC.

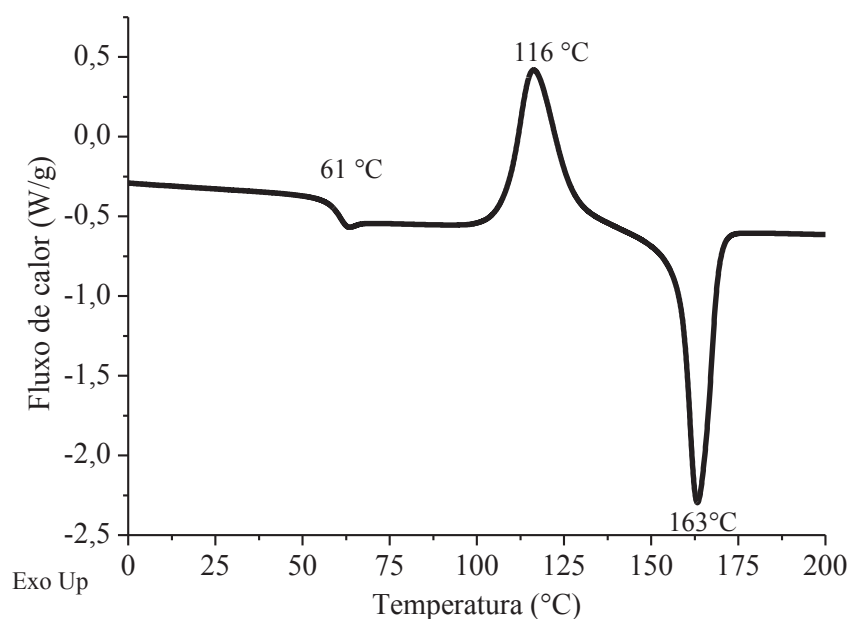
### 5.1.1 Análises térmicas para o poli(L-ácido láctico) de alta massa molecular sintetizado

O comportamento térmico do polímero sintetizado com as melhores condições (R08) foi analisado por termogravimetria (figura 17). As condições reacionais empregadas poderiam levar a uma degradação da peneira molecular durante o processo, o que causaria uma contaminação do polímero com partículas dessa peneira molecular. A análise termogravimétrica, porém, não mostrou indícios de resíduos inorgânicos nem de solventes presentes na amostra do polímero. A curva termogravimétrica mostrada na figura 17 mostra a decomposição térmica do PLLA em uma única etapa, característica de poliésteres alifáticos. A temperatura onde a taxa de degradação é máxima foi de 314 °C e o teor de cinzas restantes na amostra foi menor que 1 %, indicando que não há presença de outras substâncias no polímero.



**Figura 17.** Termograma de TGA para o poli(L-ácido láctico) obtido da reação R08.

A análise de calorimetria exploratória diferencial referente ao segundo ciclo de aquecimento do PLLA de alta massa molecular está mostrada na figura 18. O perfil da curva de DSC é típica de um polímero semicristalino e assemelha-se a exemplos encontrados na literatura para um poli(L-ácido lático) com massa molecular próxima ao produto obtido da reação R08. O polímero apresenta uma transição vítrea na temperatura de 61 °C, seguido de um processo exotérmico de cristalização em 116 °C e um pico endotérmico referente a fusão dos cristais do polímero em 163 °C.



**Figura 18.** Termograma de DSC para o PLLA proveniente da reação R08 (segundo ciclo de aquecimento).

As investigações para a obtenção de PLLA de alta massa molecular foram sempre realizadas em uma escala com até 10 gramas de polímero. Para verificar se as condições otimizadas poderiam ser utilizadas em escalas maiores, 100 gramas de polímero foram submetidas aos mesmos parâmetros aplicados para a reação R08. Porém, o polímero obtido apresentou uma massa molecular de apenas 46.000 g.mol<sup>-1</sup> em 96 horas de reação. Esse resultado pode ser decorrente do fato de que a quantidade de peneira molecular utilizada não foi suficiente para adsorver a água presente no meio reacional, o que demonstra que um aumento de escala da reação precisa ser melhor investigado.

## 5.2 Obtenção e caracterização de matrizes por *electrospinning* utilizando *blendas* de poli(D,L-ácido láctico) e poli(L-ácido láctico) de diferentes massas moleculares

Assegurar a adesão das células a um dispositivo biomédico é um dos pré-requisitos para que essas possam realizar suas funções biológicas para a manutenção da integridade do novo tecido em formação.<sup>152,153</sup> Assim, a elaboração de uma matriz que possa realizar esta interface de maneira efetiva representaria um grande progresso em direção à regeneração tecidual.

Em razão da ausência de grupos funcionais na cadeia do poli(ácido láctico), diversos estudos tem sido relatados na literatura para a funcionalização e/ou modificação desse polímero. Um exemplo seria a hidrólise ácida ou básica das ligações ésteres para a exposição das funções carboxila e hidroxila na superfície do material.<sup>154</sup> Essa exposição resultaria em uma elevação na hidrofilia da matriz, além de permitir uma posterior ancoragem de outras moléculas, como moléculas de peptídeos, ou simplesmente para resultar em uma maior interação entre a matriz sintética e o meio biológico.<sup>155</sup> Contudo, ao passo que algumas das propriedades da matriz são melhoradas, outras, porém, podem ser reduzidas, tais como a perda das propriedades mecânicas do material.<sup>153</sup>

A maior acessibilidade aos grupos polares deve-se a uma maior presença de cadeias mais curtas de PLA na amostra, resultante da clivagem das cadeias mais longas. Assim, a adição de um PLA de baixa massa molecular a um PLA de alta massa molecular poderia resultar, em teoria, em uma maior disponibilidade das funções carboxila e hidroxila ao longo de toda a matriz, e não restrito apenas à superfície do material. Além disso, o PLA de baixa massa molecular poderia atuar como um plastificante entre as cadeias do PLA de alta massa molecular, influenciando em suas propriedades mecânicas e sem a necessidade de uma destruição parcial da superfície da matriz.

De fato, a preparação de misturas entre duas amostras de poli(ácido láctico) de diferentes massas moleculares, com a finalidade de sua plastificação, já foi reportada por Martin e Avérus.<sup>156</sup> Entretanto, os autores não informaram a massa molecular do PLA de menor massa (o qual chamaram de oligômero de PLA), bem como a sua isomeria. Além disso, não há dados sobre ensaios mecânicos realizados com estas misturas. Desse modo, realizou-se algumas investigações para avaliar as propriedades de matrizes de microfibras obtidas através da técnica de eletrofiação, empregando misturas físicas (*blendas*) entre soluções de polímeros de poli(D,L-ácido láctico) de alta massa molecular (PDLLA) e poli(L-ácido láctico) de baixa

massa molecular (PLLA). Para isso, foram utilizados nesse trabalho um polilactídeo amorfo comercial com  $M_w \sim 160.000 \text{ g.mol}^{-1}$  (contendo cerca de 91 % do isômero L- e 9% do isômero D-) e um poli(L-ácido lático) semicristalino com  $M_w \sim 8.000 \text{ g.mol}^{-1}$ , sintetizado pelo método de desidratação azeotrópica. O emprego de um poli(ácido lático) de alta massa molecular é necessário para que ocorram os entrelaçamentos entre as cadeias do polímero e o material apresente propriedades mecânicas adequadas. Para efeitos comparativos, também foram investigadas as propriedades de filmes preparados a partir dessas *blendas*.

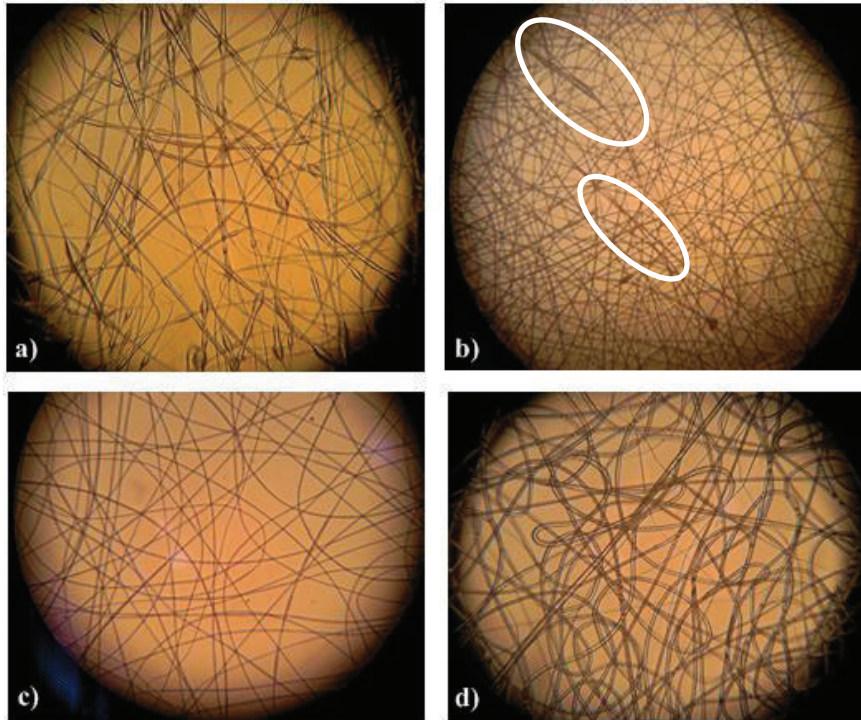
### 5.2.1 Fabricação das matrizes de PDLA/PLLA por *electrospinning*

A produção de nano ou microfibras através do princípio de eletrofiação é dependente de uma série de fatores experimentais, como já mencionados anteriormente. Entretanto, para esse trabalho apenas o parâmetro da concentração foi alterado e o efeito desse na viscosidade da solução polimérica foi avaliado. Os parâmetros de processabilidade (tensão aplicada, velocidade do fluxo da solução polimérica e distância entre os eletrodos) foram estabelecidos com soluções de PDLA de alta massa molecular e as condições foram otimizadas para a fabricação de microfibras livres da presença de *beads* (imperfeições). Os fatores ambientais não foram controlados e/ou considerados.

A fim de estabelecer as condições iniciais para a obtenção de microfibras de poli(ácido lático), soluções de PDLA em diclorometano : etanol (8:2) foram submetidas à eletrofiação, com o objetivo de determinar os melhores parâmetros experimentais. A utilização de etanol como co-solvente teve como objetivo a diminuição do uso de um solvente clorado e também pelo fato de que a presença desse solvente aumenta a condutividade da solução durante a eletrofiação, resultando em fibras mais uniformes.<sup>157</sup> A figura 19 contém imagens de microscopia óptica obtidas durante os processos de eletrofiação, em um aumento de 400 vezes. Ao todo, quatro soluções de PDLA de diferentes concentrações foram utilizadas, sendo verificado que a concentração de 10 % (m/V) do polímero permitiu a obtenção de microfibras sem a presença de *beads* (figura 19c). Esses *beads* são definidos como imperfeições resultantes da instabilidade do jato da solução polimérica, principalmente por causa da sua baixa viscosidade. Para as amostras provenientes das soluções de 6 % e 8%, observa-se a presença de diversas imperfeições ao longo das fibras (19a e 19b,



respectivamente). Ao aumentar a concentração para 12 % do PDLLA em solução, fibras com diâmetros bastante elevados foram obtidas (19d).



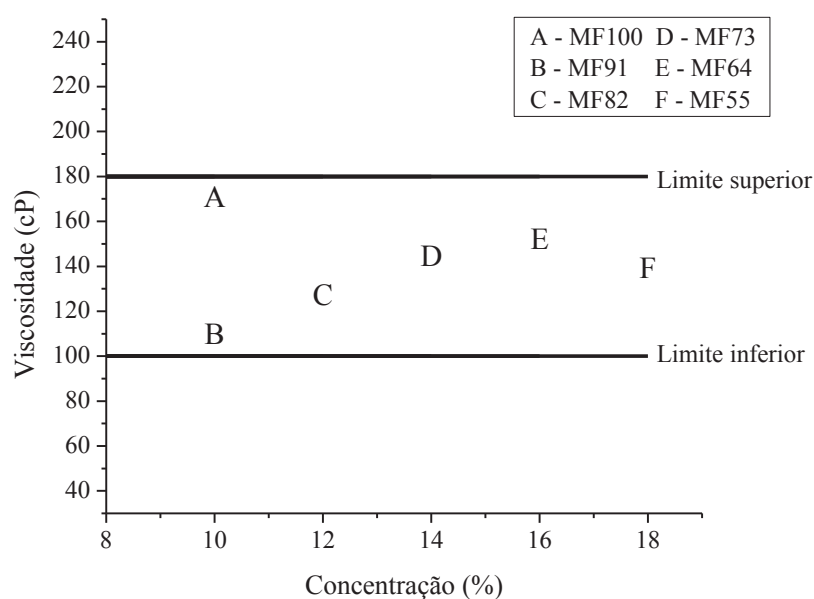
**Figura 19.** Imagens de microscopia óptica para as microfibras obtidas por eletrofição de soluções de PDLLA com a) 6%, b) 8 %, c) 10 % e d) 12 % (m/V) de concentração. (aumento de 400x)

A partir das observações realizadas, os melhores parâmetros encontrados para a obtenção de microfibras de PDLLA utilizaram uma solução de 10 % do polímero em solução, as quais foram carregadas em uma seringa de vidro, eletrofiadas sob uma diferença de potencial de 13 kV a uma distância de 15 cm entre os eletrodos e empregando um fluxo de saída da solução de  $3,8 \text{ mL.h}^{-1}$ .

O passo seguinte da investigação constituiu na eletrofição de soluções contendo os polímeros de PLA em diferentes proporções. As soluções foram preparadas através da solubilização dos polímeros em uma mistura de diclorometano : etanol (8:2) em concentrações que variaram de 10 a 18 % (m/v). O montante de PLLA de baixa massa molecular adicionado à *blenda* variou de 0 a 50 % da massa total de polímero em solução e

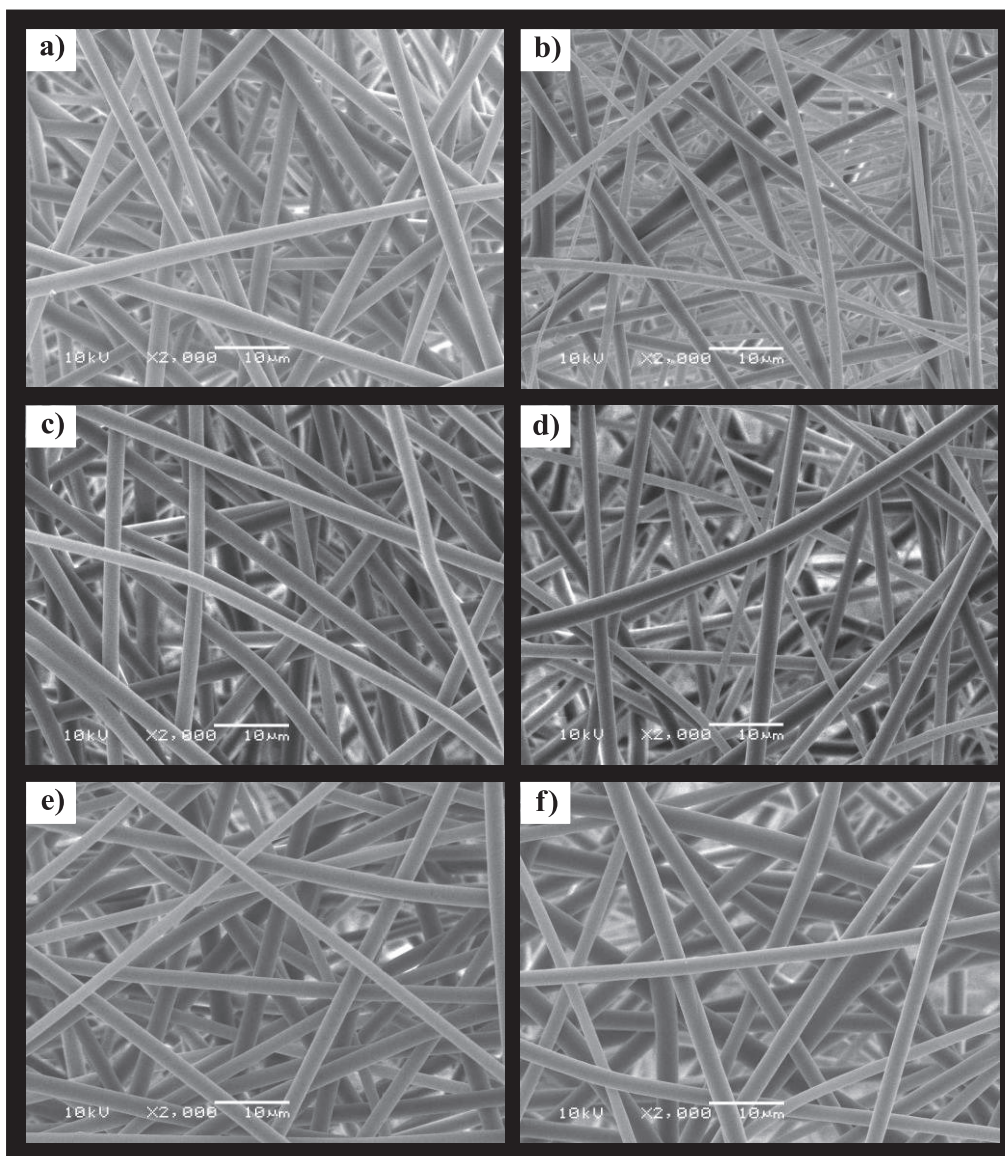
foram denominados como MF100 (sem a adição de PLLA de baixa massa molecular), MF91 (10 % de PLLA), MF82 (20 % de PLLA), MF73 (30 % de PLLA), MF64 (40 % de PLLA) e MF55 (contendo 50 % da massa total composta por PLLA de baixa massa molecular). À exceção da concentração da solução polimérica, todos os demais parâmetros foram mantidos constantes para a produção das matrizes.

A faixa de concentração de 10 a 18 % (m/v) de polímero em solução foi estabelecida através de medidas de viscosidade, as quais são apresentadas no gráfico da figura 20. Ao adicionar uma quantidade de PLLA de baixa massa molecular equivalente à 10 % da massa total do polímero em solução, observou-se uma significativa queda na viscosidade, de cerca de 170 cP (MF100) para 110 cP (MF91). Entretanto, essa diminuição da viscosidade não impediu que houvesse a formação de microfibras. Quando 20 % em massa de PLLA foi adicionado, mantendo os mesmos 10 % de concentração total de polímero em solução, fibras contendo muitas imperfeições foram obtidas, significando que a concentração de 10 % para a solução com uma mistura 80 : 20 de PDLLA : PLLA (MF82) estava muito baixa para eletrofiação. Ao elevar a concentração da mistura 80 : 20 para 12 %, obteve-se novamente a formação de microfibras sem a presença de *beads*. O mesmo raciocínio foi empregado para as demais soluções e, assim, foi possível encontrar uma faixa de viscosidade na qual a obtenção de microfibras sem imperfeições fosse viável e sem alterações nos demais parâmetros determinados.



**Figura 20.** Limites de viscosidade para as soluções empregadas para a eletrofiação.

A partir do estabelecimento da melhor concentração para cada *blenda* de poli(ácido láctico) foi possível a obtenção de microfibras de PDLLA/PLLA sem a presença de *beads* (figura 21). As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram fibras distribuídas aleatoriamente, sem a presença de poros ao longo das fibras ou quaisquer outros defeitos. Os diâmetros médios para cada uma das amostras foram calculados a partir das imagens de MEV e encontram-se na tabela 4. Apenas para a amostra MF91 houve uma diferença significativa para o tamanho do diâmetro como consequência da menor viscosidade para esta solução.



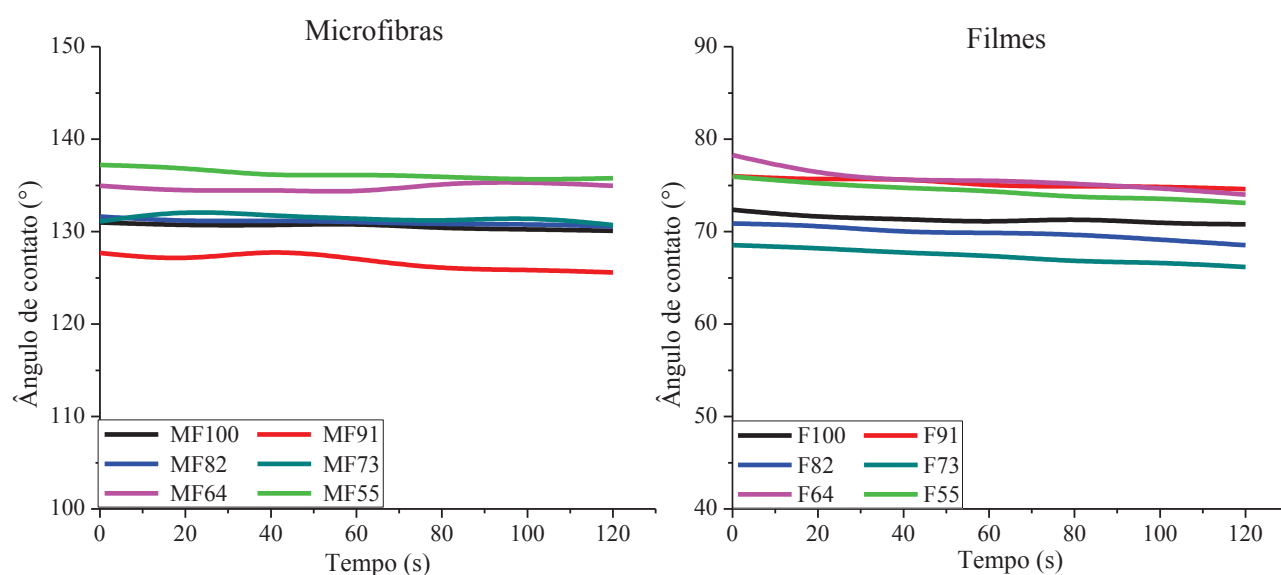
**Figura 21.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura das microfibras de PDLLA/PLLA obtidas por eletrofiação: a) MF100, b) MF91, c) MF82, d) MF73, e) MF64 e f) MF55.

**Tabela 4.** Diâmetros médios das microfibras calculados a partir das imagens de MEV.

Amostra	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Viscosidade (cP)
MF100	$2,03 \pm 0,55$	171
MF91	$1,33 \pm 0,33$	110
MF82	$2,44 \pm 0,35$	127
MF73	$1,91 \pm 0,73$	145
MF64	$2,22 \pm 0,54$	152
MF55	$2,53 \pm 0,69$	139

### 5.2.2 Análises de ângulo de contato

A fim de verificar possíveis mudanças na hidrofobicidade do material pela adição do PLLA de baixa massa molecular, medidas de ângulo de contato foram realizadas nas microfibras de *blendas* de PDLLA/PLLA. Para estabelecer comparações foram produzidos filmes a partir de soluções dessas *blendas* contendo as mesmas proporções entre os polímeros de alta e baixa massa molecular contidos nas fibras (chamados de F100, F91, F82, F73, F64 e F55). As alterações de ângulo de contato para cada amostra foram relacionadas em função do tempo e os valores obtidos são mostrados na figura 22.



**Figura 22.** Gráficos de ângulo de contato de microfibras e filmes de *blendas* de PDLLA/PLLA.

As análises mostraram que não houve diferenças expressivas para os valores de ângulo de contato ao longo do tempo, tanto para as fibras quanto para os filmes de PDLLA/PLLA. Além disso, as amostras contendo apenas polilactídeo de alta massa molecular (MF100 E F100) apresentaram valores próximos aos encontrados na literatura, tanto para filmes<sup>158</sup> (73 °) quanto para as matrizes de microfibras<sup>159</sup> (132 °). A tabela 5 apresenta os valores obtidos para os ângulos de contato das amostras em função do tempo de análise, juntamente com os respectivos desvios padrões para cada amostra.

**Tabela 5.** Valores de ângulo de contato para as matrizes de microfibras e filmes de PDLLA/PLLA.

<b>Ângulos de contato para as matrizes de microfibras (°)</b>						
<b>Tempo (s)</b>	<b>MF100</b>	<b>MF91</b>	<b>MF82</b>	<b>MF73</b>	<b>MF64</b>	<b>MF55</b>
0	131 ± 2	127,7 ± 3,2	131,6 ± 2,4	131,1 ± 3,1	134,9 ± 1,7	137,2 ± 2,4
20	130,7 ± 1,4	126,8 ± 2,9	131,1 ± 2,6	132,4 ± 2,4	134,3 ± 1,4	137 ± 2,8
40	130,7 ± 1,4	128,1 ± 3,2	131,2 ± 2,5	131,7 ± 2,2	134,6 ± 1,8	136 ± 2,5
60	130,9 ± 1,6	127,1 ± 3,1	131,1 ± 2,7	131,4 ± 2,9	134,1 ± 1,9	136,2 ± 2,8
80	130,3 ± 1,6	125,9 ± 3,5	130,8 ± 3,1	131,1 ± 2,7	135,3 ± 1,5	135,9 ± 2,4
100	130,3 ± 1,6	125,9 ± 2,9	130,8 ± 2,9	131,6 ± 2,3	135,4 ± 1,2	135,6 ± 2,5
120	130,1 ± 1,6	125,6 ± 2,9	130,6 ± 2,8	130,7 ± 3,5	135 ± 1,6	135,8 ± 2,7
<b>Ângulos de contato para os filmes (°)</b>						
	<b>F100</b>	<b>F91</b>	<b>F82</b>	<b>F73</b>	<b>F64</b>	<b>F55</b>
0	72,4 ± 3,7	76 ± 3,1	70,9 ± 3,0	68,5 ± 2,3	78,3 ± 3,0	75,9 ± 2,8
20	71,5 ± 2,9	75,6 ± 3,9	70,7 ± 3,1	68,2 ± 2,5	76,2 ± 2,7	75,2 ± 2,8
40	71,4 ± 3,3	75,8 ± 3,8	69,9 ± 2,7	67,7 ± 1,8	75,5 ± 2,1	74,7 ± 2,3
60	71 ± 3,1	74,9 ± 3,2	69,9 ± 2,6	67,4 ± 2,2	75,6 ± 2,2	74,4 ± 2,8
80	71,5 ± 3,2	74,9 ± 3,4	69,7 ± 2,6	66,7 ± 1,8	75,2 ± 2,2	73,7 ± 2,9
100	70,9 ± 3,2	74,9 ± 3,8	69,1 ± 2,5	66,7 ± 1,8	74,7 ± 2,7	73,6 ± 2,7
120	70,8 ± 3,0	74,6 ± 3,4	68,5 ± 2,6	66,2 ± 1,7	74 ± 2,4	73,1 ± 2,9

A diferença observada nos ângulos de contato entre os filmes e as matrizes de microfibras é resultante do fato das matrizes apresentarem espaços vazios entre as microfibras, os quais geram uma tensão superficial entre o ar presente nestes espaços e a gotícula de água da análise. Entretanto, o efeito esperado de diminuição do ângulo de contato em virtude de uma maior disponibilidade de funções –COOH e –OH não foi comprovado. De fato, observou-se apenas uma tendência de aumento no ângulo de contato para as amostras contendo 40 e 50 % de PLLA de baixa massa molecular para ambos os casos.



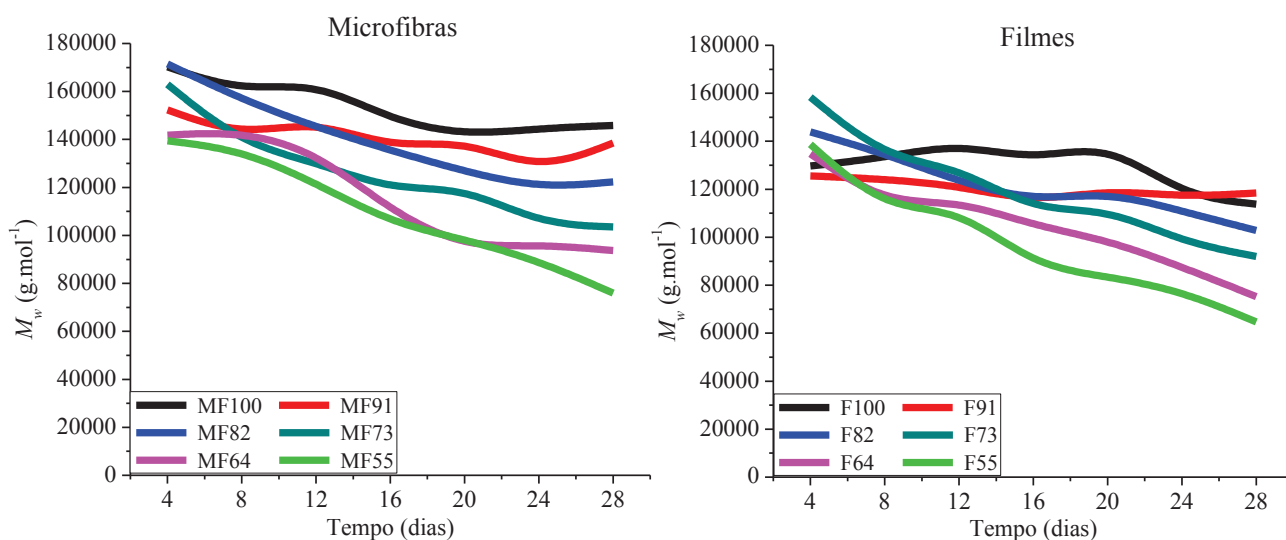
Para o caso dos filmes, a maior proporção de PLLA de baixa massa molecular na *blenda* significa que a amostra possuirá uma maior cristalinidade por causa da natureza semicristalina deste polímero. Há poucos trabalhos na literatura relacionando diferenças no ângulo de contato entre um poli(ácido lático) semicristalino e um amorfo, mas alguns dos dados disponíveis mostram que ao aumentar a porção cristalina da amostra, ocorre também um aumento no ângulo de contato.<sup>160</sup> Por outro lado, outros trabalhos indicam que não há alterações por causa da cristalinidade do polímero.<sup>161</sup> Todavia, esses trabalhos não contribuíram na justificação do comportamento da amostra contendo 10 % de PLLA, F91, onde observou-se um ângulo de contato semelhante às amostras contendo maiores proporções de PLLA (F64 e F55). O comportamento das amostras de microfibras, contudo, não pode ser relacionado com a sua cristalinidade, uma vez que apresentam a característica de um polímero amorfo, como será visto na secção referente às análises térmicas destas *blendas*.

### **5.2.3 Degradação hidrolítica das matrizes de microfibras e filmes de PDLLA/PLLA**

A consequência da adição de PLLA ao PDLLA também foi avaliada através de experimentos de degradação hidrolítica das amostras. Todas as amostras foram imersas em soluções salinas de tampão fosfato (PBS) por até 28 dias, mantendo uma temperatura constante de 37 °C. As alterações na massa molecular das matrizes de microfibras e filmes de *blendas* de PDLLA/PLLA foram mensuradas por cromatografia por exclusão de tamanho. Como resultado foram obtidos gráficos relacionando a massa molecular das *blendas* ao longo do tempo de degradação, os quais estão mostrados na figura 23.

Visto que a intenção desse estudo foi avaliar os efeitos da adição de um PLLA de baixa massa molecular em um PDLLA de alta massa molecular, os gráficos da figura 23 reportam os valores de alteração da massa molecular ponderal média ( $M_w$ ) ao longo do tempo, na qual as maiores cadeias do polímero possuem uma contribuição mais significativa no cálculo da média da massa molecular. De acordo com os gráficos da figura 23, quanto maior a proporção de PLLA de baixa massa molecular adicionado à mistura, uma degradação mais acentuada foi verificada para todos os corpos de prova, tanto para as fibras quanto para os filmes de PDLLA/PLLA. Isto ocorre, provavelmente, pela rápida degradação das cadeias com massa molecular mais baixa, o que permite um maior acesso da solução salina às cadeias maiores. Outra explicação seria o fato de que, mesmo com a renovação da solução tampão, a rápida

hidrólise das cadeias menores poderia ter ocasionado um aumento do pH da solução em razão da maior concentração de unidades do polímero contendo ácido carboxílico. Isso resultaria em um aumento na taxa de degradação das cadeias maiores, embora não tenham sido realizadas medidas do pH do meio durante os experimentos.

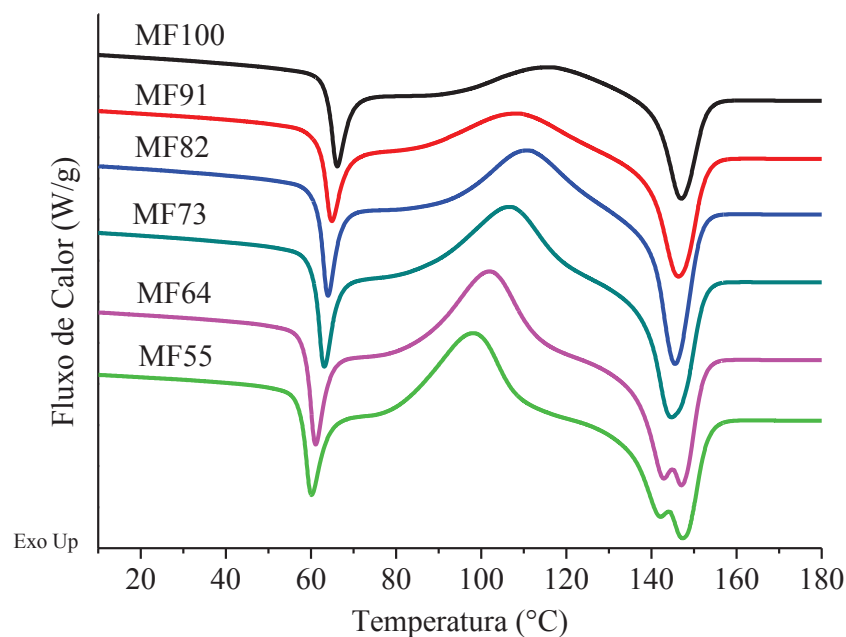


**Figura 23.** Gráficos de degradação hidrolítica para as matrizes de microfibras e filmes de *blendas* de PDLLA/PLLA.

#### 5.2.4 Propriedades térmicas das matrizes de microfibras e filmes de PDLLA/PLLA

O efeito do processo de *electrospinning* nas propriedades térmicas das amostras de *blendas* de microfibras de PDLLA/PLLA foi investigado através de calorimetria exploratória diferencial (DSC), analisando os dois ciclos de aquecimento. Para comparação, as propriedades térmicas dos filmes preparados a partir dessas *blendas* também foram avaliados por DSC. Primeiramente, verificou-se o comportamento térmico das matrizes de microfibras de PLA.

Durante o primeiro ciclo de aquecimento (figura 24) é possível visualizar um intenso pico endotérmico na região da transição vítrea do polímero, o qual é atribuído a uma entalpia de relaxação. Esse pico é referente à tensão aplicada durante a eletrofiação, a qual causa uma orientação das cadeias do poli(ácido láctico).

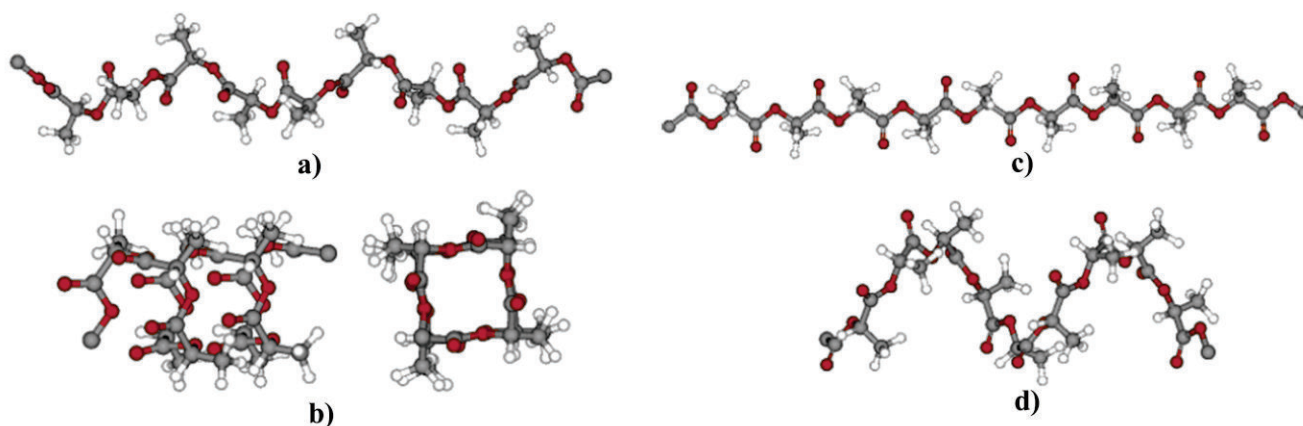


**Figura 24.** Termogramas de calorimetria exploratória diferencial para as matrizes de microfibras de *blendas* de PDLLA/PLLA. (1º aquecimento)

De acordo com Meaurio e colaboradores, estudos realizados por espectroscopia de infravermelho e modelagem do estado isomérico rotacional (do inglês *Rotational Isomeric State; RIS*) sugerem que a cadeia de poli(L-ácido lático) pode apresentar quatro conformações diferentes (figura 25).<sup>162</sup> No decorrer do processo de *electrospinning*, parte da amostra é orientada na sua conformação mais estendida (conformação helicoidal tt, figura 25c). Isso ocasiona uma redução significativa no volume livre das cadeias do polímero em consequência do maior “empacotamento” dessas cadeias estendidas, fazendo com que um excesso de energia seja armazenada durante o processo. Ao alcançar a temperatura de transição vítrea do PLA durante a análise de DSC, esta perda de entalpia associada à redução do volume livre é novamente recuperada em razão dos movimentos translacionais, resultando em um intenso pico endotérmico.

Entretanto, ao contrário do que poderia ser imaginado, a orientação das cadeias do PLA resultante da eletrofiação não induz à cristalização dos polímeros após o procedimento. O pico de cristalização observado durante o aquecimento das matrizes de microfibras no primeiro ciclo, indica que o polímero encontra-se no estado amorfo após o *electrospinning*.





**Figura 25.** Conformações helicoidais do poli(L-ácido láctico): a) conformação helicoidal gt; b) conformação helicoidal gg; c) conformação helicoidal tt; d) conformação helicoidal tg. (reproduzido com permissão de Meaurio e colaboradores)<sup>162</sup>

Isso pode ser atribuído à rápida evaporação do solvente durante o processo, o que não permite uma correta orientação das cadeias para ocorrer a cristalização. Estudos empregando a técnica de difração de raios-X mostram que matrizes de fibras de PDLLA obtidas durante o processo de eletrofição possuem uma característica amorfa, o que sustenta a observação realizada a partir das análises de DSC.<sup>163</sup>

Como consequência do processo de eletrofição, a liberação da energia armazenada nas fibras através do pico de relaxação induz a uma reorganização das cadeias durante o aquecimento, resultando em um polímero semicristalino. Esse fato é evidenciado pelo pico exotérmico de cristalização a frio próximo a 110 °C. Quanto maior a proporção de PLLA adicionado à mistura, observa-se uma redução nesta temperatura de cristalização, sugerindo que a adição do PLLA de baixa massa molecular antecipa o processo de cristalização da amostra, atuando como um agente nucleante.

A tabela 6 apresenta os valores de entalpia de cristalização e de fusão obtidos dos termogramas de DSC para as microfibras de *blendas* de PDLLA/PLLA. Os resultados confirmam que as matrizes de microfibras encontram-se em um estado amorfo após o processo de *electrospinning*, uma vez que os valores das entalpias de cristalização e de fusão são próximos. Isso significa que praticamente todos os cristais que fundem durante a análise de DSC foram formados durante o aquecimento das amostras, evidenciado pela transição de cristalização.

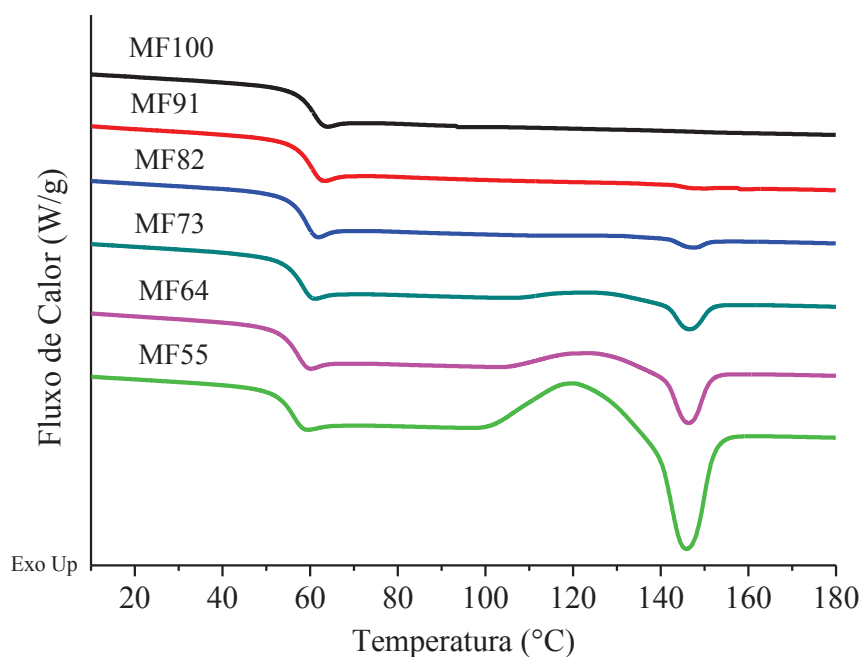
**Tabela 6.** Valores de entalpia de cristalização e de fusão das microfibras de *blendas* de PDLLA/PLLA.

<b>Amostra</b>	<b><math>\Delta H_c</math> (J.g<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>\Delta H_f</math> (J.g<sup>-1</sup>)</b>
<b>MF100</b>	12,5	14
<b>MF91</b>	16,3	20,5
<b>MF82</b>	23,8	23,8
<b>MF73</b>	27,4	28,1
<b>MF64</b>	29,1	30,3
<b>MF55</b>	27,3	28,7

Por outro lado, o comportamento observado para a amostra MF100 é bastante peculiar. Uma vez que essa matriz contém apenas o PDLLA seria esperado apenas um comportamento amorfo durante a análise de DSC. Entretanto, a análise mostra um processo de cristalização do polímero seguido da fusão. Esse processo de cristalização no polímero amorfo PDLLA deve-se à alta proporção de isômeros L- em sua estrutura. A energia liberada no processo de relaxação induziu uma reorganização dos segmentos onde a cadeia é regular, ocorrendo, assim, a cristalização da amostra seguido do processo de fusão desses cristais.

Outro detalhe a ser observado, com relação à figura 24, é a ocorrência de picos endotérmicos referentes à fusão dos cristais formados em razão da cristalização das amostras durante o aquecimento. À medida que a proporção de PLLA de baixa massa molecular presente na *blenda* é maior, surgem dois picos de fusão (MF64 e MF55). Esses dois picos podem estar relacionados à fusão das duas estruturas cristalinas conhecidas para o PLA,  $\alpha$  e  $\beta$ , ambas pertencentes à conformação helicoidal *gt* (figura 24a). Alguns autores atribuem a ocorrência destes dois picos de fusão à separação de fases entre as duas formas cristalinas do PLA, decorrente do processo de *electrospinning*.<sup>164,165</sup>

O fato da cristalização ser atribuída à entalpia de relaxação pode ser justificado através da observação do segundo ciclo de aquecimento das amostras (figura 26). Após o resfriamento (no qual não se observam processos de cristalização em nenhum dos casos), a fusão para a amostra MF100 não é observada, indicando o comportamento de um polímero completamente amorfo. Contudo, à medida que o PLA de baixa massa molar é incorporado à mistura, picos de cristalização e de fusão são observados para as amostras. Esses sinais são mais evidentes para as amostras que contém 20 % ou mais de PLLA incorporado à mistura.



**Figura 26.** Termogramas de DSC para as matrizes de microfibras de *blendas* de PDLLA/PLLA. (2° aquecimento)

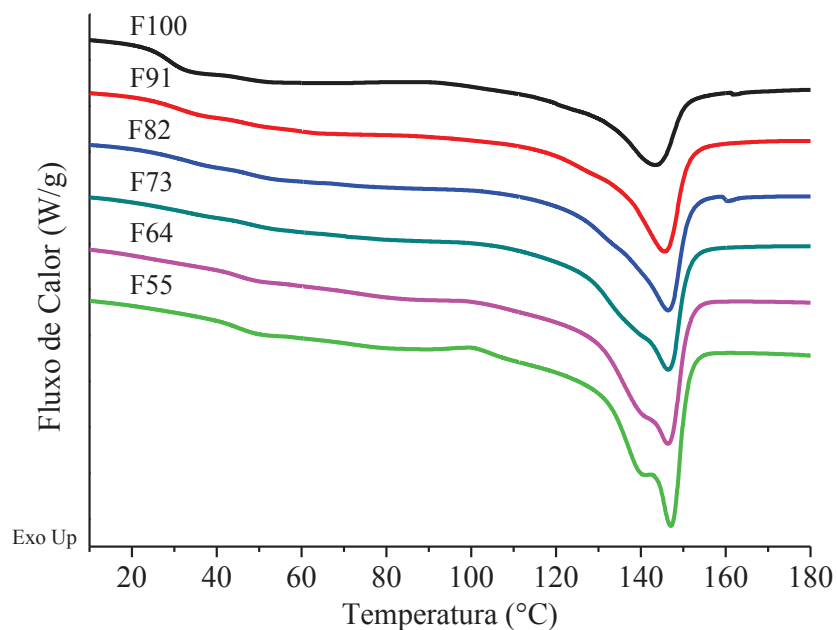
A tabela 7 mostra os valores para as temperaturas de transição vítrea, cristalização e fusão, além da entalpia de relaxação e cristalinidade em ambos os ciclos de aquecimento. Os resultados mostram, como esperado, uma tendência de diminuição da temperatura de transição vítrea das matrizes de microfibras, resultante do aumento do teor de PLLA de baixa massa molecular, mas nenhum efeito é observado para os valores de  $T_m$ . Além disso, observa-se que a adição de quantidades maiores de poli(L-ácido lático) de baixa massa resulta em um sensível aumento na entalpia de relaxação das amostras, o que nos permite concluir que maiores proporções do PLLA de baixa massa molecular contribuem para o maior alinhamento dos segmentos de isômeros L- da cadeia do PDLLA durante a eletrofiação. Esse aumento da entalpia de relaxação também se reflete em um aumento da cristalinidade das misturas, de acordo com o observado na tabela 7.

**Tabela 7.** Resultados obtidos para as análises de DSC das matrizes de microfibras de PLA.

Amostra	$T_g$ 1 (°C) <sup>a</sup>	$T_g$ 2 (°C) <sup>a</sup>	$T_m$ 1 (°C) <sup>a</sup>	$T_m$ 2 (°C) <sup>a</sup>	$T_c$ 1 (°C) <sup>a</sup>	$T_c$ 2 (°C) <sup>a</sup>	$\Delta H_r$ (Jg <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	$\chi$ 1 (%) <sup>c</sup>	$\chi$ 2 (%)
<b>MF100</b>	65	61	147	----	117	----	4,9	15	----
<b>MF91</b>	64	60	146	148	108	----	5,5	22	----
<b>MF82</b>	63	59	145	147	111	----	5,6	25	1
<b>MF73</b>	62	58	145	146	107	125	6,6	30	2
<b>MF64</b>	60	57	147	146	102	124	6,8	32	4
<b>MF55</b>	59	56	147	146	98	120	7,1	31	15
<b>PLLA<sup>d</sup></b>	57	49	144	143	----	112	----	65	39

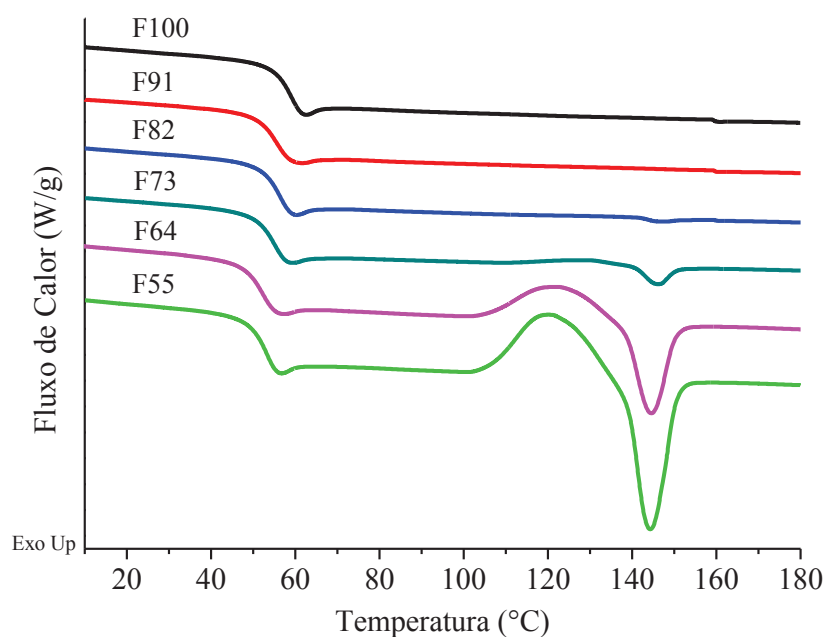
- Os índices 1 e 2 referem-se, respectivamente, ao primeiro e segundo ciclos de aquecimento.
- Entalpia de relaxação. Calculada através da área excedente à  $T_g$  do segundo ciclo de aquecimento
- Cristalinidade da amostra. Calculada a partir da fórmula  $\chi = \Delta H_f / \Delta H_f^\circ \times 100$ , onde o  $\Delta H_f^\circ$  refere-se à entalpia de fusão de um cristal perfeito de PLA, com valor igual a 93,6 Jg<sup>-1</sup>.<sup>166</sup>
- Valores referentes ao polímero isolado do meio reacional através de precipitação em etanol.

Em comparação com as microfibras de PLA, as análises de DSC para os filmes destas *blendas* durante o primeiro ciclo de aquecimento não mostraram picos de cristalização (figura 27). Esse resultado reforça a hipótese de que logo após o processo de *electrospinning* a mistura encontra-se em um estado amorfo. O fato de não haver a presença de um pico de cristalização pode ser explicado pela lenta evaporação do solvente durante a preparação dos filmes de PDLLA/PLLA, permitindo que as cadeias dos polímeros se organizem em um estado cristalino, ocorrendo o aparecimento de picos endotérmicos relacionados à fusão das misturas. Para as amostras contendo uma maior proporção de PLLA de baixa massa molecular observa-se o aparecimento de dois picos de fusão (F73, F64 e F55). Essas transições referem-se, como dito anteriormente, às duas estruturas cristalinas no PLLA presente na amostra, resultante da separação de fases desses cristais durante o processo de evaporação do solvente. Além disso, não são observados picos referentes à entalpia de relaxação na região de transição vítrea.



**Figura 27.** Termogramas de calorimetria exploratória diferencial para os filmes de PDLLA/PLLA. (1° aquecimento)

Após o ciclo de resfriamento, onde também não foram observados processos de cristalização, o comportamento dos filmes ficou semelhante ao observado para o segundo aquecimento das matrizes de microfibras de PDLLA/PLLA (figura 28).



**Figura 28.** Termogramas de DSC para os filmes de *blendas* de PDLLA/PLLA. (2° aquecimento)

A tabela 8 mostra os valores para as temperaturas de transição vítrea, cristalização e fusão, além da cristalinidade em ambos os ciclos de aquecimento para os filmes de PLA. Os resultados referentes ao primeiro ciclo de aquecimento mostram a presença de duas transições vítreas, mas nenhum efeito foi atribuído a esse comportamento. Ainda com relação ao primeiro ciclo, verifica-se altos valores de cristalinidade para todas as amostras quando comparados com os resultados encontrados para as matrizes de microfibras, o que reforça as observações realizadas para ambos os casos. Além disso, observa-se que os valores de entalpia de fusão referente ao primeiro ciclo de aquecimento aumentam à medida que o PLLA é adicionado à mistura, corroborando com os dados obtidos para a cristalinidade das *blendas*. Os valores de cristalinidade encontrados para o segundo ciclo de aquecimento aproximaram-se àqueles obtidos para as matrizes de microfibras.

**Tabela 8.** Resultados obtidos para as análises de DSC dos filmes de PLA.

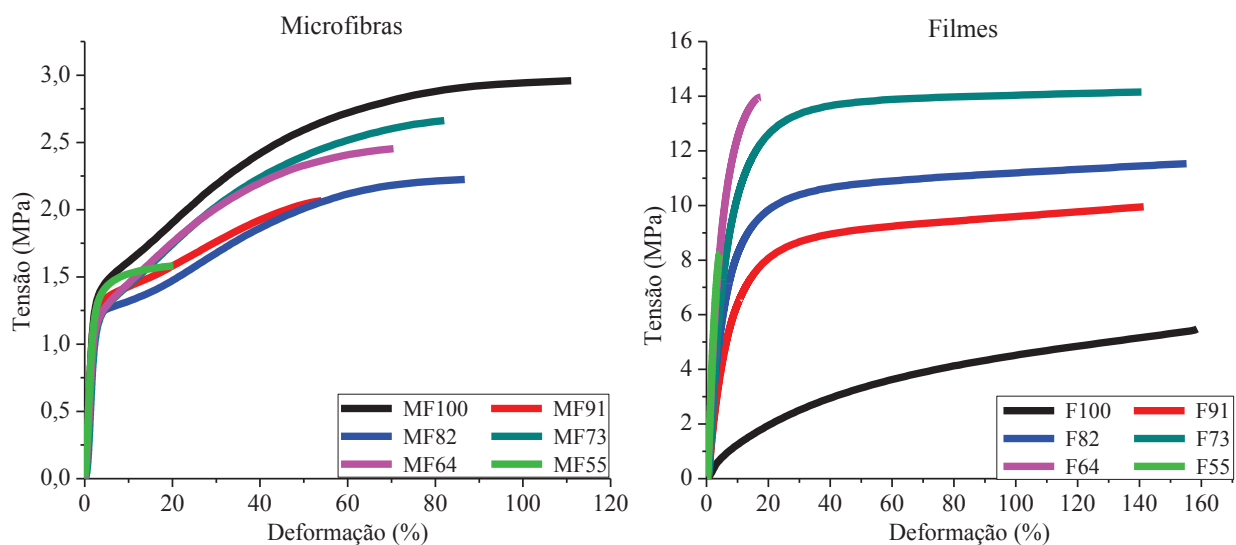
Amostra	$T_g$ 1 (°C) <sup>a</sup>	$T_g$ 2 (°C) <sup>a</sup>	$T_m$ 1 (°C) <sup>a</sup>	$T_m$ 2 (°C) <sup>b</sup>	$T_c$ 2 (°C) <sup>a</sup>	$\chi$ 1 (%) <sup>c</sup>	$\chi$ 2 (%) <sup>c</sup>	$\Delta H_f$ (J.g <sup>-1</sup> ) <sup>e</sup>
<b>F100</b>	29 e 44	59	143	----	----	26	----	25,8
<b>F91</b>	31 e 47	56	145	----	----	36	----	28,1
<b>F82</b>	33 e 47	56	146	145	----	36	----	31,8
<b>F73</b>	33 e 47	55	146	146	----	37	1	36,1
<b>F64</b>	45	52	146	144	123	43	8	41,2
<b>F55</b>	44	53	147	144	120	48	15	45,6
<b>PLLA</b> <sup>d</sup>	57	49	144	143	112	65	39	62,4

- Os índices 1 e 2 referem-se, respectivamente, ao primeiro e segundo ciclos de aquecimento.
- Temperatura referente ao pico de fusão mais intenso.
- Cristalinidade da amostra. Calculada a partir da fórmula  $\chi = \Delta H_f / \Delta H_f^\circ \times 100$ , onde o  $\Delta H_f^\circ$  refere-se à entalpia de fusão de um cristal perfeito de PLA, com valor igual a 93,6 Jg<sup>-1</sup>.<sup>166</sup>
- Valores referentes ao polímero isolado do meio reacional através de precipitação em etanol.
- Entalpia de fusão referente ao primeiro ciclo de aquecimento.

### 5.2.5 Análises de tensão *versus* deformação e dinâmico-mecânicas (DMA)

As propriedades mecânicas do material foram investigadas através de medidas de tensão *versus* deformação e são mostradas na figura 29. As análises para as matrizes de microfibras e dos filmes de misturas de PDLA/PLLA foram conduzidas à temperatura de 37 °C para mimetizar uma possível aplicação como substitutos biológicos. Na figura 29 observa-se que a

tensão máxima necessária para romper as amostras de matrizes de microfibras é consideravelmente menor em comparação com os filmes de PDLLA/PLLA. Isso se deve à característica porosa dessa matriz e a natureza amorfa do polímero contido nas microfibras, na temperatura de análise. Além disso, à medida que se aumentou a quantidade de PLLA de baixa massa molecular nas misturas, houve redução da tensão máxima necessária para romper as fibras. A redução do teor de polímero de alta massa molecular refletiu-se em uma redução dos pontos de entrelaçamento entre estas cadeias, o que resultou em diminuição nas propriedades mecânicas do material. Outra observação foi em relação ao alongamento máximo durante a análise, a qual não ultrapassou 115 %, havendo rompimento de todas as amostras.



**Figura 29.** Curvas de tensão  $\times$  deformação para as matrizes de microfibras e dos filmes de *blendas* de PDLLA/PLLA.

A presença de PLLA de baixa massa molecular nos filmes alterou o perfil das curvas de tensão  $\times$  deformação para estas amostras, em relação ao observado para as matrizes de microfibras. O aumento da quantidade de poli(L-ácido lático) de baixa massa molecular utilizado na elaboração das misturas resultou em um aumento da tensão máxima de ruptura e do módulo. A presença de domínios cristalinos induzidos pela adição de um polímero de menor massa molar contribuiu para um significativo aumento da resistência à deformação quando comparado ao PDLLA de alta massa molecular (F100). Ainda assim, os filmes de

PLA semicristalinos alcançaram valores de alongamento entre 140-160 % para as amostras F100, F91, F82 e F73. Em ambos os casos, os filmes contendo 40 e 50 % do polímero de baixa massa molecular apresentaram os piores desempenhos mecânicos. Entretanto, é importante salientar que a mistura PLLA/PDLLA altera o comportamento de plástico flexível para plástico rígido com o aumento do teor de PLLA de baixa massa molecular.

Os valores de módulo, tensão na ruptura e de alongamento para cada amostra estão contidos na tabela 9. Para as amostras de matrizes de microfibras se observou uma pequena diminuição nos valores de módulo de Young à medida que o teor de PLLA de baixa massa molecular contido na mistura aumenta. Além disso, constata-se uma significativa redução no alongamento máximo das amostras quanto mais PLLA é incorporado à *blenda*. Isso é resultado da diminuição dos entrelaçamentos entre as cadeias de maior massa molecular de PDLLA e pela maior presença de domínios cristalinos nas amostras.

**Tabela 9.** Valores de módulo, tensão máxima e de alongamento para as matrizes de microfibras e para os filmes de *blendas* de PDLLA/PLLA.

<b>Matrizes de microfibras</b>			
<b>Amostra</b>	<b>Módulo de Young (MPa)</b>	<b>Tensão máxima na ruptura (MPa)</b>	<b>Alongamento (%)</b>
<b>MF100</b>	79,3	2,9	111,0
<b>MF91</b>	70,1	2,1	54,0
<b>MF82</b>	73,1	2,2	86,7
<b>MF73</b>	63,4	2,6	82,1
<b>MF64</b>	64,6	2,4	70,4
<b>MF55</b>	70,9	1,6	20,2
<b>Filmes</b>			
<b>F100</b>	15,0	5,5	159,1
<b>F91</b>	116,3	9,9	141,3
<b>F82</b>	157,6	11,5	155,2
<b>F73</b>	187,9	14,1	140,6
<b>F64</b>	261,2	13,9	17,5
<b>F55</b>	302,6	8,2	4,3

O efeito da adição de PLLA de baixa massa molecular torna-se mais evidente para os filmes, onde se observou um grande aumento no valor do módulo, resultante do aumento da rigidez dos filmes em virtude da maior presença de domínios cristalinos na amostra. Essa



rigidez também se reflete nos valores de alongamento máximo dos filmes, os quais são reduzidos significativamente quando maiores quantidades de PLLA são adicionadas à mistura (F64 e F55). Entretanto, observa-se que adições de até 30 % do PLLA de baixa massa podem ser empregadas sem que ocorram perdas expressivas em suas propriedades mecânicas. De fato, essas adições proporcionaram um aumento na resistência à deformação sem ocorrer uma grande supressão no alongamento máximo das amostras. Desse modo, a teoria inicial de que a adição de PLLA de baixa massa molecular pudesse atuar como um plastificante não é verdadeira, pois o que se observa é um aumento na rigidez dos filmes. A adição de um PLLA semicristalino à *blenda* não proporcionou nenhuma alteração significativa no módulo de Young das matrizes de microfibras, uma vez que essas se caracterizam por apresentar um comportamento amorfo.

As amostras de matrizes de microfibras e filmes de PDLLA/PLLA também foram submetidas à avaliação do comportamento dinâmico-mecânico e os gráficos para os módulos de armazenamento, de perda e de  $\tan \delta$  são mostrados na figura 30. Os baixos valores para os módulos de armazenamento e perda para as microfibras de *blendas* de PLA são decorrentes do fato de que a amostra possui uma porosidade considerável quando comparada aos filmes, o que faz com que sua resistência à tração seja bastante inferior.

Todas as matrizes de microfibras apresentaram um comportamento semelhante entre si. Todavia, é preciso destacar o grande aumento dos valores de módulo após a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) em cerca de 60 °C. Esse comportamento é atribuído ao fenômeno de cristalização a frio que ocorre durante o processo de aquecimento da amostra, em concordância com o comportamento observado através da análise de DSC. Ao serem aquecidas, as cadeias amorfas de PDLLA liberam a energia armazenada durante o processo de eletrofição, resultando em uma formação de núcleos cristalinos no interior das fibras. Quanto maior o teor de PLLA de baixa massa molecular, mais rapidamente ocorre essa nucleação, como evidenciado nas curvas do módulo de perda das fibras. Ao serem aquecidos além da  $T_g$ , estes sítios cristalinos induzem a cristalização das cadeias mais próximas, conferindo rigidez à matriz, conforme observado pelo aumento do valor do módulo de armazenamento. Em seguida, ocorre o escoamento das amostras resultante do processo de fusão.

Assim como observado nas análises de DSC, a natureza amorfa das matrizes de microfibras fica evidente através dos intensos picos no gráfico de  $\tan \delta$ , o qual mede a capacidade de dissipação de energia da amostra. Em virtude da energia armazenada durante o

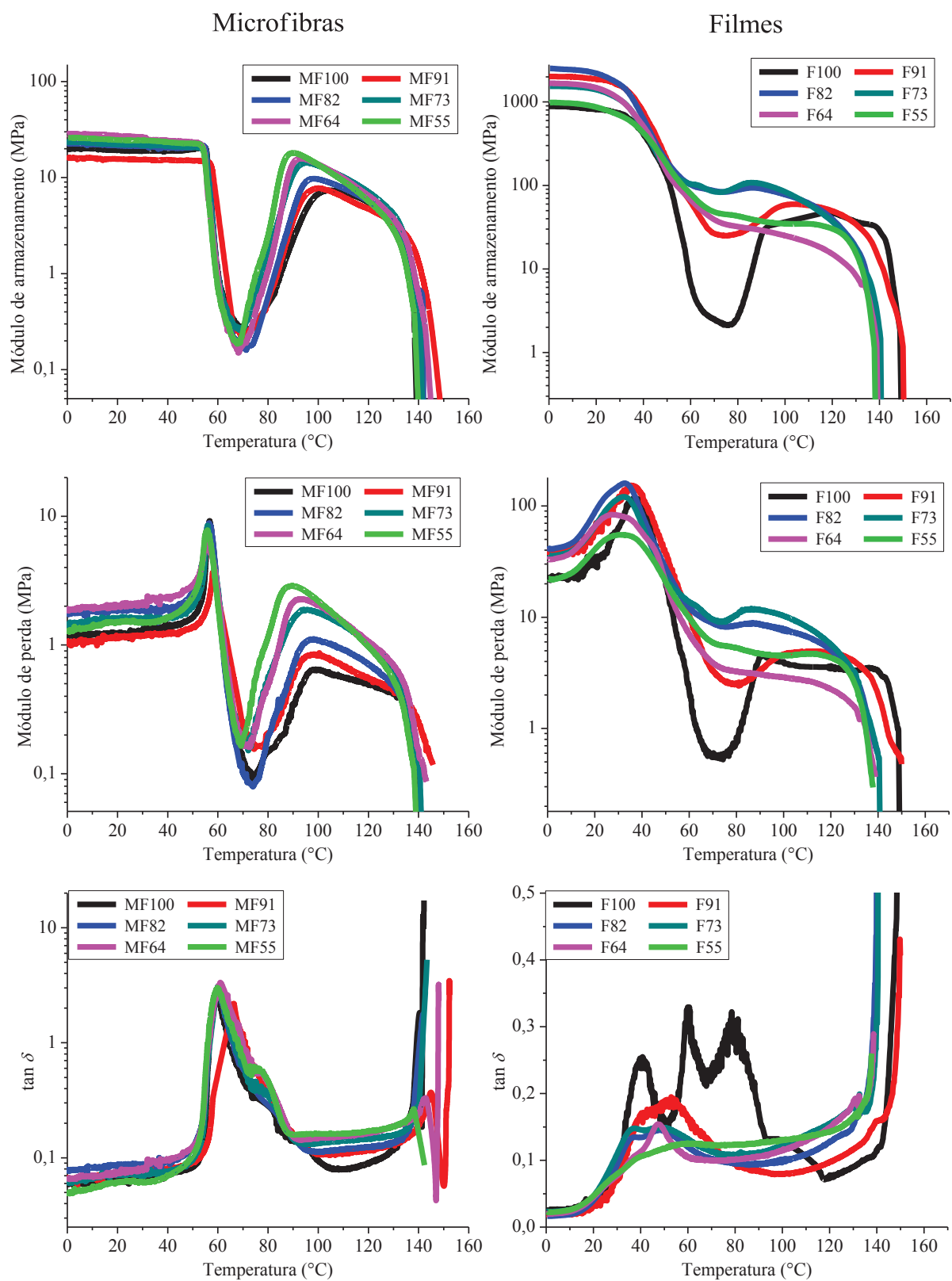
processo de eletrofiação (entalpia de relaxação), ao atingir a temperatura de transição vítrea essa energia é liberada, observando-se os picos presentes no gráfico de  $\tan \delta$ . Quanto mais intenso esse pico, maior é a dissipação de energia armazenada nas ligações da cadeia do polímero. Além da transição relacionada à  $T_g$  das misturas, verifica-se a presença de uma segunda transição, a qual está relacionada com a temperatura de cristalização das amostras, onde a mistura, até então amorfa, passa para um estado semicristalino antes de ocorrer o escoamento.

O comportamento dos filmes é típico de um polímero semicristalino. Após a região vítrea ocorre uma queda de cerca de 2 ordens de grandeza no módulo de armazenamento. Entretanto, conforme observado na figura 30, a amostra F100 tende a cristalizar a frio durante a análise, resultando em um aumento do módulo após a região vítrea.

Esse resultado difere daquele encontrado nas análises de DSC, onde não foi observada cristalização para essa amostra. Por outro lado, visto que a taxa de aquecimento empregada na análise de DMA é muito menor em comparação com a análise de DSC, é possível que tenha ocorrido um processo de cristalização, uma vez que esta baixa taxa de aquecimento permitiria um melhor arranjo dos segmentos de isômeros L- das cadeias do PDLA.

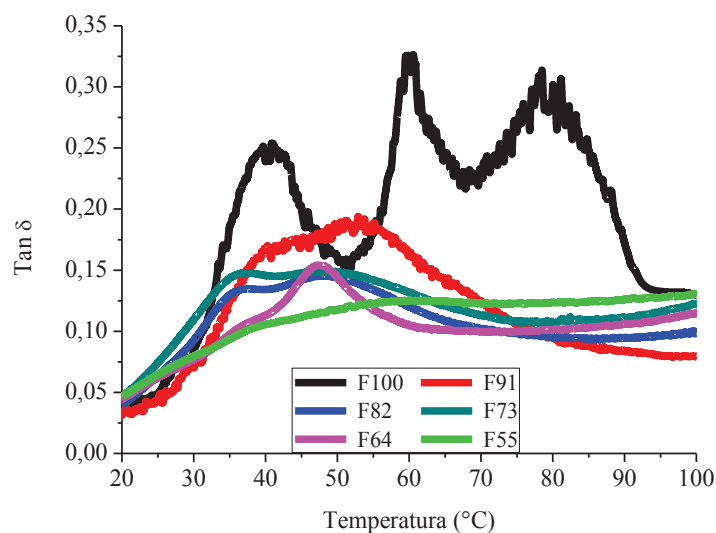
Para as demais amostras de filmes, a adição do PLLA de baixa massa molecular ocasionou um aumento no valor do módulo da região do platô elástico apenas para as amostras F82 e F73. O valor desse módulo para as amostras F91, F64 e F55 ficou próximo ao observado para o filme F100. O PLLA de baixa massa molecular, quando presente em quantidades inferiores a 30%, parece atuar como um agente nucleante na mistura, favorecendo a cristalização e aumentando a cristalinidade.

O gráfico de  $\tan \delta$  da figura 30 para as amostras de filmes mostra um comportamento incomum para o filme de PDLA F100, uma vez que foram observadas três diferentes transições: em 40 °C, relacionada à temperatura de transição vítrea do polímero; em 80 °C, atribuída à cristalização da amostra; e outra em cerca de 60 °C, a qual pode estar relacionada a uma porção mais rígida da cadeia de PDLA, uma vez que a amostra encontra-se em um estado semicristalino, segundo dados de DSC.



**Figura 30.** Análises dinâmico-mecânicas para as matrizes de microfibras e filmes de *blendas* de PDLLA/PLLA.

De fato, uma visualização mais detalhada desse gráfico pode ser realizada a partir da figura 31, no qual é possível perceber a presença de dois picos para todas as amostras de filmes de PDLLA/PLLA. Essas transições seriam conferidas às estruturas amorfas com caráter mais flexível (primeira transição) e mais rígida (segunda transição).<sup>167</sup>



**Figura 31.** Gráfico mostrando as curvas de  $\tan \delta$  para os filmes de PDLLA/PLLA.

A partir dos gráficos do módulo de perda das amostras, foram obtidos os valores das temperaturas de transição vítrea, os quais estão mostrados na tabela 10. Os resultados encontrados para as matrizes de microfibras são próximos àqueles obtidos pela análise de DSC durante o primeiro ciclo de aquecimento. As diferenças observadas em comparação com a tabela 6 devem-se às diferentes taxas de aquecimento empregadas em ambas as análises. Contudo, as temperaturas obtidas para os filmes de PDLLA/PLLA diferem-se muito em relação ao encontrado durante as análises de calorimetria exploratória diferencial. Enquanto que para a análise de DSC é averiguado a presença de duas transições vítreas, os valores encontrados através do DMA referem-se a apenas uma transição, a qual foi calculada a partir do ponto máximo dessa transição na curva do módulo de perda das amostras.

**Tabela 10.** Valores de temperaturas de transição vítrea para as matrizes de microfibras e filmes de misturas de PDLLA/PLLA obtidos por análise dinâmico-mecânica.

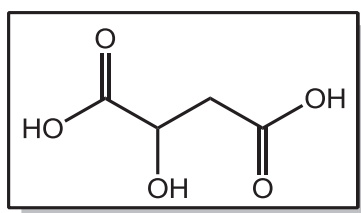
<b>Microfibras</b>		<b>Filmes</b>	
<b>Amostra</b>	<b><math>T_g</math> (°C)</b>	<b>Amostra</b>	<b><math>T_g</math> (°C)</b>
<b>MF100</b>	57	<b>F100</b>	37
<b>MF91</b>	58	<b>F91</b>	35
<b>MF82</b>	56	<b>F82</b>	33
<b>MF73</b>	56	<b>F73</b>	33
<b>MF64</b>	55	<b>F64</b>	29
<b>MF55</b>	56	<b>F55</b>	33

Em resumo, a adição de um poli(L-ácido láctico) semicristalino de baixa massa molecular a um poli(D,L-ácido láctico) amorfo de alta massa molecular não resultou em um aumento de hidrofília do materiais como esperado, tanto para as matrizes de microfibras quanto para filmes. Contudo, essa adição alterou significamente o perfil de degradação de ambas as amostras. Visto que matrizes de poli(ácido láctico) são conhecidas por apresentar um elevado tempo de degradação, essa seria uma alternativa de redução deste tempo. Além disso, as propriedades mecânicas apresentadas sugerem que o PLLA de baixa massa possa ser adicionado em uma quantidade de até 30 % da composição total da mistura, mantendo boa parte das propriedades iniciais em comparação com amostras de PDLLA puro. Esse resultado é interessante uma vez que a obtenção de propriedades mecânicas apropriadas é necessária para diferentes aplicações como substitutos biológicos.

### 5.3 Síntese do poli(L-ácido láctico-co-L-ácido málico) (PLLALMA)

Os métodos mais utilizados para a introdução de funções carboxilas e/ou hidroxilas na estrutura de uma matriz de poliéster são, como já mencionado anteriormente, os métodos de hidrólise ácida ou básica, ou tratamento com forno de plasma. Essas técnicas permitem a modificação/funcionalização da superfície da matriz com essas funções, ocasionando a alteração de propriedades do material como, por exemplo, a sua hidrofiliidade, proporcionando melhores interações entre a matriz e a célula. Entretanto, a busca pela alteração da hidrofiliidade de uma matriz de poli(ácido láctico), através da preparação de *blendas* com diferentes massas moleculares desse polímero não resultou em alterações na hidrofiliidade do material. Além disso, os experimentos de cultivo celular sobre estas matrizes não foram realizados.

A utilização de biopolímeros contendo esses grupos disponíveis em sua estrutura possibilitaria a construção de matrizes sem a necessidade de modificações posteriores. Desse modo, a obtenção de um poliéster funcionalizado contendo grupos carboxila pendentes à cadeia foi proposta a partir da síntese de um copolímero contendo os monômeros L-ácido láctico e ácido málico (figura 32). O ácido málico é um  $\alpha$ -hidróxi diácido carboxílico encontrado naturalmente em frutas, como maçãs e pêras, o qual é frequentemente utilizado como acidulante. Além disso, esse diácido também é empregado na limpeza e regeneração de feridas e queimaduras, o que o torna um elemento importante na síntese de polímeros destinados à substituição e/ou reparação de tecido epitelial.<sup>168,169</sup>



**Figura 32.** Estrutura molecular do DL-ácido málico.

A síntese do poli(lactídeo-co-ácido málico) (PLMA) já é descrita na literatura através da polimerização por abertura de anel.<sup>96,170</sup> Entretanto, sua síntese é realizada em diversas

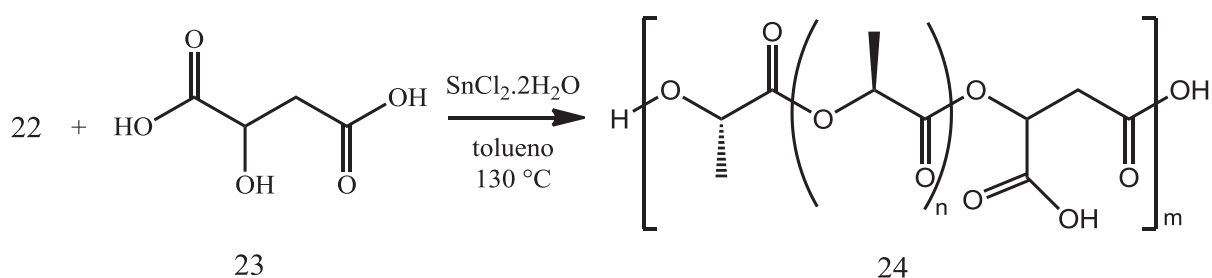
etapas, dentre as quais baixos rendimentos são obtidos (cerca de 13 % de rendimento total). Dessa maneira, a proposta do presente trabalho foi sintetizar o poli(L-ácido lático-co-ácido málico) (PLLAMA) através da policondensação direta. Visto que o objetivo deste estudo foi a inclusão de grupos funcionais ácidos carboxílicos ao longo da cadeia principal do poli(L-ácido lático), decidiu-se empregar um oligômero de PLLA (*o*-PLLA) como material de partida para as reações com o ácido málico. Dessa forma um copolímero de maior massa molecular pode ser sintetizado, uma vez que diversas cadeias do oligômero de PLLA podem ser conectadas entre si através da ligação com o monômero ácido málico.

Sendo assim, a estratégia para a obtenção deste copolímero consistiu, primeiramente, na preparação de um oligômero de poli(L-ácido lático) [22] partindo de uma solução aquosa 85 % do L-ácido lático [21], sob condições reacionais já estabelecidas no item 5.1 deste trabalho. O oligômero de PLLA [22] foi sintetizado em 85 % de rendimento e a massa molecular obtida através de cromatografia por exclusão de tamanho, resultou em um valor de  $M_w = 1.720 \text{ g.mol}^{-1}$  (PDI= 2,8). A massa molecular numérica média do polímero também foi calculada a partir da análise de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (figura 33), a partir da seguinte equação

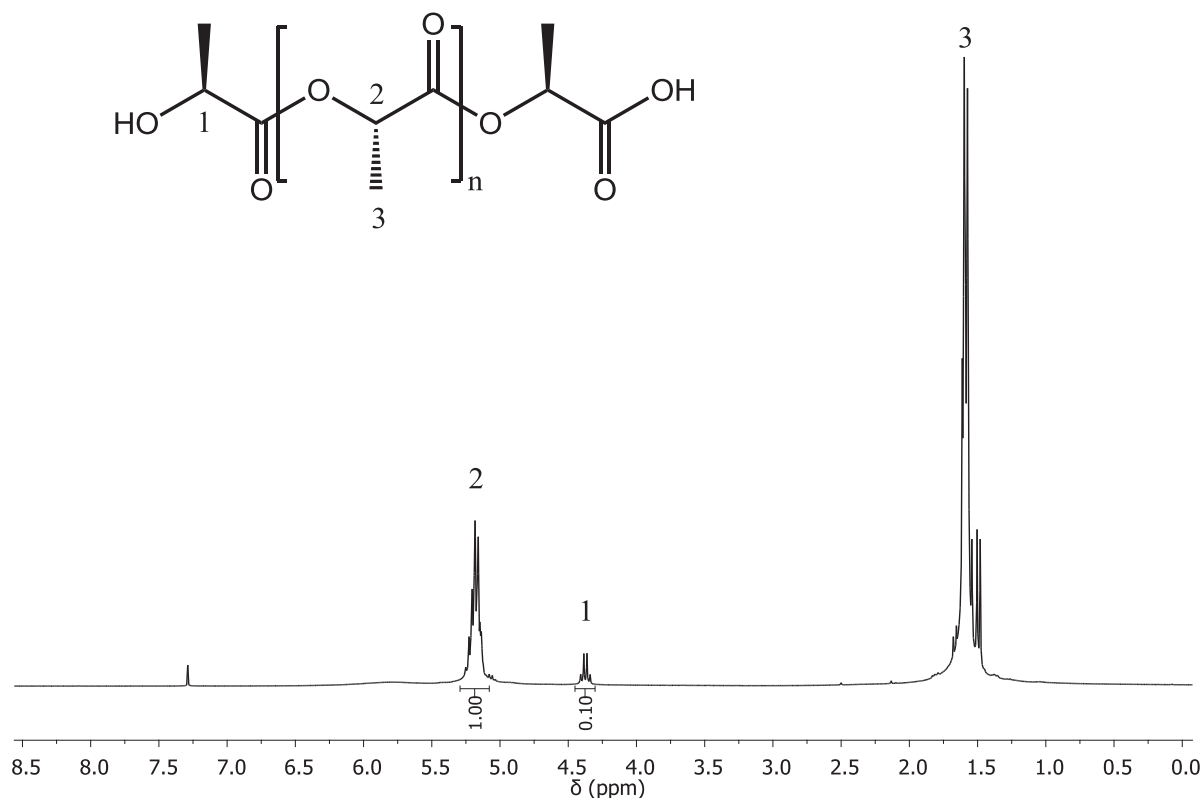
$$M_n = 90 + 72 \frac{\text{valor da integral do CH da unidade repetitiva (B)}}{\text{valor da integral do CH terminal (A)}}$$

onde o valor 90 corresponde à massa molar da unidade terminal do ácido lático e o valor 72 corresponde à massa molar da unidade repetitiva da cadeia principal.<sup>171</sup> Desse modo, o valor encontrado foi de  $M_n = 830 \text{ g.mol}^{-1}$ , o qual foi utilizado para calcular a proporção de ácido málico utilizada nas reações de copolimerização.

Em seguida, o oligômero de PLLA foi submetido às reações de polimerização na presença de DL-ácido málico em diferentes condições (esquema 8).



**Esquema 7.** Síntese do poli(L-ácido lático-co-DL-ácido málico) [24] através de polimerização por etapas.



**Figura 33.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H para o oligômero de PLLA [22]. (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

Primeiramente, a obtenção do PLLAMA [24] foi realizada em tolueno, no intuito de remover azeotropicamente a água formada como subproduto durante a reação. Assim, o oligômero de PLLA e o DL-ácido málico [23] foram adicionados a um balão de fundo redondo, na presença de tolueno e do catalisador. Para remover a água da reação, um condensador do tipo Dean-Stark foi conectado ao sistema. Após o término da reação, o polímero foi precipitado em etanol, filtrado e posteriormente seco à pressão reduzida. Os resultados desse estudo estão contidos na tabela 11, onde a nomenclatura RAM refere-se à “Reações com Ácido Málico”.

As reações RAM01 e RAM02 (tabela 11) mostram uma comparação entre os dois diferentes sistemas catalíticos utilizados. A incorporação do ácido málico na cadeia do copolímero não foi observada quando o catalisador SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O foi utilizado. Por outro lado, a utilização de ácido *p*-toluenosulfônico como co-catalisador permitiu a obtenção do PLLAMA [24]. Além disso, uma diferença bastante significativa é observada no rendimento obtido nos dois procedimentos, onde uma proporção equivalente entre o oligômero de PLLA e o DL-ácido málico foi utilizada. A partir desse resultado, o sistema SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O/PTSA foi



adotado nas investigações seguintes, uma vez que este parece ser o melhor sistema catalítico para estas reações. O tempo de reação também foi investigado quando uma proporção de 1 : 1 entre os monômeros foi empregada (RAM02 e RAM03). Porém, os resultados mostraram que houve diferenças mínimas nos valores obtidos para os dois procedimentos.

**Tabela 11.** Resultados das polimerizações entre o *o*-PLLA e DL-ácido málico em tolueno.

Entrada	<i>o</i> -PLLA : DL-AM	Catalisador <sup>a</sup>	t (h)	$M_w$ (g.mol <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	$M_w/M_n$	% AM <sup>c</sup>	R (%)
RAM01	1 : 1	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	48	5.900	1,1	n.o. <sup>d</sup>	12
RAM02	1 : 1	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O/PTSA	48	8.650	1,1	5,2	59
RAM03	1 : 1	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O/PTSA	24	8.890	1,1	6,0	49
RAM04	1 : 0,5	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O/PTSA	24	7.090	1,1	n.d. <sup>e</sup>	40
RAM05	1 : 0,5	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O/PTSA	48	8.410	1,1	4,7	36
RAM06	1 : 0,1	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O/PTSA	24	7.470	1,1	n.d. <sup>e</sup>	42
RAM07	1 : 0,1	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O/PTSA	48	11.340	1,2	3,0	73

a. Em todas as reações utilizou-se a quantidade de 0,4 % (m/m).

b. Determinado por GPC.

c. Conteúdo de ácido málico incorporado à cadeia principal calculado por RMN de <sup>1</sup>H.

d. Não observado.

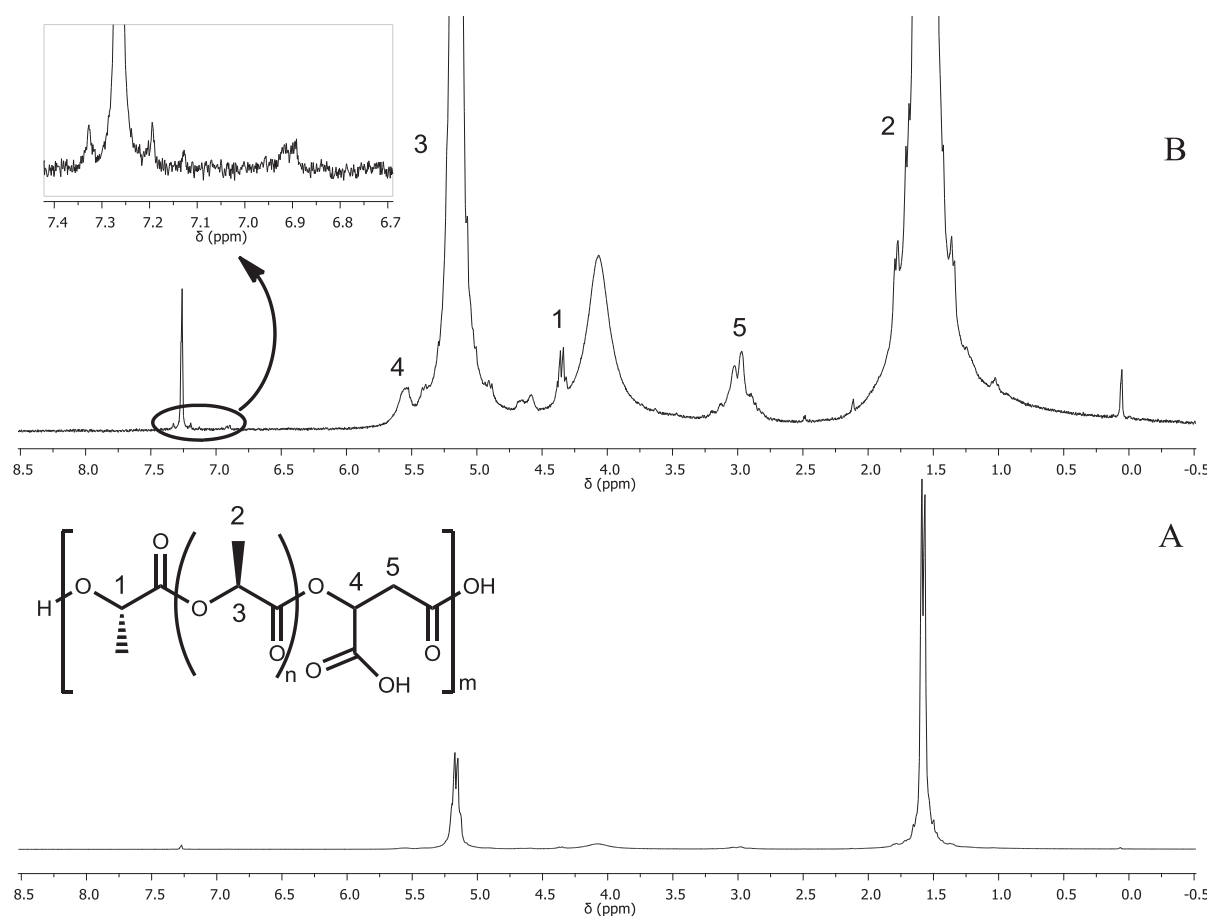
e. Não determinado.

Os baixos valores encontrados para a massa molecular do polímero sintetizado podem estar relacionados à natureza trifuncional do monômero de DL-ácido málico, o que levaria à possíveis terminações de cadeia. Além disso, a saturação do solvente da reação com a água eliminada durante o processo pode ter contribuído para o estabelecimento do equilíbrio da reação, dificultando o deslocamento para a obtenção de massas moleculares mais altas. Apesar de quantidades equivalentes entre o oligômero de PLLA e do DL-ácido málico terem sido utilizadas, houve apenas uma pequena incorporação deste monômero à cadeia do polímero. Isso decorre do fato da baixa solubilidade do ácido málico em tolueno. Ao aquecer a reação a 130 °C esse monômero alcança o seu ponto de fusão, permitindo que o mesmo fique líquido a essa temperatura. Contudo, temperaturas maiores do que 130 °C não poderiam ser utilizadas nessas reações, uma vez que o ácido málico degrada-se acima de 135 °C.

A variação na proporção de ácido málico utilizada na copolimerização com o *o*-PLLA não apresentou mudanças significativas tanto na incorporação do DL-ácido málico à cadeia do polímero, quanto na massa molecular ponderal média das amostras. Entretanto, quando 0,1

equivalentes (10 % em mol) de DL-ácido málico foram utilizados, observou-se um pequeno aumento da massa molecular, assim como um maior rendimento (RAM07). Isto pode ser justificado pelo fato de que a menor presença do monômero trifuncional favorece o acoplamento entre cadeias de *o*-PLLA, diminuindo a quantidade de DL-ácido málico incorporado ao polímero.

A análise de RMN-<sup>1</sup>H para o copolímero sintetizado [24] é apresentada na figura 34, onde o espectro B corresponde a uma ampliação das intensidades dos sinais do espectro A.



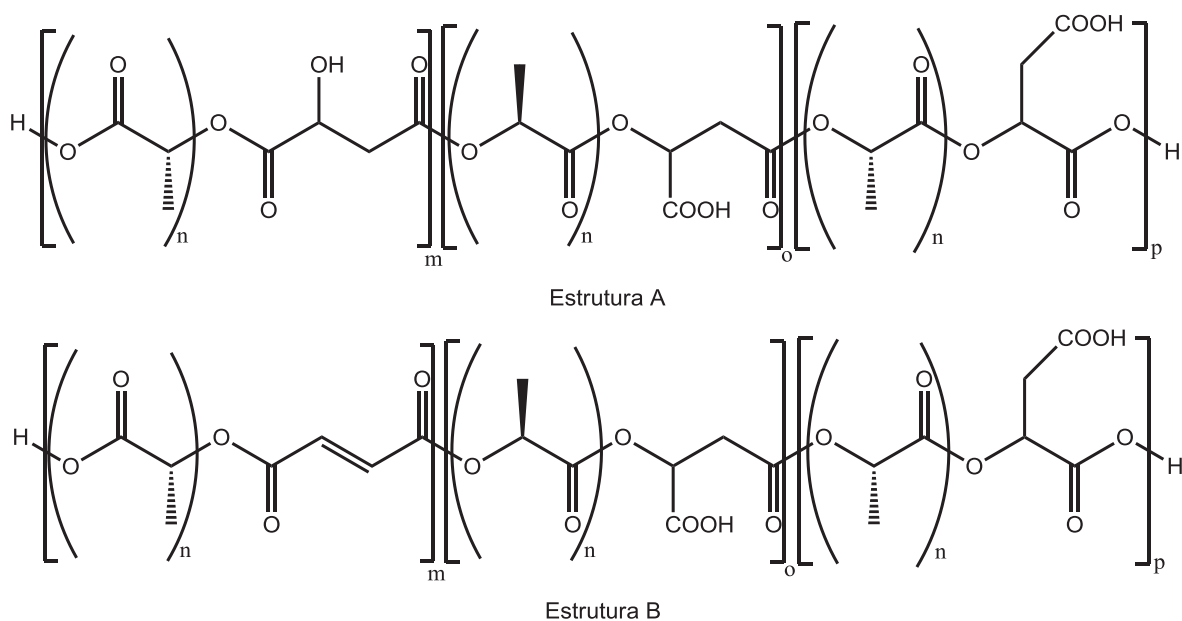
**Figura 34.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H para o poli(L-ácido lático-*co*-DL-ácido málico) obtido a partir das reações de policondensação em tolueno. (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

O espectro de RMN de hidrogênio para o PLLAMA mostra um dublete e um quarteto em  $\delta$  1,58 e  $\delta$  5,18 ppm (sinais 2 e 3, respectivamente), correspondentes aos hidrogênios das unidades repetitivas de ácido lático presente no polímero, e um quarteto em  $\delta$  4,36 ppm (sinal

1) referente ao hidrogênio CH da unidade terminal da cadeia do PLLA. Através da ampliação do espectro do copolímero em B é possível verificar a presença dos sinais correspondentes ao DL-ácido málico. Dessa maneira, verifica-se a presença de um multiplete em  $\delta$  3 ppm correspondente aos hidrogênios metilênicos do DL-ácido málico e um multiplete em  $\delta$  5,56 ppm correspondente ao CH ligado à carboxila pendente na cadeia principal.

Entretanto, sabendo que o substrato DL-ácido málico possui três funcionalidades presentes na sua molécula, seria esperado a formação de diferentes estruturas do polímero. Isso pode ser verificado pela presença de um multiplete em  $\delta$  4,63 ppm, o qual foi atribuído a um sinal de CH vizinho a um grupo hidroxila, resultante da reação de duas cadeias do oligômero de PLLA com as carboxilas do DL-ácido málico. Não obstante, observa-se também a presença de alguns sinais em  $\delta$  6,9 ppm (região ampliada do espectro B), os quais corresponderiam aos hidrogênios de uma dupla ligação carbono-carbono, resultante da eliminação destes grupos hidroxilas devido tanto à temperatura, quanto à presença do sistema catalítico no meio reacional. Além disso, a presença de duas funções carboxilas na estrutura do DL-ácido málico permitiria a obtenção de polímeros com funções carboxilas primárias e secundárias pendentes à cadeia do polímero, embora esta suposição não tenha sido confirmada a partir do espectro da figura 34. Outro fato não confirmado através das análises de RMN de  $^1\text{H}$  foi a possível presença de ramificações de cadeias laterais à cadeia principal do PLLAMA.

Assim, pode-se pressupor que o copolímero obtido através da reação entre o oligômero de PLLA [22] e o DL-ácido málico [23] pode ser constituído de uma mistura de duas possíveis estruturas, conforme representado na figura 35.



**Figura 35.** Prováveis estruturas para o PLLAMA obtido por polimerização em etapas.

A fim de aumentar tanto a massa molecular, quanto o rendimento dos polímeros sintetizados, investigou-se a obtenção do PLLAMA [24] em reações em massa (na ausência de solventes), utilizando alto-vácuo para a remoção da água presente na reação. Assim, o oligômero de PLLA e o DL-ácido málico foram adicionados a um frasco de reação, na presença do catalisador  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{PTSA}$  e a reação foi conduzida sob vácuo a  $130\text{ }^\circ\text{C}$  e agitação magnética. Os resultados desses experimentos são mostrados na tabela 12.

**Tabela 12.** Polimerizações entre o oligômero de PLLA e DL-ácido málico sob vácuo.

Entrada	<i>o</i> -PLLA : DL-AM	Catalisador <sup>a</sup>	t (h)	$M_w$ ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) <sup>b</sup>	$M_w/M_n$	% AM <sup>c</sup>	R (%)
RAM08	1 : 1	$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6	5.850	1,1	5,0	16
RAM09	1 : 1	$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{PTSA}$	6	11.890	1,5	7,0	30
RAM10	1 : 1	$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{PTSA}$	12	12.640	1,1	7,8	20
RAM11	1 : 0,5	$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{PTSA}$	6	6.700	1,1	4,3	48
RAM12	1 : 0,1	$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{PTSA}$	6	6.620	1,1	6,3	53

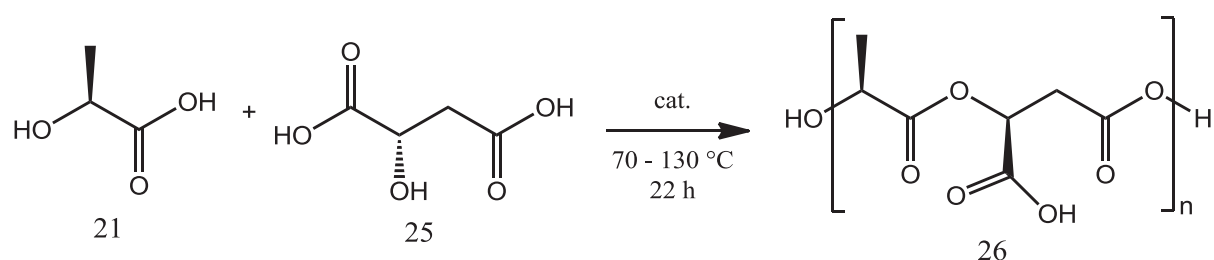
a. Em todas as reações utilizou-se a quantidade de 0,4 % (m/m).

b. Determinado por GPC.

c. Conteúdo de ácido málico incorporado à cadeia do polímero, calculado por RMN de  $^1\text{H}$ .

Assim como observado nas reações em tolueno, o melhor sistema catalítico consistiu na adição de um co-catalisador à reação (RAM09). A variação na proporção dos reagentes resultou na obtenção de polímeros com massas moleculares mais altas quando uma proporção equivalente dos reagentes foi utilizada (RAM09 e RAM10). Contudo, a execução das reações de polimerização entre o *o*-PLLA e o DL-ácido málico na ausência de solvente favoreceu a obtenção do PLLAMA [24] com massas moleculares semelhantes e até superiores em comparação com as realizadas em tolueno, mas com tempos de reação muito menores. Esse resultado pode estar associado ao fator entrópico, uma vez que as moléculas de DL-ácido málico estão mais próximas das moléculas do oligômero de PLLA em razão da ausência de solvente. Essa condição se reflete, também, na quantidade ligeiramente superior de DL-ácido málico incorporado à cadeia do PLLAMA. Apesar disso, os rendimentos obtidos para estas reações foram muito baixos.

As reações de polimerização entre o oligômero de poli(L-ácido láctico) e o DL-ácido málico, tanto em tolueno como em massa, não resultaram na obtenção de copolímeros com altas massas moleculares, além de baixos rendimentos serem observados. Sendo assim, outro procedimento foi empregado para a obtenção do poli(L-ácido láctico-*co*-L-ácido málico). Para isso, ao invés da utilização da mistura racêmica do ácido málico, utilizou-se o seu isômero L-ácido málico [25] (esquema 9). Essa variação foi realizada para investigar se o monômero quiral poderia tanto melhorar os resultados obtidos durante as polimerizações, quanto proporcionar possíveis interações entre o polímero quiral e os receptores celulares.



**Esquema 8.** Síntese do PLLALMA [26] a partir de uma solução aquosa de L-ácido láctico e de L-ácido málico.

Os polímeros obtidos a partir desse novo procedimento não precipitaram em etanol, muito provavelmente por causa da alta proporção de ácido málico presente no copolímero. Os resultados dessa investigação estão contidos na tabela 13.

**Tabela 13.** Polimerizações utilizando solução aquosa de L-ácido láctico e L-ácido málico.

Entrada	AL:AM	Catalisador	$M_w$ (g.mol <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	$M_w/M_n$	% AM <sup>d</sup>	R (%)
RAM13	1:0,5	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O/PTSA <sup>a</sup>	1.550	3,6	42	65
RAM14	1:0,3	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O/PTSA <sup>a</sup>	2.430	3,5	-- <sup>e</sup>	55
RAM15	1:0,2	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O/PTSA <sup>a</sup>	2.490	5,7	-- <sup>e</sup>	54
RAM16	1:0,1	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O/PTSA <sup>a</sup>	4.860	3,3	-- <sup>e</sup>	47
RAM17	1:0,2	Sc(OTf) <sub>3</sub> <sup>b</sup>	6.700	1,4	18	77

a. Quantidade de 0,4 % (m/m).

b. Quantidade de 0,2 % (m/m).

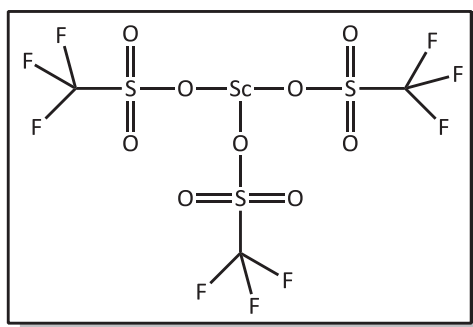
c. Determinado por GPC.

d. Conteúdo de ácido málico incorporado à cadeia principal calculado por RMN de <sup>1</sup>H.

e. Conteúdo de ácido málico não determinado em razão da sobreposição de sinais no RMN de <sup>1</sup>H.

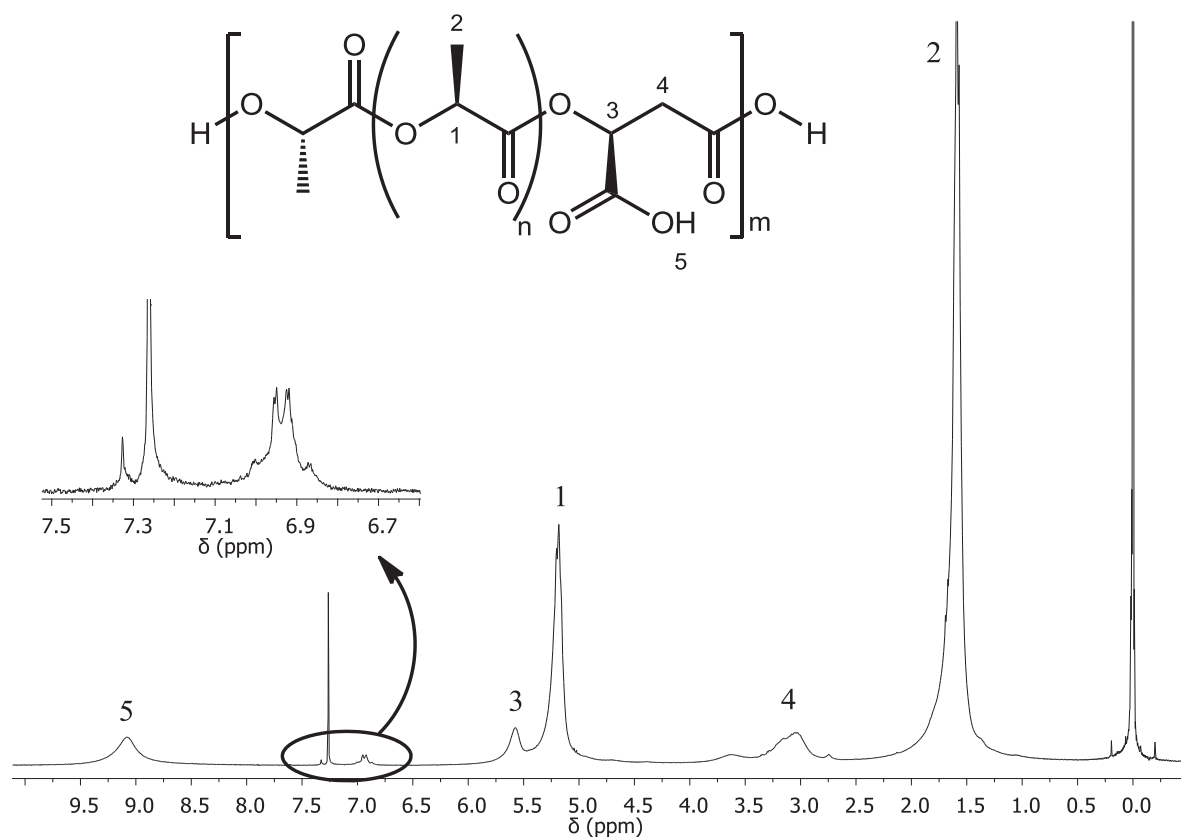
Quando o sistema catalítico SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O/PTSA foi utilizado, observou-se que quanto maior a proporção inicial de ácido málico empregada, menor a massa molecular obtida para o polímero, apesar da alta incorporação de L-ácido málico ao polímero da reação RAM13. Esse resultado também pode ser atribuído ao caráter trifuncional do L-ácido málico, o qual poderia estar causando terminações de cadeia e impedindo o crescimento do polímero. O teor de L-ácido málico presente nas amostras RAM14, RAM15 e RAM16 não puderam ser determinados através de RMN de hidrogênio por causa da sobreposição dos sinais das unidades repetitivas dos ácidos láctico e málico.

Porém, quando optou-se pelo uso do catalisador triflato de escândio (Sc(OTf)<sub>3</sub>, figura 36), observou-se uma significativa melhoria na síntese do PLLALMA em todos os aspectos: massa molecular mais elevada que seus correspondentes sintetizados com o sistema SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O/PTSA, baixa polidispersidade; uma excelente incorporação de L-ácido málico à cadeia do polímero, assim como um bom rendimento (RAM17). A presença de três grupos fortemente eletro-retiradores na estrutura do catalisador pode ter favorecido a coordenação do centro metálico desse catalisador com a função carboxila das espécies no meio reacional, proporcionando uma significativa diminuição na energia de ativação da reação e resultando na obtenção de um copolímero com características bastante interessantes.



**Figura 36.** Estrutura molecular do catalisador triflato de escândio.

O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio para o copolímero obtido da reação RAM17 está mostrado na figura 37. Diferentemente do espectro apresentado na figura 34 para as reações empregando o oligômero de PLLA, observa-se claramente os sinais correspondentes aos hidrogênios presentes na estrutura da cadeia do polímero, sem a necessidade de ampliações do espectro para a visualização dos sinais.



**Figura 37.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do copolímero PLLALMA [26]. (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

O espectro da figura 37 apresenta um sinal alargado em  $\delta$  9,1 ppm, o qual é atribuído ao hidrogênio da função carboxila, comprovando que o polímero possui uma intensa presença destes grupos ao longo de sua estrutura. Além disso, o espectro mostra, ainda, os hidrogênios resultantes da eliminação de funções hidroxila para a formação de uma dupla ligação em  $\delta$  6,93 ppm. Como consequência da natureza mais ácida do catalisador triflato de escândio é possível que praticamente todas as hidroxilas que eventualmente estariam presentes no copolímero tenham sido eliminadas durante a reação, uma vez não se observam sinais de CH vizinhos às funções OH. Análises de RMN para essa amostra em DMSO, tanto para hidrogênio como para  $^{13}\text{C}$ , podem ser visualizados nas figuras 86 e 87, nas páginas 186 e 187, respectivamente.

Visto que uma das principais características deste copolímero é a presença de diversas funções carboxilas ao longo de sua cadeia, o índice de acidez (IA) deste material foi verificado através da titulação com uma base. O valor de IA foi calculado segundo a equação:

$$\text{IA} = \frac{V_m \cdot C \cdot \text{MM}}{m}$$

onde  $V_m$  é o volume médio da solução da base utilizada para a titulação das amostras, C é a concentração da solução de base, MM é a massa molecular da base empregada e m é a massa de amostra utilizada. Essa análise resultou em um valor de 110 mg de base (NaOH) para cada grama de amostra de polímero. Para efeitos de comparação, um PLLA com massa molecular de cerca de  $5.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  foi sintetizado empregando o mesmo catalisador de escândio. A titulação desse polímero com a mesma base resultou em um valor de índice de acidez de 29 mg de base para cada grama de polímero, mostrando que o copolímero PLLALMA [26] sintetizado possui um alto teor de carboxilas em sua estrutura.

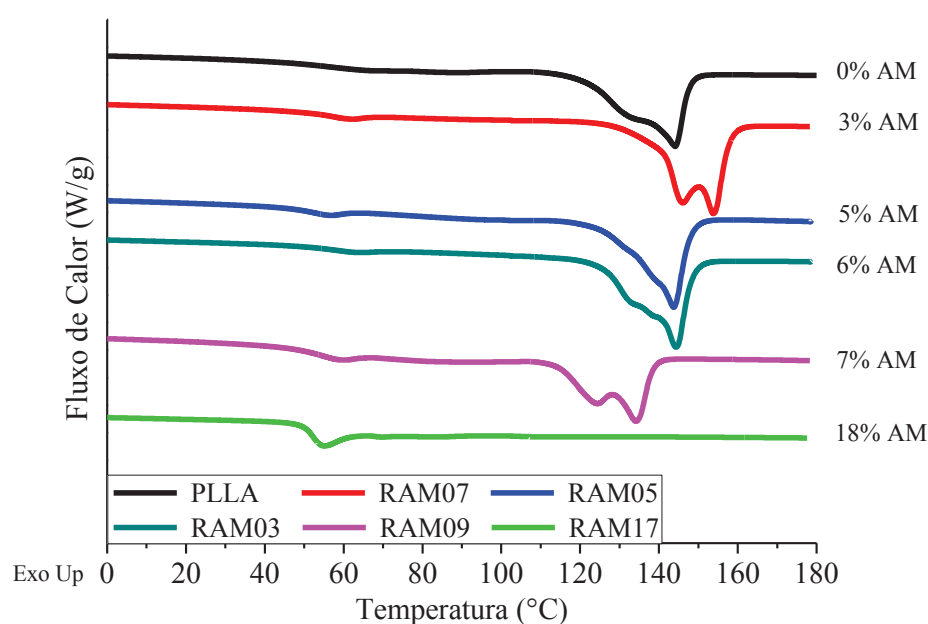
### 5.3.1 Propriedades térmicas dos copolímeros contendo ácido málico

Os copolímeros sintetizados foram submetidos às caracterizações por calorimetria exploratória diferencial (DSC) para a avaliação de suas propriedades térmicas. A rampa de aquecimento utilizada foi de  $20 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  e as análises foram conduzidas sob atmosfera de  $\text{N}_{2(\text{g})}$ . Para esses experimentos foram selecionadas as amostras RAM03, RAM05, RAM07, RAM09 e RAM17, além de um PLLA de massa molecular ponderal média de cerca de  $7.500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



para comparação. A escolha dessas amostras levou em consideração as diferentes quantidades de ácido málico incorporado ao polímero.

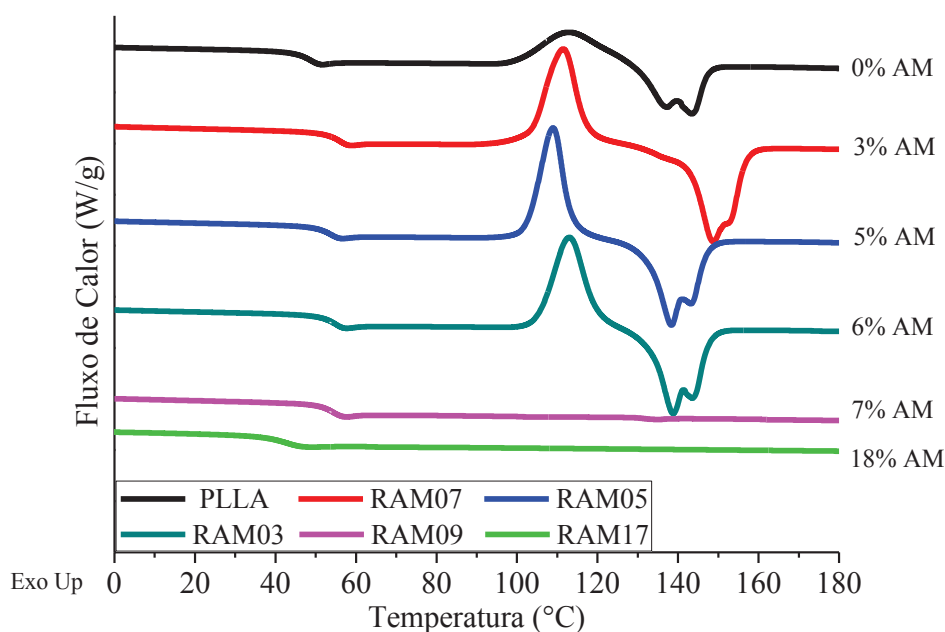
O primeiro ciclo de aquecimento das amostras durante a análise de DSC teve por objetivo a eliminação da história térmica dos materiais (figura 38). À exceção da amostra RAM17, a qual foi sintetizada a partir dos monômeros L-ácido málico e L-ácido láctico, observou-se que todos os demais copolímeros obtidos a partir do *o*-PLLA, mostraram-se em um estado semicristalino. Para essas amostras semicristalinas, verificou-se que houve uma tendência de diminuição da temperatura de fusão dos copolímeros com o aumento do teor de ácido málico nos materiais, ou seja, o ácido málico dificulta a formação dos cristalitos em virtude da diminuição da regularidade das cadeias dos copolímeros. Além disso, observou-se ainda a presença de dois picos de fusão, os quais se referem às duas formas cristalinas dos segmentos de PLLA contidos nas amostras.



**Figura 38.** Termogramas de DSC para os copolímeros de PLLALMA. (1º ciclo de aquecimento)

O segundo ciclo de aquecimento, apresentado na figura 39, mostrou que após o resfriamento das amostras (no qual não foi observado a ocorrência de processo de cristalização), essas encontram-se em um estado amorfo. Isso pode ser observado a partir dos

picos exotérmicos das amostras RAM07, RAM05, RAM03 e para o PLLA de baixa massa molecular. Após as amostras serem novamente aquecidas, o aumento de entropia das macromoléculas permitiu uma reorganização dos segmentos de PLLA, resultando na cristalização dos polímeros e sua posterior fusão. Entretanto, à medida que a composição de ácido málico nos copolímeros aumentou (> 6 % AM), os copolímeros não apresentaram uma cristalização a frio, permanecendo completamente amorfos após o aquecimento (RAM09 e RAM17). Esses resultados estão de acordo com o observado na literatura para o poli(D,L-ácido láctico). Quando a proporção de isômeros D- em uma amostra de poli(D,L-ácido láctico) é igual ou superior a 8 %, esse polímero torna-se completamente amorfo durante o seu reaquecimento na análise de DSC, uma vez que a regularidade da cadeia é interrompida.<sup>172</sup> Para o caso dos copolímeros contendo o L-ácido málico, quantidades iguais ou superiores à 7 % desse monômero também tornaram estes polímeros completamente amorfos em razão da irregularidade proporcionada à cadeia do polímero.



**Figura 39.** Termogramas de DSC para os copolímeros de PLLALMA. (2º ciclo de aquecimento).

Os valores para as temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ) e temperatura de fusão ( $T_m$ ), referentes ao segundo ciclo de aquecimento, são

apresentados na tabela 14, bem como os valores de cristalinidade e entalpias de cristalização e de fusão. Os resultados mostraram que para baixas proporções de ácido málico presentes no copolímero não há diferenças para os valores de transição vítrea entre as amostras. Porém, quando o conteúdo de ácido málico incorporado foi próximo à 20 %, o valor da  $T_g$  foi de 43 °C, abaixo do observado para o PLLA de baixa massa molecular, mas ainda acima da temperatura ideal de 37 °C para utilização em um meio biológico. As temperaturas de cristalização a frio e de fusão observadas referem-se ao segmento de poli(L-ácido láctico) presente em maior proporção, uma vez que o mesmo caracteriza-se por ser semicristalino. Os valores para a cristalinidade dos copolímeros durante o segundo ciclo de aquecimento foram calculados a partir da entalpia de fusão de um cristal perfeito de PLLA. Os valores encontrados para as entalpias de cristalização e de fusão durante o segundo ciclo de aquecimento para as amostras RAM07, RAM05 e RAM03 mostraram-se bastante próximos, o que indica que esses polímeros se encontravam em um estado amorfo antes do aquecimento. Quando os polímeros foram aquecidos ocorreu um rearranjo dos segmentos de PLLA, permitindo a formação de cristais e a obtenção de um polímero semicristalino.

**Tabela 14.** Valores de  $T_g$ ,  $T_c$  e  $T_m$  referentes ao segundo ciclo de aquecimento da análise de DSC para as diferentes amostras de PLLAMA.

Amostra	% AM	$T_g$ (°C)	$T_c$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\chi$ (%) <sup>a</sup>	$\Delta H_c$ (J.g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	$\Delta H_f$ (J.g <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>
PLLA	0	49	112	144	33	30,0	30,6
RAM07	3	56	111	149	59	52,7	55,7
RAM05	5	54	109	138	51	47,6	48,2
RAM03	6	55	113	139	53	49,2	49,9
RAM09	7	54	----	----	----	----	----
RAM17	18	43	----	----	----	----	----

- Cristalinidade da amostra. Calculada a partir da fórmula  $\chi = \Delta H_f / \Delta H_f^\circ \times 100$ , onde o  $\Delta H_f^\circ$  refere-se à entalpia de fusão de um cristal perfeito de PLA, com valor igual a 93,6 Jg<sup>-1</sup>.<sup>164</sup>
- Entalpia de cristalização referente ao segundo ciclo de aquecimento.
- Entalpia de fusão referente ao segundo ciclo de aquecimento.

### 5.3.2 Fabricação de *scaffolds* contendo o copolímero PLLALMA através de *electrospinning*

Após as caracterizações térmicas dos copolímeros de PLLALMA sintetizados, a etapa seguinte consistiu na utilização desses copolímeros para a produção de matrizes de microfibras, visando a sua aplicação como substitutos poliméricos de tecido epitelial. Contudo, apenas o copolímero obtido da reação RAM17 foi empregado nesse estudo em razão ao seu alto grau de funcionalização. Além disso, a sua utilização permitiria a obtenção de uma matriz com capacidade de ancoragem de outras moléculas em sua estrutura, como peptídeos e fatores de crescimento celular.

O polímero PLLALMA [26] não poderia ser empregado diretamente na produção de matrizes de nano/microfibras através de eletrofiação, em razão da baixa massa molecular obtida para esse polímero durante a sua síntese. Assim, um PDLLA amorfo de alta massa molecular foi utilizado para atuar como o “suporte estrutural” da matriz, de maneira semelhante à empregada nos estudos de eletrofiação de *blendas* de poli(ácido láctico) de diferentes massas moleculares.

Desse modo, soluções para eletrofiação foram preparadas em concentrações na faixa de 10 a 12 % (m/V), utilizando uma mistura de diclorometano : etanol (8 : 2) como solvente. A proporção entre os polímeros variou de zero à 30 % de massa total em solução e foram denominados de MFAM100 (sem a adição de PLLALMA), MFAM91 (10 % de PLLALMA), MFAM82 (20 % de PLLALMA) e MFAM73 (contendo 30 % da massa total composta pelo copolímero PLLALMA [26]), onde a designação MFAM corresponde às “MicroFibras de Ácido Málico”. Os parâmetros experimentais utilizados para o *electrospinning*, como a distância entre os eletrodos, a voltagem e o fluxo de saída da solução polimérica, foram os mesmos usados no estudo anterior e os fatores ambientais também não foram considerados.

As concentrações para as soluções utilizadas para a eletrofiação foram avaliadas através de medidas de viscosidade. Para a solução de PDLLA com concentração de 10 % (MFAM100) foi observado a formação de microfibras sem imperfeições (*beads*) e uma viscosidade de 135 cP (tabela 15). Esse valor é menor do que o encontrado para a solução com concentração idêntica, estabelecida durante as investigações para obtenção de

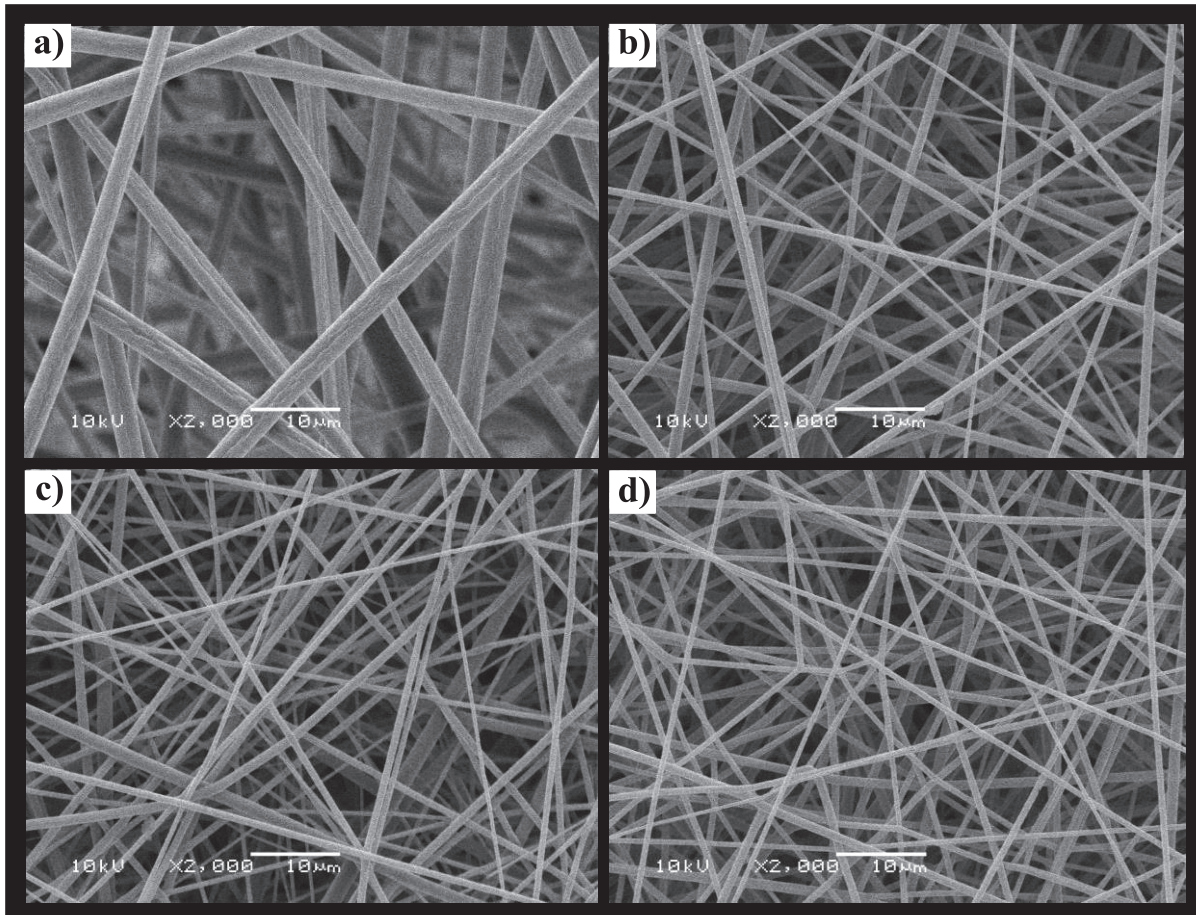
microfibras de *blendas* de PLA (170 cP, MF100, página 72). Essa diferença de viscosidade entre as duas soluções de mesma concentração pode estar associada ao etanol empregado para a preparação das mesmas, uma vez que este foi adquirido de fornecedores diferentes.

Ao adicionar 10 % em massa do PLLALMA [26] e mantendo a concentração total em 10 %, nanofibras perfeitas foram obtidas e a medida de viscosidade dessa solução revelou um valor de 95 cP (MFAM91). Entretanto, ao adicionar 20 % de PLLALMA, mas mantendo-se uma concentração total de 10 % de polímero em solução, o valor da viscosidade diminuiu para 43 cP e matrizes com muitas imperfeições foram obtidas (dado não mostrado). Quando a concentração total de polímeros em solução para a *blenda* contendo 20 % de PLLALMA foi aumentada para 11 %, uma viscosidade de 88 cP foi obtida para a solução, assim como a formação de nanofibras sem a presença de *beads* (MFAM82). Por fim, a adição de 30 % de PLLALMA à mistura em uma concentração total de 12 % resultou em uma viscosidade de 83 cP e a obtenção de uma matriz livre de imperfeições em suas fibras.

**Tabela 15.** Medidas de viscosidade para as *blendas* de PDLA/PLLALMA.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração (%)</b>	<b>Viscosidade (cP)</b>
<b>MFAM100</b>	10	135
<b>MFAM91</b>	10	95
<b>MFAM82</b>	11	88
<b>MFAM73</b>	12	83

A figura 40 mostra as micrografias de microscopia eletrônica de varredura para as matrizes de fibras obtidas a partir da eletrofição das soluções descritas anteriormente. As micrografias mostraram a formação de fibras distribuídas aleatoriamente e sem a presença de imperfeições, à exceção da amostra MFAM100 onde algumas “ranhuras” estão presentes ao longo das fibras. Além disso, a diferença para os diâmetros das amostras que contém o copolímero de PLLALMA em sua composição é perceptível, quando comparados às microfibras de PDLA. Essa observação é resultado das distintas viscosidades encontradas para as soluções, onde as amostras que apresentaram as menores viscosidades (MFAM 82 e MFAM73) resultaram na formação de fibras em escala submicrométrica.



**Figura 40.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura das matrizes de PDLLA/PLLALMA: a) MFAM100, b) MFAM91, c) MFAM82 e d) MFAM73.

O diâmetro médio de cada matriz está mostrado na tabela 16, o qual é resultante da média de 100 medidas para cada amostra. Com exceção da amostra MFAM100, a qual apresentou um diâmetro médio próximo a sua matriz equivalente MF100, as demais matrizes contendo a presença do copolímero poli(L-ácido láctico-*co*-L-ácido málico) apresentaram diâmetros médios abaixo de 1 micrômetro. Dessa forma, pode-se inferir que a eletrofiação de *blendas* de PDLLA/ PLLALMA resultou na obtenção de nanofibras para essas *blendas*.

**Tabela 16.** Diâmetro médio para as matrizes de fibras de *blendas* de PDLLA/PLLALMA.

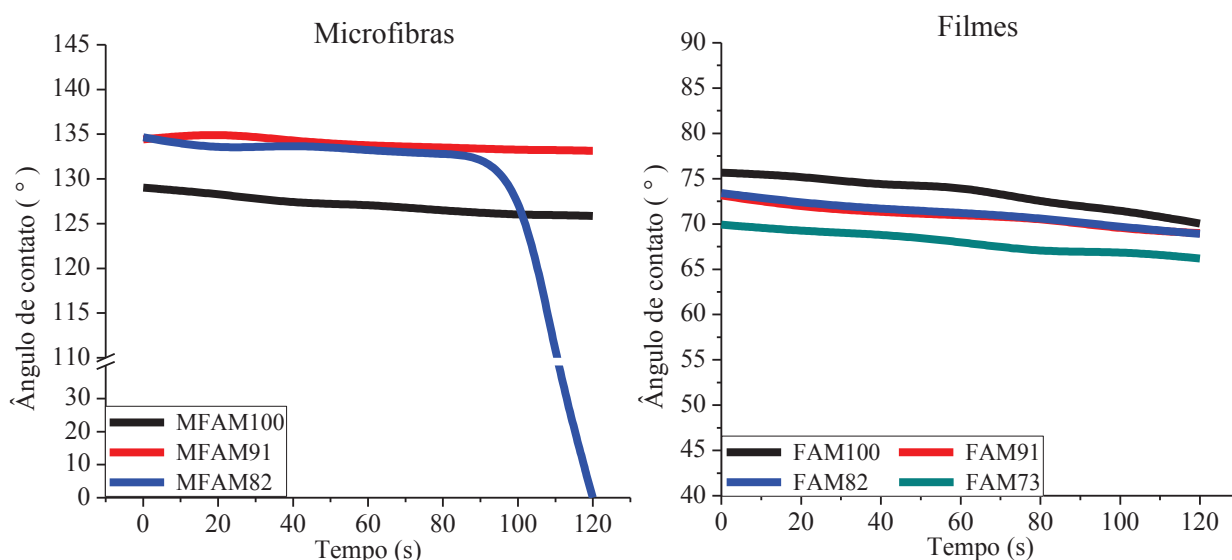
<b>Amostra</b>	<b>Diâmetro (µm)</b>
<b>MFAM100</b>	2,40 ± 0,67
<b>MFAM91</b>	0,93 ± 0,37
<b>MFAM82</b>	0,72 ± 0,29
<b>MFAM73</b>	0,73 ± 0,21



### 5.3.3 Caracterização da superfície das nanofibras e filmes contendo o PLLALMA: medidas de ângulo de contato e de infravermelho

As matrizes de nanofibras de *blendas* de PDLLA/PLLALMA foram submetidas às análises de ângulo de contato. A fim de confrontar os resultados obtidos para essas amostras, filmes dessas misturas foram preparados a partir de soluções contendo as mesmas proporções entre os polímeros empregadas para a fabricação das matrizes de nanofibras. Os polímeros foram solubilizados em uma mistura de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : EtOH (95 : 5) e dispostos em placas de *Petri* para a completa evaporação dos solventes. A utilização de 5 % de EtOH para a produção dos filmes deve-se ao fato de que a solubilização do PLLALMA em diclorometano não é completamente efetiva. Após a secagem a vácuo dos filmes, esses foram submetidos às análises de ângulo de contato e denominados de FAM100, FAM91, FAM82 e FAM73. Os resultados dessas avaliações estão mostrados nos gráficos da figura 41.

Para o gráfico de ângulo de contato das matrizes de micro/nanofibras, observa-se que as amostras MFAM100 e MFAM91 possuem um caráter essencialmente hidrofóbico, apresentando uma pequena diminuição no valor do ângulo de contato ao longo do tempo de análise. A alta hidrofobicidade apresentada para a amostra MFAM100 já era esperada, de acordo com os resultados obtidos anteriormente (figura 22, página 74).



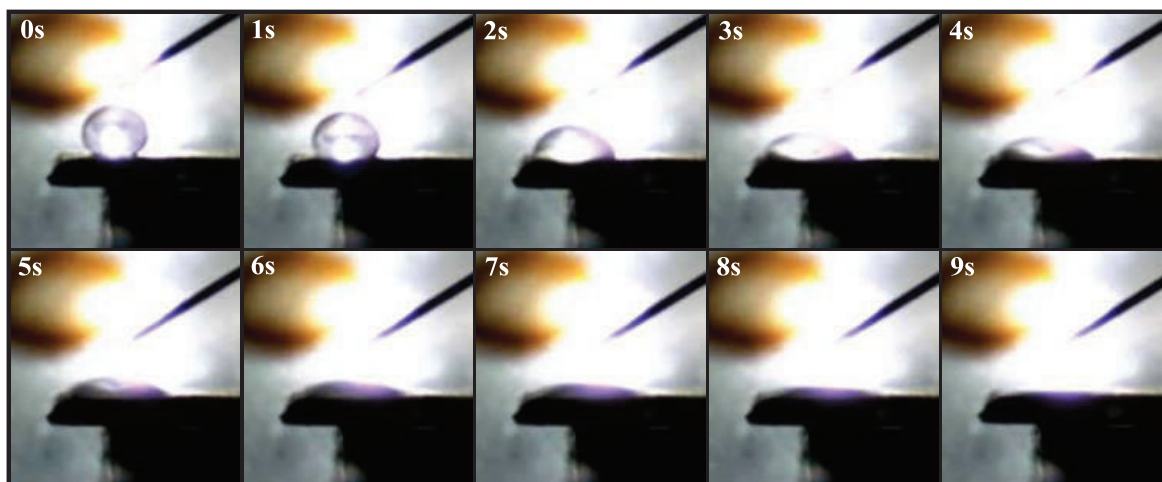
**Figura 41.** Gráficos para as análises de ângulo de contato para as matrizes de micro/nanofibras e filmes de PDLLA/PLLALMA.

Uma alteração no perfil da curva de ângulo de contato da amostra MFAM91 seria esperada em razão da adição de um polímero com características mais hidrofílicas. Porém, observa-se que a amostra apresentou uma característica hidrofóbica durante o tempo de análise investigado. Esse achado poderia indicar um envolvimento do copolímero de PLLALMA [26] no interior das fibras pela fase contínua do PDLLA, resultando na ausência do copolímero na superfície da matriz.<sup>173</sup> Essa hipótese poderia ser confirmada através de análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET) a qual, contudo, não foi realizada nesse trabalho. Além disso, a diferença entre os ângulos de contato iniciais das matrizes MFAM100, MFAM91 e MFAM82 pode ser atribuída aos diferentes diâmetros médios das amostras. Estudos da literatura mostram que há uma tendência no aumento do ângulo de contato das amostras quanto menor for o diâmetro das fibras, a qual é atribuída a uma maior rugosidade da superfície das amostras de matrizes de nanofibras.<sup>174</sup>

O comportamento apresentado para a amostra MFAM82 diferiu daquele observado para as amostras anteriores. Inicialmente, a matriz exibiu uma característica hidrofóbica semelhante à amostra MFAM91. Contudo, a lenta difusão da gotícula de água sobre a superfície da matriz faz com que ocorra o rompimento da tensão superficial entre essa gota e a matriz em cerca de 85 segundos, resultando na completa absorção da gota ao final da análise. Com esse resultado, é possível afirmar que o copolímero [26] já não estaria apenas confinado no interior das fibras, mas presente também em sua interface com o meio externo.

As medidas para o ângulo de contato da amostra MFAM73 não puderam ser realizadas. Em virtude da alta proporção de PLLALMA incorporado à mistura dos polímeros, a matriz de nanofibras tornou-se muito hidrofílica. A figura 42 mostra imagens capturadas durante os primeiros instantes de análise de ângulo de contato desta matriz. Observa-se que a difusão da gota de água inicia logo após o seu contato com o *scaffold*, completando a sua absorção em 9 segundos.



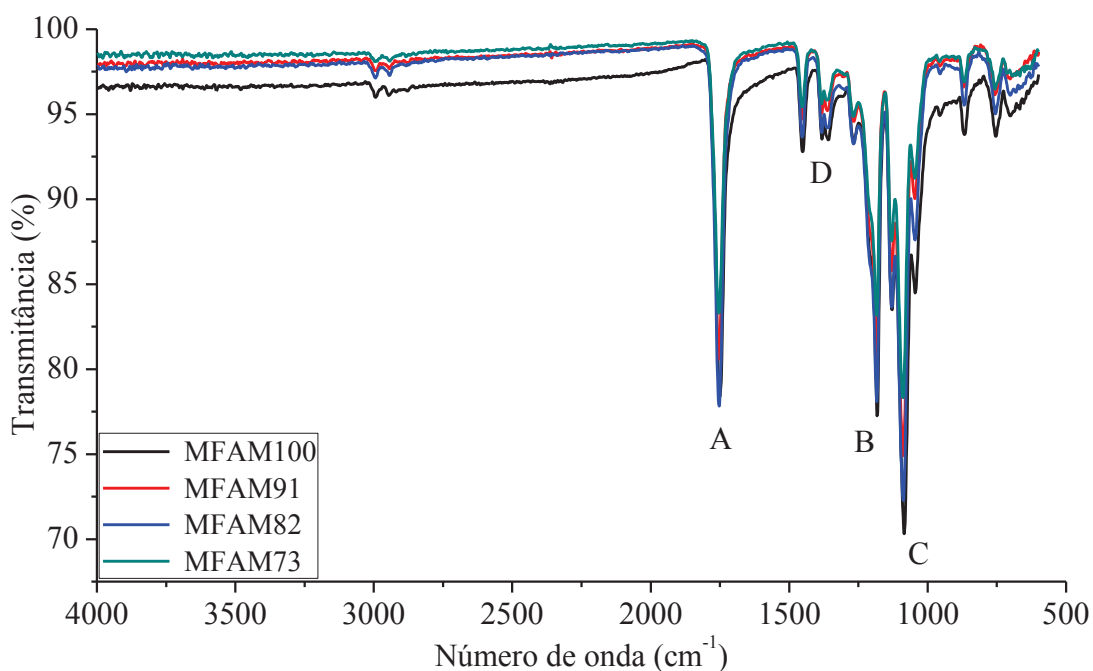


**Figura 42.** Imagens capturadas durante a análise de ângulo de contato para a amostra MFAM73, mostrando a rápida absorção da gota de água sobre a superfície do *scaffold*.

Os resultados obtidos para os valores de ângulo de contato dos filmes de *blendas* de PDLLA/PLLALMA mostraram que houve apenas uma pequena redução em comparação com o filme de poli(D,L-ácido láctico). Ao contrário do evidenciado para as matrizes de nanofibras dessas *blendas*, não se observou uma redução no ângulo de contato dos filmes ao longo do tempo de análise. Esse comportamento foi semelhante ao constatado para os filmes de misturas de poli(ácido láctico) de diferentes massas moleculares (figura 22, página 74). Por ser um material compactado, a ausência de porosidade na amostra não permitiu a propagação da gota d'água para o interior dos filmes.

Além das caracterizações por ângulo de contato das matrizes de *blendas* de PDLLA/PLLALMA, utilizou-se também a técnica de infravermelho por refletância total atenuada (do inglês ATR-IR) para a análise qualitativa de suas superfícies. A figura 43 apresenta os espectros de infravermelho para as fibras contendo o copolímero de PLLALMA.

A presença das bandas de estiramento das carbonilas de ésteres de ambos os polímeros é verificada através do intenso pico de absorção em  $1.755\text{ cm}^{-1}$  (A). Entretanto, não são observadas bandas de carbonila de funções carboxilas em nenhuma das amostras.

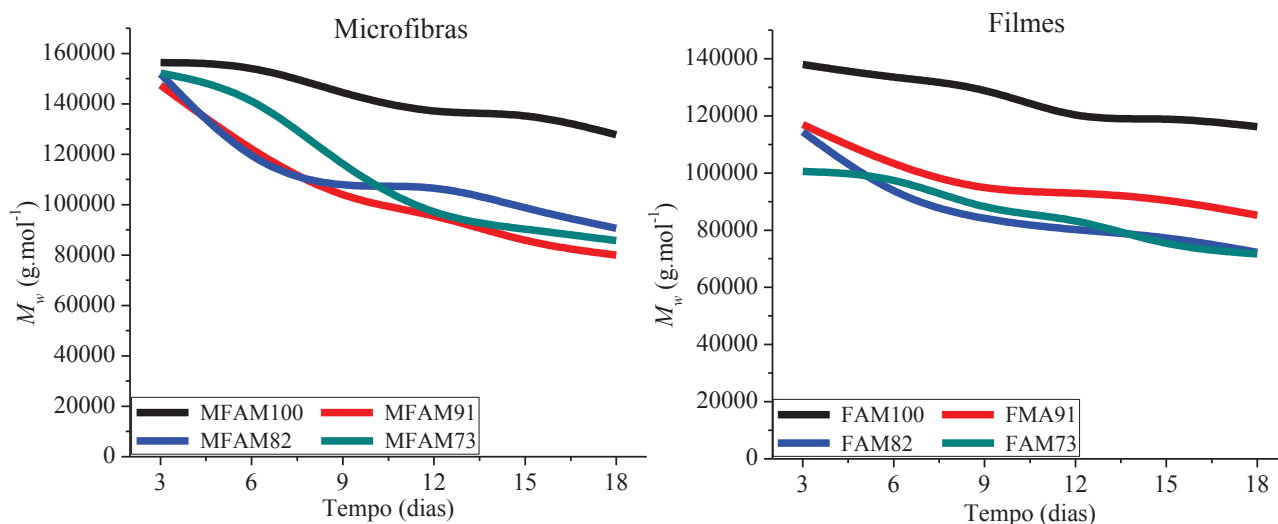


**Figura 43.** Espectros de infravermelho ATR para as matrizes de fibras de *blendas* de PDLA/PLLALMA, onde se destacam algumas das bandas de absorção características para essa *blenda*.

Moléculas contendo funcionalidades de ácido carboxílico caracterizam-se por apresentar bandas de estiramento de carbonila em cerca de  $1.720\text{-}1.700\text{ cm}^{-1}$ , resultado da dimerização das funções ácidas, e bandas muito intensas e alargadas entre  $3.500\text{ e }2.400\text{ cm}^{-1}$ , resultante do estiramento O-H. Quando ácidos carboxílicos são analisados por infravermelho em baixas concentrações, as interações de ligação de hidrogênio já não exercem efeito sobre as carbonilas, as quais deslocam-se para regiões absorção em torno de  $1.760\text{ cm}^{-1}$ .<sup>175</sup> Assim, a ausência de bandas no espectro de IV, tanto para os estiramentos C=O, quanto para os estiramentos O-H das funções carboxilas dos polímeros (especialmente do copolímero [26]), deve-se à baixa “concentração” destas funções presentes nas amostras. Outras bandas observadas nos espectros de IV da figura 43 são referentes aos estiramentos das ligações C-O e C-O-C (B e C, respectivamente) e três bandas na região entre  $1.500\text{-}1.300\text{ cm}^{-1}$  atribuídas às deformações simétricas e assimétricas das ligações C-H dos grupos  $\text{CH}_3$  do poli(ácido láctico) (D).<sup>176</sup> Os filmes de *blendas* de PDLA/PLLALMA também foram avaliados por espectroscopia de infravermelho, mas por apresentarem espectros idênticos aos discutidos para as micro/nanofibras, estes não serão mostrados.

### 5.3.4 Degradação hidrolítica das nanofibras e filmes contendo o copolímero PLLALMA

O efeito da presença do copolímero [26] em *blendas* com o PDLLA também foi avaliado através de experimentos de degradação hidrolítica das amostras. Esses experimentos foram conduzidos de forma semelhante àqueles empregados para a degradação hidrolítica de microfibras e filmes de misturas de PDLLA/PLLA. Contudo, os ensaios foram realizados até o 18º dia de degradação, em temperatura mantida a 37 °C e retirada de alíquotas a cada 3 dias. O motivo do menor tempo de degradação foi relacionado ao fato de que algumas das amostras apresentaram uma rápida perda em massa, não sendo possível prosseguir com o experimento após este período. Outra mudança em relação ao experimento anterior foi o menor intervalo de tempo utilizado para a retirada das alíquotas, de 4 para 3 dias, no intuito de evitar que os produtos de degradação viessem a interferir na degradação das amostras durante o ensaio. As alterações na massa molecular das espécies foram avaliadas por GPC e os gráficos obtidos relacionando a massa molecular das *blendas* ao longo do tempo de degradação são mostrados na figura 44.



**Figura 44.** Gráficos de degradação hidrolítica para as matrizes de nanofibras e filmes de *blendas* de PDLLA/PLLALMA.

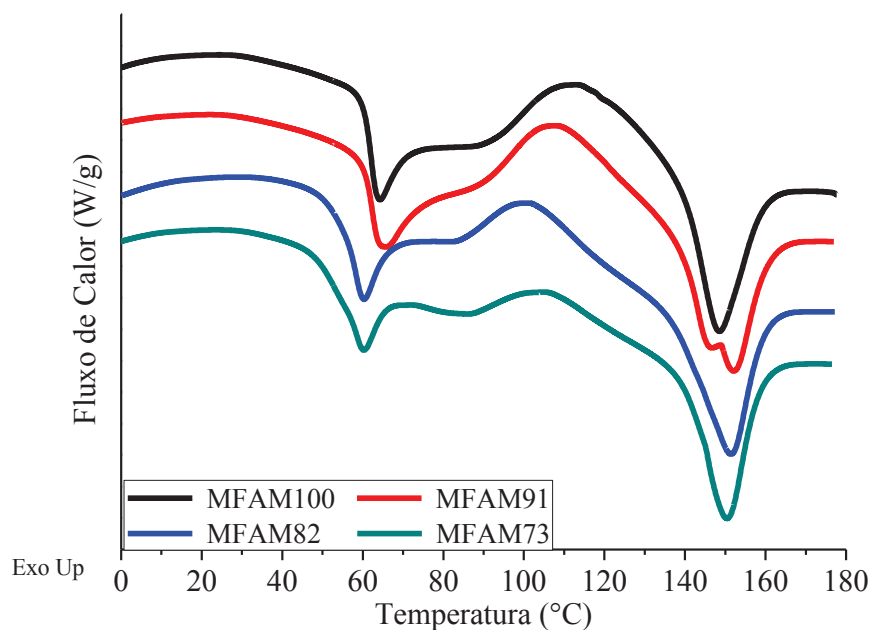
Os perfis apresentados para as curvas de degradação das matrizes de fibras e filmes de PDLLA/PLLALMA mostraram-se muito semelhantes. Em ambos os casos é possível verificar que a adição do poli(L-ácido láctico-co-L-ácido málico) à mistura aumenta a

velocidade de degradação do poli(D,L-ácido lático) de alta massa molecular, a qual decaiu de cerca de  $160.000 \text{ g.mol}^{-1}$  para valores abaixo de  $80.000 \text{ g.mol}^{-1}$  em apenas 18 dias. Entretanto, essa rápida degradação ocorreu principalmente durante os primeiros dias do experimento, especialmente para as amostras de matrizes de nanofibras, onde uma acentuada queda nas curvas de degradação pode ser visualizada. Em razão da rápida degradação das matrizes de nanofibras contendo o PLLALMA, não foi possível prosseguir com os experimentos após o 18º dia, uma vez que houve uma rápida perda de massa dessas matrizes. Sendo assim, para estabelecer comparações, os ensaios com os filmes também foram realizados até o 18º dia de degradação.

Essa característica pode ser atribuída ao PLLALMA presente nas amostras, o qual provocou o aumento na hidrofiliabilidade do material, permitindo a difusão da solução de PBS para o interior das matrizes e, conseqüentemente, uma aceleração na taxa de degradação da amostra. Além disso, a hidrólise desse polímero pode ter levado a uma pequena diminuição do pH do meio que envolvia as fibras de PDLLA, auxiliando no processo de degradação. A partir do momento em que o copolímero [26] é completamente hidrolisado, o que se acredita que ocorra durante os primeiros dias do ensaio, observa-se uma suavização na queda da massa molecular ponderal média do PDLLA. Com relação às diferentes proporções de PLLALMA empregadas nas *blendas*, não foram encontradas diferenças significativas para os perfis de degradação hidrolítica, tanto das matrizes de micro/nanofibras quanto dos filmes.

### **5.3.5 Propriedades térmicas das matrizes de nanofibras e filmes contendo o PLLALMA**

As propriedades térmicas das matrizes de micro/nanofibras e filmes de PDLLA/PLLALMA foram determinadas através de análises de calorimetria exploratória diferencial. A figura 45 mostra o primeiro ciclo de aquecimento para as matrizes de micro/nanofibras das *blendas* em estudo. O comportamento térmico apresentado para estas amostras aproxima-se ao averiguado durante a determinação das propriedades térmicas das microfibras de PDLLA/PLLA. Na região de transição vítrea, observa-se um pico endotérmico referente à entalpia de relaxação das cadeias em virtude da tensão aplicada durante o processo de eletrofiação.



**Figura 45.** Termogramas de DSC para as matrizes de micro/nanofibras de PDLLA/PLLALMA. (1º ciclo de aquecimento)

Um fato interessante, o qual difere do observado em relação às microfibras do trabalho anterior, é a tendência à diminuição na intensidade do pico de cristalização das amostras. Como já mencionado, a cristalização presente nas curvas de DSC para as fibras indica que a matriz encontra-se em um estado amorfo após a eletrofiação. Além disso, a cristalização observada é referente aos segmentos de isômeros L- presentes em maior proporção no polímero PDLLA, o qual é determinado como sendo amorfo. Ao aquecer essas fibras, ocorre uma reorganização das cadeias do polímero (PDLLA) e a formação de cristalitos (regiões cristalinas de polímero), seguido do processo de fusão destes cristais. Para as microfibras de PDLLA/PLLA, as entalpias de cristalização e de fusão possuem valores muito semelhantes, indicando que a fusão ocorrida durante a análise de DSC refere-se aos cristalitos formados durante a análise (dados não mostrados).

Entretanto, na figura 45 observa-se que há uma redução na intensidade do pico de cristalização quanto maior é a proporção de PLLALMA empregada na mistura. As medidas das entalpias de cristalização revelam que para as amostras MFAM82 e MFAM73 ocorre uma diminuição dessa entalpia, enquanto que os valores de entalpia de fusão mantiveram-se constantes (tabela 17). Uma vez que a entalpia de cristalização é menor que a de fusão durante o aquecimento, isso significa que após o processo de eletrofiação essas amostras encontram-

se em um estado semicristalino e não mais amorfo, como o verificado para as amostras MFAM100, MFAM91 e as pertencentes ao estudo anterior (MF100, MF91, MF82, MF73, MF64 E MF55). Ao que tudo indica, a presença do poli(L-ácido lático-co-L-ácido málico) induziu uma cristalização parcial do poli(D,L-lactídeo) durante o *electrospinning*. No entanto, para poder confirmar essa hipótese, análises de difração de Raios-X seriam necessárias para evidenciar a presença desses cristais após a eletrofiação.

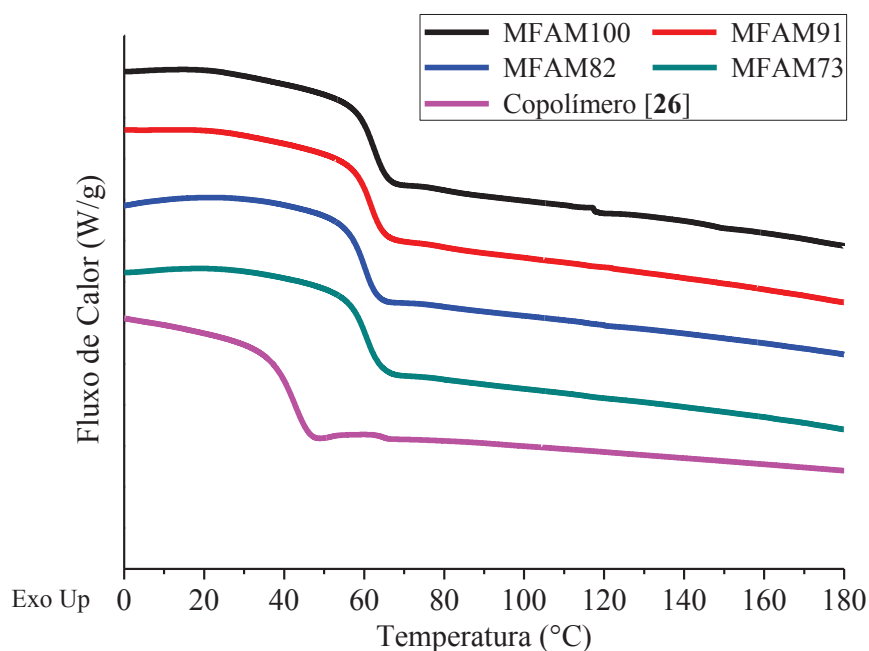
**Tabela 17.** Valores para as entalpias de cristalização e de fusão das matrizes de micro/nanofibras de PDLLA/PLLALMA obtidas através de análise de DSC.

<b>Amostra</b>	$\Delta H_c$ (J.g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	$\Delta H_f$ (J.g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
<b>MFAM100</b>	14,7	15,1
<b>MFAM91</b>	16,5	17,2
<b>MFAM82</b>	7,0	17,8
<b>MFAM73</b>	5,5	17,0

a. Entalpia de cristalização calculada a partir do primeiro ciclo de aquecimento.

b. Entalpia de fusão calculada a partir do primeiro ciclo de aquecimento.

A figura 46 mostra o segundo ciclo de aquecimento para as matrizes de micro/nanofibras de *blendas* de PDLLA/PLLALMA e também para o copolímero [26], a qual mostra que após a eliminação da história térmica das amostras, não ocorrem transições de cristalização e/ou de fusão e a *blenda* caracteriza-se por ser amorfa.



**Figura 46.** Termogramas de DSC para as matrizes de micro/nanofibras de PDLLA/PLLALMA. (2° ciclo de aquecimento)

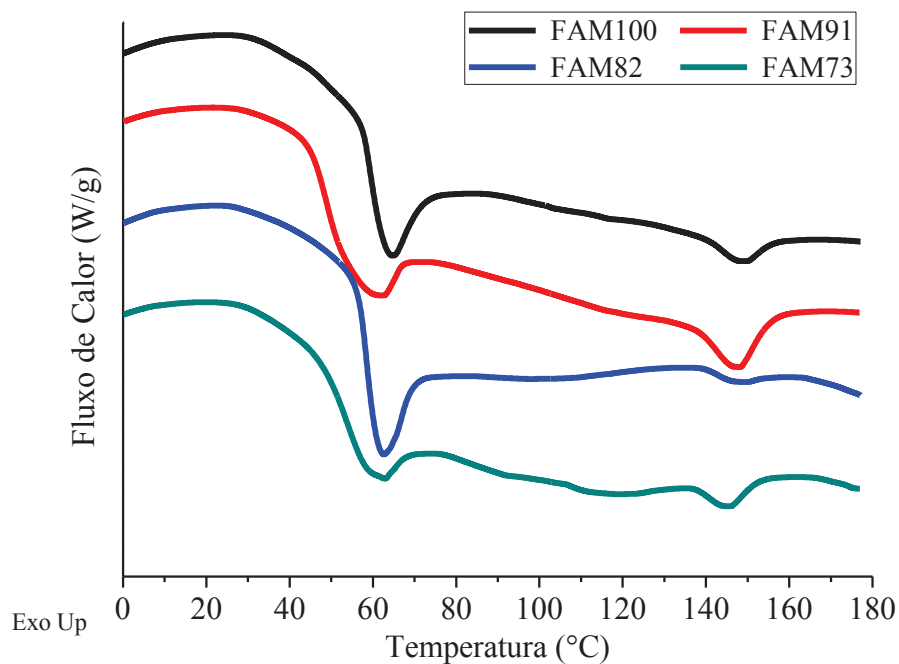
A tabela 18 mostra os valores para as temperaturas de transição vítrea, de cristalização e de fusão para as amostras de matrizes de micro/nanofibras, onde não são observadas mudanças significativas em razão da presença do PLLALMA nas amostras, para ambos os ciclos de aquecimento da análise de DSC. Todavia, a tendência à diminuição dos valores para a entalpia de relaxação das matrizes mostra que o aumento da presença do copolímero [26] na *blenda* provoca uma interrupção na regularidade do acondicionamento das cadeias do PDLLA. Com isso, as cadeias do polímero não são acomodadas de maneira a armazenar a energia adquirida durante a eletrofiação.

**Tabela 18.** Resultados obtidos para as análises de DSC das matrizes de micro/nanofibras de PDLLA/PLLALMA.

Amostra	$T_g$ 1 <sup>a</sup> (°C)	$T_c$ 1 (°C)	$T_m$ 1 (°C)	$T_g$ 2 (°C)	$\Delta H_r$ (J.g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
MFAM100	62,1	114	148,4	62,4	2,8
MFAM91	62,3	108,5	149,1	61,3	4,1
MFAM82	58,3	101,7	151,3	60,1	3,2
MFAM73	58,5	105,7	150,5	60,6	2,4
RAM17	52	----	----	43	----

- Os índices 1 e 2 referem-se, respectivamente, ao primeiro e segundo ciclos de aquecimento.
- Entalpia de relaxação. Calculada através da área excedente à  $T_g$  do primeiro ciclo de aquecimento.

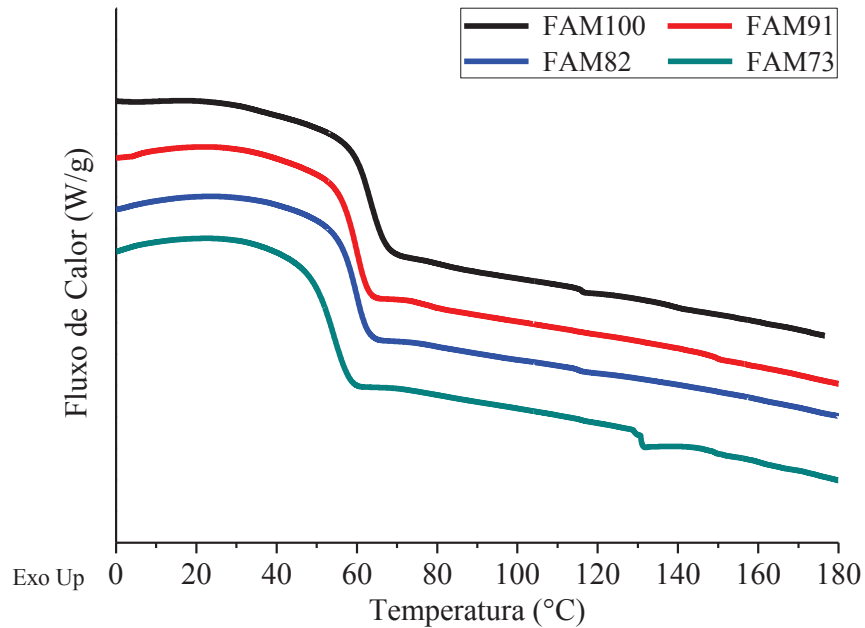
Assim como observado para as *blendas* de PDLLA/PLLA, não foram observados picos exotérmicos de cristalização durante o primeiro ciclo de aquecimento para os filmes de PDLLA/PLLALMA e a presença de picos endotérmicos de fusão indicam que os filmes encontram-se em um estado semicristalino (figura 47). Contudo, verifica-se o aparecimento de um pico de entalpia de relaxação durante a transição vítrea das amostras, embora nenhum tipo de tratamento ou processo tenha sido empregado na preparação dos filmes além da evaporação do solvente.



**Figura 47.** Termogramas de DSC para os filmes de PDLLA/PLLALMA. (1° ciclo de aquecimento)

Após o ciclo de resfriamento, o comportamento dos filmes ficou semelhante ao observado para o segundo ciclo de aquecimento das matrizes de micro/nanofibras (figura 48).





**Figura 48.** Termogramas de DSC para os filmes de PDLLA/PLLALMA. (2º ciclo de aquecimento)

A tabela 19 mostra os valores para as transições observadas durante as análises de DSC para os dois ciclos de aquecimento das amostras de filmes de *blendas* de PDLLA/PLLALMA. Em nenhuma das amostras foram observadas duas temperaturas de transição vítrea. Porém, em consequência da pequena diferença das temperaturas de transição vítrea dos componentes da mistura, a miscibilidade entre os mesmos teria de ser comprovada através de outras técnicas como, por exemplo, DMA. À medida que uma maior proporção do copolímero de PLLALMA foi adicionada à *blenda*, houve uma diminuição da temperatura de transição vítrea, especialmente para a amostra de FMA73. A adição do PLLALMA não alterou a temperatura de fusão das amostras, observada durante o primeiro ciclo de aquecimento.

**Tabela 19.** Valores para as temperaturas de transição, de cristalização, de fusão e as entalpias de relaxação e de fusão para os filmes de PDLLA/PLLALMA obtidos por DSC.

Amostra	$T_g$ 1 (°C) <sup>a</sup>	$T_m$ 1 (°C) <sup>a</sup>	$T_g$ 2 (°C) <sup>a</sup>	$\Delta H_r$ (J.g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	$\Delta H_f$ (J.g <sup>-1</sup> )
FAM100	59,4	148,0	63,1	2,5	1,2
FAM91	48,8	148,4	60,0	1,6	2,6
FAM82	58,4	146,0	59,9	2,9	0,5
FAM73	53,7	146,1	54,3	0,9	1,1
RAM17	52	----	43	----	----

a. Os índices 1 e 2 referem-se, respectivamente, ao primeiro e segundo ciclos de aquecimento.

b. Entalpia de relaxação. Calculada através da área excedente à  $T_g$  do primeiro ciclo de aquecimento.

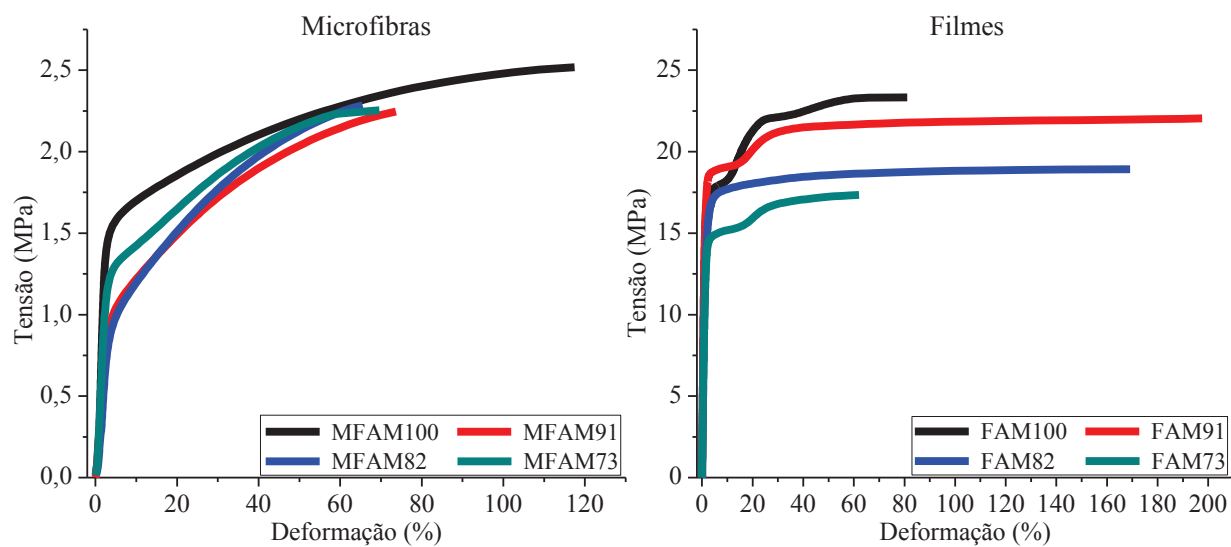
Os resultados encontrados durante as análises de DSC para as entalpias de fusão das amostras de filmes de PDLLA/PLLALMA diferem muito daqueles encontrados para os filmes de misturas de PDLLA/PLLA, sobretudo quando compara-se a amostra F100 com a FAM100. A diferença entre os dois filmes está na sua metodologia de preparação: para a amostra F100, o solvente utilizado foi diclorometano, enquanto que para a amostra FAM100 utilizou-se uma mistura de 95 % CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e 5 % de etanol.

A presença de um não-solvente, como é caso do etanol, em uma mistura de solventes utilizada na preparação de filmes de PLLA pode aumentar a cristalinidade desse polímero, segundo dados obtidos da literatura.<sup>177</sup> Entretanto, como a diferença da pressão de vapor entre o diclorometano e etanol é grande, pode-se supor que o diclorometano evaporou mais rapidamente e a concentração de etanol no meio foi aumentando, dificultando a cristalização. Contudo, não foram encontrados trabalhos na literatura relacionando o efeito da adição de um não-solvente sobre a possível presença de “cristalinidade” na preparação de filmes de PDLLA amorfo.

### 5.3.6 Propriedades mecânicas: análises de tensão x deformação para as matrizes de micro/nanofibras e filmes de PDLLA/PLLALMA

As propriedades mecânicas dos materiais (matrizes de micro/nanofibras e filmes de PDLLA/PLLALMA) foram investigadas através de medidas de tensão *versus* deformação, as quais foram conduzidas a 37 °C para mimetizar as condições de temperatura corporal, e são mostradas na figura 49. Os resultados encontrados para as matrizes de micro/nanofibras

assemelharam-se àqueles determinados para as matrizes de micro/nanofibras de *blendas* de PDLLA/PLLA. A tensão máxima necessária para romper as amostras de matrizes de nanofibras é muito menor em comparação com os respectivos filmes, fato atribuído à elevada porosidade da matriz. Além disso, observa-se que a adição do copolímero [26] ocasionou uma redução no alongamento máximo das amostras de fibras.



**Figura 49.** Curvas de tensão x deformação para as matrizes de micro/nanofibras e filmes de PDLLA/PLLALMA.

Os filmes, no entanto, apresentaram um comportamento diferenciado ao encontrado para os filmes de *blendas* de poli(D,L-lactídeo) de alta massa molecular e poli(L-ácido láctico) de baixa massa molecular (figura 29, página 85). Esse efeito está relacionado com a baixa cristalinidade observada para essas misturas. Enquanto nas *blendas* de PDLLA/PLLA a presença de um PLLA de baixa massa molecular atuava como um agente nucleante, aumentando a cristalinidade da mistura, aqui o copolímero estático PLLALMA exerce o efeito contrário, provocando a diminuição da cristalinidade.

A adição do PLLALMA à blenda resultou em uma melhora significativa nas propriedades mecânicas das matrizes FAM91 e FAM82. Por ser um polímero amorfo, a adição do copolímero [26] pode ter atuado como um plastificante na composição da mistura, o que elevou o alongamento de cerca de 80 % (FAM100) para elongações de 200 % (FAM91) e 170 % (FAM82). A adição de 30 % do copolímero PLLALMA à *blenda* (FAM73), contudo,

ocasionou uma redução no alongamento máximo observada, provavelmente pelo fato de ocorrer uma diminuição dos entrelaçamentos formados pelas cadeias de PDLLA de alta massa molecular. O módulo de Young e o alongamento máximo na ruptura, como esperado, diminuíram com o aumento do teor de PLLALMA.

Enquanto que para a amostra F100 (figura 29 pg. 85) foi encontrado um valor relativamente elevado para o alongamento e uma baixa tensão máxima de ruptura, para o filme FAM100 observou-se o efeito contrário, ou seja, uma elevada tensão máxima de ruptura e um baixo alongamento, além de uma alta resistência à deformação. Uma vez que a cristalinidade da amostra FAM100 (~2 %) é menor do que o filme F100 (~26 %), seria esperado que o segundo filme possuísse uma resistência à deformação maior do que o primeiro. Entretanto, os motivos para esse comportamento nos filmes não foram elucidados. Os dados encontrados na literatura a respeito de ensaios de tensão *versus* deformação de filmes de PDLLA também apresentam a mesma problemática, pois ora apresentam dados com baixa tensão máxima de ruptura,<sup>178</sup> ora apresentam valores com altas tensões de ruptura para as mesmas condições de análise.<sup>179</sup> Futuras investigações poderão ser realizadas para caracterizar adequadamente o comportamento de filmes deste polímero.

A tabela 20 mostra os valores encontrados para as propriedades mecânicas das micro/nanofibras e filmes de PDLLA/PLLALMA durante os ensaios de tensão  $\times$  deformação. As matrizes de micro/nanofibras caracterizam-se por apresentarem baixa resistência à deformação (módulo de Young) e baixa tensão máxima de ruptura, propriedades essas conferidas a sua característica porosa. Além disso, a adição do copolímero [26] à *blenda* resultou em uma diminuição do alongamento máximo em comparação com a matriz de microfibras de PDLLA (MFAM100). Para os filmes, entretanto, observa-se que os valores do módulo de Young são cerca de 10 a 15 vezes maiores aos observados para os filmes de misturas de PDLLA/PLLA e mais de 100 vezes maior para a amostra FAM100. A adição de PLLALMA, ao que tudo indica, atuou como um plastificante na *blenda* dos filmes. Entretanto, a elevação para o módulo de Young para a amostra FAM100, como argumentado anteriormente, não pode ser completamente elucidada através dos resultados obtidos.

**Tabela 20.** Propriedades mecânicas para as *blendas* de matrizes de micro/nanofibras e filmes de PDLLA/PLLALMA.

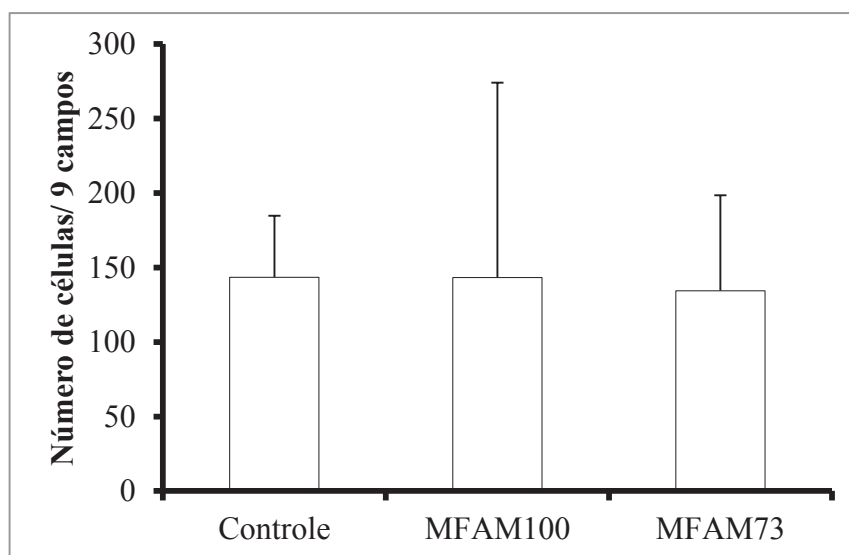
<b>Micro/nanofibras</b>			
<b>Amostra</b>	<b>Módulo de Young (MPa)</b>	<b>Tensão máxima na ruptura (MPa)</b>	<b>Alongamento (%)</b>
<b>MFAM100</b>	91	2,5	118
<b>MFAM91</b>	34	2,4	75
<b>MFAM82</b>	32	2,3	66
<b>MFAM73</b>	54	2,3	70
<b>Filmes</b>			
<b>FAM100</b>	1870	23,1	81
<b>FAM91</b>	1790	22,1	205
<b>FAM82</b>	1260	19,2	169
<b>FAM73</b>	1200	17,4	62

### 5.3.7 Avaliação biológica

Estudos sobre o comportamento das células cultivadas em uma estrutura construída a partir de polímeros sintéticos são imprescindíveis para o desenvolvimento de materiais cuja finalidade é a regeneração de tecidos ou órgãos. Assim, o copolímero [26] foi submetido a experimentos de adesão e viabilidade celular no intuito de avaliar a resposta biológica dessas células frente a este material. Para isso, utilizou-se matrizes de microfibras contendo 30 % em massa do copolímero [26] em *blendas* com o poli(D,L-lactídeo) (MFAM73). Como grupo controle, utilizou-se uma matriz de microfibras de PDLLA sem a adição do copolímero [26] (MFMA100).

Para a realização dos ensaios de adesão e viabilidade celular, as matrizes poliméricas foram afixadas em lamínulas de vidro com 1,5 cm de diâmetro. Essas lamínulas foram distribuídas em placas de cultivo celular de 24 poços e previamente esterilizadas por luz ultravioleta (524nm) por 120 minutos em capela de fluxo laminar. Para os testes biológicos, foi realizada a comparação entre os dois grupos de matrizes com um grupo controle, correspondente às células semeadas diretamente nos poços da placa de poliestireno. As células-troco mesenquimais utilizadas nesses ensaios foram obtidas a partir da polpa de dentes decíduos, popularmente conhecidos como dentes de leite, os quais foram gentilmente cedidos pela Faculdade de Odontologia da UFRGS.

A figura 50 mostra o resultado da adesão celular sobre as matrizes MFAM100 e MFAM73 quando comparado com o grupo controle, observando-se que não houve diferença estatística entre os grupos ( $p=0,99$ ). Os dados mostraram que a adição do copolímero [26] à *blenda* não trouxe nenhum acréscimo na adesão das células à matriz MFAM73, quando comparado com a matriz MFAM100.

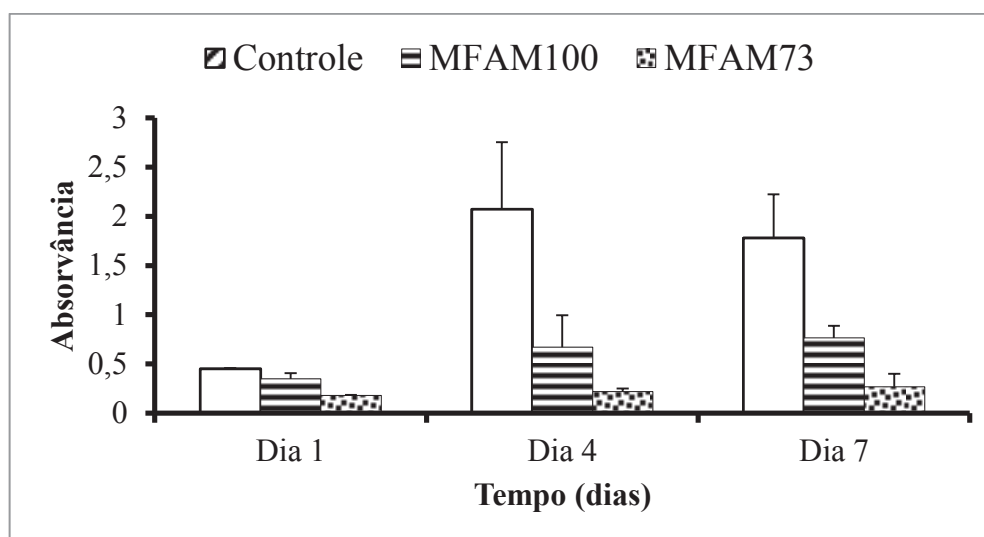


**Figura 50.** Contagem de células aderidas na superfície das matrizes MFAM100, MFAM73 e em relação ao grupo controle. Os dados mostraram que não houve diferença estatística entre os grupos ( $p=0,99$ ).

Os resultados obtidos com os ensaios de adesão celular não corroboraram a hipótese de que a presença do poli(L-ácido lático-*co*-L-ácido málico) em uma matriz de PDLLA poderia proporcionar uma melhora na adesão através de interações entre as células e os grupos funcionais carboxila presentes neste copolímero. Contudo, a escolha para a utilização de uma matriz contendo 30 % do copolímero [26] em ensaios de adesão e viabilidade celular foi realizada antes da realização das medidas para determinação do ângulo de contato destas matrizes. A adesão celular a uma matriz polimérica é dependente do ângulo de contato dessa matriz e que quanto maior é a sua hidrofiliicidade há uma menor tendência para a adesão celular, uma vez pode haver a inibição da adsorção das proteínas celulares sobre a matriz.<sup>66,180</sup> A escolha da matriz MFAM73 para os ensaios biológicos foi, portanto, equivocada, uma vez que esta amostra apresentou a mais alta hidrofiliicidade dentre todas as composições

estudadas. Essa alta hidrofiliicidade apresentada pela matriz MFAM73 pode ter sido um fator determinante para a não-observação de um aumento na adesão das células à matriz em relação aos grupos controle.

Os resultados para o ensaio de viabilidade celular são apresentados na figura 51. A comparação entre os grupos das matrizes de nanofibras, MFAM100 e MFAM73 mostraram-se iguais ( $p=0,16$ ). Entretanto, o grupo controle foi sempre superior quando comparado aos grupos com matrizes ( $p<0,01$ ). Quando os grupos foram analisados em relação ao tempo de cultivo celular, houve diferença estatística entre os grupos para todos os dias de análise ( $p<0,05$ ), sendo que o grupo controle foi maior que a amostra MFAM100 e esta maior que a matriz MFAM73. Esse resultado mostrou que a presença do PLLALMA na matriz MFAM73 não ocasionou um aumento do número de células viáveis com o passar do tempo.

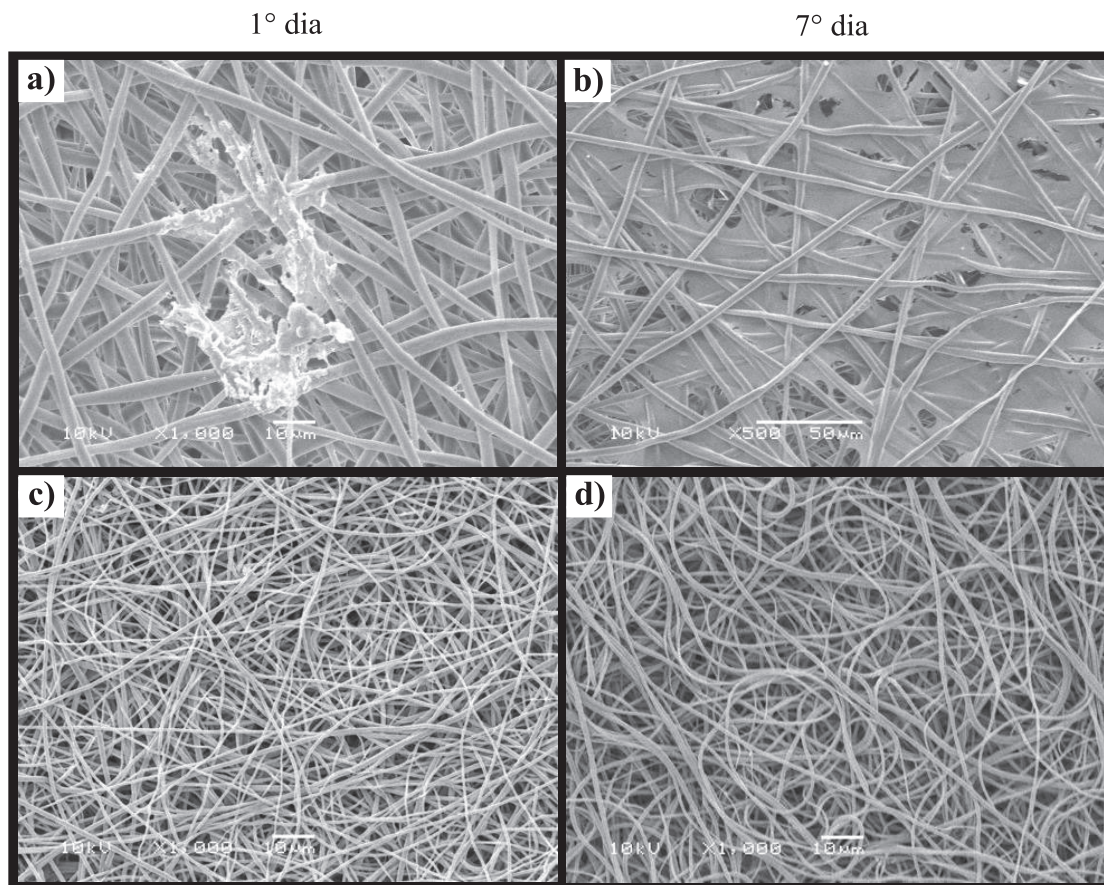


**Figura 51.** Gráfico da análise de viabilidade celular realizada sobre as matrizes MFAM100 e MFAM73, em comparação com o grupo controle.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura para as matrizes de micro/nanofibras no primeiro e sétimo dia de cultivo celular são mostradas na figura 52. Durante o primeiro dia de cultivo (figura 52a) para a amostra MFAM100, são observadas poucas estruturas celulares ao longo dessa matriz. Contudo, no sétimo dia observa-se que as células proliferaram-se por praticamente toda a superfície do *scaffold* (figura 52b). Além disso, percebe-se que as células-tronco mesenquimais proliferaram, também, para o interior da matriz.



Para a matriz MFAM73, entretanto, não foram observadas estruturas celulares sobre a sua superfície. A preparação das amostras para a análise de MEV requer uma desidratação completa dessas matrizes. Esse procedimento é realizado através da utilização de etanol em concentrações crescentes de até 100 % desse solvente, o que pode ter resultado em uma remoção das células presentes nos *scaffolds* (figuras 52c e 52d).



**Figura 52.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura que mostra as matrizes MFAM100 (a e b) e MFAM73 (c e d) no primeiro e sétimo dia de cultivo celular.

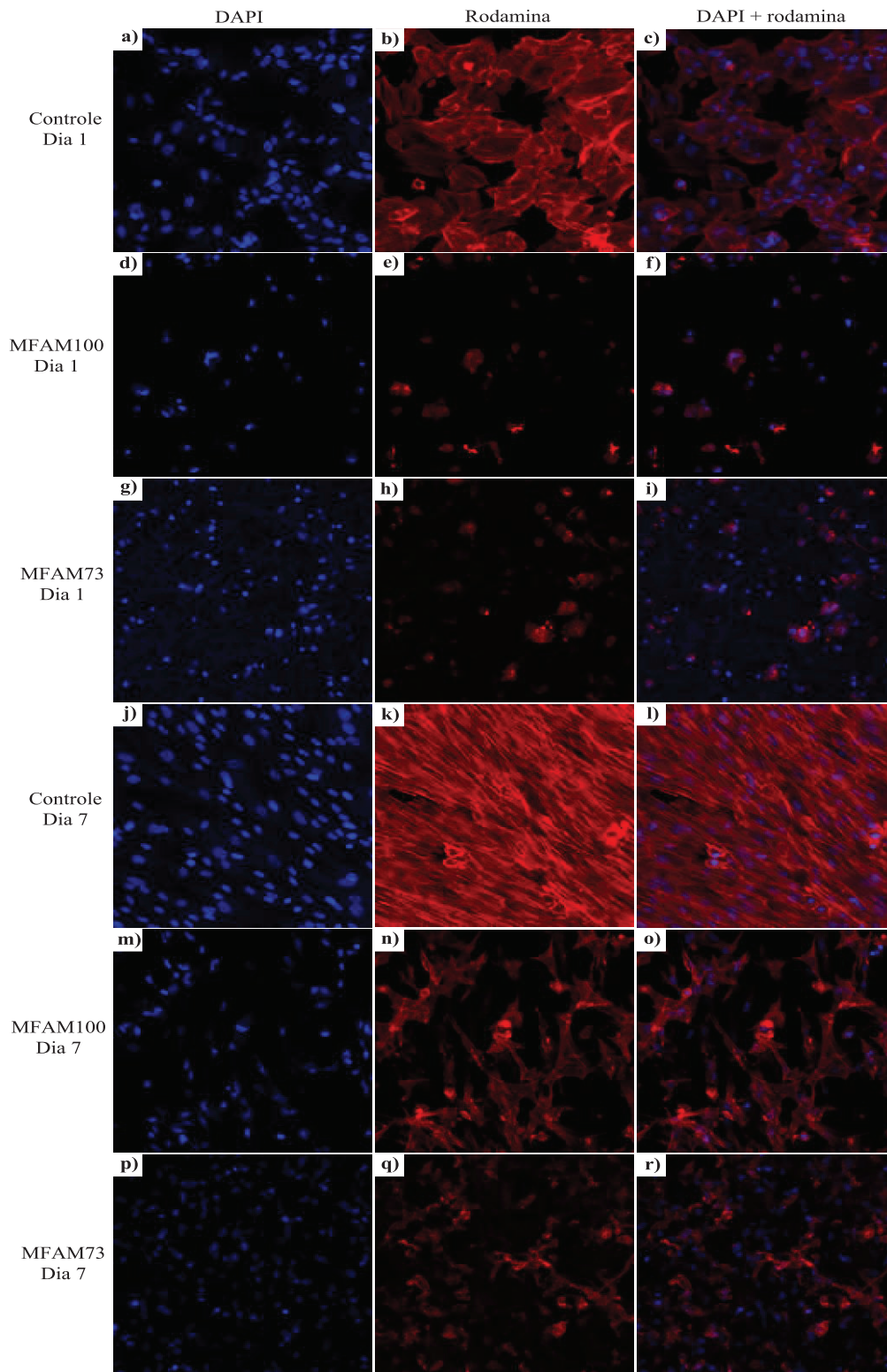
As análises de microscopia confocal foram realizadas para avaliar a morfologia das células sobre as matrizes de micro/nanofibras. A fim de evidenciar os filamentos de fibras de actina do citoesqueleto celular foi realizada a coloração dessas estruturas utilizando faloidina conjugada com rodamina (figura 53, coloração em vermelho). Para identificar os núcleos celulares, a coloração foi realizada mediante a utilização do corante DAPI (figura 53, coloração em azul). A actina é uma proteína que, em conjunto com a miosina e moléculas de



ATP, gera movimentos celulares e musculares. Quando polimerizada, essa proteína forma os microfilamentos de actina que compõem o citoesqueleto celular.

A figura 53 mostra que houve a proliferação das células-troco mesenquimais sobre a superfície das matrizes e do grupo controle. Contudo, observa-se que a maior proliferação ocorreu para os grupos controle, tanto no primeiro dia (figuras 53a, 53b e 53c) quanto no sétimo dia de cultivo (figuras 53j, 53k e 53l). A comparação entre os grupos de matrizes no primeiro dia de cultivo celular mostra que a matriz MFAM73 (figuras 53g, 53h, 53i) possui mais núcleos celulares que a matriz MFAM100 (figuras 53d, 53e e 53f). Porém, mesmo com uma proporção de núcleos celulares maior, observa-se que há poucas estruturas de actina para a matriz MFAM73 no primeiro dia de cultivo celular.

Quando se realiza a comparação entre as matrizes no sétimo dia do experimento, observa-se um maior volume de estruturas de actina para a matriz MFAM100 (figuras 53m, 53n, 53o). Isso poderia indicar que a presença do copolímero de PLLALMA na matriz MFAM73 estaria dificultando a produção de actina pela célula, uma vez que esse copolímero possui uma acidez elevada.



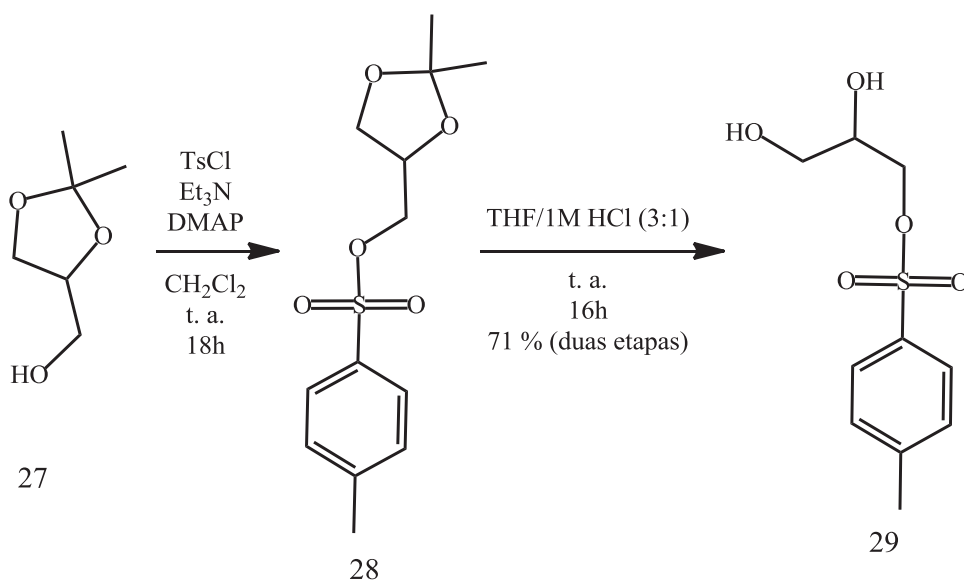
**Figura 53.** Imagens de microscopia confocal para o cultivo celular das amostras do grupo controle (a,b, c – dia 1; j, k, l – dia 7), para a matriz de MFAM100 (d, e, f – dia 1; m, n, o – dia 7) e para a matriz MFAM73 (g, h, i – dia 1; p, q, r – dia 7). A coloração dos núcleos utilizou o corante DAPI, enquanto que os filamentos de actina foram marcados com faloidina conjugada com rodamina.

## 5.4 Síntese e polimerização de monômeros bifuncionais derivados do glicerol

A síntese de biomateriais utilizados para a substituição de tecidos biológicos deve ser realizada levando em consideração a natureza dos monômeros que serão aplicados para a sua obtenção. Desse modo, o emprego de monômeros cujos produtos de degradação participem do metabolismo do corpo humano é altamente recomendado, uma vez que esses materiais irão apresentar uma baixa ou até mesmo ausência de toxicidade ao organismo.

O glicerol (1,2,3-propanotriol) foi descoberto por Carl W. Scheele em 1783 durante a separação de uma mistura de PbO com óleo de oliva preparada a quente.<sup>181</sup> Na natureza, esse composto é encontrado na forma associada com diversos ácidos graxos e é também considerado um composto fundamental no processo metabólico de muitas espécies, sendo um precursor para a síntese de triacilgliceróis e de fosfolípidios. Por ser reconhecido como uma substância atóxica, o glicerol possui uma grande variedade de aplicações, desde o seu uso como aditivo em alimentos, assim como componente em formulações de cosméticos e fármacos.<sup>182</sup> Em virtude dessas características, além do fato de possuir uma grande disponibilidade e baixo custo, optou-se pela utilização do glicerol como um precursor para a síntese de polímeros biocompatíveis e biodegradáveis.

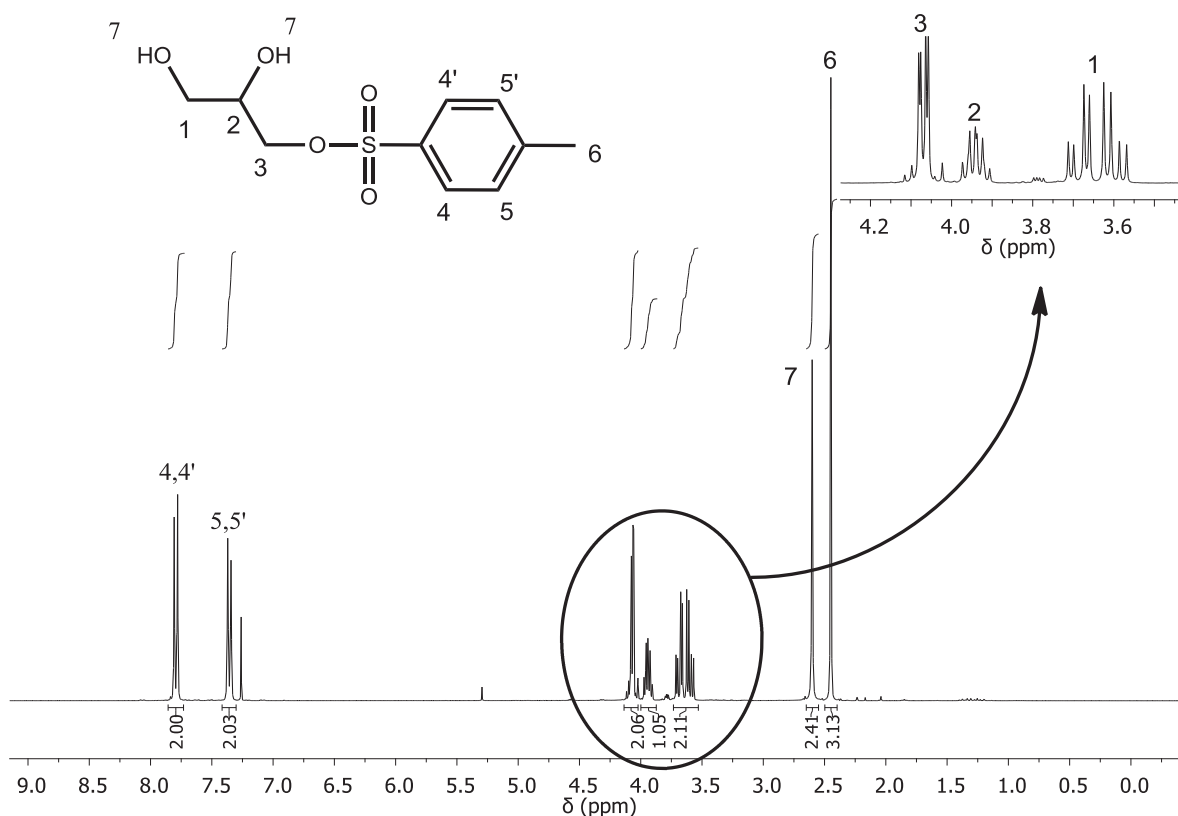
Uma vez que o glicerol é uma molécula trifuncional, adotou-se uma estratégia sintética que permitisse a obtenção de um polímero linear evitando, assim, a formação de uma estrutura reticulada, a qual seria inviável para a sua utilização em técnicas de eletrofição. Desse modo, o produto conhecido comercialmente como solketal [27], um derivado protegido do glicerol, foi empregado como material de partida para a síntese do monômero a ser utilizado para a síntese do poliéster linear. Esse substrato caracteriza-se por possuir uma hidroxila livre, a qual é passível de proteção através da reação com um grupo protetor para hidroxilas. Assim, a síntese do monômero derivado do glicerol iniciou através da proteção da hidroxila do substrato [27] com o cloreto de *p*-toluenosulfonila (esquema 10). A presença do radical *p*-toluenosulfonila no monômero é de grande interesse na obtenção de um poliéster linear, uma vez que este é um bom grupo de saída, favorecendo a posterior substituição desse grupo e a funcionalização do poliéster.



**Esquema 9.** Síntese do diol protegido [29] a partir do solketal [27].

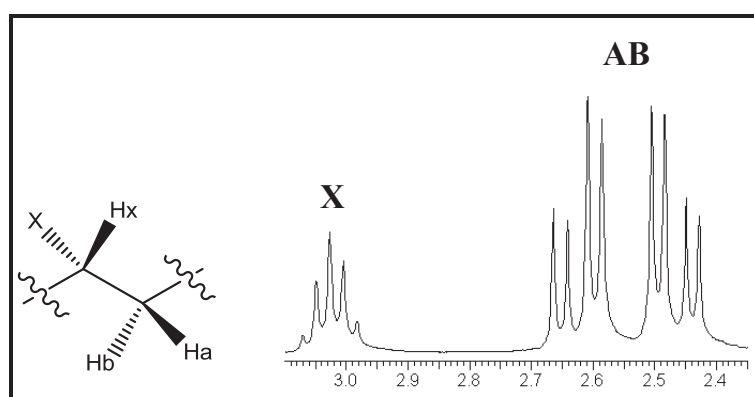
A síntese do tosilato de glicerila [29] foi realizada em duas etapas. Primeiramente, o grupo hidroxila do substrato [27] foi protegido através do emprego de cloreto de *p*-toluenosulfonila, obtendo-se o produto [28] em 95 % de rendimento bruto.<sup>183</sup> O derivado sintético [28] não precisou ser purificado para a etapa seguinte, a qual consistiu na hidrólise ácida do anel isopropilideno em uma mistura de THF/1M HCl (3:1) durante 16 h.<sup>184</sup> O produto bruto obtido foi purificado em coluna cromatográfica de sílica-gel, aplicando a mistura hexano : acetato de etila (2 : 8) para a eluição da amostra, obtendo-se o diol protegido [29] em 71 % de rendimento após duas etapas. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto [29] pode ser visualizado na figura 54.

Na faixa de deslocamento químico entre  $\delta$  4,1-3,6 ppm é possível verificar o conjunto de sinais referentes à unidade do glicerol presente na molécula. O padrão de desdobramentos observado refere-se a um sistema do tipo ABX, o qual se caracteriza pelo acoplamento entre hidrogênios geminais ao mesmo tempo em que estes hidrogênios acoplam-se com um outro hidrogênio vicinal (figura 55). Esses acoplamentos originam o aparecimento de um duplo duplo dubleto (*ddd*) em  $\delta$  3,7 ppm, referente aos hidrogênios da posição C1 e de um multiplete em  $\delta$  3,95 ppm, referente aos hidrogênios da posição em C2, observados na região ampliada da figura 54.



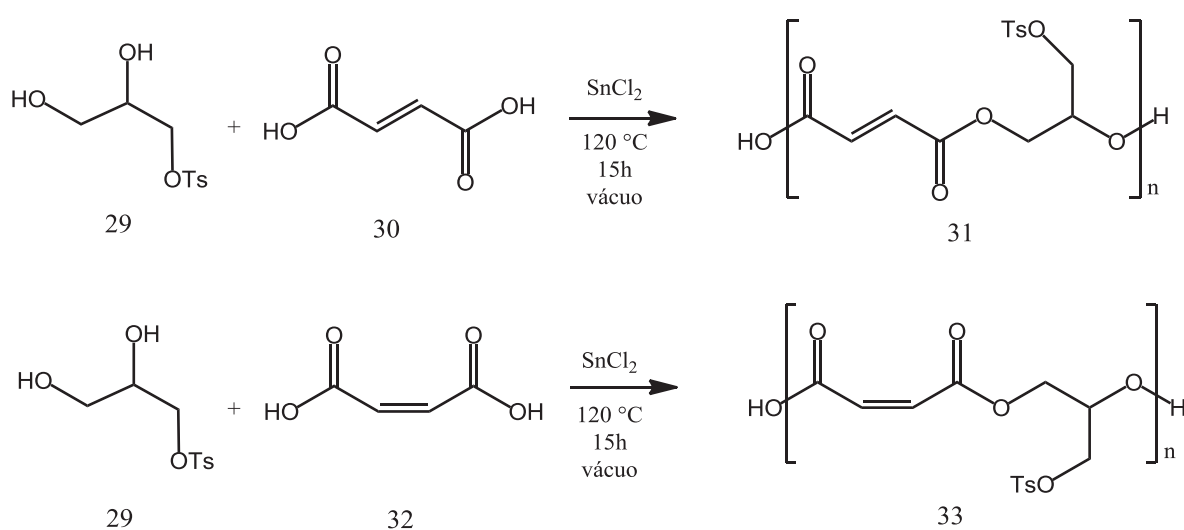
**Figura 54.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o tosilato de glicerila [29]. (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

O mesmo desdobramento seria esperado para os hidrogênios metilênicos do carbono 3, mas a presença do grupo sulfonila alterou a densidade eletrônica para estes hidrogênios e o acoplamento geminal não ocorreu. Desse modo, observa-se apenas um duplo dubleto em  $\delta$  4,1 ppm. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT (figura 75, página 175) confirma a estrutura para o produto [29], apresentando todos os sinais característicos desta molécula.



**Figura 55.** Ilustração para um sistema do tipo ABX, observados em espectros de RMN.

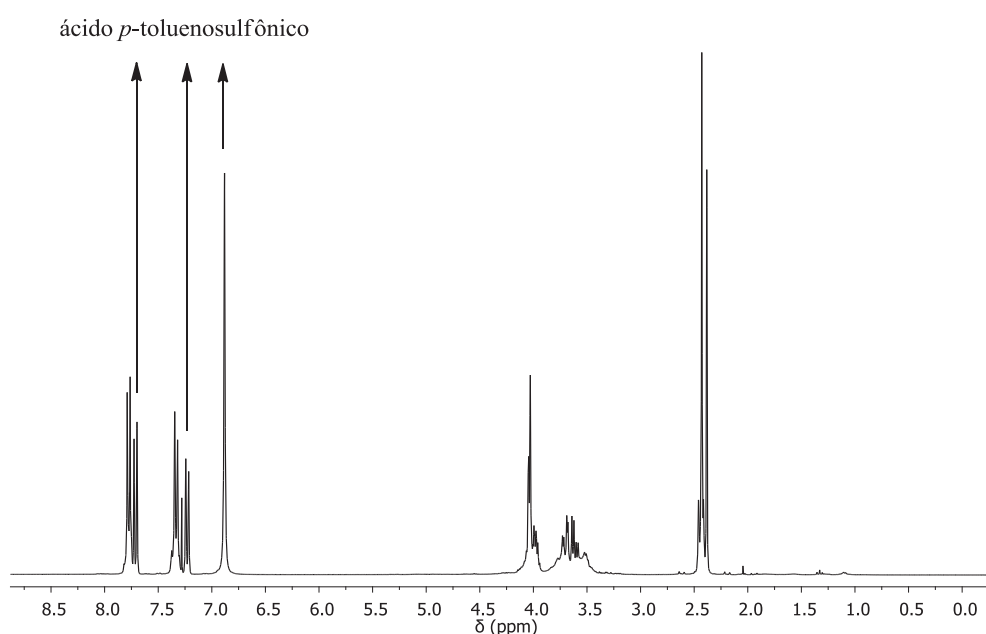
Em seguida, o tosilato de glicerila [29] foi utilizado como monômero para a reação de polimerização com diferentes diácidos carboxílicos (esquema 11). O ácido fumárico [30] é um importante intermediário presente no ciclo de produção do ácido cítrico e apresenta uma baixíssima toxicidade para o metabolismo humano.<sup>185</sup> Já o seu isômero ácido malêico [31] é considerado tóxico se utilizado para consumo oral humano. Entretanto, a toxicidade dérmica para este substrato é exatamente igual à encontrada para o ácido láctico, com um valor de  $LD_{50} = 2.000 \text{ mg/kg}$ .<sup>186</sup> Assim, estes dois diácidos foram inicialmente utilizados para a polimerização com o tosilato de glicerila [29].



**Esquema 10.** Reações de polimerização do tosilato de glicerila [29] com o ácido fumárico [30] e ácido malêico [32], na presença do catalisador  $\text{SnCl}_2$ .

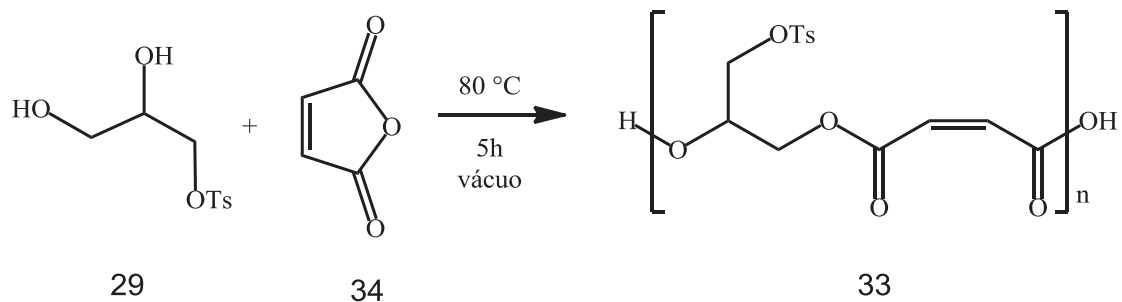
As reações de polimerização entre o diol [29] e os diácidos fumárico [30] e malêico [32] empregaram uma razão de 1 : 1 entre o diol e o diácido, na presença do catalisador  $\text{SnCl}_2$ . A pressão do sistema foi reduzida para cerca de 10 Pa com o auxílio de uma bomba de vácuo, no intuito de remover o subproduto formado durante a reação. A temperatura foi elevada para  $80^\circ\text{C}$  por 2 horas, então  $100^\circ\text{C}$  por mais 2 horas e, finalmente,  $120^\circ\text{C}$  por 15 horas. Entretanto, essas reações produziram apenas um material insolúvel em ambos os casos. Esse resultado pode estar associado às reações de reticulação que poderiam ter ocorrido como resultado da perda do grupo tosilato em [29]. Em uma tentativa de evitar essas reticulações, a temperatura final da reação foi reduzida para  $100^\circ\text{C}$ , mas o mesmo resultado foi obtido.

Essas observações levaram a concluir que a água eliminada durante a reação estaria promovendo um ataque ao carbono metilênico vizinho ao radical tosila, resultando na formação de um grupo hidroxila primário no polímero e na eliminação do ácido *p*-toluenosulfônico como subproduto. A presença do grupo hidroxila no esqueleto do polímero resultaria em reações de reticulação entre as cadeias durante a polimerização. Para confirmar essa suspeita, um teste simples foi realizado aquecendo o glicerol protegido com o grupo tosila [29] a 100 °C por 3 horas, sendo verificada a formação de ácido *p*-toluenosulfônico, como o verificado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 56).



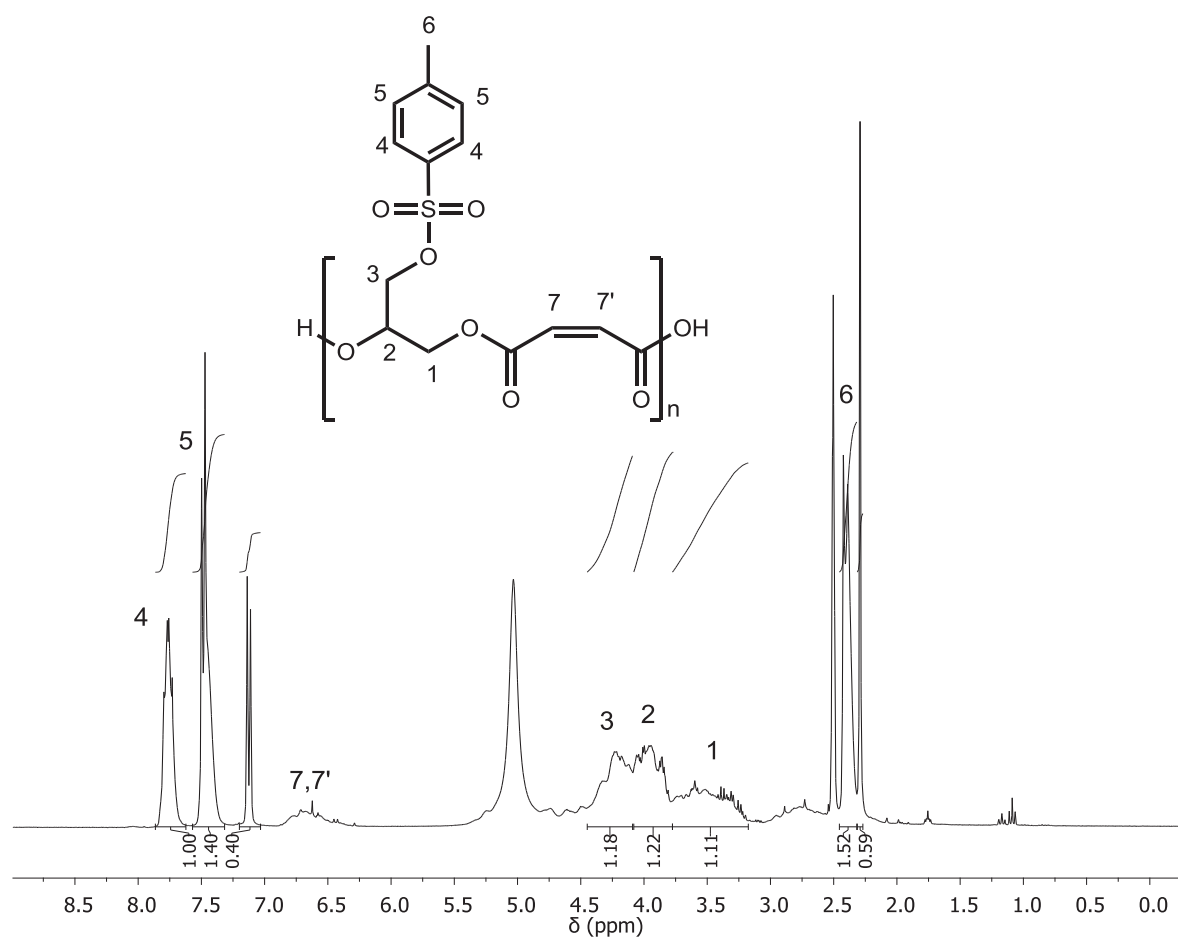
**Figura 56.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do tosila de glicerila [29] aquecido a 100 °C por 3 h, mostrando a decomposição térmica para o ácido *p*-toluenosulfônico. (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Para reduzir a possibilidade de reticulação, anidrido malêico [34] foi utilizado como monômero na tentativa de empregar condições mais brandas para a polimerização e sem a adição de catalisador (esquema 12). O produto obtido dessa reação apresentou uma característica bastante viscosa (semi-sólida), o que poderia indicar a formação de um polímero de baixa massa molecular. Testes de solubilidade indicaram que o mesmo era solúvel em DMSO, sendo possível a realização da análise por ressonância magnética nuclear de hidrogênio para o composto, mostrado na figura 57, onde são atribuídos os sinais correspondentes a cada hidrogênio.



**Esquema 11.** Reação de polimerização usando o anidrido malêico [34] e o diol [29].

Todavia, apesar de se tratar do polímero esperado [33], é possível observar ainda a presença de sinais do ácido *p*-toluenossulfônico em  $\delta$  7,1 ppm e  $\delta$  2,25 ppm, resultante da perda do grupo protetor do composto [29], confirmado através dos valores das integrais.



**Figura 57.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do polímero [33]. (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



Na tentativa de evitar a perda do grupo protetor, foram realizadas polimerizações em condições mais brandas, as quais são mostradas na tabela 21, onde a designação RTG é atribuída às “Reações com Tosilato de Glicerila”.

**Tabela 21.** Condições reacionais investigadas para a polimerização entre [29] e [34].

<b>Entrada</b>	<b>Condições</b>	<b><math>M_w</math> (g.mol<sup>-1</sup>)</b>
<b>RTG01</b>	65 °C por 1 h s/v 80 °C por 5 h c/v	720
<b>RTG02</b>	65 °C por 1.5 h s/v 80 °C por 15 h c/v	2.090
<b>RTG03</b>	65 °C por 1 h s/v 80 °C por 30 h c/v	Material insolúvel
<b>RTG04</b>	65 °C por 1 h s/v 80 °C por 4 h c/v 100 °C por 15 h c/v	Material insolúvel

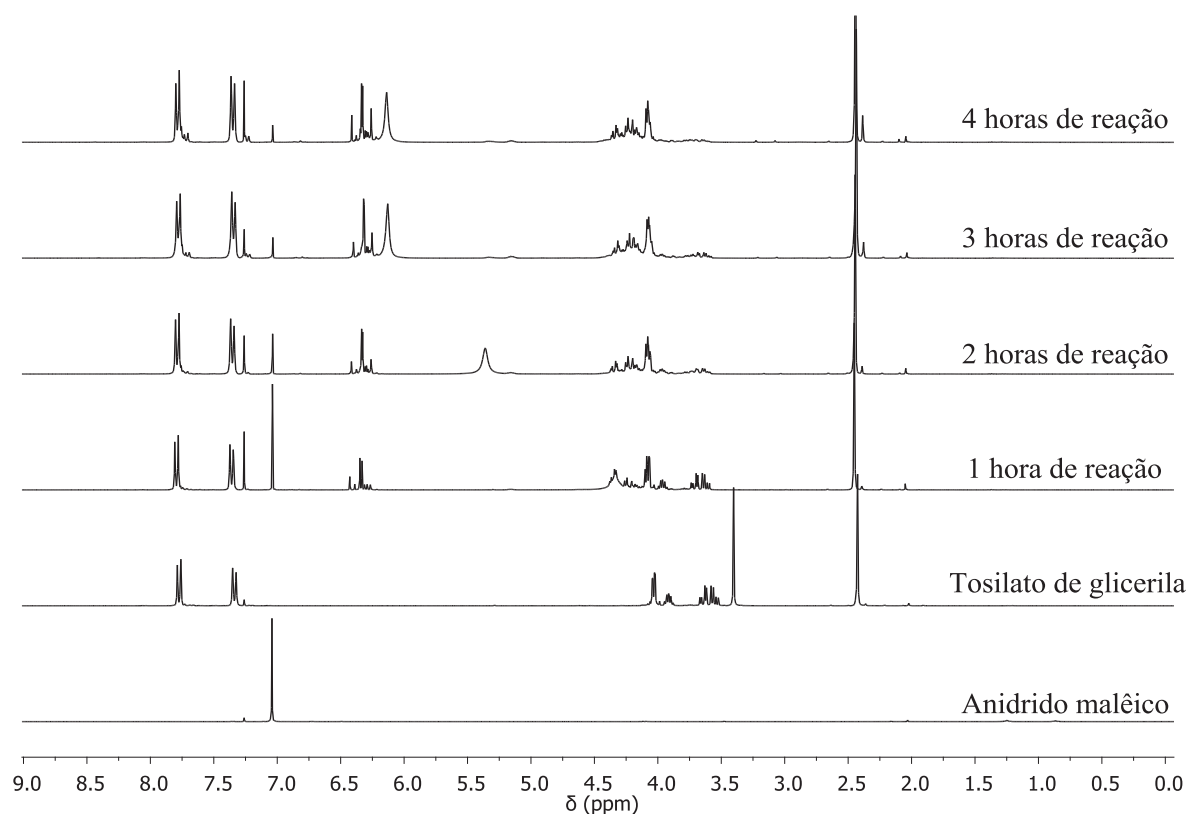
s/v = sem vácuo e sob fluxo de argônio      c/v = com vácuo

Na primeira reação (RTG01), o reagente anidrido malêico [34] e o diol [29] foram aquecidos a 65 °C sob atmosfera inerte por uma hora (para fundir completamente o anidrido malêico), seguido pela redução da pressão e aumento da temperatura para 80 °C por 5 horas. O produto obtido para essa reação apresentava uma aparência de óleo amarelo viscoso, que é um indicativo de um oligômero de baixa massa molecular. Mesmo em condições mais brandas, a perda do grupo tosila foi verificada através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. Quando o tempo de reação à 80 °C foi aumentado para 15 horas, o resultado obtido por cromatografia de permeação em gel mostrou uma massa molecular de 2.090 g.mol<sup>-1</sup> para o polímero sintetizado (RTG02). O aumento desse tempo para 30 horas (RTG03), assim como o aumento de temperatura (RTG04), resultaram apenas em um material insolúvel em diversos solventes testados (THF, CHCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, DMSO, DMF), como resultado das reticulações formadas em razão da perda do grupo tosila.

Além das reticulações causadas pela presença de um grupo hidroxila, poderia haver a possibilidade de polimerização térmica entre as ligações duplas presentes no anidrido malêico, resultando em mais reticulações. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H da figura 57 mostrou, entre  $\delta$  3,0 e 2,5 ppm, um indício de que essas ligações estariam ocorrendo. Os sinais

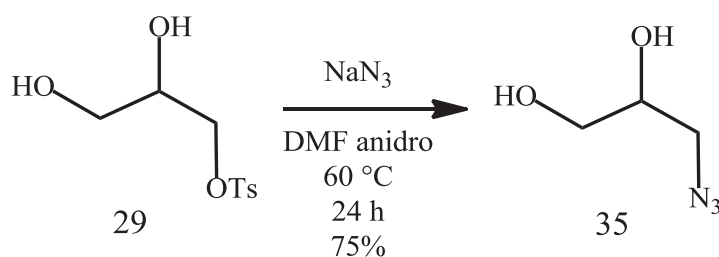
observados poderiam ser atribuídos aos hidrogênios CH<sub>2</sub> vizinhos a um CH, resultante da formação de uma ligação sigma. Entretanto, não é possível afirmar com absoluta certeza se essas reações entrecruzadas ocorreram, uma vez que análises de RMN de <sup>13</sup>C não foram realizadas para esse polímero.

Outro experimento foi realizado acerca do tempo de reação entre o tosilato de glicerila e o anidrido malêico na temperatura de 65 °C. Nesse procedimento, os dois monômeros foram adicionados a um balão de fundo redondo sob atmosfera inerte e aquecidos até a temperatura de fusão do anidrido malêico. A evolução da reação foi acompanhada através de espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H, a qual é apresentada na figura 58. Pode-se visualizar que após uma hora de reação já existem sinais referentes ao polímero (oligômeros) em formação, em  $\delta$  4,3 ppm. Entretanto, é possível verificar a presença de sinais referentes ao ácido *p*-toluenosulfônico a partir de duas horas, ocorrendo um gradual aumento das intensidades destes picos ao longo do tempo total de reação investigado.



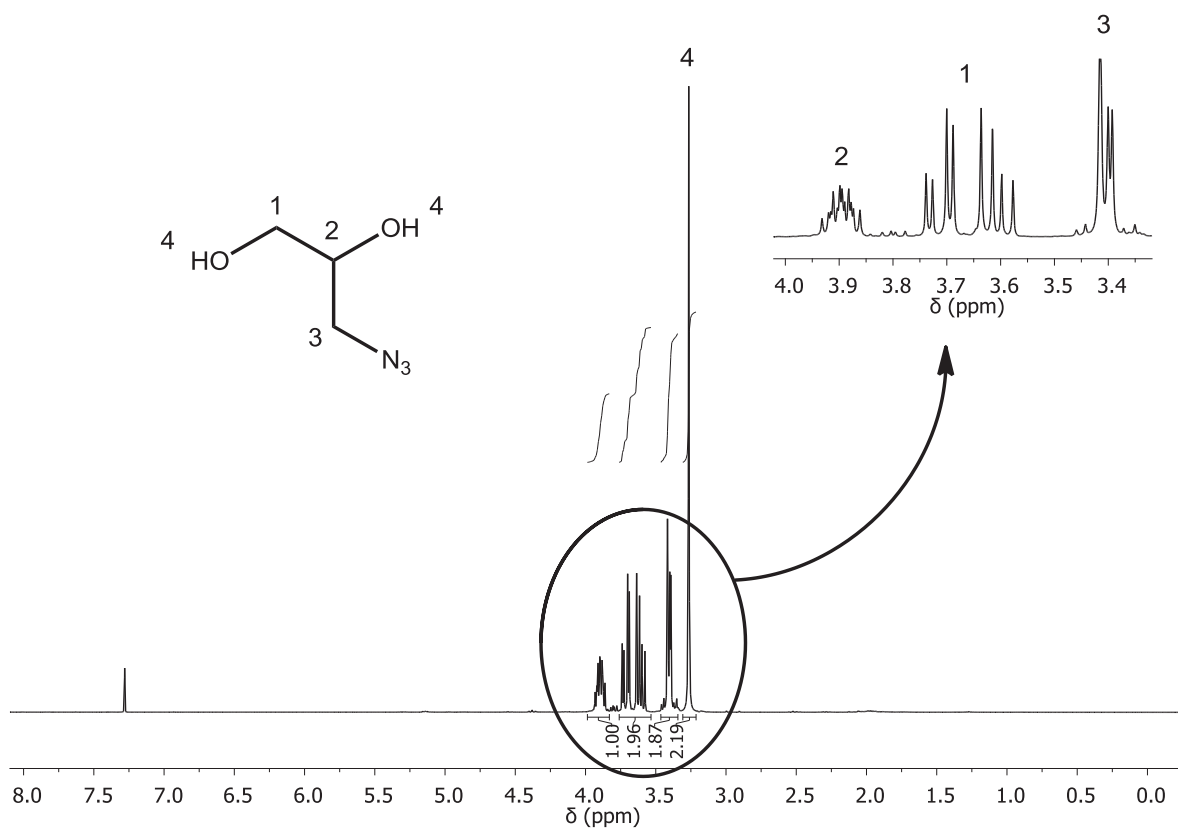
**Figura 58.** Espectros de RMN de <sup>1</sup>H que mostram a evolução da reação entre anidrido malêico [34] e tosilato de glicerila [29] na temperatura de 65 °C. (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

Como consequência da instabilidade térmica do composto [29], outra estratégia foi elaborada, a qual consistiu na substituição do grupo tosilato pela função azida. A reação foi conduzida como mostrado no esquema 13, com rendimento de 75%. A presença dessa função na cadeia polimérica seria de grande interesse em aplicações biológicas em virtude da possibilidade de funcionalização deste polímero através do emprego de reações de cicloadição 1,3-dipolares, também conhecidas como “*Click Chemistry*”.<sup>183</sup>



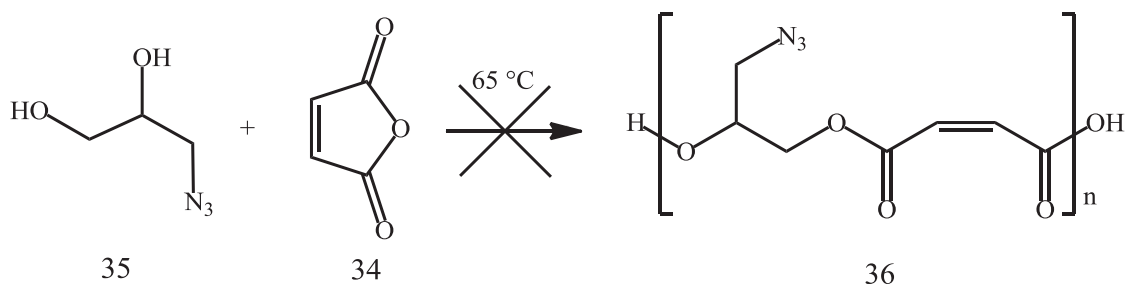
**Esquema 12.** Conversão do monotosilato de glicerila [29] no 3-azidopropanodiol [35].

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H para o produto [35] está apresentado na figura 59, mostrando a atribuição dos sinais referentes aos hidrogênios contidos nesta molécula. Verifica-se a presença do sistema de acoplamento do tipo ABX em  $\delta$  3,9 e 3,6 ppm, semelhante ao encontrado para a molécula de tosilato de glicerila. Porém, a mudança de ambiente químico causada pela troca do grupo tosilato pela função azido resultou em um deslocamento para campo alto dos sinais dos hidrogênios metilênicos vizinhos a essa função. O espectro de RMN de <sup>13</sup>C-APT (figura 77, página 177), apresentando os sinais para os carbonos metilênicos em 64,1 e 53,6 ppm e o sinal referente ao CH em  $\delta$  71 ppm.



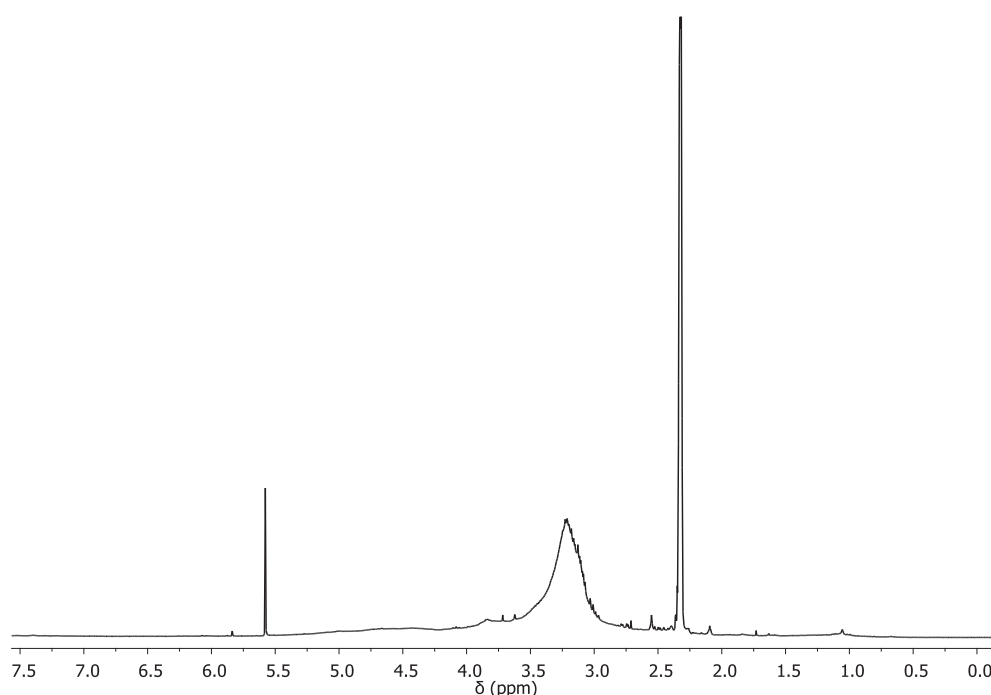
**Figura 59.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o composto [35]. (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

A próxima reação consistiu na tentativa de polimerização entre o azido-glicerol [35] com anidrido malêico [34] (razão entre os monômeros de 1 : 1) sob as mesmas condições utilizadas para o tosilato [29] (esquema 14). Porém, após 15 minutos ocorreu a formação de uma espuma no meio reacional e a agitação foi interrompida. Na tentativa de retornar o meio ao estado fundido, a temperatura foi aumentada para 80, 100, 120 e 140 °C, mas nenhuma mudança foi observada.



**Esquema 13.** Polimerização do azido-glicerol [35] na presença do anidrido malêico [34].

O espectro de RMN de hidrogênio para essa espuma formada durante a reação mostrou apenas um pico muito alargado entre  $\delta$  3 e 3,75 ppm e um singlete em  $\delta$  5,75 ppm (figura 60), o que pode indicar a presença de glicerol e anidrido malêico puro. Esse resultado sugere uma possível decomposição da azida e liberação de nitrogênio gasoso, a qual pode ter sido causada pela presença do ácido malêico, resultante da decomposição do anidrido na presença de água, ou em virtude de impurezas presentes no anidrido malêico, uma vez que o mesmo possuía uma pureza de 98 %.

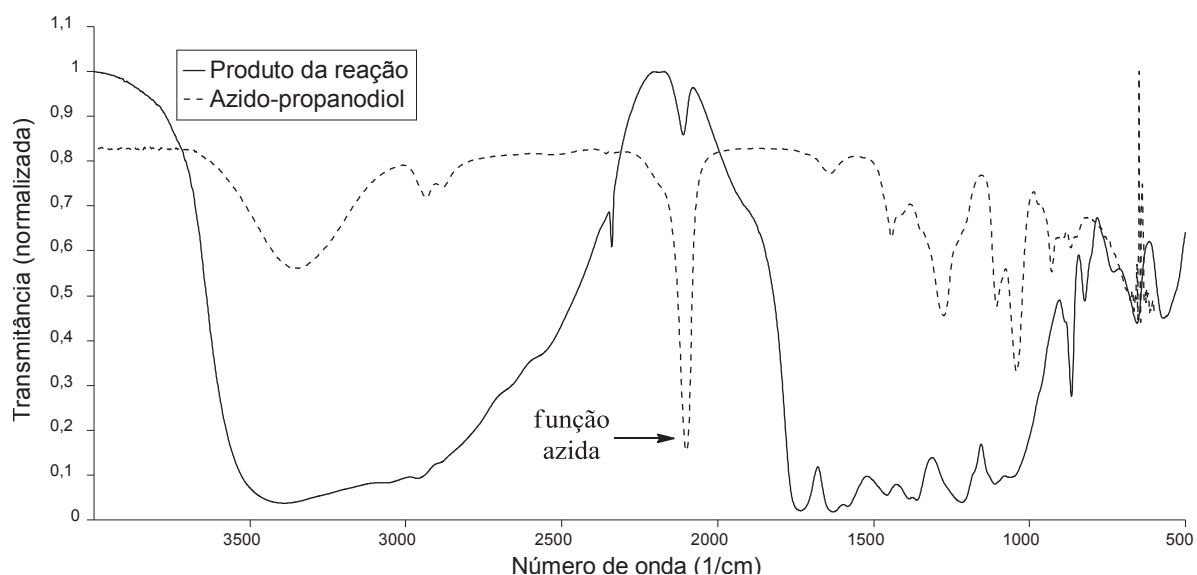


**Figura 60.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para a reação entre [35] e [34]. (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )

A massa molecular desse produto desconhecido foi investigada por cromatografia de exclusão de tamanho utilizando DMF como solvente e curva de calibração em relação ao padrão de poliestireno. A análise apresentou um valor de  $M_w = 5.255 \text{ g.mol}^{-1}$  com polidispersidade de 3,85, utilizando um detector de UV, e  $M_w = 3.990 \text{ g.mol}^{-1}$  com polidispersidade 3 quando um detector de índice de refração foi utilizado. A massa molecular detectada indica a formação de um polímero, embora o mecanismo ocorrido durante a reação não esteja bem elucidado. Uma dedução a respeito do comportamento dessa reação seria uma

perda inicial da função azida, gerando um produto contendo uma amina primária a qual, por sua vez, proporcionaria a formação de uma ligação amida na presença do anidrido malêico.

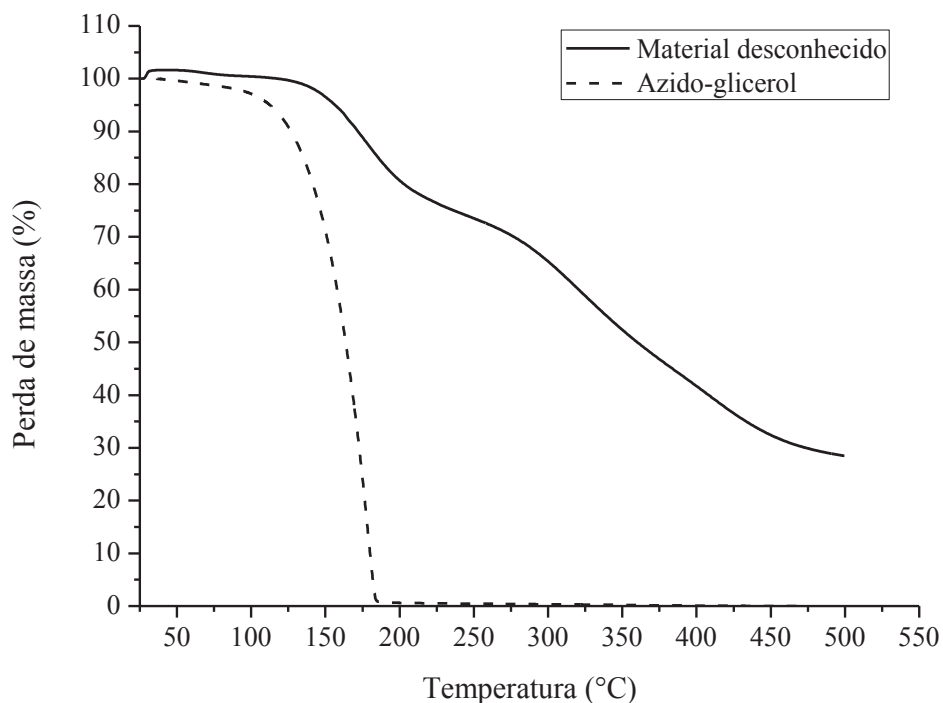
Outro ensaio foi realizado para verificar se a presença do ácido malêico poderia resultar na mesma decomposição observada quando anidrido malêico foi utilizado. Da mesma forma, após 20 minutos de reação a 65 °C uma espuma de coloração amarela foi obtida, a qual apresentou o mesmo espectro de RMN de  $^1\text{H}$  que a reação anterior. O espectro de infravermelho para esse produto mostrou que o pico referente à função azida, próximo a  $2.100\text{ cm}^{-1}$ , do produto formado praticamente desapareceu quando comparando com o material de partida [35] (figura 61), o que confirma a hipótese de decomposição do monômero 3-azidopropanodiol.



**Figura 61.** Sobreposição dos espectros de IV para o 3-azidopropanodiol [35] (ATR) e para o produto obtido da reação. (KBr)

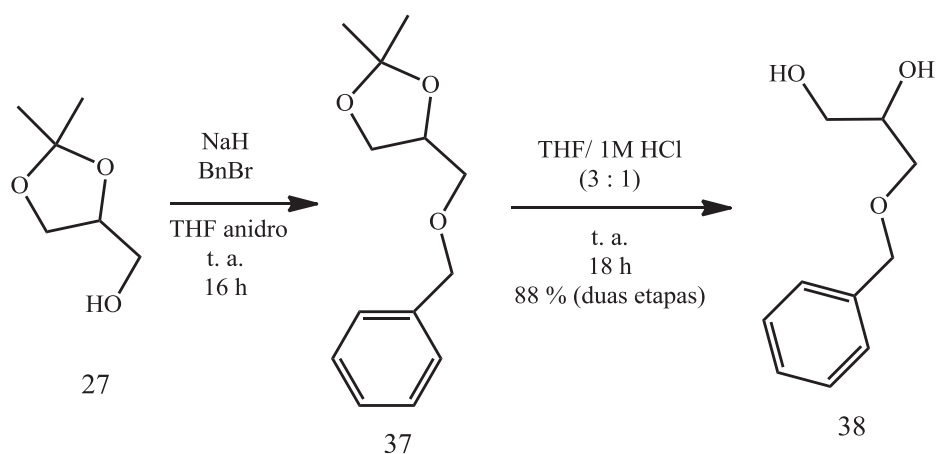
A análise termogravimétrica para o material proveniente da reação entre a azida [35] e o anidrido malêico apresentou um perfil de decomposição térmica em duas etapas, sendo a primeira iniciando em cerca de  $150\text{ °C}$  e a segunda próximo a  $270\text{ °C}$  (figura 62). No limite de temperatura investigado ( $500\text{ °C}$ ), verifica-se ainda que o percentual de matéria remanescente ainda é próximo a 30 %, o que não condiz com o perfil de degradação térmica de poliésteres lineares, frequentemente associados a uma única degradação e com um baixo teor de resíduos. Além disso, a primeira etapa de degradação poderia ser referente à

degradação do azido-glicerol [35] ainda presente na amostra, como pode ser observado pela curva de degradação térmica desse composto contida na figura 62.



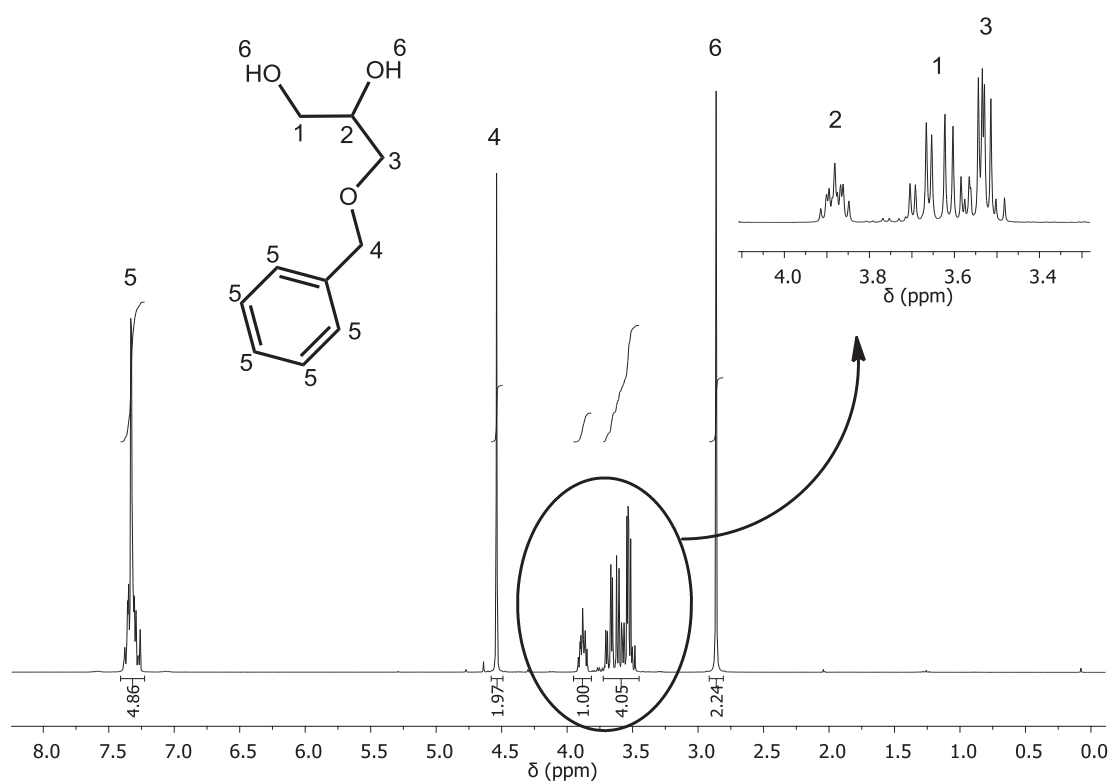
**Figura 62.** Termogramas de TGA para o 3-azidopropanodiol [35] e o produto da reação com anidrido malêico.

Uma vez que não foi possível realizar a polimerização do azido-glicerol [35] com ácidos carboxílicos ou mesmo com seus derivados anidridos, uma nova rota sintética foi proposta para a obtenção do glicerol protegido a partir do solketal [27], utilizando um grupo protetor mais estável. Nessa estratégia, o brometo de benzila (BnBr) foi utilizado para proteger o grupo hidroxila do solketal, seguido de abertura do anel isopropilideno sob condições ácidas (esquema 15). O produto [38] foi obtido em um rendimento de 88% após duas etapas.<sup>183</sup>



**Esquema 14.** Proteção do solketal [27] com brometo de benzila, seguido de desproteção das hidroxilas em meio ácido para resultar no diol [38].

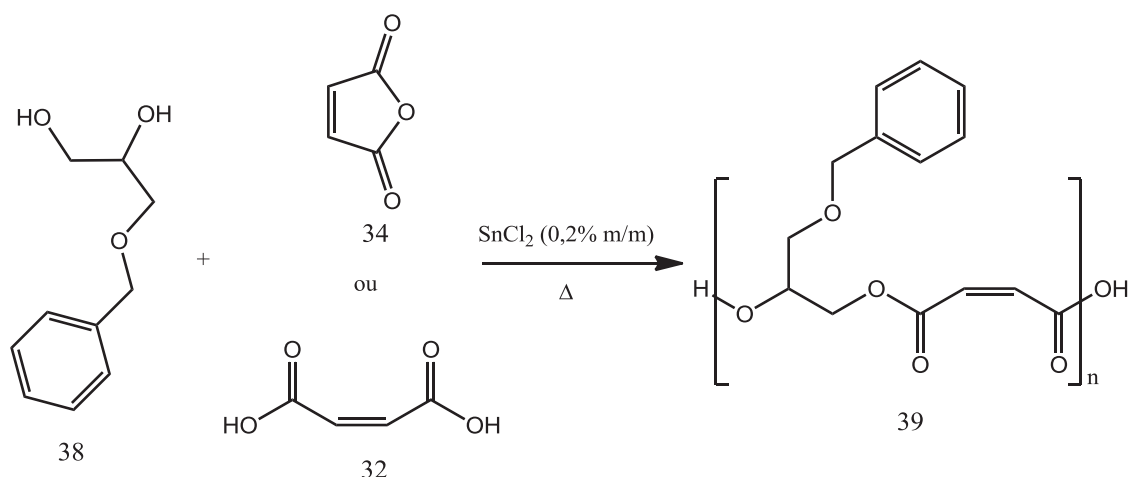
O produto [38] foi caracterizado por espectroscopia de RMN de hidrogênio e o espectro está apresentado na figura 63. A presença do sistema ABX pode ser verificada, novamente, entre  $\delta$  3,9 e 3,5 ppm, referente aos sinais dos hidrogênios pertencentes ao radical do glicerol. Além disso, em  $\delta$  7,3 e  $\delta$  4,5 ppm encontram-se os sinais para os hidrogênios do radical benzila.



**Figura 63.** RMN de  $^1\text{H}$  do glicerol protegido com benzila [38]. (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



A próxima etapa consistiu na polimerização entre o diol [38], anidrido malêico [34] ou ácido malêico [32] para a obtenção do respectivo poliéster [39], na presença de SnCl<sub>2</sub> (esquema 16). Diferentes condições reacionais foram empregadas, as quais estão descritas na tabela 22.



**Esquema 15.** Reação de polimerização entre o benzilato de glicerila [38] e anidrido ou ácido malêico para a obtenção do poliéster [39].

**Tabela 22.** Condições reacionais empregadas para as polimerizações entre benzilato de glicerila [38] e ácido ou anidrido malêico.

Entrada	Ácido ou anidrido	Condições	$M_w$ (g.mol <sup>-1</sup> )	$M_w/M_n$
RBG01	Anidrido malêico	80 °C; 3h s/v	4.880	5,2
		100 °C; 2h s/v		
		120 °C; 15h c/v		
RBG02	Ácido malêico	Condições idênticas à RBG01	3.280	3,6
RBG03	Anidrido malêico	80 °C; 3h s/v	7.710	3,4
		100 °C; 2h s/v		
		120 °C; 30h c/v		
RBG04	Ácido malêico	Condições idênticas à RBG03	6.790	2,8
RBG05	Anidrido malêico	100 °C; 3h s/v 150 °C; 15h c/v	Material insolúvel	-

s/v = sem vácuo e sob fluxo de argônio

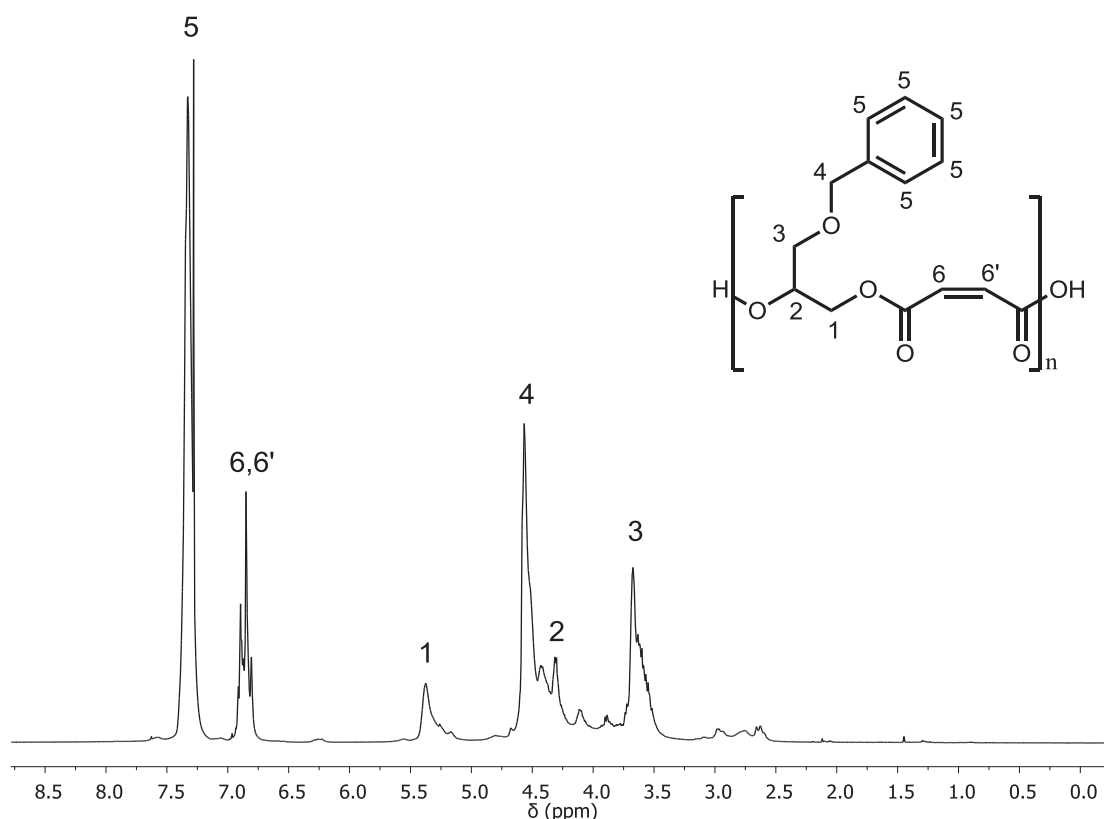
c/v = com vácuo; foi utilizada uma bomba de difusão (± 9 Pa)

Primeiramente, os reagentes foram aquecidos a 80 °C sob atmosfera de argônio (em razão da sensibilidade do anidrido malêico à umidade) para que houvesse uma reação parcial

entre os monômeros (formação de dímeros, trímeros, etc), seguido do aumento da temperatura para 100 °C. Após essas duas etapas, a temperatura foi elevada para 120 °C e a reação prosseguiu por 15 horas sob alto-vácuo (entradas RBG01 e RBG02). Ao final da reação obteve-se um material bastante viscoso, o qual não pôde ser precipitado. Análises de GPC mostraram a obtenção de um polímero com baixa massa molecular para ambas as reações e com polidispersidades bastante elevadas. Acredita-se que essa alta polidispersidade deve-se tanto ao aumento irregular das cadeias do polímero, característico de polimerizações em etapas, quanto às diferentes reatividades das hidroxilas primária e secundária do monômero [38]. Ao aumentar o tempo de permanência da reação a 120 °C para 30 horas, houve um aumento na massa molecular do polímero, assim como uma redução na polidispersidade. No entanto, quando se buscou um maior aumento na temperatura da reação, observou-se a formação de um material insolúvel em diversos solventes (THF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, DMSO, DMF), provavelmente em virtude das reações entre as ligações duplas C=C presentes no polímero.

A figura 64 mostra o espectro de RMN de hidrogênio para o polímero resultante da reação entre o benzilato de glicerila e anidrido malêico, com todas as suas atribuições. Contudo, observou-se ainda a presença de um conjunto de sinais entre  $\delta$  3 e 2,5 ppm que pode ser decorrente da formação de uma ligação sigma entre duas ou mais cadeias de polímero em consequência da reação entre as ligações duplas C=C contidas na estrutura do polímero.

Apesar do resultado obtido, a massa molecular do polímero sintetizado ainda é muito baixa para ser empregado diretamente em um processo de eletrofiação. Além disso, a presença de um grupo benzila na estrutura do polímero poderia promover a liberação de álcool benzílico ou tolueno durante a degradação deste material, o que causaria a morte de células do novo tecido em formação, quando empregados como substitutos biológicos. Uma vez que a retirada desse grupo protetor é realizada através de reação de hidrogenólise, a massa molecular do polímero decairia ainda mais, dificultando a sua utilização em processos de eletrofiação.

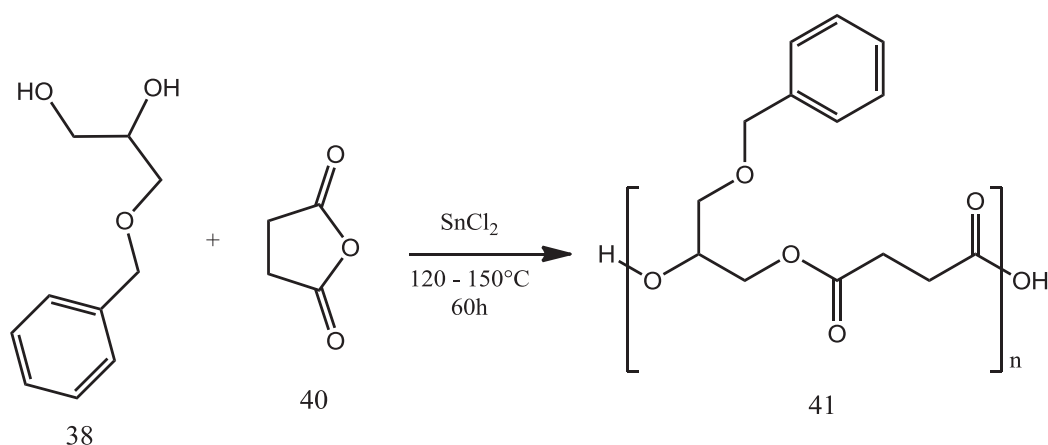


**Figura 64.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do poli(3-benzilglicerol-*co*-maleato) [39]. (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Sendo assim, na tentativa de obter um material com massa molar superior e, principalmente, a fim de evitar reações paralelas em razão da presença das ligações duplas  $\text{C}=\text{C}$ , conduziu-se um experimento em que o diol [38] foi polimerizado com anidrido succínico [40] em uma proporção de 1 : 1, resultando no poli(3-benzilglicerol-*co*-succinato) [41] (esquema 17). Esse polímero já havia sido sintetizado por Grinstaff e colaboradores sob a forma de um dendrímero.<sup>187</sup> Todavia, a síntese desse dendrímero requer 14 etapas de preparação, além de purificações cromatográficas, para a obtenção de um polímero com massa molecular média de  $8.700 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .<sup>188</sup>

O ácido butanodióico, conhecido como ácido succínico, é um ácido dicarboxílico produzido como um intermediário do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), ou como produto principal da fermentação anaeróbica por alguns microrganismos, constituindo-se em um metabólito comum produzido por plantas, animais e microrganismos.<sup>189</sup> Possui uma baixa toxicidade e é amplamente utilizado na indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos,

além de atualmente ser considerado de grande importância para a fabricação de *commodities*, tais como surfactantes, solventes, antibióticos e poliésteres.<sup>190</sup>



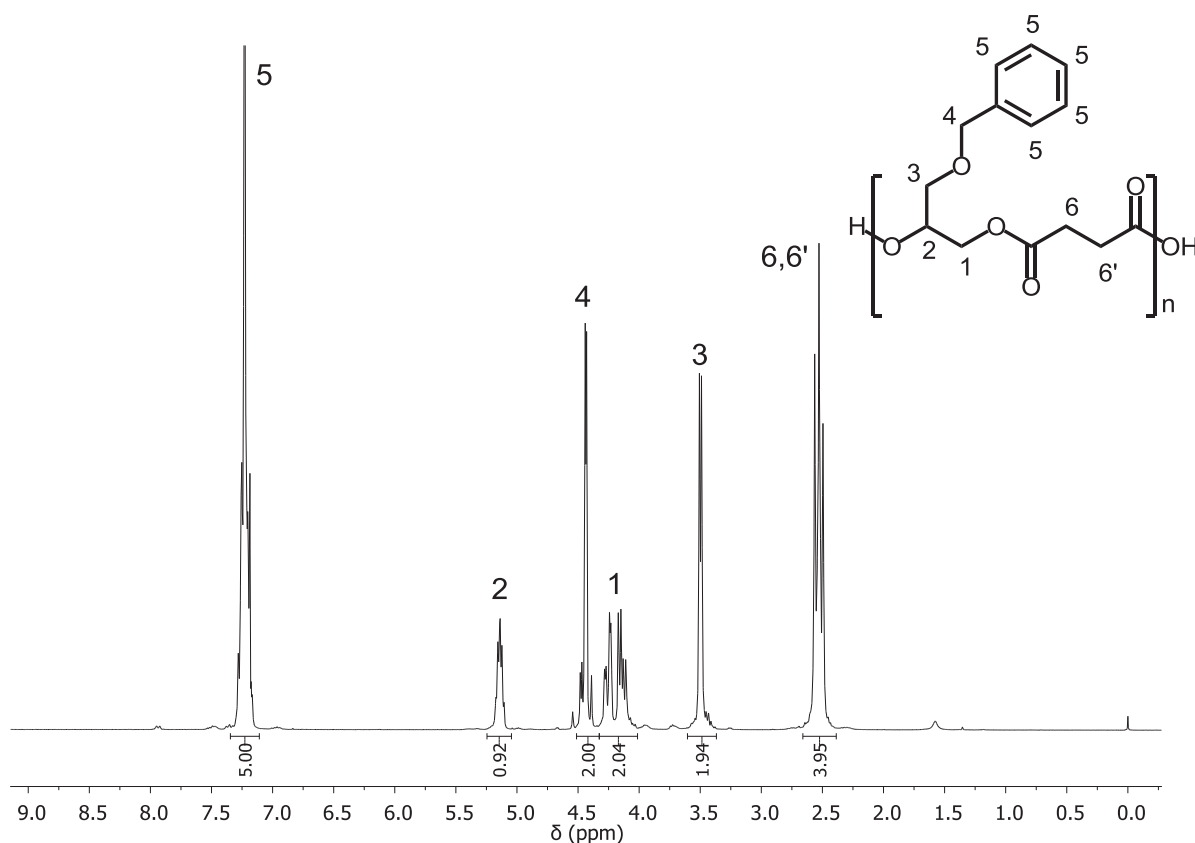
**Esquema 16.** Síntese de poli(3-benzilglicerol-*co*-ácido succínico) [41] a partir do 3-benzilglicerol [38] e do anidrido succínico [40].

A síntese do poliéster [41] foi realizada em três etapas. Primeiramente, após a adição de todos os reagentes ao frasco da reação, adicionou-se também tolueno ao sistema, a fim de favorecer o deslocamento do equilíbrio reacional para a formação dos produtos através da destilação azeotrópica. A adição desse solvente para essa reação está relacionada à perda do monômero [38] sob condições de alto-vácuo, fato este observado durante as reações para a síntese do poliéster [39]. Um condensador do tipo Dean-Stark foi adaptado ao sistema e a mistura reacional foi aquecida até  $140^\circ\text{C}$ , permanecendo nessas condições por 15 horas. Em seguida, o solvente foi removido e submeteu-se o produto remanescente a uma temperatura de  $150^\circ\text{C}$  sob alto-vácuo por até 35 horas, obtendo-se o poliéster [41] como um produto bastante viscoso.

As análises de GPC foram realizadas para as três etapas desta reação. A primeira etapa, usando condições azeotrópicas, apresentou uma massa molecular ponderada média de  $1.400\text{ g.mol}^{-1}$  (PDI= 1,3). Na segunda etapa, utilizando um vácuo de cerca de 100 Pa, a massa molecular do polímero aumentou para  $M_w = 8.590\text{ g.mol}^{-1}$  (PDI= 2,1). Na última etapa, onde a reação permaneceu por 15 horas a  $150^\circ\text{C}$  sob um vácuo de  $\pm 9\text{ Pa}$ , a massa molecular do polímero aumentou para  $M_w = 61.000\text{ g.mol}^{-1}$  (PDI= 4,1). Esse alto valor para a polidispersão, como já citado anteriormente, deve ocorrer principalmente pela diferença de reatividade entre

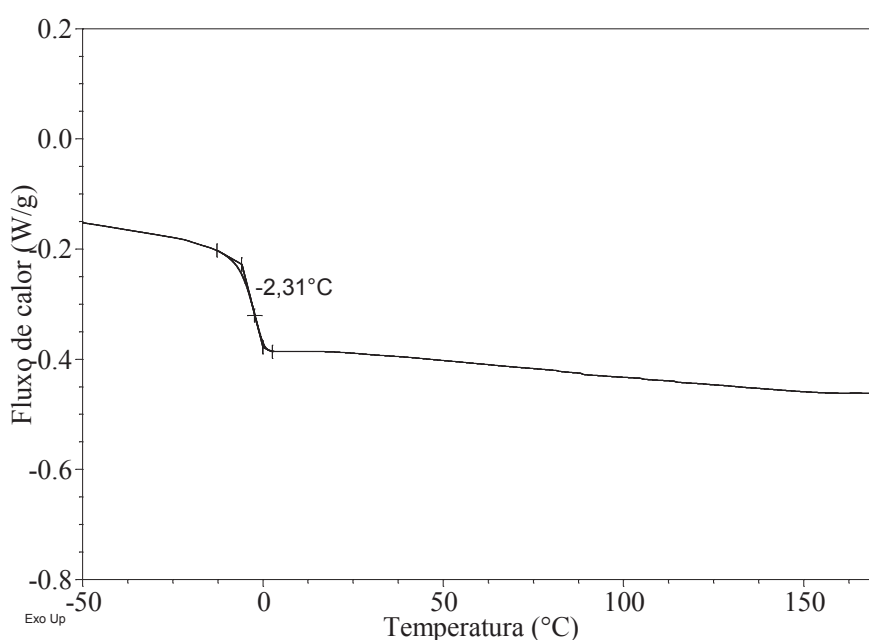
as duas hidroxilas do monômero [38]. Contudo, é possível que parte do monômero possa ter sido removido do meio reacional em virtude do alto-vácuo empregado, o que levaria à interrupção do crescimento de algumas das cadeias do polímero. Apesar desse alto valor de polidispersidade, o objetivo de sintetizar um polímero com alta massa molecular foi alcançado, o que é de grande interesse para a construção de matrizes para engenharia de tecidos utilizando a metodologia de *electrospinning*.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do poli(3-benzilglicerol-*co*-succinato) linear está mostrado na figura 65, o qual contém a atribuição de todos os sinais pertencentes à cadeia do polímero. Por se tratar de uma macromolécula, é preciso que seja destacada a alta resolução de todos os picos, uma vez que o esperado seria a aparecimento de picos alargados em razão da distribuição de massas moleculares das cadeias. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT para este polímero encontra-se na figura 83, página 183.



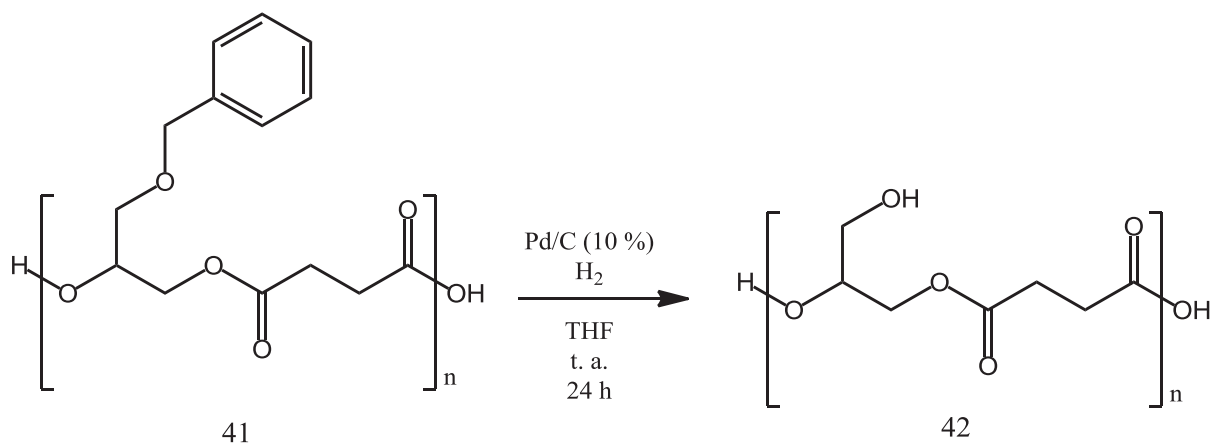
**Figura 65.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do poli(3-benzilglicerol-*co*-ácido succínico) [41]. (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

As propriedades térmicas desse polímero foram avaliadas através de calorimetria exploratória diferencial (DSC). O termograma obtido mostrou que o polímero sintetizado possui um comportamento amorfo, isto é, não ocorre formação de cristalitos na amostra e, conseqüentemente, não apresenta uma temperatura de fusão (figura 66). A temperatura de transição vítrea para esse material apresentou um valor de  $-2,31\text{ }^{\circ}\text{C}$ , característica que o torna interessante para aplicações biomédicas, uma vez que a temperatura média do corpo humano é de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Por outro lado, por causa da sua propriedade viscosa, não foi possível a sua caracterização através de ensaios mecânicos.



**Figura 66.** Termograma de DSC para o poliéster [41]. (2º ciclo de aquecimento)

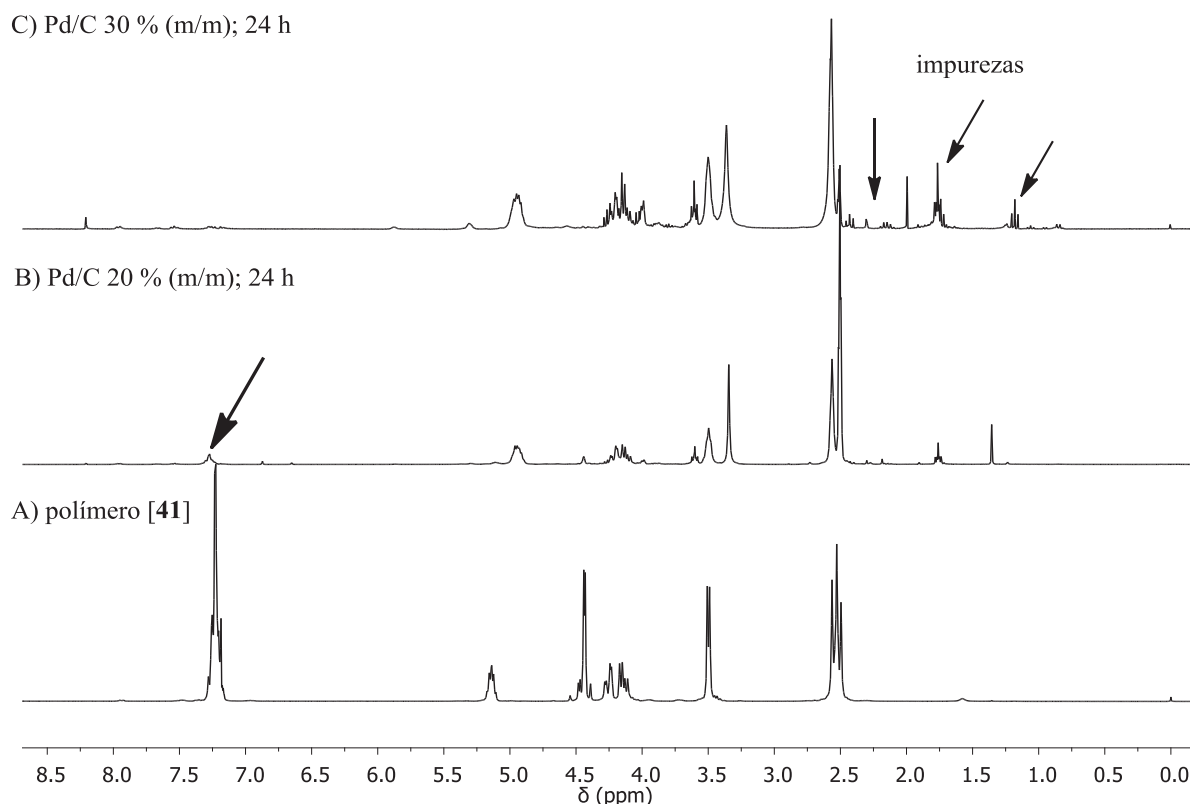
A fim de evitar possíveis problemas de biocompatibilidade, investigou-se a remoção do grupo protetor benzila através de reações de hidrogenólise.<sup>97</sup> Além disso, a presença de hidroxilas na cadeia do polímero poderia aumentar as interações entre a matriz sintética e as células. Nessas reações, a uma solução do poliéster [41] em THF foi adicionado o catalisador de Pd suportado em carbono (10 %) em diferentes proporções (esquema 18). As reações foram realizadas à temperatura ambiente por 24 horas, sob atmosfera de  $\text{H}_2$ , e a remoção do grupo protetor foi verificada através de RMN de hidrogênio.



**Esquema 17.** Reação de hidrogenólise do poliéster [41] na presença de Pd/C e H<sub>2</sub>.

A figura 67 contém os espectros de RMN de <sup>1</sup>H para o poliéster [41] (espectro A) e dos produtos das reações de hidrogenólise utilizando 20 e 30 % do catalisador de paládio (espectros B e C, respectivamente). A utilização de 20 % em massa do catalisador na reação resultou em uma remoção quase completa do grupo benzila do polímero após 24 horas de reação, evidenciado pela redução na intensidade do sinal do multipeto em cerca de δ 7,3 ppm, indicado pela seta no espectro B. Quando 30 % do catalisador foi empregado, observou-se que a conversão do material de partida foi completa após o tempo total de reação, caracterizada pelo desaparecimento do multipeto referente aos hidrogênios do grupo benzila (espectro C).

A solubilidade e o aspecto do polímero após a reação também sofreu alterações. O poliéster [41] era completamente solúvel em CDCl<sub>3</sub> antes da hidrogenólise. Após a reação, o produto obtido não era mais solúvel nesse solvente e os espectros de RMN precisaram ser registrados em DMSO-*d*<sub>6</sub>, em razão da mudança de polaridade do material proporcionada pela presença de diversas hidroxilas ao longo da cadeia. Além disso, o polioli obtido passou de um material bastante viscoso e amarelo para um óleo incolor.



**Figura 67.** Conjunto de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para as reações de hidrogenólise do poliéster **[41]**. (300 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$ )

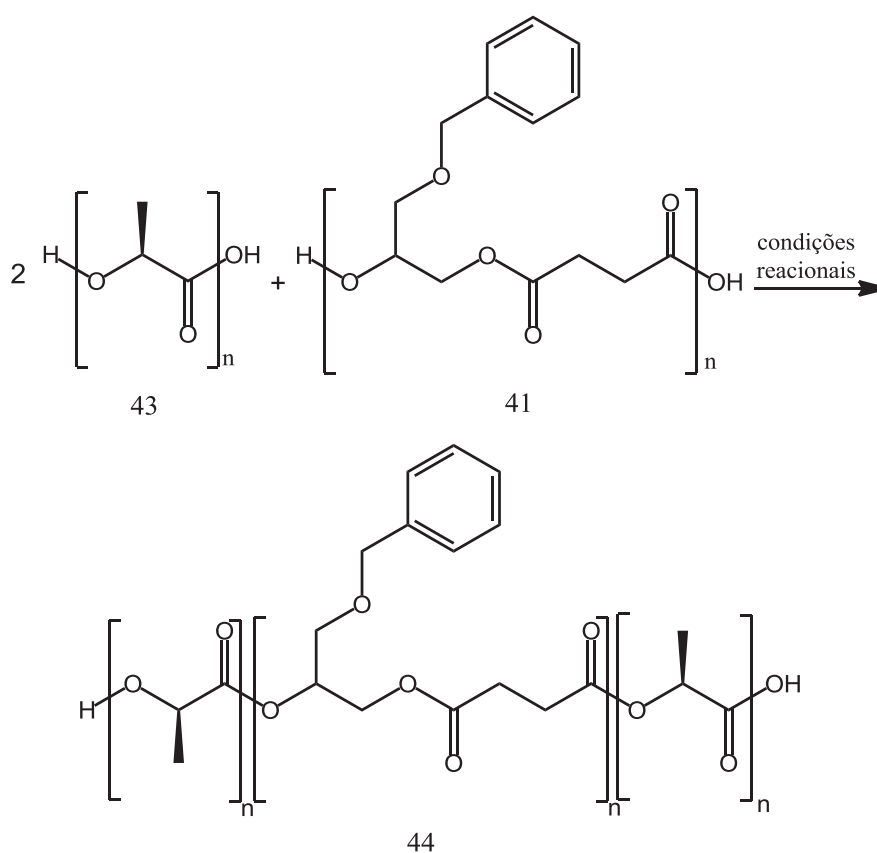
Apesar de ter sido constatado a remoção do grupo protetor do poliéster **[41]**, ocorreu o aparecimento de alguns sinais no espectro de RMN que não pertencem ao polímero estudado, os quais foram caracterizados como impurezas presentes no produto final. Porém, o grande problema encontrado nessa reação de hidrogenólise foi a redução na massa molecular do polímero após o processo. A massa molecular ponderal média, que antes era de cerca de  $61.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , foi reduzida para cerca de  $5.600 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , com polidispersidade de 1,3. O procedimento empregado não apenas removeu os grupos protetores presentes na cadeia do polímero, como também a fragmentou. Os sinais atribuídos às impurezas nos espectros de RMN são, assim, indícios dessa fragmentação do polímero.

A redução da massa molecular do poliéster **[41]**, durante a reação de hidrogenólise, foi ocasionada tanto pela remoção dos grupos benzila, quanto à clivagem de ligações ésteres da cadeia principal. Contudo, a redução da massa molecular em cerca de 90 % do valor inicial não era esperada, uma vez que a reação foi realizada à pressão atmosférica. O tempo de



reação, assim como a quantidade de catalisador empregado, podem ter sido os fatores determinantes para a alteração da massa molecular do polímero. Como o processo foi baseado em um trabalho da literatura, não foi investigado se o tempo de 24 horas seria o mais adequado para o procedimento empregado no presente estudo. Essas investigações serão realizadas em trabalhos futuros para a otimização das condições reacionais de hidrogenólise para a obtenção do polioliol [42].

Os resultados encontrados durante a síntese do poli(3-benzilglicerol-*co*-succinato) [41] linear motivou a realização de experimentos com o intuito de melhorar algumas das características observadas. Por tratar-se de um material não-sólido, tanto o poliéster [41] quanto o polioliol [42] não apresentam propriedades mecânicas apropriadas para serem utilizados na construção de matrizes para a engenharia de tecidos através da técnica de eletrofição. Além disso, com a baixa massa molecular obtida para o polímero [42] seria complicado utilizá-lo também na forma de *blenda* com outro polímero em consequência de sua baixa viscosidade. Desse modo, foram realizados alguns testes de acoplamento entre poliéster protegido [41] com um poli(L-ácido láctico) (esquema 19).



**Esquema 18.** Reação de acoplamento entre o poliéster [41] e o poli(L-ácido láctico) [43].

Para essas reações foi sintetizado um poli(3-benzilglicerol-*co*-succinato) [41] com massa molecular de  $M_w = 48.330 \text{ g.mol}^{-1}$  (PDI = 3,5). O poli(L-ácido láctico) [43] utilizado foi o mesmo preparado durante as investigações para a obtenção de PLLA de alta massa molecular, com um valor de  $M_w = 47.300 \text{ g.mol}^{-1}$  (PDI = 1,7). Duas metodologias foram empregadas para a realização destas reações: utilizando ácidos de Lewis como catalisadores para promover a ligação entre os polímeros; e utilizando carbodiimidas como agentes de acoplamento entre as cadeias. As condições reacionais utilizadas para cada um dos ensaios estão contidas na tabela 23, onde a designação RA refere-se às “Reações de Acoplamento”.

**Tabela 23.** Condições reacionais empregadas para reações de acoplamento entre o poli(3-benzilglicerol-*co*-succinato) [41] e poli(L-ácido láctico) [43].

Entrada	Catalisador	Agente de acoplamento	Tempo (h)	$M_w$ (g.mol <sup>-1</sup> )	$M_w/M_n$
RA01 <sup>a)</sup>	SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	--	24	37.200	2,2
RA02 <sup>a)</sup>	Sc(OTf) <sub>3</sub>	--	24	57.200	3,5
RA03 <sup>b)</sup>	--	DCC/DMAP	48	48.340	2,6
RA04 <sup>b)</sup>	--	EDC/NHS	48	47.170	2,5

a) Reações realizadas à 175 °C e sob alto-vácuo.

b) Reações realizadas à temperatura ambiente.

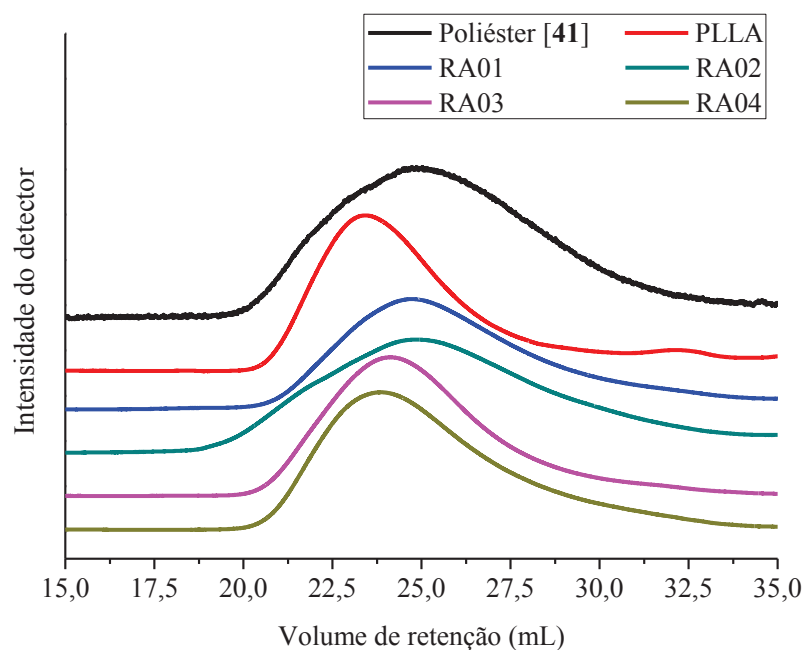
As duas primeiras entradas da tabela 23 referem-se às reações em que foram empregados dois diferentes ácidos de Lewis. Uma vez que o PLLA contém tanto uma carboxila quanto uma função hidroxila como funções terminais e o poliéster [41] possui, inevitavelmente, uma destas duas funções, é esperado que o uso de catalisadores que promovam a ativação do carbono carboxílico em um dos polímeros favoreçam a reação de acoplamento entre as cadeias.

Assim, os ácidos de Lewis SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O e Sc(OTf)<sub>3</sub> foram utilizados em reações de condensação à alta temperatura e sob alto-vácuo (entradas RA01 e RA02). Em razão do fato de que os polímeros empregados possuíam uma considerável massa molecular e que a estequiometria empregada foi de 2 : 1 (PLLA : poliéster [41]), seria esperado que houvesse um grande aumento na massa molecular do polímero em bloco sintetizado, caso a reação fosse bem sucedida. Porém, os resultados apresentados na tabela 23 mostraram que provavelmente não ocorreu a condensação entre os polímeros para a formação do bloco. Por outro lado, o fato de os polímeros terem sido submetidos a altas temperaturas e na presença de

catalisadores de caráter ácido, pode ter conduzido à hidrólise dos mesmos durante o processo, resultando em uma diminuição da massa molecular observada, mesmo ocorrendo o acoplamento entre os polímeros.

Os resultados mostrados na tabela 23 para as entradas RA03 e RA04 referem-se à utilização de carbodiimidas para as reações de esterificação entre os polímeros. A utilização desses reagentes permite o emprego de condições mais brandas à reação, evitando possíveis fragmentações dos polímeros por causa da temperatura. A estequiometria usada foi a mesma empregada para as entradas RA01 e RA02, mas os tempos de reação foram aumentados para permitir a formação dos estados de transição durante a esterificação. De modo semelhante ao observado anteriormente, não foi verificado um aumento da massa molecular para essas amostras.

A figura 68 mostra os cromatogramas de GPC para todas as reações apresentadas na tabela 23. Observa-se que, quando comparados à curva do poli(L-ácido láctico), ocorreu um pequeno deslocamento para maiores volumes de retenção, ou seja, para menores massas moleculares.

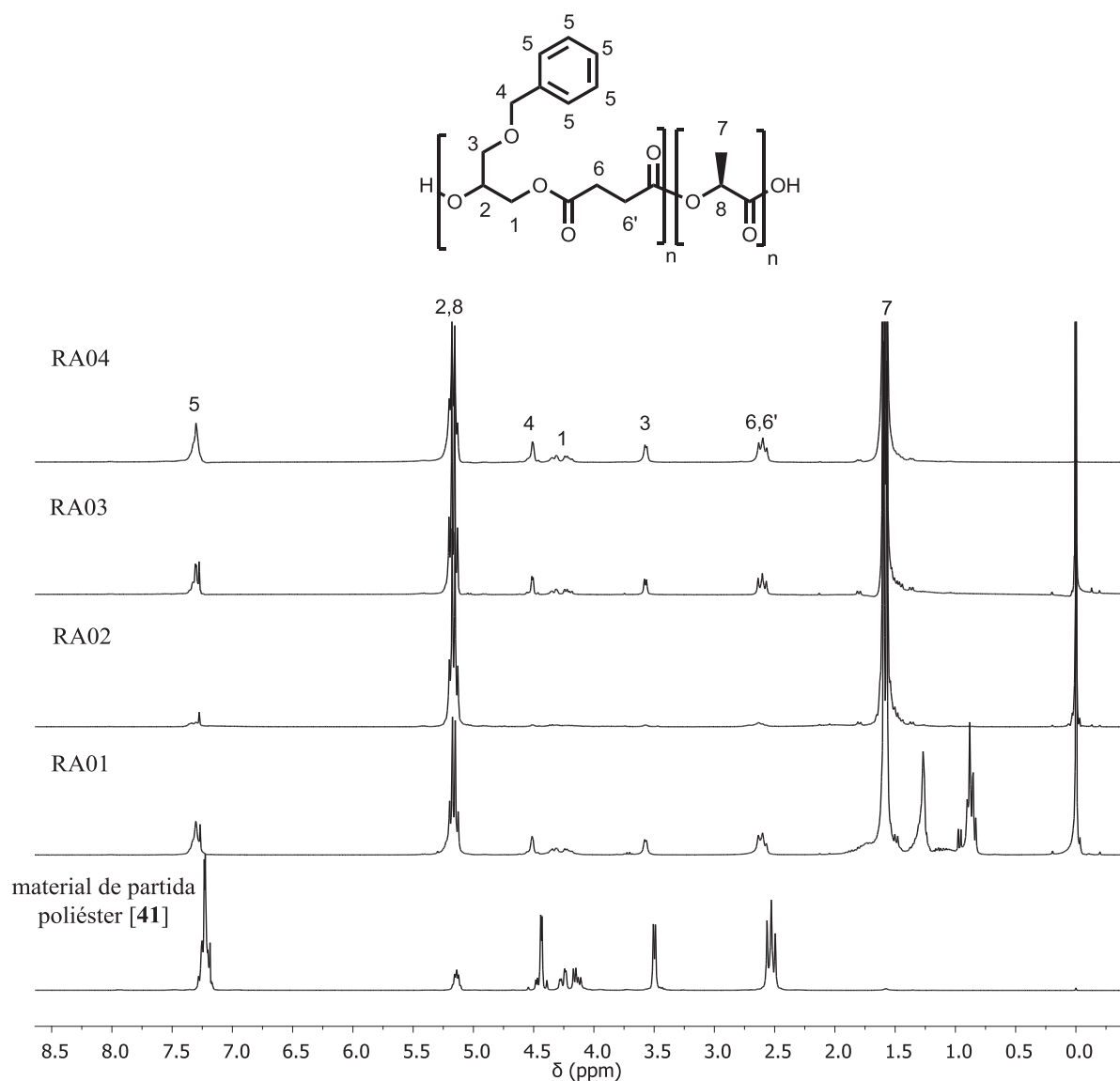


**Figura 68.** Cromatogramas de GPC para as reações de acoplamento entre o PLLA [43] e o poliéster [41].

À exceção desse deslocamento, as curvas dos produtos sintetizados assemelham-se ao PLLA, o que indica que em nenhum dos casos investigados houve a formação dos polímeros em bloco. Contudo, a análise de SEC não nos permite afirmar se houve ou não esse acoplamento. Sabendo que a técnica de cromatografia por exclusão de tamanho não separa as moléculas de acordo com suas massas moleculares, e sim através do volume hidrodinâmico do polímero em solução, é possível que o solvente empregado na análise (THF) não tenha permitido a completa expansão da cadeia do polímero em bloco nesse solvente, resultando em valores abaixo do esperado.

Visto que as análises de GPC foram inconclusivas, os produtos das reações de acoplamento da tabela 23 foram submetidos às análises de espectroscopia de RMN de hidrogênio e de  $^{13}\text{C}$ -APT, no intuito de procurar evidências da formação de ligações entre os dois polímeros. A figura 69 mostra os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do material de partida [41] e dos produtos das reações, sendo os picos com maior intensidade em  $\delta$  1,6 ppm e  $\delta$  5,1 ppm atribuídos à cadeia do PLLA. Observa-se, então, que em todos os espectros aparecem os sinais referentes à cadeia do poli(3-benzilglicerol-*co*-succinato) [41], indicando que esse polímero está presente na amostra dos produtos.

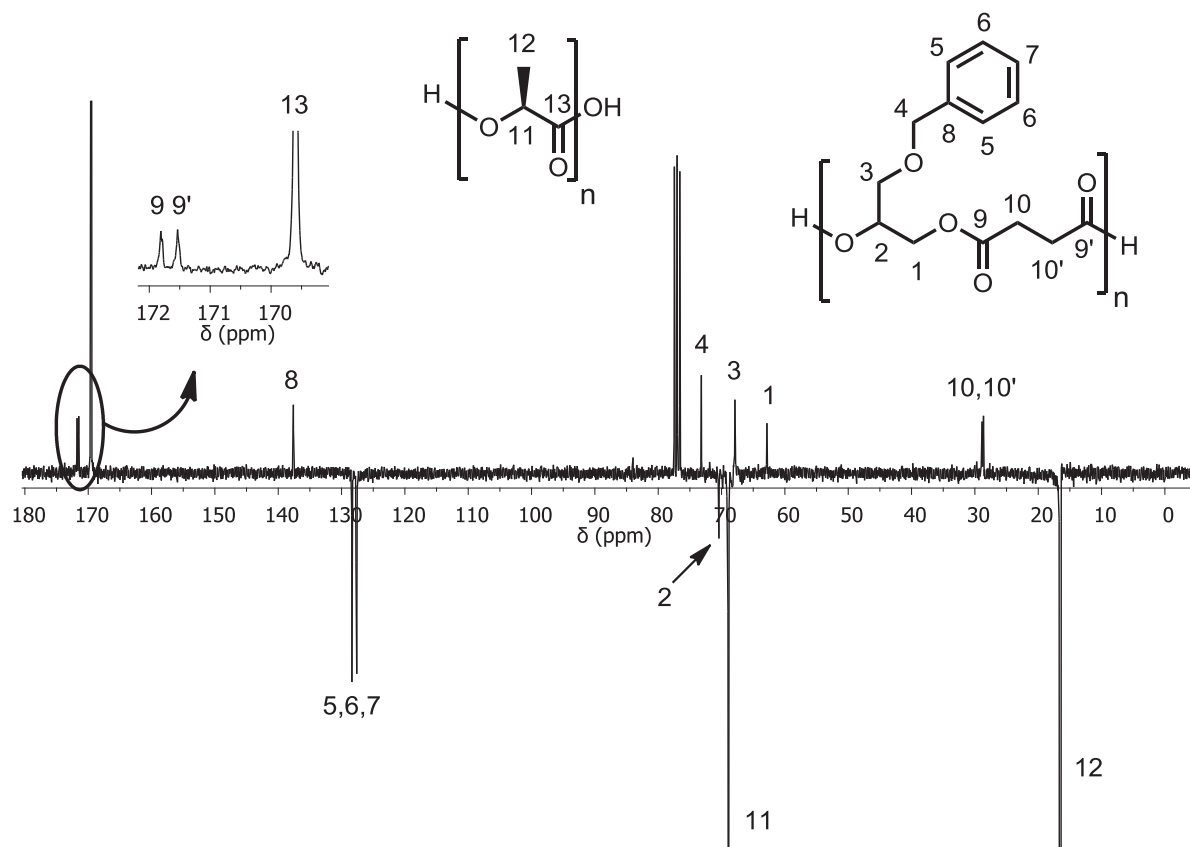
Contudo, pode-se verificar que para a reação RA02 os sinais referentes ao polímero [41] possuem uma intensidade muito baixa em comparação aos demais, sugerindo que a reação entre os dois polímeros investigados não ocorreu. Para a reação RA01, por outro lado, é possível perceber a presença de dois multipletos em  $\delta$  0,8 ppm e  $\delta$  1,25 ppm que não pertencem a nenhum dos polímeros, o que levaria à consideração de uma possível degradação de uma das cadeias durante a polimerização. As amostras RA03 e RA04 apresentam todos os sinais esperados para o polímero em bloco. Entretanto, não é correto afirmar que houve um acoplamento entre os polímeros, pois a presença de sinais do poliéster [41] poderia ser apenas em decorrência da mistura entre os dois polímeros a partir do meio reacional.



**Figura 69.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para os produtos obtidos das reações de acoplamento. (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

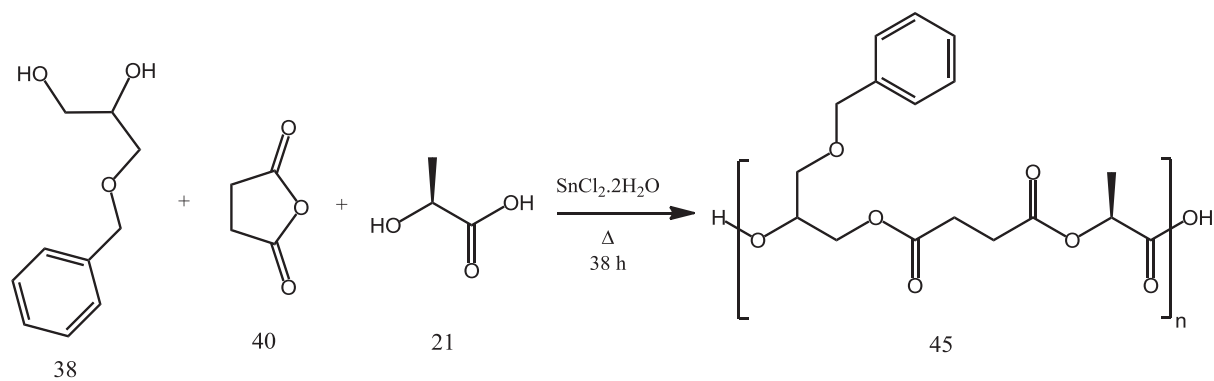
Em uma última tentativa para verificar a formação de uma ligação covalente entre o PLLA e o poliéster [41], foram realizadas análises de RMN de  $^{13}\text{C}$  para os produtos obtidos. A figura 70 mostra o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT para o material isolado da reação RA04 e observa-se a presença de todos os sinais característicos para o polímero em bloco [44] (as demais amostras possuem espectros idênticos e, portanto, não serão apresentados). O acoplamento entre as cadeias dos polímeros é confirmado pela presença de sinais de carbonila resultante da esterificação entre o PLLA e o poliéster [41]. Todavia, a ampliação da região do

espectro da figura 70 mostra apenas os sinais designados às carbonilas do PLLA em  $\delta$  169,6 ppm e das carbonilas do poliéster [41] em  $\delta$  171,5 e 171,8 (o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT do poliéster [41] pode ser visualizado na figura 83, página 183). Visto que não é possível observar claramente a presença de uma carbonila resultante da junção dos dois polímeros, concluiu-se que o copolímero em bloco [44] não foi obtido. O que se observa no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT da figura 70 é, na verdade, uma mistura entre o PLLA e o copolímero [41].



**Figura 70.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT para o produto da reação RA04. (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Uma vez que as reações de acoplamento entre o PLLA e o poliéster [41] não apresentaram bons resultados, foram realizados alguns ensaios para a obtenção de um terpolímero utilizando os monômeros L-ácido láctico [21], anidrido succínico [40] e o diol [38] (esquema 20). Essa síntese foi elaborada com a finalidade de obter um polímero que apresente propriedades de processabilidade diferentes daquelas observadas para o poliéster [41].



**Esquema 19.** Síntese do terpolímero [45] a partir da reação de polimerização entre o L-ácido láctico, anidrido succínico e o 3-benzilglicerol.

O procedimento para essa polimerização foi realizado em três etapas. Primeiro, o anidrido succínico [40] e o 3-benzilglicerol [38] foram adicionados a um balão de fundo redondo sob atmosfera inerte e aquecidos a 80 °C por 3 horas, na presença de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Essa etapa teve a finalidade de realizar a abertura do anel do anidrido com o diol [38], uma vez que o anidrido succínico é sensível à presença de água e não poderia ser adicionado ao mesmo tempo com a solução aquosa de L-ácido láctico. Em seguida, a solução de L-ácido láctico foi adicionado ao sistema e a temperatura foi elevada para 100 °C. A reação permaneceu nessa temperatura e sob fluxo de argônio durante 15 horas para a remoção do excesso de água contida na solução de ácido láctico. Por fim, a temperatura foi aumentada para 150 °C e uma bomba de vácuo foi acoplada ao balão da reação, a qual permaneceu nessas condições por mais 20 horas.

Diferentes proporções de monômeros foram empregadas e os resultados para estas reações estão contidos na tabela 24, onde RST refere-se às “Reações para a Síntese do Terpolímero” [45]. Em todas as proporções de monômeros empregadas verificou-se a formação de um material com coloração semelhante ao poliéster [41], mas apresentando uma característica mais rígida. Os terpolímeros obtidos apresentaram massas moleculares de aproximadamente  $10.000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ , com rendimentos de moderados a bons e polidispersidades características de polimerizações por etapas.

**Tabela 24.** Resultados obtidos para as reações de obtenção do terpolímero [45].

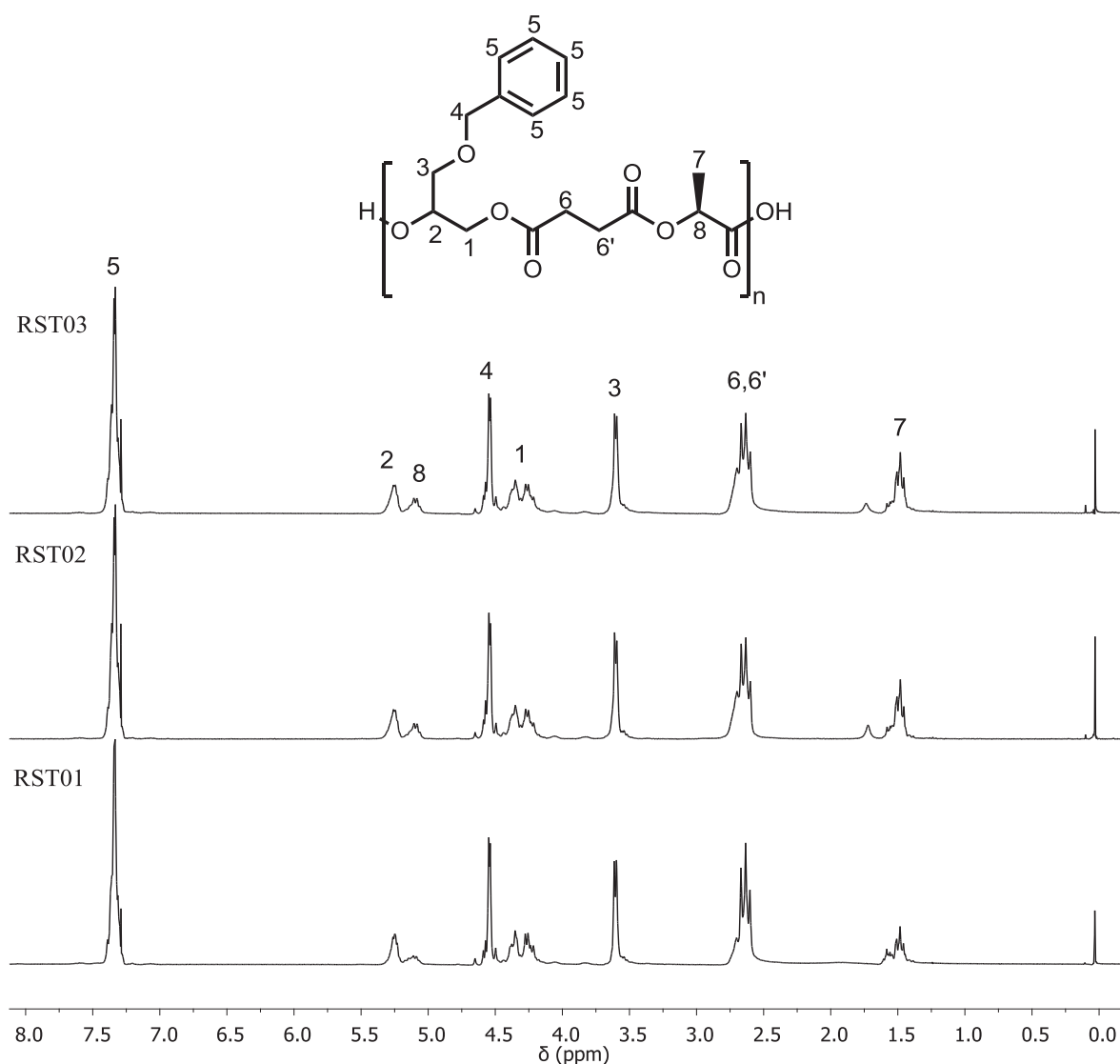
Entrada	Proporção AL:BG:AnS <sup>a</sup>	$M_w$ (g.mol <sup>-1</sup> )	$M_w/M_n$	Rendimento (%)	Composição (%) (AL:BG:AnS)
<b>RST01</b>	1 : 0,5 : 0,5	15.000	1,7	67	15:43:42
<b>RST02</b>	1 : 0,6 : 0,6	10.840	1,8	54	20:40:40
<b>RST03</b>	1,2 : 0,5 : 0,5	15.060	1,8	71	18:38:44

a) AL = ácido lático; BG = 3-benzilglicerol; AnS = anidrido succínico

A composição final de cada monômero presente nesses polímeros, entretanto, não correspondeu à proporção inicial entre os monômeros utilizada nas reações. Em todos os terpolímeros obtidos foi possível verificar que a quantidade de L-ácido lático presente na composição das amostras está muito abaixo daquela empregada no início da reação. Esse baixo teor de L-ácido lático nos terpolímeros pode estar associado ao vácuo utilizado durante o processo de polimerização. Nesse estudo, as três reações foram realizadas de uma única vez e utilizaram a mesma linha de alto-vácuo. No final do processo foi percebida a presença de um produto cristalino e incolor condensado nas junções entre os balões da reação e a saída para a bomba de alto-vácuo. Esse produto pode ser oligômeros de PLLA que foram removidos da reação em virtude do vácuo empregado, o que explicaria a baixa proporção de monômeros de L-ácido lático na composição dos terpolímeros. Contudo, nenhuma análise foi realizada para determinar a composição desse subproduto.

Os produtos obtidos das reações da tabela 24 foram estruturalmente caracterizados por RMN de <sup>1</sup>H e todos os polímeros sintetizados apresentaram espectros idênticos (figura 71).

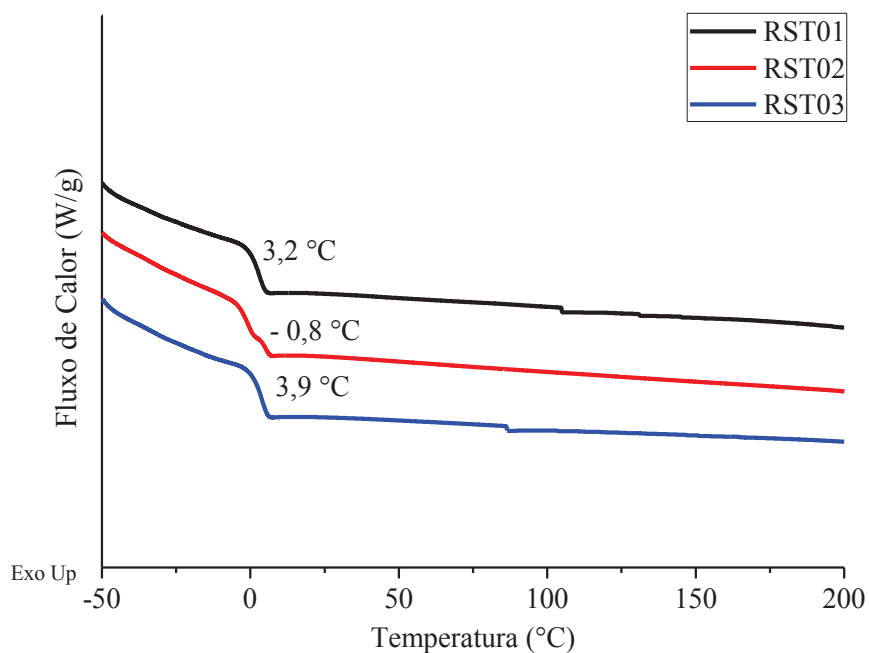




**Figura 71.** Espectros de RMN de <sup>1</sup>H para as reações de obtenção do terpolímero [45].

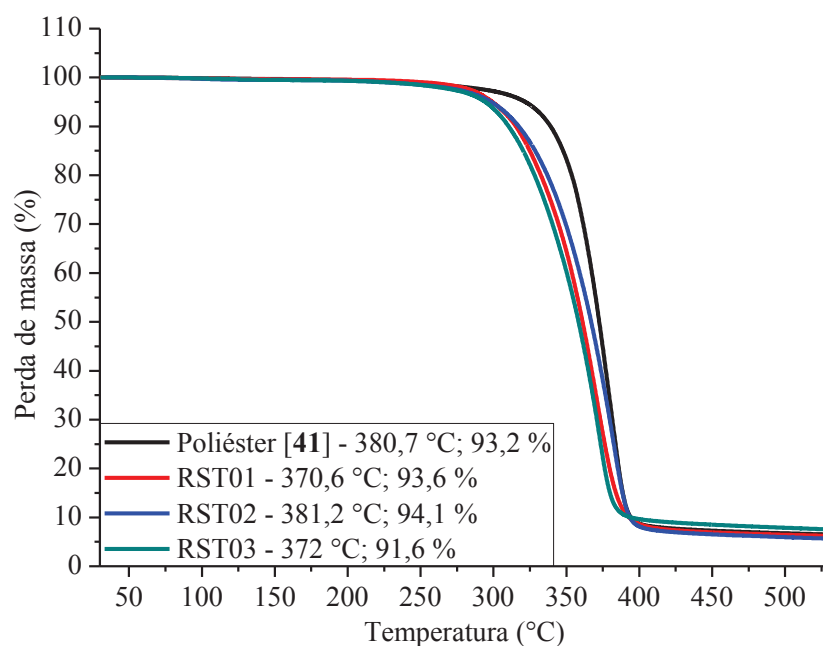
As propriedades térmicas desses materiais foram verificadas por calorimetria exploratória diferencial, sendo observado que todos os terpolímeros possuem uma característica completamente amorfa (figura 72). Uma vez que polímeros de L-ácido láctico são semicristalinos, o aparecimento de picos de fusão e cristalização para a amostra poderia ser esperado. Porém, em razão da distribuição aleatória dos monômeros na estrutura do polímero, esses picos não foram observados, o que comprova que o L-ácido láctico reagiu com os demais monômeros presentes no meio, não apenas com ele mesmo. As temperaturas de transição vítrea mostraram pequenas variações em consequência ao emprego de diferentes

proporções de monômeros, onde se destacam os baixos valores encontrados, ideais para aplicações em dispositivos médicos.



**Figura 72.** Termogramas de DSC para os terpolímeros sintetizados (referentes ao 2º ciclo de aquecimento).

A figura 73 contém os termogramas de TGA para os perfis de degradação térmica dos terpolímeros sintetizados. Todas as amostras apresentam características idênticas para a degradação térmica de poliésteres alifáticos, ou seja, uma única e acentuada queda na curva dos termogramas e um teor residual muito baixo.



**Figura 73.** Análise termogravimétrica para os terpolímeros da tabela 23 e para o polímero [41].

As análises mostraram que a síntese dos terpolímeros da tabela 24 foi bem sucedida. Segundo dados coletados por DSC, os polímeros apresentam propriedades térmicas interessantes para aplicação em engenharia de tecidos. Entretanto, outras investigações serão necessárias para aperfeiçoar o procedimento de polimerização, uma vez que as massas molares obtidas para esse polímero foram baixas para a eletrofiação. Como o próximo passo envolve a reação de hidrogenólise para a remoção dos grupos benzílicos, isso resultaria em uma possível queda na massa molecular, inviabilizando ainda mais a sua utilização. Além disso, muitas aplicações requerem polímeros com altas massas moleculares por apresentarem melhores propriedades mecânicas. Essas propriedades não foram investigadas para esses terpolímeros, em razão de suas massas moleculares.

## 6. Conclusões

A obtenção de poli(ácido láctico) de alta massa molar a partir de uma solução aquosa de ácido láctico foi realizada em duas etapas. A primeira consistiu na síntese de um pré-polímero de PLA de baixa massa molecular através de desidratação azeotrópica em xileno, na presença de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . A seguir, esse polímero foi submetido às condições de polimerização em etapas em xileno anidro, utilizando peneira molecular para remover a água resultante da reação de policondensação. O polímero foi sintetizado com uma massa molecular ponderal média de cerca de  $80.000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  em 48 h.

A partir de soluções contendo misturas entre um poli(D,L-ácido láctico) (PDLLA) de alta massa molecular e um poli(L-ácido láctico) (PLLA) de baixa massa molecular foi possível a obtenção de matrizes de microfibras através da técnica de eletrofiação. As soluções utilizadas apresentaram viscosidades entre 110 e 170 cP. As matrizes de microfibras obtidas não apresentaram imperfeições em sua estrutura, de acordo com as análises de microscopia eletrônica de varredura. Além disso, filmes dessas *blendas* foram obtidos a partir da evaporação do solvente da solução.

A característica hidrofóbica das matrizes de microfibras, contudo, não foi alterada quando maiores proporções de PLLA foram adicionadas à mistura. A degradação das matrizes de microfibras e dos filmes de PDLLA/PLLA apresentaram perfis semelhantes e foram mais rápidas quanto maior a quantidade de PLLA adicionado à *blenda*. As análises térmicas das matrizes de microfibras mostraram um comportamento amorfo à temperatura ambiente, enquanto que os filmes são semicristalinos.

A adição de um PLLA de baixa massa molecular a um PDLLA de alta massa molecular não diminuiu o alongamento máximo obtido para as matrizes de microfibras em ensaios de tensão  $\times$  deformação, mas alterou significativamente a resistência à deformação dessas amostras. Entretanto, a adição do PLLA nos filmes proporcionou tanto um aumento da resistência à deformação quanto um aumento na tensão máxima de ruptura durante os ensaios mecânicos.

O primeiro poliéster funcionalizado deste trabalho foi obtido a partir dos monômeros L-ácido láctico e L-ácido málico. As reações empregando um oligômero de poli(L-ácido láctico) com o DL-ácido málico resultaram na obtenção de copolímeros contendo um baixo teor de

ácido málico incorporado ao polímero. Quando a quantidade de ácido málico incorporado foi de 7 % em mol ou maior, o copolímero tornou-se amorfo.

A utilização de uma solução aquosa de L-ácido láctico e do L-ácido málico na presença do catalisador de triflato de escândio (III) permitiu a obtenção de um copolímero com massa molecular ponderal média de  $6.700 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Além disso, as análises de RMN de  $^1\text{H}$  mostraram uma incorporação de 18 % em mol de ácido málico à cadeia do polímero. A principal característica desse copolímero é a presença de diversos grupos carboxila em sua estrutura, tornando-o interessante para a funcionalização de matrizes para regeneração de tecidos.

O poli(L-ácido láctico-*co*-L-ácido málico) (PLLALMA) foi empregado na produção de matrizes através da técnica de *electrospinning* para posterior utilização como substitutos biológicos. Em razão de sua baixa massa molecular, esse copolímero foi utilizado na forma de *blenda* com um poli(D,L-ácido láctico) de alta massa molecular em uma quantidade de até 30 % em massa. As matrizes de fibras contendo este copolímero apresentaram diâmetros médios inferiores a um micrometro e sem a presença de imperfeições, como resultado da baixa viscosidade das soluções em razão da presença do poli(L-ácido láctico-*co*-L-ácido málico). Para estabelecer comparações, filmes contendo esse copolímero também foram preparados.

Os ensaios de ângulo de contato mostraram que as matrizes de nanofibras tornaram-se completamente hidrofílicas quando quantidades superiores a 10 % de PLLALMA [26] foram utilizadas na composição da *blenda*, mas nenhuma diferença foi observada para os filmes. A degradação hidrolítica para as amostras de matrizes de nanofibras e dos filmes contendo o PLLALMA mostrou uma queda na massa molecular ponderal média do PDLLA de cerca de 50 % em 18 dias, em comparação com uma redução de apenas 10 % para as amostras contendo apenas o PDLLA, nesse mesmo período.

As análises térmicas das nanofibras contendo o poli(L-ácido láctico-*co*-L-ácido málico) mostraram que ao aumentar a quantidade de PLLALMA na mistura, as matrizes de nanofibras apresentam-se em um estado semicristalino, diferentemente do encontrado para as microfibras de *blendas* de PDLLA/PLLA. Os experimentos de tensão  $\times$  deformação mostraram que a adição do PLLALMA [26] atuou como um plastificante para os filmes contendo este copolímero e quanto maior a sua adição, menor a tensão de ruptura e menor a resistência à deformação. A adição deste copolímero às nanofibras resultou em uma diminuição da resistência à deformação e baixas elongações.

Os ensaios de adesão para as matrizes de nanofibras contendo 30 % de PLLALMA adicionado à *blenda* mostraram que não houve diferença estatística entre essa matriz e o grupo controle. Contudo, os experimentos de viabilidade celular indicaram que não houve uma expansão celular nas matrizes de nanofibras contendo o PLLALMA.

A partir do substrato *solketal* [27] foi possível sintetizar três monômeros derivados do glicerol. Contudo, os monômeros tosilato de glicerila [29] e 3-azidopropanodiol [35] mostraram-se termicamente instáveis para serem utilizados em polimerizações com diácidos carboxílicos e anidridos. Por outro lado, a reação entre o 3-benzilglicerol [38] e o anidrido succínico [40] permitiu a obtenção do copolímero linear poli(3-benzilglicerol-*co*-succinato) [41], com uma massa molecular de cerca de  $60.000 \text{ g.mol}^{-1}$  e temperatura de transição vítrea em  $-2,3 \text{ }^\circ\text{C}$ . A alta massa molecular obtida, assim como sua baixa  $T_g$ , torna-o um excelente candidato para a fabricação de *scaffolds* para engenharia de tecidos através da técnica de eletrofiação.

Entretanto, a tentativa de remoção dos grupos protetores benzila através de reação de hidrogenólise resultou em uma grande redução na massa molecular do polímero. No intuito de melhorar as propriedades desse polímero realizou-se algumas tentativas de acoplamento desse copolímero com um poli(L-ácido láctico). Todavia, as análises realizadas não comprovaram o estabelecimento de ligações entre esses polímeros.

A reação entre L-ácido láctico, 3-benzilglicerol e ácido succínico em diferentes proporções resultou na obtenção de terpolímeros com baixas massas moleculares e temperaturas de transição vítrea entre  $-1$  e  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 7. Referências

1. Langer, R.; Vacanti, J. P.; *Science* **1993**, *260*, 920.
2. Lee, K. Y.; Mooney, D. J.; *Chemical Reviews* **2000**, *101*, 1869.
3. Putnam, A. J.; Mooney, D. J.; *Nat. Med.* **1996**, *2*, 824.
4. Marler, J. F.; Upton, J.; Langer, R.; Vacanti, J. P.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *33*, 165.
5. Herman, A. R.; *J. Drugs Dermatol.* **2002**, *1*, 298.
6. Walter, C. J.; *Laryngol. Otol.* **1988**, *102*, 1079.
7. Bennett, R. G.; *Cutaneous surgery: history and development. Fundamentals of cutaneous surgery*; St Louis: Mosby; **1988**, p 3.
8. Ang, G. C.; *Clin. Dermatol.* **2005**, *23*, 320.
9. Berthiaume, F.; Maguire, T. J.; Yarmush, M. L.; *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2011**, *2*, 403.
10. Merrill, J. P.; Murray, J. E.; Harrison, J. H.; Guild, W. R.; *J. Amer. Med. Assoc.* **1984**, *251*, 2566.
11. Hilfiker, A.; Kasper, C.; Hass, R.; Haverich, A.; *Langenbecks Arch. Surg.* **2011**, *396*, 489.
12. Wang, S.; Cui, W.; Bei, J.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 547.
13. Nerem, R. M.; *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 1143.
14. Chen, G.; Ushida, T.; Tateishi, T.; *Macromol. Biosci.* **2002**, *2*, 67.
15. Lanza, R.; Langer, R.; Vacanti, J.; *Principles of Tissue Engineering*; Elsevier: San Diego; **2007**; p 135-248.
16. van Blitterswijk, C.; Thomsen, P.; Lindahl, A.; Hubbell, J.; Williams, D.; Cancedda, R.; de Bruijn, J.; Sohier, J.; *Tissue Engineering*; Elsevier: San Diego; **2008**; p. 308-309.
17. Fonte: <http://nextbigfuture.com/2011/01/nanotechnology-strategies-for-tissue.html>
18. Groeber, F.; Holeiter, M.; Hampel, M.; Hinderer, S.; Schenke-Layland, K.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *128*, 352.
19. Howard, D.; Buttery, L. D.; Shakesheff, K. M.; Roberts, S. J.; *J. Anat.* **2008**, *213*, 66.
20. Cho, C. H.; Parashurama, N.; Park, E. Y. H.; Sukanuma, K.; Nahmias, Y.; Park, J.; Tilles, A. W.; Berthiaume, F.; Yarmush, M. L.; *FASEB J.* **2008**, *22*, 898.

21. Abousleiman, R. I.; Reyes, Y.; McFetridge, P.; Sikavitsas, V.; *Artif. Organs* **2008**, *32*, 735.
22. Takahashi, K.; Yamanaka, S.; *Cell* **2006**, *126*, 663.
23. Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D.; Moorman, M. A.; Simonetti, D. W.; Craig, S.; Marshak, D. R.; *Science* **1999**, *284*, 143.
24. Hutmacher, D. W.; *Biomaterials* **2000**, *21*, 2529.
25. Park, H.; Temenoff, J. S.; Tabata, Y.; Caplan, A. I.; Mikos, A. G.; *Biomaterials* **2007**, *28*, 3217.
26. Rezwani, K.; Chen, Q. Z.; Blaker, J. J.; Boccaccini, A. R.; *Biomaterials* **2006**, *27*, 3413.
27. Lawrence, B. D.; Marchant, J. K.; Pindrus, M. A.; Omenetto, F. G.; Kaplan, D. L.; *Biomaterials* **2009**, *30*, 1299.
28. Rafat, M.; Li, F.; Fagerholm, P.; Lagali, N. S.; Watsky, M. A.; Munger, R.; Matsuura, T.; Griffith, M.; *Biomaterials* **2008**, *29*, 3960.
29. Fiegel, H. C.; Kaufmann, P. M.; Bruns, H.; Kluth, D.; Horch, R. E.; Vacanti, J. P.; Kneser, U. J.; *Cell. Mol. Med.* **2008**, *12*, 56.
30. Rastogi, A.; Nissenson, A. R.; *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *4*, S132.
31. Hammerman, M. R.; *Kidney Int.* **2003**, *63*, 1195.
32. Shimizu, T.; Yamato, M.; Isoi, Y.; Akutsu, T.; Setomaru, T.; Abe, K.; Kikuchi, A.; Umezumi, M.; Okano, T.; *Circ. Res.* **2002**, *90*, E40.
33. Sacks, M. S.; Schoen, F. J.; Mayer, J. E. Jr.; *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2009**, *11*, 289.
34. Schmidt, C. E.; Leach, J. B.; *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2003**, *5*, 293.
35. Yang, F.; Murugan, R.; Wang, S.; Ramakrishna, S.; *Biomaterials* **2005**, *26*, 2603.
36. Ma, L.; Gao, C.; Mao, Z.; Zhou, J.; Shen, J.; Hu, X.; Han, C.; *Biomaterials* **2003**, *24*, 4833.
37. Böttcher-Haberzeth, S.; Biedermann, T.; Reichmann, E.; *Burns* **2010**, *36*, 450.
38. Liu, Y.; Ma, L.; Gao, C.; *Mater. Sci. Eng. C* **2012**, *32*, 2361.
39. MacNeil, S.; *Nature* **2007**, *445*, 874.
40. Horch, R. E.; Kopp, J.; Kneser, U.; Beier, J.; Bach, A. D.; *J. Cell. Mol. Med.* **2005**, *9*, 592.
41. Metcalfe, A. D.; Ferguson, M. W. J.; *J. R. Soc. Interface* **2007**, *4*, 413.
42. Liu, H.; Mao, J.; Yao, K.; Yang, G.; Cui, L.; Cao, Y. J.; *Biomater. Sci. Polymer Edn.* **2004**, *15*, 25.



43. Wade, R. J.; Burdick, J. A.; *Mater. Today* **2012**, *15*, 454.
44. Bačáková, L.; Filová, E.; Rypáček, F.; Švorčík, V.; Starý, V.; *Physiol. Res.* **2004**, *53*, S35.
45. Lutolf, M. P.; Hubbell, J. A.; *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 47.
46. Michaelis, S.; Robelek, R.; Wegener, J.; *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* **2012**, *126*, 33.
47. Roach, P.; Farrar, D.; Perry, C. C.; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8168.
48. Helmus, M. N.; Tweden, K.; *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, Part A*; Basel: New York; **1995**, p27.
49. Nair, L. S.; Laurencin, C. T.; *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 762.
50. Vacanti, C. A.; *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 1137.
51. Ulery, B. D.; Nair, L. S.; Laurencin, C. T.; *J. Polym. Sci. Pol. Phys.* **2011**, *49*, 832.
52. Payne, R. G.; Yaszemski, M. J.; Yasko, A. W.; Mikos, A.G.; *Biomaterials* **2002**, *23*, 4359.
53. Awad, H. A.; Wickham, M. Q.; Leddy, H. A.; Gimble, J. M.; Guilak, F.; *Biomaterials* **2004**, *25*, 3211.
54. Risbud, M.; Endres, M.; Ringe, J.; Bhonde, R.; Sittinger, M.; *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *56*, 120.
55. Shimizu, T.; Yamato, M.; Kikuchi, A.; Okano, T.; *Biomaterials* **2003**, *24*, 2309.
56. de la Puente, P.; Ludeña, D.; Fernández, A.; Aranda, J. L.; Varela, G.; Iglesias, J.; *J. Biomed. Mater. Res. A* **2011**, *99A*, 648.
57. Acharya, C.; Hinz, B.; Kundu, S. C.; *Biomaterials* **2008**, *29*, 4665.
58. Bhardwaj, N.; Kundu, S. C.; *Carbohydr. Polym.* **2011**, *85*, 325.
59. Vepari, C.; Kaplan, D. L.; *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 991.
60. Monzack, E. L.; Rodriguez, K. J.; McCoy, C. M.; Gu, S.; Masters, K. S.; *Natural Materials in Tissue Engineering Applications. Biomaterials for Tissue Engineering Applications*; Springer-Verlag:Wien; **2011**, p 209.
61. Gunatillake, P. A.; Adhikari, R.; *Eur. Cells Mater.* **2003**, *5*, 1.
62. Boudriot, U.; Goetz, B.; Dersch, R.; Greiner, A.; Wendorff, J. H.; *Macromol. Sy.* **2005**, *225*, 9.
63. Jiang, X.; Li, J.; Ding, M.; Tan, H.; Ling, Q.; Zhong, Y.; Fu, Q.; *Eur. Polym. J.* **2007**, *43*, 1838.
64. Vasita, R.; Mani, G.; Agrawal, C. M.; Katti, D. S.; *Polymer* **2010**, *51*, 3706.
65. Ma, A.; Mao, A.; Gao, C.; *Colloid Surface B* **2007**, *60*, 137.

66. Chen, H.; Yuan, L.; Song, W.; Wu, Z.; Li, D.; *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 1059.
67. Peng, H.; Xiao, Y.; Mao, X.; Dhen, L.; Crawford, R.; Whittaker, A. K.; *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 95.
68. Sokolsky-Papkov, M.; Agashi, K.; Olaye, A.; Shakesheff, K.; Domb, A. J.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 187.
69. Datta, R.; Henry, M.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2006**, *81*, 1119.
70. Auras, R. A.; Harte, B.; Selke, S.; Hernandez, R.; *J. Plast. Film Sheet.* **2003**, *19*, 123.
71. Anderson, K. A.; Schreck, K. M.; Hillmyer, A. M. A.; *Polymer Reviews* **2008**, *48*, 85.
72. Fukushima, K.; Kimura, Y.; *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **2008**, *46*, 3714.
73. Kamber, N. E.; Jeong, W.; Waymouth, R. M.; *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5813.
74. Garlotta, D.; *J. Polym. Environ.* **2002**, *9*, 63.
75. Stille, J. K.; *J. Chem. Edu.* **1981**, *58*, 862.
76. Odian, G.; *Principles of Polymerization*; John Wiley & Sons: Hoboken; **2004**, p 41.
77. Maharana, T.; Mohanty, B.; Negi, Y. S.; *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34*, 99.
78. Ajioka, M.; Suizu, H.; Higuchi, C.; Kashima, T.; *Polym. Degrad. Stabil.* **1998**, *59*, 137.
79. Proikakis, C. S.; Tarantili, P. A.; Andreopoulos, A. G.; *J. Elastom. Plast.* **2002**, *34*, 49.
80. Takasu, A.; Narukawa, Y.; Hirabayashi, T.; *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **2006**, *44*, 5247.
81. Ajioka, M.; Enomoto, K.; Suzuki, K.; Yamaguchi, A.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1995**, *68*, 2125.
82. Ajioka, M.; Enomoto, K.; Suzuki, K.; *J. Environ. Polym. Deg.* **1995**, *3*, 225.
83. Ajioka, M.; Enomoto, K.; Yamaguchi, A.; US Patent N° 5310865, **1994**.
84. Bos, H.; Meesters, K.; Conijn, S.; Corré, W.; Patel, M.; *Sustainability aspects of biobased applications: Comparison of different crops and products from the sugar platform*; Wageningen UR Food & Biobased Research; Report 1166, **2010**.
85. Kim, K. W.; Woo, S. I.; *Macromol. Chem. Phys.* **2002**, *203*, 2245.
86. Zhao, Y.; Wang, Z.; Wang, J.; Mai, H.; Yan, B.; Yang, F.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *91*, 2143.
87. Chen, G. -X.; Kim, H. -S.; Kim, E. -S.; Yoon, J. -S.; *Eur. Polym. J.* **2006**, *42*, 468.
88. Moon, S. I.; Lee, C. W.; Miyamoto, M.; Kimura, Y.; *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **2000**, *38*, 1673.
89. Moon, S. I.; Kimura, Y.; *Polym. Int.* **2003**, *52*, 299.
90. Achmad, F.; Yamane, K.; Quan, S.; Kokugan, T.; *Chem. Eng. J.* **2009**, *151*, 342.
91. Williams, C. K.; *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1573.

92. Kim, H.; Olsson, J. V.; Hedrick, J. L.; Waymouth, R. M.; *ACS Macro Lett.* **2012**, *1*, 845.
93. You, Z.; Wang, Y.; *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 2812.
94. Wang, L.; Jia, X.; Yuan, Z.; *Polymer* **2006**, *47*, 6978.
95. Seyednejad, H.; Ghassemi, A. H.; van Nostrum, C. F.; Vermonden, T.; Hennink, W. E.; *J. Control. Release* **2011**, *152*, 168.
96. He, B.; Bei, J.; Wang, S.; *Polymer* **2003**, *44*, 989.
97. He, B.; Wan, Y.; Bei, J.; Wang, S.; *Biomaterials* **2004**, *25*, 5239.
98. Seyednejad, H.; Vermonden, R.; Fedorovich, N. E.; van Eijk, R.; van Steenberg, M. J.; Dhert, W. J. A.; van Nostrum, C. F.; Hennink, W. E.; *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 3048.
99. Seyednejad, H.; Ji, W.; Schuurman, W.; Dhert, W. J. A.; Malda, J.; Yang, F.; Jansen, J. A.; van Nostrum, C.; Vermonden, T.; Hennink, W. E.; *Macromol. Biosci.* **2011**, *11*, 1684.
100. Leemhuis, M.; van Nostrum, C. F.; Kruijtzter, J. A. W.; Zhong, Z. Y.; ten Breteler, M. R.; Dijkstra, P. J.; Feijen, J.; Hennink, W. E.; *Macromolecules* **2006**, *39*, 3500.
101. Yang, J.; Webb, A. R.; Ameer, G. A.; *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 511.
102. Yao, F.; Bai, Y.; Zhou, Y.; Liu, C.; Wang, H.; Yao, K.; *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **2003**, *41*, 2073.
103. Wang, Y.; Ameer, G. A.; Sheppard, B. J.; Langer, R.; *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 602.
104. Rai, R.; Tallawi, M.; Grigore, A.; Boccaccini, A. R.; *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 1051.
105. Kolitz, M.; Cohen-Arazi, N.; Hagag, I.; Katzhendler, J.; Domb, A. J.; *Macromolecules* **2009**, *42*, 4520.
106. Park, H. -S.; Gong, M. -S.; Knowles, J. C.; *J. Biomater. Appl.* **2012**, *27*, 99.
107. Tan, L.; Maji, S.; Mattheis, C.; Zheng, M.; Chen, Y.; Caballero-Díaz, E.; Gil, P. R.; Parak, W. J.; Greiner, A.; Agarwal, S.; *Macromol. Biosci.* **2012**, *12*, 1068.
108. Li, Y.; Thouas, G. A.; Chen, Q. -Z.; *RSC Advances* **2012**, *2*, 8229.
109. Bettinger, C. J.; *Macromol. Biosci.* **2011**, *11*, 467.
110. van Aalst, J. A.; Reed, C. R.; Han, L.; Andrade, T.; Hromadka, M.; Bernacki, S.; Kolappa, K.; Collins, J. B.; Lobo, E. G.; *Ann. Plas. Surg.* **2008**, *60*, 577.
111. Greiner, A.; Wendorff, J. H.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5670.
112. Dahlin, R. L.; Kasper, F. K.; Mikos, A. G.; *Tissue Eng. Pt. B-Rev.* **2011**, *17*, 349.
113. Bhardwaj, N.; Kundu, S. B.; *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 325.

114. Huang, Z. -M.; Zhang, Y. -Z.; Kotaki, M.; Ramakrishna, S.; *Compos. Sci. Technol.* **2003**, *63*, 2223.
115. Agarwal, S.; Wendorff, J. H.; Greiner, A.; *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 3343.
116. Blackwood, K. A.; McKean, R.; Canton, I.; Freeman, C. O.; Franklin, K. L.; Cole, D.; Brook, I.; Farthing, P.; Rimmer, S.; Haycock, J.W.; Ryan, A. L.; MacNeil, S.; *Biomaterials* **2008**, *29*, 3091.
117. Fong, H.; Chun, I.; Reneker, D. H.; *Polymer* **1999**, *40*, 4585.
118. Tan, S. -H.; Inai, R.; Kotaki, M.; Ramakrishna, S.; *Polymer* **2005**, *46*, 6128.
119. Gupta, P.; Elkins, C.; Long, T. E.; Wilkes, G. L.; *Polymer* **2005**, *46*, 4799.
120. McKee, M. G.; Wilkes, G. L.; Colby, R. H.; Long, T. E.; *Macromolecules* **2004**, *37*, 1760.
121. Deitzel, J. M.; Kleinmeyer, J.; Harris, D.; Tan, N. C. B.; *Polymer* **2001**, *42*, 261.
122. Jun, Z.; Hou, H.; Schaper, A.; Wendorff, J. H.; Greiner, A.; *e-Polym.* **2003**, *9*, 1.
123. Kim, K. -H.; Jeong, L.; Park, H. -N.; Shin, S. -Y.; Park, W. -H.; Lee, S. -C.; Kim, T. -I.; Park, Y. -J.; Seol, Y. -J.; Lee, Y. -M.; Ku, Y.; Rhyu, I. -C.; Han, S. -B.; Chung, C. -P.; *J. Biotechnol.* **2005**, *120*, 327.
124. Huang, L.; Nagapudi, K.; Apkarian, R. P.; Chaikof, E. L.; *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2001**, *12*, 979.
125. Lee, J. S.; Choi, D. H.; Ghim, H. D.; Kim, S. S.; Chun, D. H.; Kim, H. Y.; Lyoo, W. S.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *93*, 1638.
126. Jarusuwannapoom, T.; Hongrojjanawiwat, W.; Jitjaicham, W.; Wannatong, L.; Nithitanakul, M.; Pattamaprom, C.; Koombhongse, P.; Rangkupan, R.; Supaphol, P.; *Eur. Polym. J.* **2005**, *41*, 409.
127. Wang, Y. -X.; Robertson, J. L.; Spillman Jr., W. B.; Claus, R. O.; *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 1362.
128. Tian, H.; Tang, Z.; Zhuang, X.; Chen, X.; Jing, X.; *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 237.
129. Yang, J.; Wan, Y.; Tu, C.; Cai, Q.; Bei, J.; Wang, S.; *Polym. Int.* **2003**, *52*, 1892.
130. Park, G. E.; Pattison, M. A.; Park, K.; Webster, T. J.; *Biomaterials* **2005**, *26*, 3075.
131. Drevelle, O.; Bergeron, E.; Senta, H.; Lauzon, M. -A.; Roux, S.; Grenier, G.; Faucheux, N.; *Biomaterials* **2010**, *31*, 6468.
132. Jung, H. J.; Park, K.; Kim, J. -J.; Lee, J. H.; Han, K. -O.; Han, D. K.; *Artif. Organs* **2008**, *32*, 981.
133. Zhu, Y. B.; Gao, C. Y.; Liu, X. Y.; Shen, J. C.; *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1312.

134. Buckley, C.T.; O'Kelly, K.U.; *Topics in Bio-Mechanical Engineering: Regular Scaffold Fabrication Techniques For Investigations In Tissue Engineering*; TCBE & NCBES: Ireland; **2004**, p 147.
135. Jacobs, T.; Morent, R.; De Geyter, N.; Dubruel, P.; Leys, C.; *Plasma Chem. Plasma P.* **2012**, 32, 1039.
136. Chu, P. K.; Chen, J. Y.; Wang, L. P.; Huang, N.; *Mat. Sci. Eng. R* **2002**, 36, 143.
137. Chen, J.-P.; Su, C.-H.; *Acta Biomater.* **2011**, 7, 234.
138. Bodas, D.; Khan-Malek, C.; *Sensor Actuat. B-Chem.* **2007**, 123, 368.
139. Gunn, J.; Zhang, M.; *Trends Biotechnol.* **2010**, 28, 189.
140. Wan, Y.; Wu, H.; Cao, X.; Dalai, S.; *Polymer Degradation and Stability* **2008**, 93, 1736.
141. Ghosh, S.; Viana, J. C.; Reis, R. L.; Mano, J. F.; *Mater. Sci. Eng. C* **2008**, 28, 80.
142. Zhang, Y.; Ouyang, H.; Lim, C. T.; Ramakrishna, S.; Huang, Z. -M.; *J. Biomed. Mater. Res. B* **2005**, 72B, 156.
143. Deng, C.; Tian, H.; Zhang, P.; Sun, J.; Chen, X.; Jing, X.; *Biomacromolecules* **2006**, 7, 590.
144. Pavia, F. C.; La Carrubba, V.; Palumbo, F.; Giammona, G.; Brucato, V.; *14th International Conference On Material Forming Esaform* **2011**, 1353, 809.
145. Taddei, P.; Monti, P.; Simoni, R.; *J. Mater. Sci. Mater. M.* **2002**, 13, 469.
146. ASTM International **F1635-11: Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants**, **2011**.
147. Bernardi, L.; Luisi, S. B.; Fernandes, R.; Dalberto, T. P.; Valentim, L.; Chies, J. A. B.; Fossati, A. S. M.; Pranke, P.; *J. Endodont.* **2011**, 37, 973.
148. Davis, M. E.; Lobo, R. F.; *Chem. Mater.* **1992**, 4, 156.
149. Graziano, G.; *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1998**, 94, 3345.
150. Hiltunen, K.; Seppälä, J. V.; Härkönen, M.; *Macromolecules* **1997**, 30, 373.
151. Moon, S. I.; Lee, C. W.; Miyamoto, M.; Kimura, I. Y.; *J. Polym. Sci. A1* **2000**, 38, 1673.
152. Buck, C. A.; *Ann. Rev. Cell Biol.* **1987**, 3, 179.
153. Kim, J. -E.; Noh, K. -T.; Yu, H. -S.; Lee, H. -Y.; Jang, J. -H.; Kim, H. -W.; *Adv. Eng. Mat.* **2010**, 12, B94.
154. Rasal, R. M.; Janorkar, A. V.; Hirt, D. E.; *Prog. Polym. Sci.* **2010**, 35, 338.

155. Atthoff, B.; Hilborn, J.; *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* **2007**, *80B*, 121.
156. Martin, O.; Avérous, L.; *Polymer* **2001**, *42*, 6209.
157. Zuo, W.; Zhu, M.; Yang, W.; Yu, H.; Chen, Y.; Zhang, Y.; *Polym. Eng. Sci.* **2005**, *45*, 704.
158. Liu, X.; Huang, C.; Feng, Y.; Liang, J.; Fan, Y.; Gu, Z.; Zhang, X.; *J. Biomat. Sci.- Polym. E.* **2010**, *21*, 963.
159. Ma, Z.; Chen, F.; Zhu, Y. -J.; Cui, T.; Liu, X. -Y.; *J. Colloid Interf. Sci.* **2011**, *359*, 371.
160. Areias, A. C.; Ribeiro, C.; Sencadas, V.; Garcia-Giralt, N.; Diez-Perez, A.; Ribelles J. L. G.; Lanceros-Méndez, S.; *Soft Matter* **2012**, *8*, 5818.
161. Park, A.; Cima, L. G.; *J. Biomed. Mater. Res.* **1996**, *31*, 117.
162. Meaurio, E.; Zuza, E.; López-Rodríguez, N.; Sarasua, J. R.; *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 5790.
163. Wang, C.; Chien, H. -S.; Yan, K. -W.; Hung, C. -L.; Hung, K. -L.; Tsai, S. -J.; Jhang, H. -J.; *Polymer* **2009**, *50*, 6100.
164. Hoogsteen, W.; Postema, A. R.; Pennings, A. J.; ten Brinke, G.; Zugenmaier, P.; *Macromolecules* **1990**, *23*, 634.
165. Dersch, R.; Liu, T.; Schaper, A. K.; Greiner, A.; Wendorff, J. H.; *J. Polym. Sci. A1*, **2003**, *41*, 545.
166. SolarSKI, S.; Ferreira, M.; Devaux, E.; *Polymer* **2005**, *46*, 11187.
167. Zuza, E.; Ugartemendia, J. M.; Lopez, A.; Meaurio, E.; Lejardi, A.; Sarasua, J. R.; *Polymer* **2008**, *49*, 4427.
168. Lloyd, D. A.; Mickel, R. E.; Kritzing, N. A.; *Bums* **1989**, *15*, 125.
169. Max, J. -J.; Chapados, C.; *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 6452.
170. Lai, K. -L.; He, B.; Gu, Z. -W.; *Chinese J. Polym. Sci.* **2008**, *26*, 177.
171. Codari, F.; Moscatelli, D.; Storti, G.; Morbidelli, M.; *Macromol. Mater. Eng.* **2010**, *295*, 58.
172. Lim, L. -T.; Auras, R.; Rubino, M.; *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 820.
173. Yang, X.; Xu, Q.; Yan, N.; Sui, G.; Cai, Q.; Deng, X.; *Polym. Adv. Technol.* **2011**, *22*, 2222.
174. Ma, M.; Mao, Y.; Gupta, M.; Gleason, K. K.; Rutledge, G. C.; *Macromolecules* **2005**, *38*, 9742.

175. Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R.; *Introduction to Spectroscopy*, 4<sup>th</sup> Ed.; Brooks/Cole : Belmont, **2009**.
176. Pamuła, E.; Błażewicz, M.; Paluszkiwicz, C.; Dobrzyński, P.; *J. Mol. Struct.* **2001**, *596*, 69.
177. Byun, Y.; Whiteside, S.; Thomas, R.; Dharman, M.; Hughes, J.; Kim, Y. T.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, *124*, 3577.
178. Gao, Y.; Kong, L.; Zhang, L.; Gong, Y.; Chen, G.; Zhao, N.; Zhang, X.; *Eur. Polym. J.* **2006**, *42*, 764.
179. Focarete, M. L.; Scandola, M.; Dobrzynski, P.; Kowalczyk, M.; *Macromolecules* **2002**, *35*, 8472.
180. Ma, Z.; Mao, Z.; Gao, C.; *Colloids Surface B* **2007**, *60*, 137.
181. Behr, A.; Eilting, J.; Irawadi, K.; Leschinski, J.; Lindner, F.; *Green Chem.* **2008**, *10*, 13.
182. Arruda, P. V.; Rodrigues, R. C. L. B.; de Felipe, M. G. A.; *Revista Analytica* **2006/2007**, *26*, 56.
183. Wu, W.; Li, R.; Malladi, S. S.; Warshakoon, H. J.; Kimbrell, M. R.; Amolins, M. W.; Ukani, R.; Datta, A.; David, S. A.; *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3198.
184. Zarbin, P. H. G.; Arrigoni, E. B.; Reckziegel, A.; Moreira, J. A.; Baraldi, P. T.; Vieira, P. C.; *J. Chem. Ecol.* **2003**, *29*, 377.
185. Deshpande, S. S.; *Handbook of Food Toxicology*; Marcel Dekker: New York, **2002**.
186. Final Report on the Safety Assessment of Maleic Acid; *Int. J. Toxicol.* **2007**, *26*, 125.
187. Grinstaff, M.W.; *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 2839.
188. Carnahan, M. A.; Grinstaff, M. W.; *Macromolecules* **2001**, *34*, 7648.
189. Cheng, K.-K.; Zhao, X.-B.; Zeng, J.; Zhang, J.-A.; *Biofuels, Bioprod. Bioref.* **2012**, *6*, 302.
190. Delhomme, C.; Weuster-Botza, D.; Kühn, F. E.; *Green Chem.* **2009**, *11*, 13.

## **8. ANEXO 1**

### **ESPECTROS DE RMN DE $^1\text{H}$ E DE $^{13}\text{C}$**



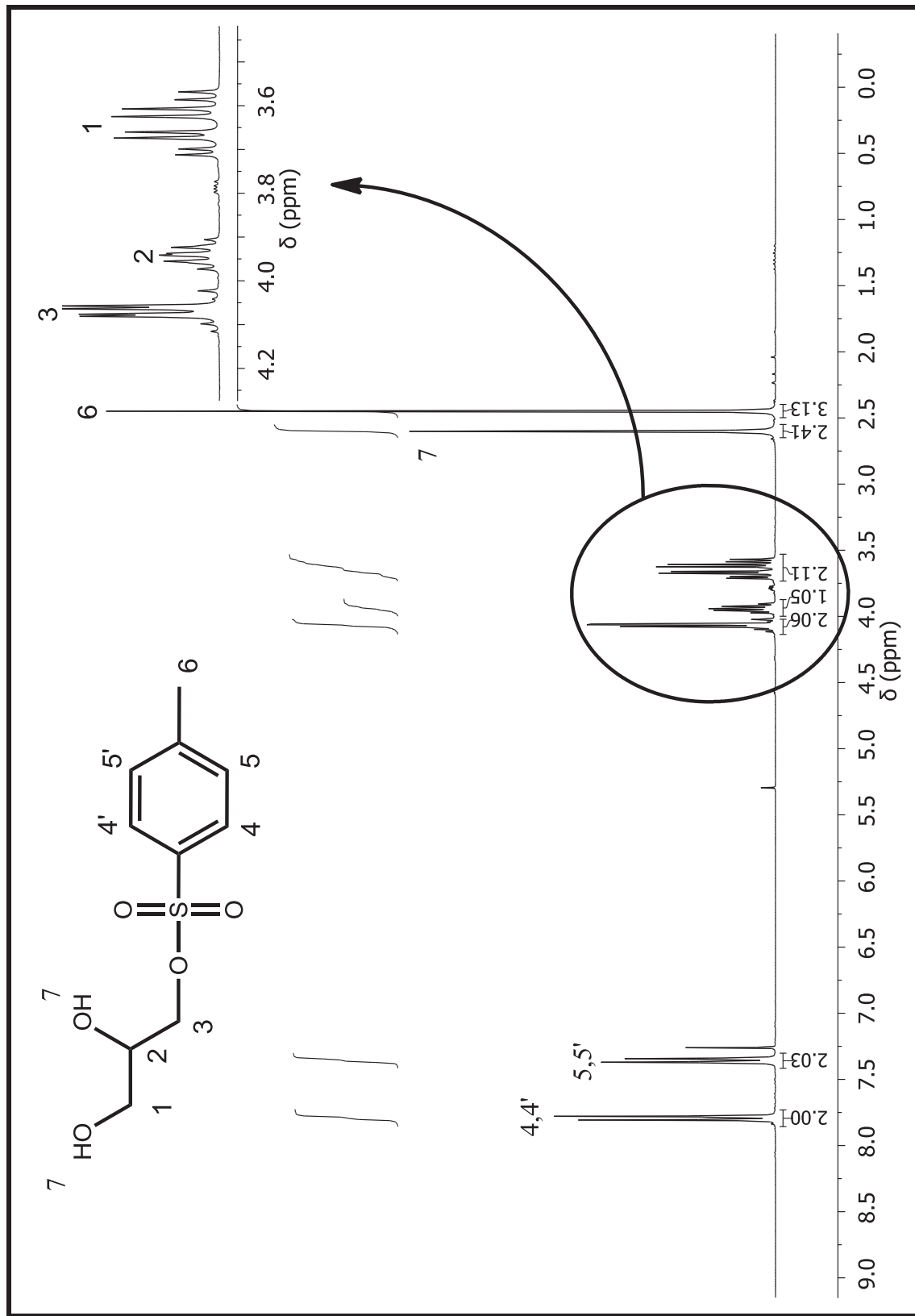
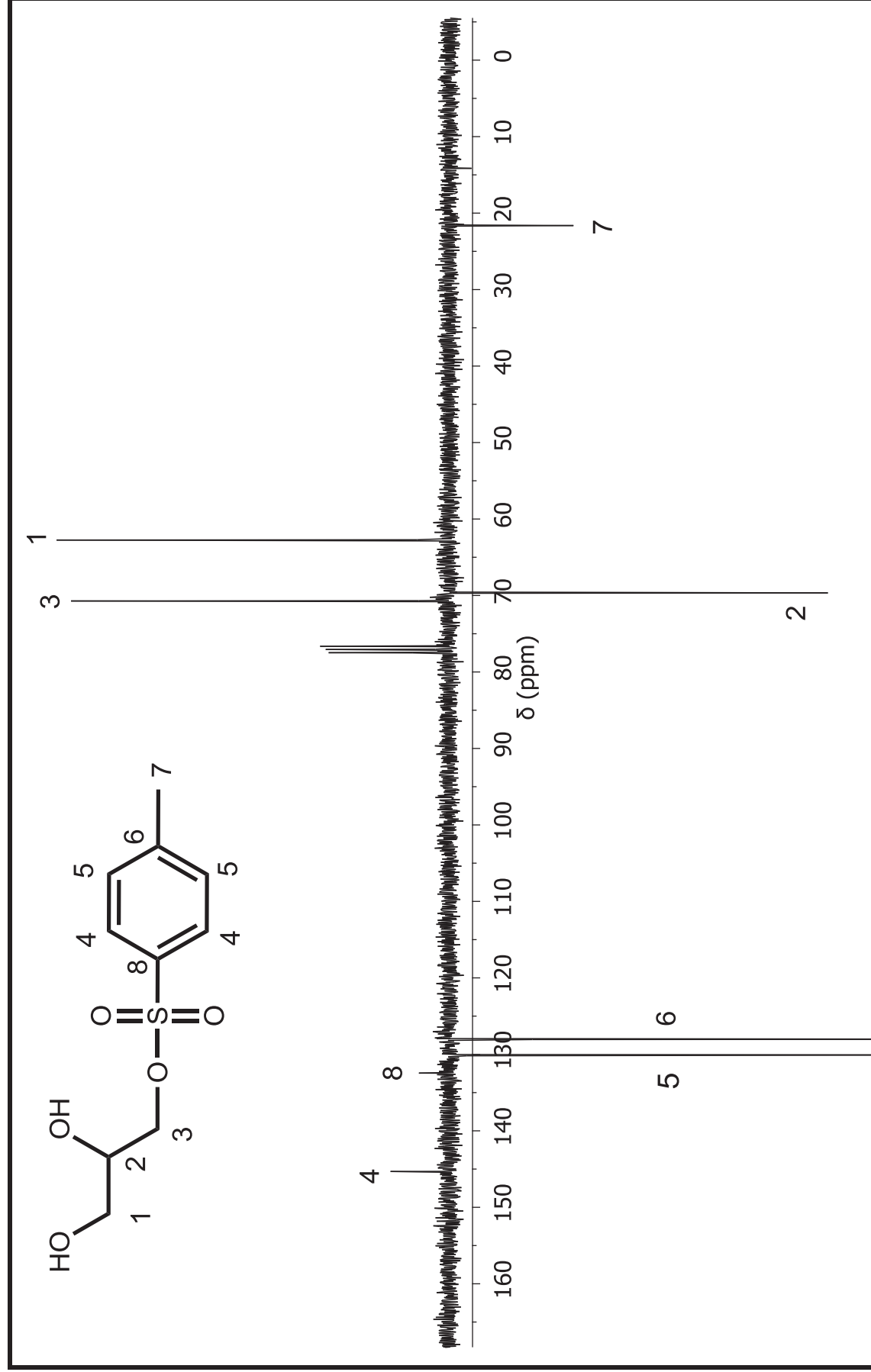
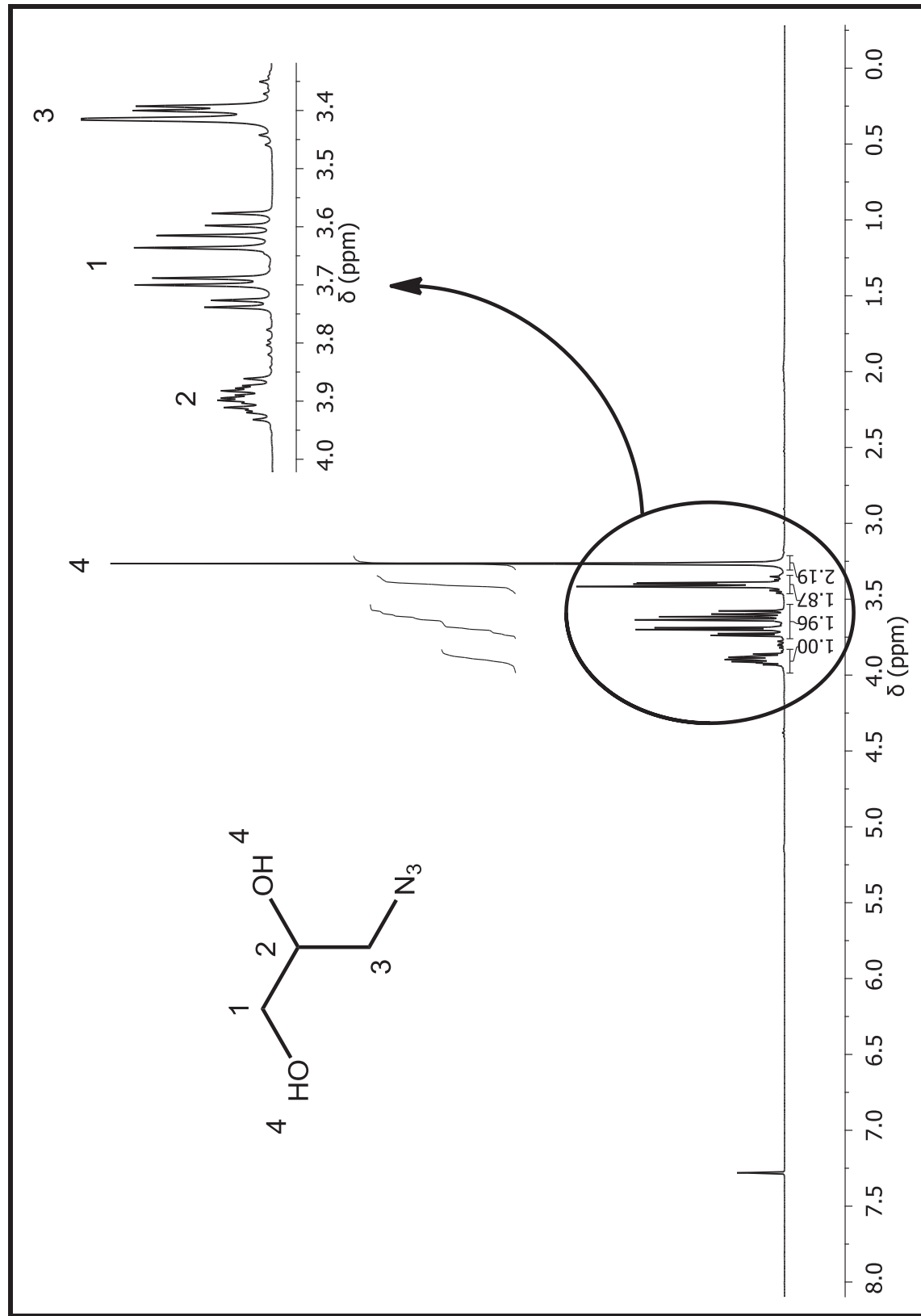


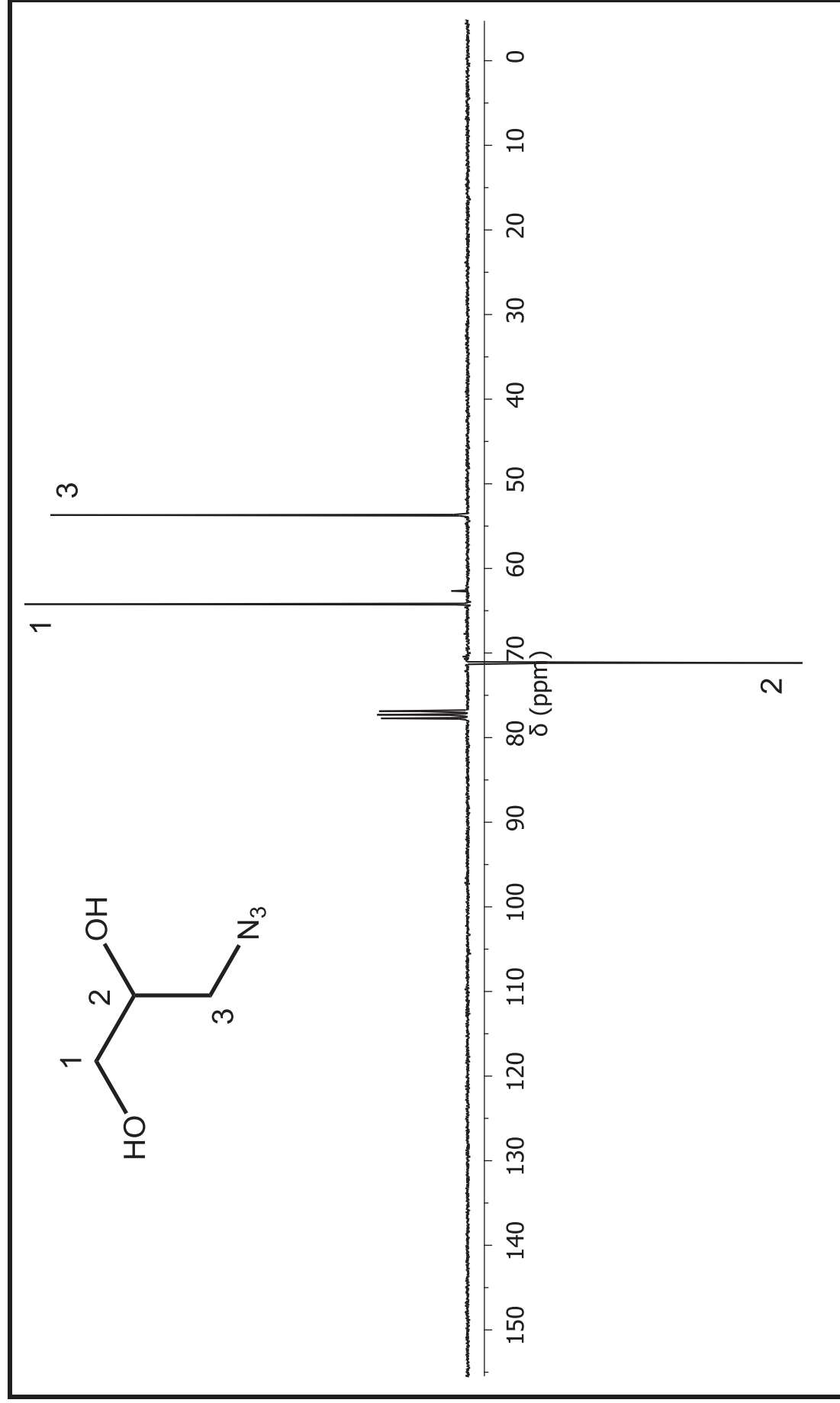
Figura 74. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o tosilato de glicerila [29]. (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



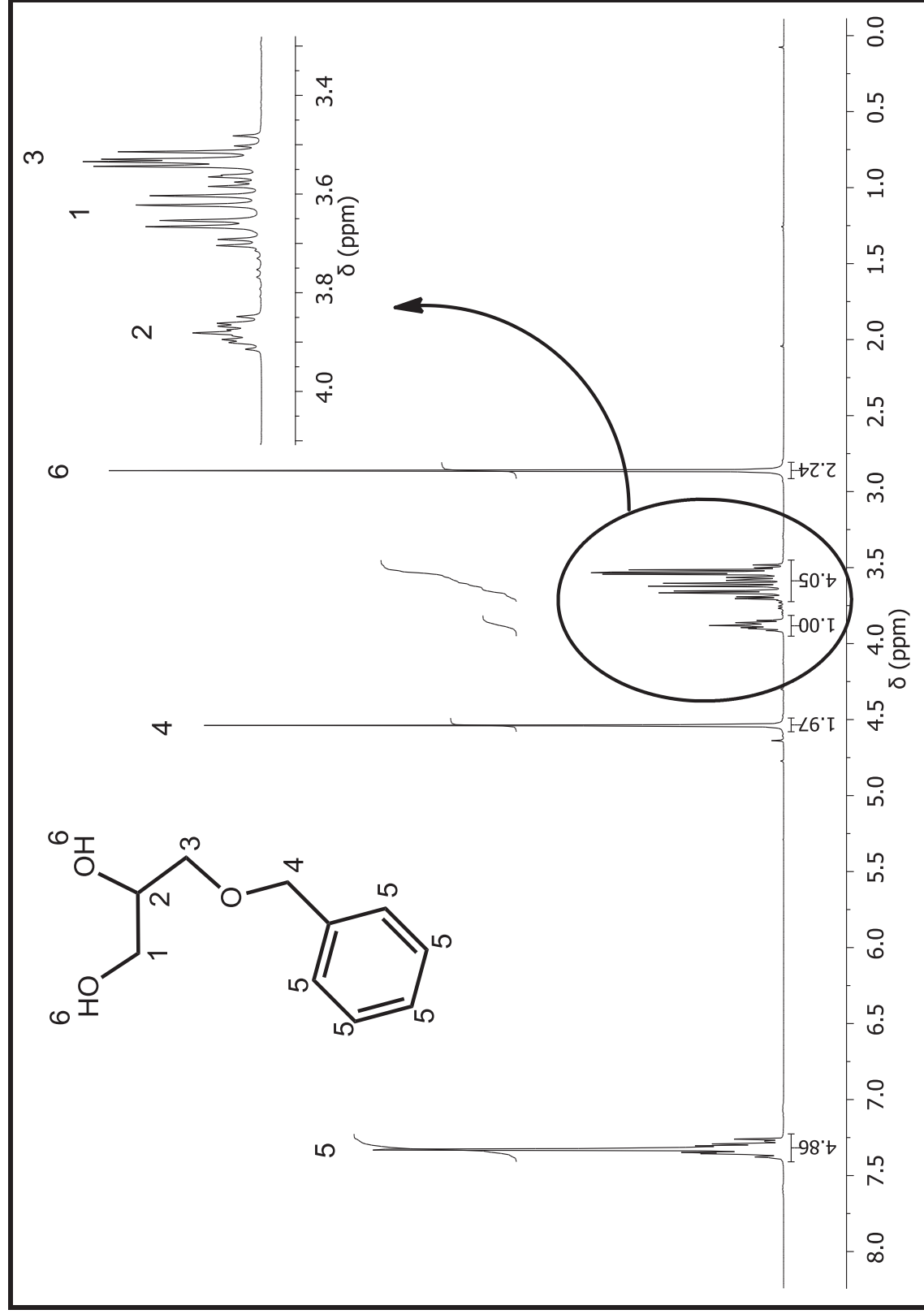
**Figura 75.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT para o tosilato de glicerila [29]. (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



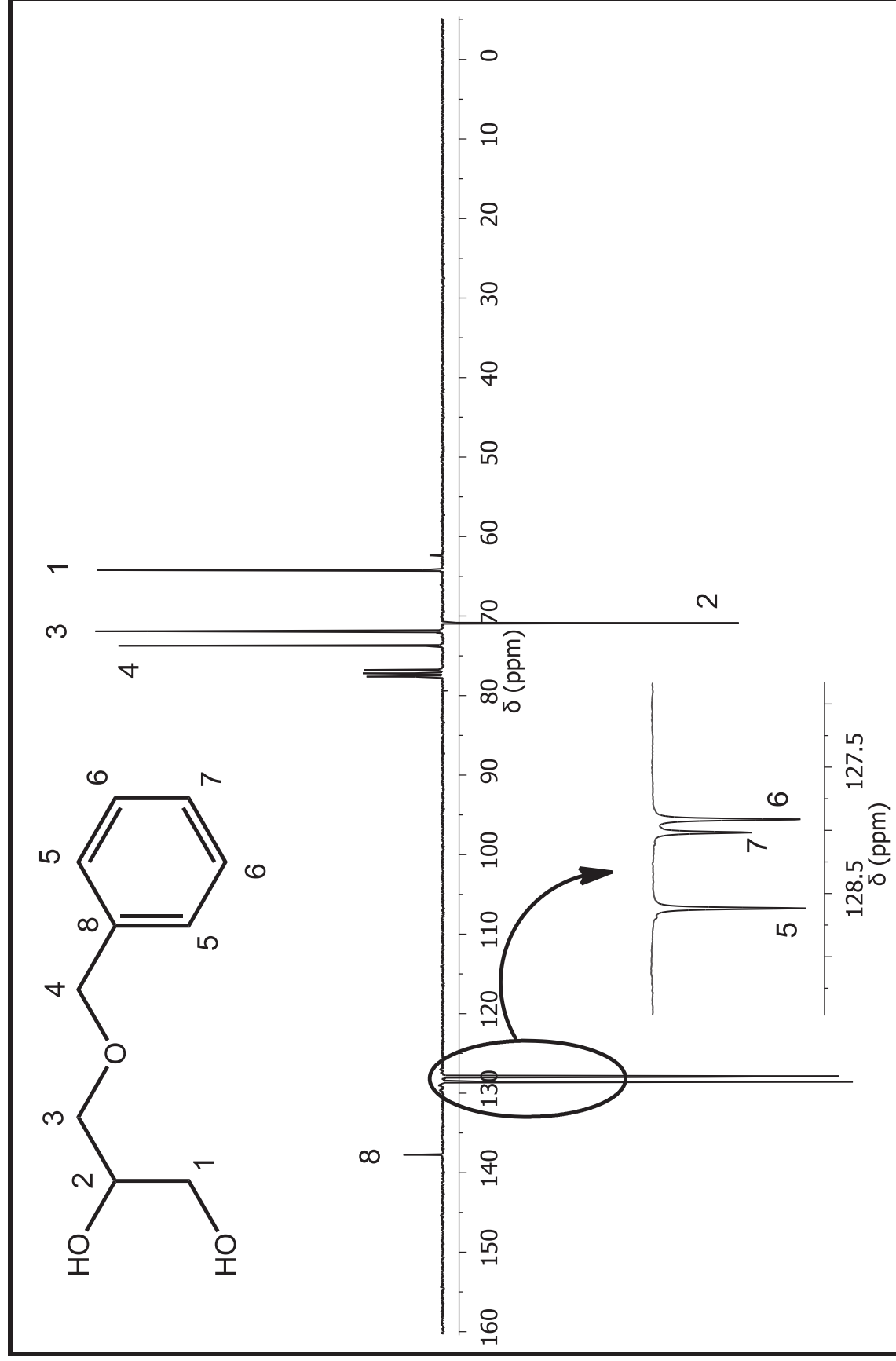
**Figura 76.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H para o azido-propanodiol [35]. (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



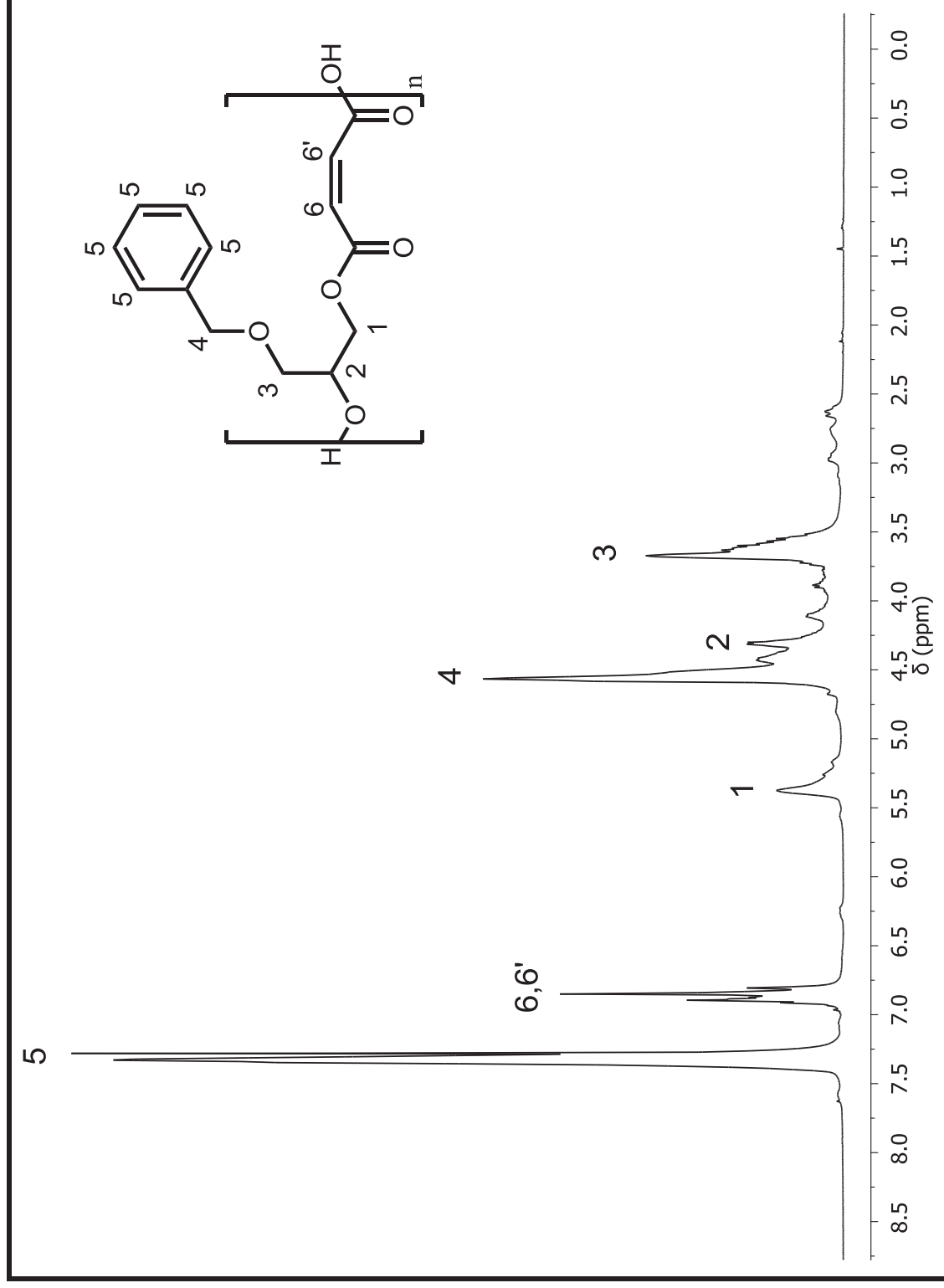
**Figura 77.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C-APT para o azido-propanodiol [35]. (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



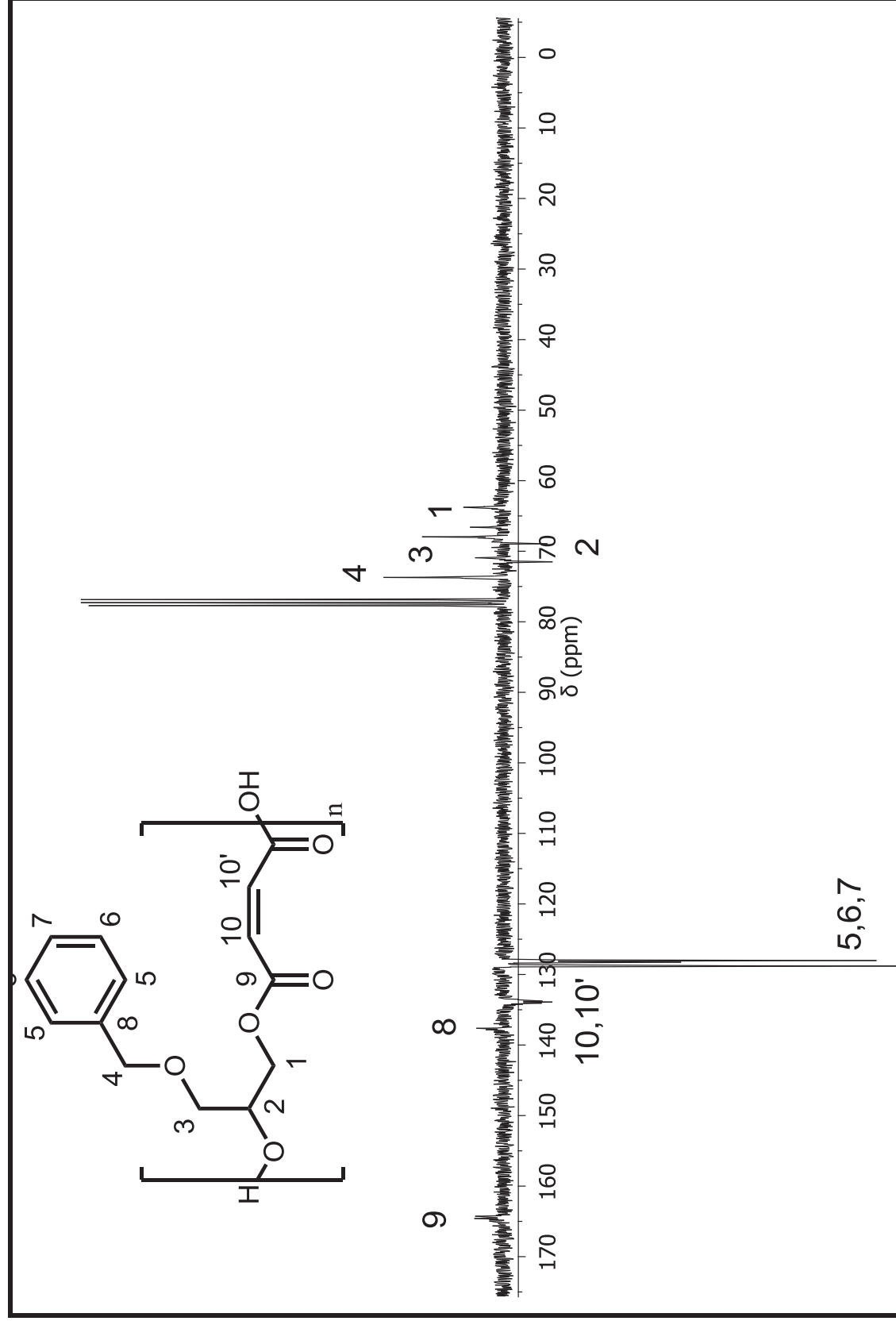
**Figura 78.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o benzilato de glicerila [38]. (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura 79.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT para o benzilato de glicerila [38]. (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

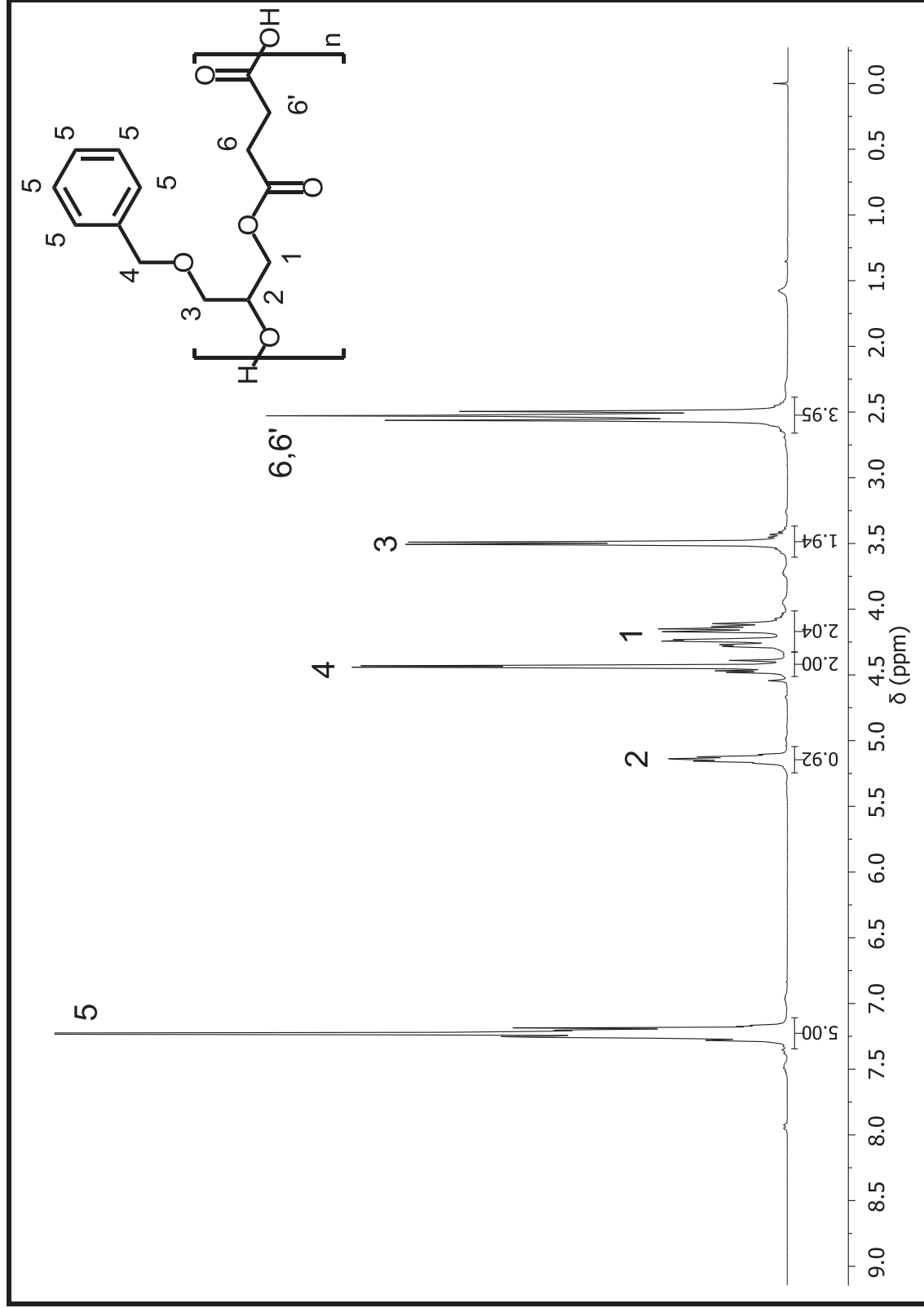


**Figura 80.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o poli(3-benzilglicerol-co-maleato) [39]. (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

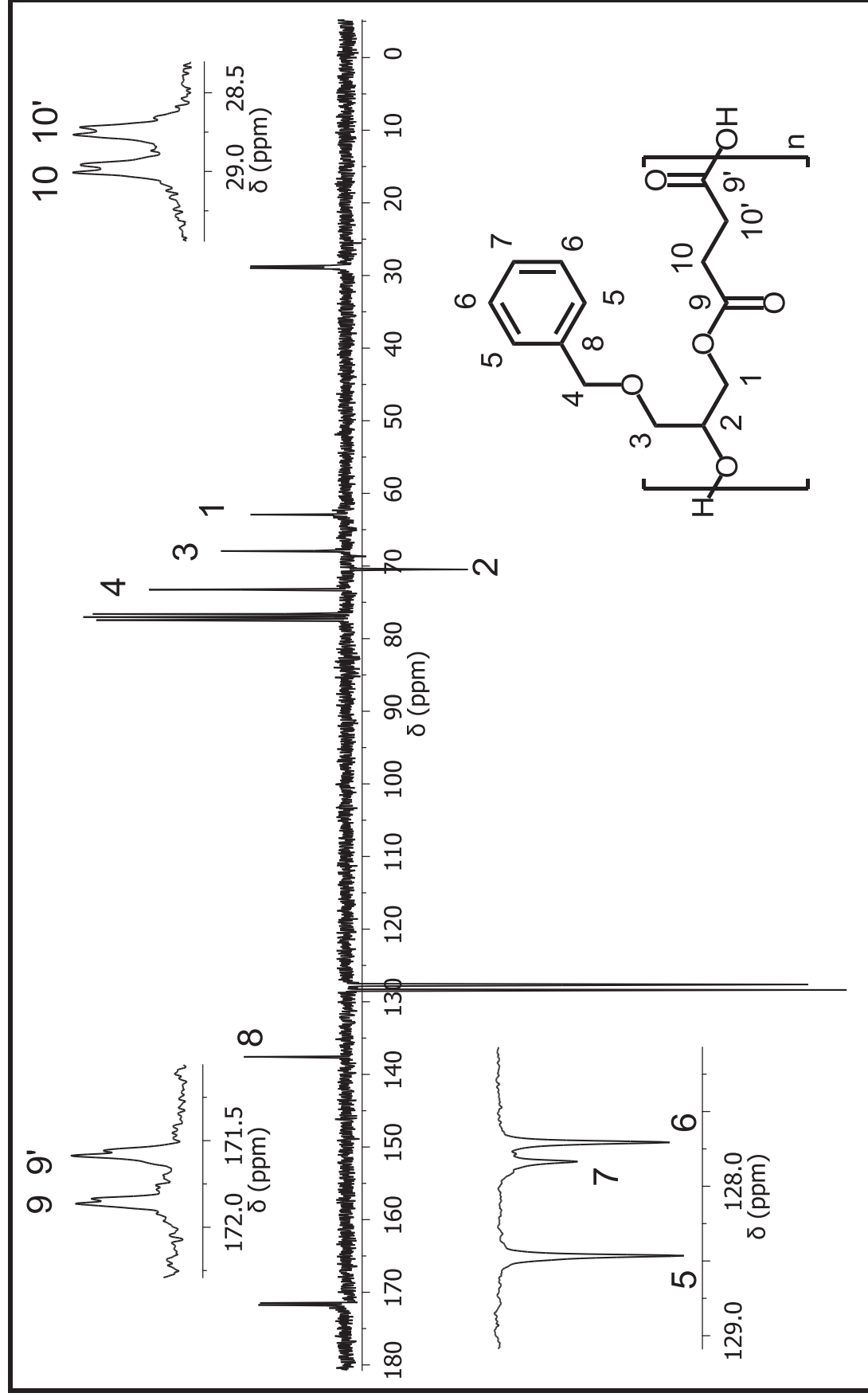


**Figura 81.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT para o poli(3-benzilglicerol-*co*-maleato) [39]. (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

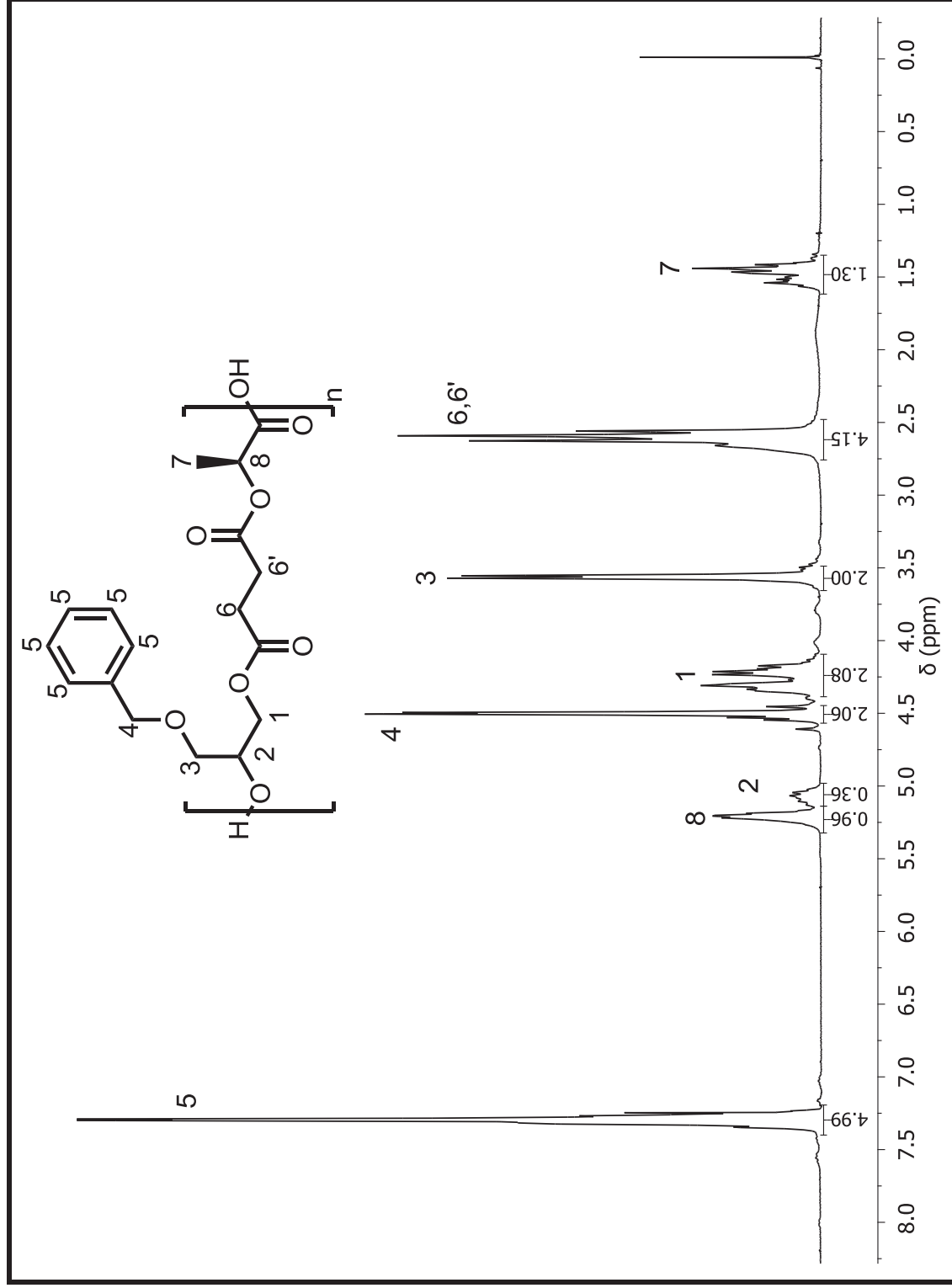




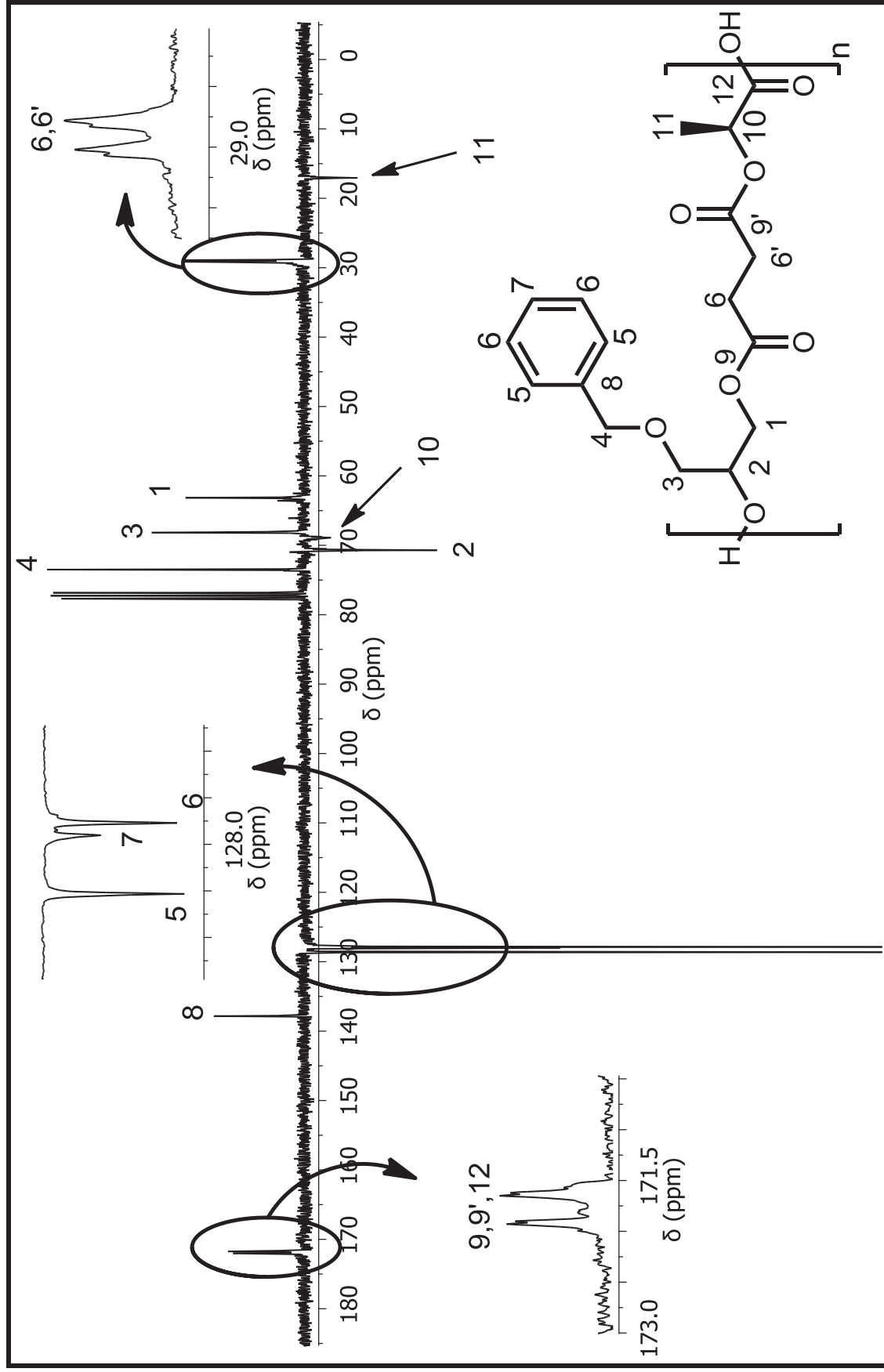
**Figura 82.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o poli(3-benzilglicerol-co-succinato) linear [41]. (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



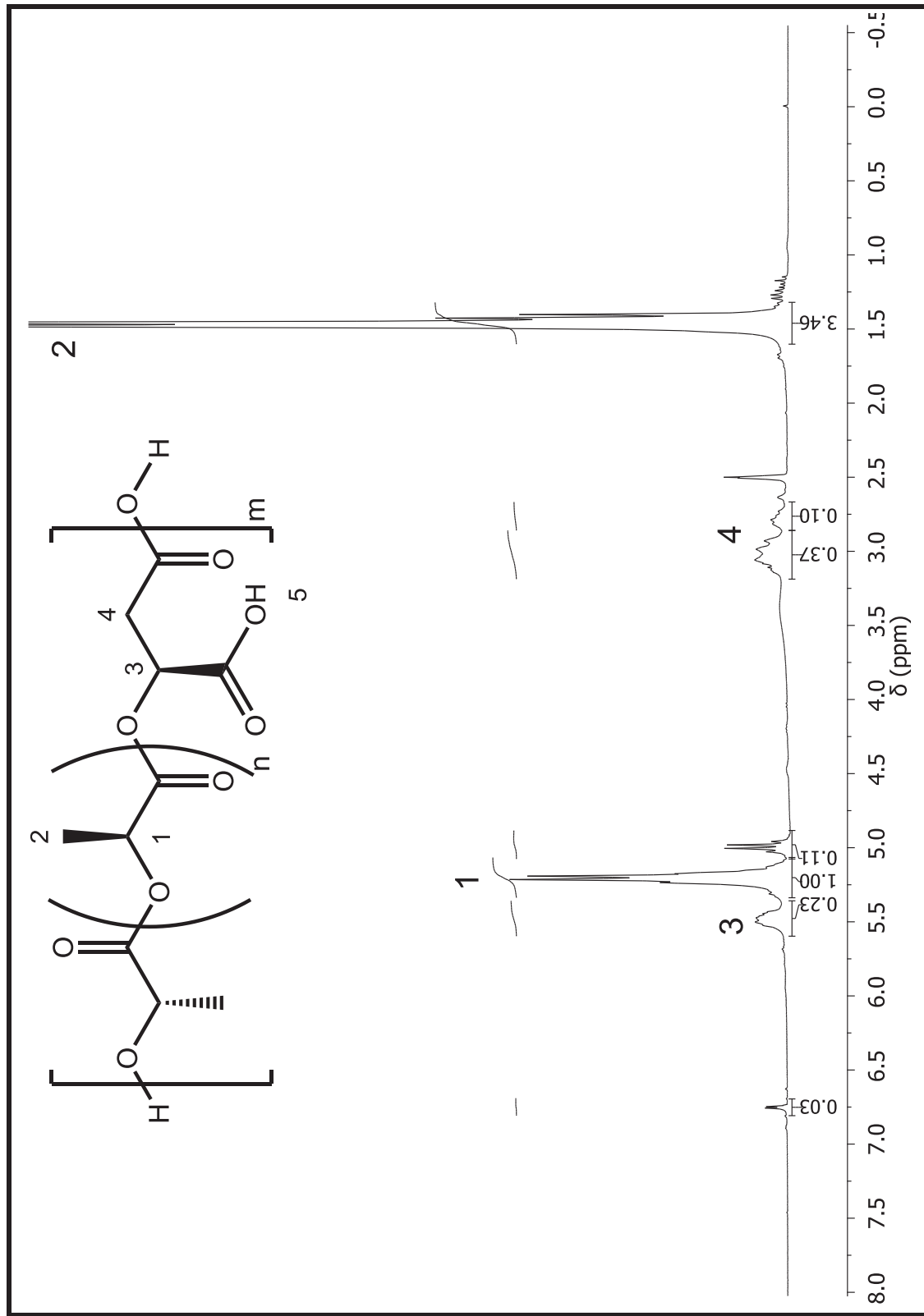
**Figura 83.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT para o poli(3-benzilglicerol-co-succinato) linear [41]. (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



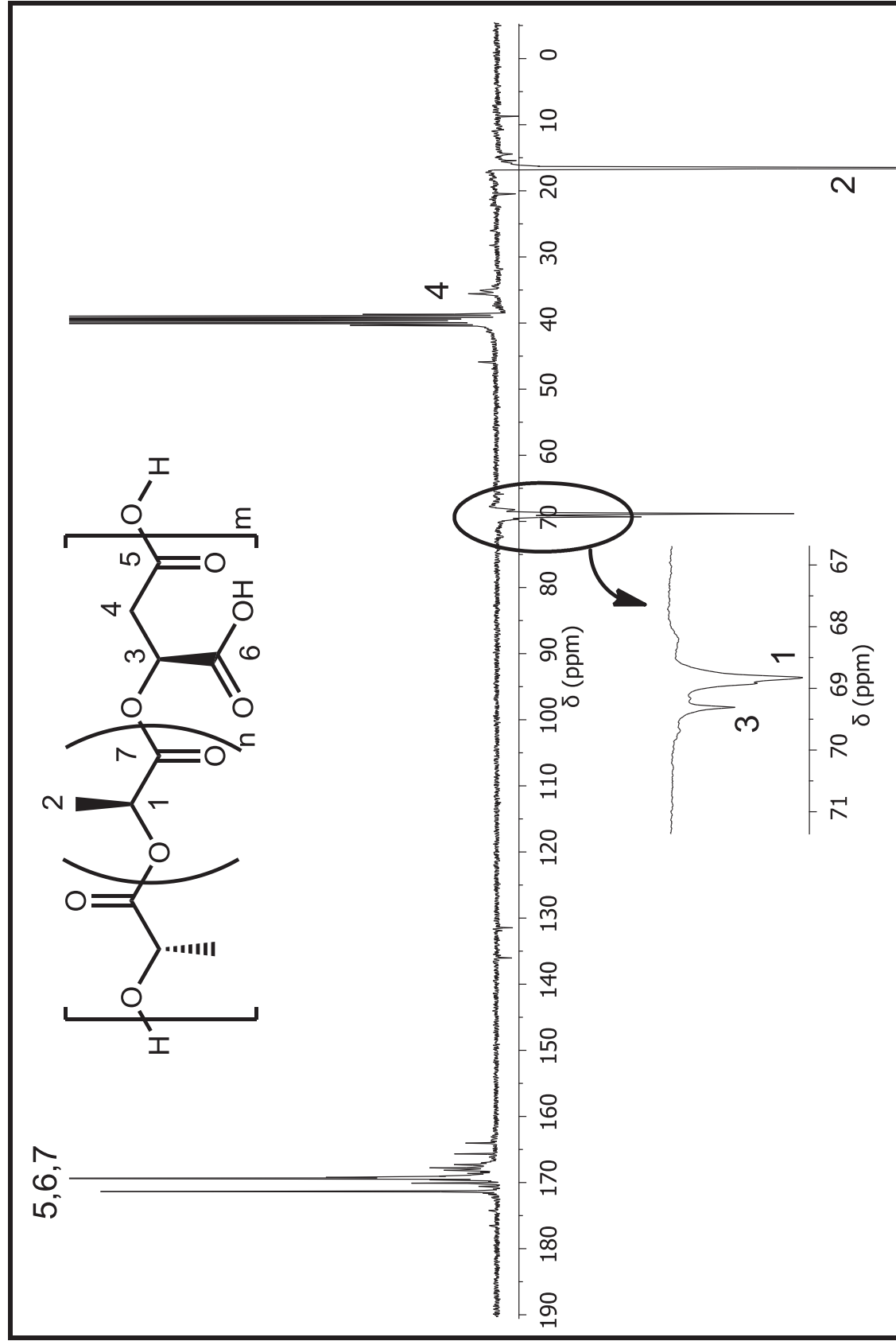
**Figura 84.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H para o terpolímero [45] da reação RST01. (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



**Figura 85.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT para o terpolímero [45] da reação RST01. (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura 86.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o copolímero [26]. (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



**Figura 87.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT para o copolímero de PLLALMA [26]. (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )