UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ZHAO LILI

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO COPOLÍMERO
TRIBLOCO ANFIFÍLICO BIODEGRADÁVEL POLI(L, L-
LACTÍDEO-STAT- ϵ -CAPROLACTONA)-BLOCO-
POLI(ÓXIDO DE ETILENO)-BLOCO-POLI(L,L-LACTÍDEO-
STAT- ϵ -CAPROLACTONA)**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Departamento de Engenharia Metalúrgica e de
Materiais da Escola Politécnica da Universidade
de São Paulo como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em engenharia.

São Paulo

2007

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVOS	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1. POLIÉSTERES	12
3.1.1. <i>Ácido Lático</i>	12
3.1.1.1. <i>Produção do ácido lático</i>	14
3.1.1.2. <i>Preparação de polímeros baseados em ácido lático</i>	17
3.1.2. <i>Poli (Ácido Glicólico)</i>	20
3.1.3. <i>Poli(ϵ-caprolactona)</i>	22
3.2. POLI(GLICOL ETILÊNICO)/POLI(ÓXIDO DE ETILENO)	24
3.2.1. <i>Propriedades do PEG</i>	25
3.2.2. <i>Aplicações do PEG</i>	27
3.3. POLIMERIZAÇÃO POR ABERTURA DE ANEL	28
3.4. BIODEGRADAÇÃO	32

3.4.1. Fatores que Influenciam a Degradação	35
3.4.1.1. Localização do Implante	35
3.4.1.2. Composição Química	36
3.4.1.3. Cristalinidade	37
3.4.1.4. Massa molar	37
3.4.1.5. Reticulação	37
3.4.1.6. Morfologia	38
3.5. ENGENHARIA DE TECIDOS	39
4. PARTE EXPERIMENTAL	43
4.1. MATERIAIS	43
4.2. EQUIPAMENTOS:	43
4.3. METODOLOGIA	44
4.3.1. Procedimento geral para síntese de copolímero tribloco com PEG20K (1)	45
4.3.2. Síntese de PEG modificados (PEG-MODIF) a partir de PEG com 4000 u.m.a. (PEG 4K) (2)	47
4.3.2.1. Fundamentos teóricos e cálculos	47
4.3.2.2. Procedimento da síntese de poli(glicol etilênico)s a partir de PEG com 4000 u.m.a. (2)	49
4.3.3. Síntese de copolímero tribloco Poli(PLLA-CL-b-PEG-b-PLLA-CL)a partir de PEG -MODIF (3)	50
5. CARACTERIZAÇÃO E RESULTADOS	51
5.1. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN- ¹³ C E RMN- ¹ H)	51
5.2. ANÁLISE TÉRMICA DINÂMICO-MECÂNICA (DMTA)	62

5.3. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	67
5.4. TERMOGRAVIMETRIA / TERMOGRAVIMETRIA DERIVADA (TG/DTG).....	74
5.5. ANÁLISE POR DIFRAÇÃO DE RAIO-X (<i>WIDE ANGLE X-RAY SCATTERING WAXS</i>)	81
5.6. MICROSCOPIA ÓTICA DE LUZ POLARIZADA (MOLP).....	87
5.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	91
5.8. TESTES DE BIOCOMPATIBILIDADE	94
6. CONCLUSÕES.....	97
7. BIBLIOGRAFIA	99

1. INTRODUÇÃO

Neste início do século XXI, aproximadamente seis bilhões de pessoas vivem no planeta Terra e, estima-se que a população ultrapasse os dez bilhões até meados do século. Por causa desse aumento explosivo da população, o mundo começou a enfrentar vários problemas sérios, como escassez de recursos energéticos, alimentícios e a poluição ambiental. A ciência e a tecnologia fizeram um progresso surpreendente no último século, particularmente depois da Segunda Guerra Mundial, tornando a vida cotidiana mais confortável e conveniente. Da mesma forma, para os materiais poliméricos, a variedade de polímeros sintéticos está aumentando cada vez mais e suas aplicações estão substituindo os usos tradicionais de fibras naturais, madeiras e borrachas naturais. Os polímeros sintéticos são utilizados em um campo imenso de aplicações, tais como transporte, construção, embalagens, áreas médicas, etc. Hoje em dia, 150 milhões de toneladas de plásticos são produzidos anualmente em todo o mundo e, a produção e o consumo continuam crescendo. A maioria desses plásticos é originada do petróleo e o aumento da produção deles, como consequência, resulta no crescimento do consumo de óleo. O ponto mais preocupante é que a grande durabilidade desses polímeros sintéticos causa um impacto ambiental muito significativo devido ao seu lento processo de degradação.^[1]

Uma das estratégias que resolvem esses difíceis problemas de recursos fósseis e do meio ambiente é a reciclagem dos materiais poliméricos eliminados. De fato, a reciclagem do plástico tem se tornado altamente popular em todo o mundo. A reciclagem do plástico deveria ser disseminada com maior amplitude, porém a poluição causada pelos mesmos não pode ser solucionada apenas por meios de reciclagem. Nem sempre é possível recuperar todo o plástico utilizado. Nesses casos deveria ser indispensável o uso de polímeros

biodegradáveis. Além disso, percebe-se que esses processos de reciclagem, tanto a mecânica quanto a química, consomem considerável quantidade de energia térmica e por este motivo, não se pode reciclá-los para sempre, sendo esses materiais geralmente destinados à queima ou aterros sanitários. Tendo isto em consideração, entende-se facilmente a necessidade dos polímeros biodegradáveis, os quais são reciclados por microorganismos sem o consumo de energia térmica. ^[1,2]

Polímeros biodegradáveis são definidos como polímeros que são degradados, eventualmente transformados em dióxido de carbono e água, por microorganismos tais como bactérias e fungos. ^[3] Portanto, quando esses polímeros vierem a ser degradados, eles não deverão gerar quaisquer substâncias danosas ao meio ambiente. Polímeros biodegradáveis podem ser classificados em: i. **Polímeros naturais** (colágeno, lipídios, celulose e polissacarídeos, entre outros); ii. **Polímeros naturais modificados** (por exemplo, reticulação de gelatina utilizando-se formaldeído, reticulação de quitosana utilizando-se glutaraldeído ou transformação de celulose a acetato de celulose); iii. **Polímeros sintéticos** (poli(álcool vinílico), poli(ácido acrílico), poli(acrilamidas), poli(etilenoglicol), poliésteres, etc^[4-6]). Entre os poliésteres, tem-se o poli(glicolídeo) como polímero alifático linear mais simples. Na grande família de polímeros biodegradáveis, destacam-se dois grupos: o primeiro de plásticos biodegradáveis para consumos diários comuns tais como sacos de lixo, embalagens de alimentos, cosméticos, de produtos de limpeza, etc, substituindo os vilões da poluição ambiental; e um segundo grupo constituído por polímeros com aplicações na área médica e farmacêutica, tais como implante de dispositivos médicos, órgãos artificiais, dispositivos de liberação controlada de drogas, próteses, etc.^[7] Para esses usos, exige-se do polímero tanto biodegradabilidade quanto biocompatibilidade.

No primeiro grupo tem-se um famoso representante, o poli(hidroxibutirato) (PHB), cuja descoberta ocorreu graças a uma bactéria chamada *Burkholderia sacchari*, a qual se alimenta diretamente de açúcar, transformando o excedente do seu metabolismo em um plástico biodegradável, o que foi nomeado de PHB, posteriormente.^{[3],[4]} Tecnicamente, o PHB possui propriedades mecânicas semelhantes ao polipropileno: é resistente a água e possui a impermeabilidade a gases. Quanto à biodegradabilidade, ele se decompõe em uma grande diversidade de meios, liberando apenas água e gás carbônico. Em fossas sépticas, a perda da massa chega a 90% em 180 dias e em aterro sanitário perde 50% da massa em 280 dias, enquanto que o plástico de origem petroquímica pode levar centenas de anos para se degradar.^[10] A fabricação do PHB em escala industrial pode ser integrada totalmente à linha de produção da usina de açúcar. A energia para cultivo da bactéria vem da queima de bagaço de cana.^{[8],[9]} O alimento é o próprio açúcar e o solvente usado para retirar o polímero das bactérias é um derivado da produção de etanol. Até os efluentes da linha de produção têm aplicação dentro da cadeia produtiva: são usados para adubar e irrigar plantações. Além disso, a alta produtividade (para cada 3 quilos de açúcar utilizado para alimentar as bactérias é possível obter 1 quilo de plástico), revelada pelos pesquisadores do IPT (Instituto de Pesquisas Tecnológicas), tornou a produção industrial do PHB ainda mais atraente.^[10]

Já na família dos poliésteres alifáticos, os polímeros, tais como o poli(ϵ -caprolactona), poli(l-lactídio) e poli(ácido glicólico), atualmente, são produzidos comercialmente e suas vendas continuam crescendo^{[9],[11]}. Além desses poliésteres alifáticos, vários tipos de polímeros sintéticos biodegradáveis têm sido projetados e testados para aplicações práticas. Muitos copolímeros desses materiais são utilizados como

sistema de liberação controlada de fármacos. Essa tecnologia envolve diferentes aspectos multidisciplinares e pode contribuir muito para o avanço da saúde humana. O chamado “drug delivery system” oferece inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional: ^[12-16]

- a) Maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco, a partir da degradação da matriz;
- b) Diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação;
- c) Natureza e composição dos veículos variados e, ao contrário do que se poderia esperar, não há predomínio de mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco (bio-inativação prematura);
- d) Administração segura (sem reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses);
- e) Direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas;
- f) Tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas podem ser incorporadas.

Outra aplicação interessante é a confecção de implantes, suportes (*scaffolds*) para crescimento celular, suturas de uso temporário^[17-18] e não removíveis. Por ter uma biodegradação atóxica em uma escala de tempo programável, a principal vantagem clínica destes dispositivos temporários e bio-assimiláveis, é a redução de infecções e redução de custo, pois não necessitam de uma segunda cirurgia para remoção do implante. ^[19]

Na engenharia de tecidos, o primeiro passo para a reconstrução de um órgão ou tecido visa à seleção do suporte para as células. Assim, o material polimérico utilizado no

caso de necessidade de *scaffolds* é desenvolvido de forma a suportar física e mecanicamente as células, da inoculação até o reimplante no organismo hospedeiro. Portanto, o material tem função como um suporte para o crescimento celular e paralelamente servir como substituto mecânico/estrutural do tecido original até a formação do novo tecido. Enquanto o tecido se desenvolve, o polímero é degradado e reabsorvido gradualmente, permitindo espaço para a proliferação celular; a cultura *in vitro* e o tecido maduro são formados no final dessa etapa. Somente após a formação completa do tecido, o implante é inserido no organismo. ^[20-21]

Durante a década de 90, grandes investimentos foram feitos em pesquisas e desenvolvimentos de engenharia de tecidos cartilagosos e ósseos, liderados por médicos e engenheiros e os *scaffolds* de PGA e PLA foram relatados em usos de reconstruções cartilagosas. Nos últimos anos, eles foram testados experimentalmente visando até a reprodução total ou parcial de estruturas anatômicas humanas, como por exemplo: tecido hepático, mandíbula, nervos periféricos, válvulas e ductos urológicos, vasos e regeneração de tecido ósseo. ^[22-26] Um relato mais completo das informações existentes sobre a engenharia de tecidos é citado no capítulo 3.5.

A Figura 1.1 ilustra um exemplo de implante tipo *stent* intravascular biodegradável feito de blenda de polilactídeo e carbonato de trimetileno. ^[5]

Para melhorar ainda mais a biocompatibilidade com os tecidos vivos, surge a necessidade de desenvolver materiais com propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas, simultaneamente, tais como copolímeros em bloco. Esse tipo de copolímero, contendo ambas as partes, é chamado copolímero de propriedade anfifílica.

Figura 1.1 Protótipo de um *stent* intravascular biodegradável (blenda de polilactídeo e carbonato de trimetileno). ^[5]

2. OBJETIVOS

O trabalho tem como enfoque principal sintetizar e caracterizar copolímeros anfifílicos e estudar detalhadamente a sua preparação e a influência da sua microestrutura nas propriedades químicas e físicas, principalmente, as propriedades mecânicas.

Este Projeto de pesquisa se insere nos trabalhos do grupo de polímeros biodegradáveis e envolve a preparação de copolímeros em bloco de etileno glicol, ϵ -caprolactona e l-lactídeo, cujas composições estudadas foram baseadas nas pesquisas desenvolvidas no laboratório anteriormente^[27-28]. A cadeia de poli(l,l-lactídeo) (PLA) contribui para melhorar a propriedade mecânica e, a fase amorfa é dominada por poli(ϵ -caprolactona) (PCL) que, por sua vez, contribuirá na redução do tempo de degradação do copolímero. A cadeia do poli(óxido de etileno) (PEO) tem característica hidrofílica, assim, com a adição desse material, torna o copolímero um produto de natureza anfifílica. A presença do PEO no copolímero pode aumentar a biocompatibilidade do material, originando a menor reação imunológica possível, quando é usado como material de implantes. Sabe-se que a sua propriedade mecânica varia com o tamanho da cadeia, e por outro lado, trechos menores possuem maior facilidade de excreção pelo organismo. Portanto, sintetizar uma nova cadeia de poli (óxido de etileno) para atender essas duas finalidades tornou-se também uma parte dos objetivos desse trabalho.

Resumidamente, este trabalho engloba as seguintes etapas:

- Sintetizar e caracterizar copolímeros contendo segmentos de PLA e PCL, a partir de PEG com massa molar de 20.000 u.m.a;
- Sintetizar e caracterizar cadeias de PEG com pesos moleculares maiores, a partir de PEG com 4.000 u.m.a;

- Sintetizar e caracterizar o copolímero tribloco usando PLA, PCL e PEG sintetizado no item anterior;
- Realizar testes de biocompatibilidade.

PEG é usualmente terminado em dois grupos hidroxila, os quais são facilmente ativados pelo di(etil-hexanoato) de estanho (SnOct_2), e reage como iniciador das reações para preparação de PLA e PCL por abertura de anel, possibilitando a formação de copolímeros com estrutura tribloco poli(1,1-lactídeo-stat- ϵ -caprolactona)-bloco-poli(óxido de etileno)-bloco-poli(1,1-lactídeo-stat- ϵ -caprolactona) (Figura 2.1).

Figura 2.1 Representação estrutural do copolímero tribloco.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. POLIÉSTERES

A maioria dos poliésteres alifáticos é biodegradável, sendo que os três que mais se destacam nesse grupo para o uso na área biomédica estão representados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Os principais poliésteres biodegradáveis usados na área biomédica.^{[5],[15],[22]}

Polímero	Sigla	Fórmula	T _g (°C)	T _m (°C)	Módulo de elasticidade (GPa)	Tempo de degradação (meses)
Poli (ácido glicólico)	PGA		35-40	225-230	8,4	6-12
Poli (l-ácido láctico)	PLLA		60-65	173-178	2,7	>24
Poli (ε-caprolactona)	PCL		(-65)-(-60)	58-63	0,4	24-36

3.1.1.Ácido Láctico

Ácido láctico (ácido 2-hidroxipropanóico) é um ácido orgânico encontrado em vários produtos de origem natural. O primeiro relato do isolamento desse ácido do leite foi por volta do ano 1780 e, a solidificação pela sua própria esterificação foi descoberta alguns

anos depois. A dimerização formando lactídeo pela policondensação do ácido láctico e sua polimerização pelo mecanismo de abertura de anel foram descritos por Carothers et al em 1932. Desde a década de 60 do século passado, as vantagens desse material na área médica foram pesquisadas e reveladas, e em seguida, a fabricação desses polímeros foi realizada em escala industrial. ^{[1],[29]}

Poliésteres baseados em poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA) e seus copolímeros poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) são os melhores biomateriais para projetos numa vasta área biomédica. Ácido láctico contendo um carbono- α assimétrico, o qual é descrito tipicamente na forma D ou L, em termo de isomeria clássica, ou apresentado em forma R e S, respectivamente, como mostra na Figura 3.1 Para homopolímeros, as formas enantioméricas são poli (D-ácido láctico) (PDLA) e poli (L-ácido láctico) (PLLA). PDLA e PLLA apresentam propriedades físico-químicas semelhantes, são ópticamente ativos em relação a feixe de luz polarizada, enquanto que o PLA racêmico tem características bastante diferentes. Por exemplo, as temperaturas de transição vítreas de ambos são em torno de 60°C, mas PLLA apresenta uma cristalinidade bastante elevada com seu ponto de fusão, T_m de 170°C; enquanto o PLA racêmico é completamente amorfo ^[29-30]

Figura 3.1 Estereoisômeros de ácido láctico.

Por ser a forma natural, o PLLA é considerado mais biocompatível. Os polímeros são derivados de monômeros produzidos pelo metabolismo do corpo humano, a degradação desses materiais é considerada segura para usos “in vivo”. Para esta finalidade, os produtos de degradação freqüentemente definem a biocompatibilidade de um polímero – não necessariamente o polímero em si. Muito embora o PLGA seja extensivamente utilizado e represente a nata dos polímeros degradáveis, o aumento da acidez local devido à degradação pode levar a uma irritação durante a utilização do polímero. A introdução de sais básicos tem sido investigada como uma técnica de controle de pH no meio local dos implantes de PLGA.^[31-34]

3.1.1.1. Produção do ácido láctico

L-ácido láctico, a estereoforma presente nos organismos de mamíferos, por exemplo, é produzido pelo músculo com atividade intensa no conhecido “*Ciclo Cori*”. Ácido láctico pode ser produzido tanto por processos de fermentação quanto pelas rotas sintéticas existentes. Entretanto, a primeira opção ainda é mais adotada por sua simplicidade e baixo custo. Por isso, atualmente, somente um fabricante japonês (Musashino) e um americano (Sterling Chemicals Inc.) utilizam a rota de síntese química para a produção de ácido láctico racêmico a qual está esquematizada na Figura 3.2.^{[33],[35-36]}

(a) Adição do ácido cianídrico

(b) Hidrólise por H_2SO_4

(d) Esterificação

(e) Hidrólise por H_2O

Figura 3.2 Rota de síntese química na obtenção de ácido láctico.

A fermentação ocorre normalmente em processos por bateladas ou contínuos. Os parâmetros importantes na fermentação são valores de pH, temperatura, atmosfera e em alguns casos, agitação.

Na fermentação por bateladas, o valor de pH é geralmente mantido constante pela adição dos agentes neutralizantes como CaCO_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{Mg}(\text{OH})_2$, NaOH , ou NH_4OH . Essa fermentação é feita tipicamente começando de 5% de concentração de açúcar e com presença de nitrogênio-nutriente. A conversão de 90-99% de ácido láctico pode ser obtida em dois dias. Em processo contínuo, os parâmetros e os aditivos são semelhantes ao primeiro e a sua vantagem é a maior produtividade em relação ao outro.

Após o processo de fermentação, em muitos casos, o ácido láctico obtido é purificado para uma possível polimerização seguinte. Neutralização com a base seguida por uma filtração, concentração e uma acidificação é o processo tradicional para a fabricação de ácido láctico de alta pureza. O processo de extração líquido/líquido é utilizado para a recuperação de ácido láctico e o processo baseado na esterificação com álcoois seguida por uma destilação e hidrólise também é uma das importantes rotas. Esses processos mencionados acima podem ser usados combinados com as técnicas de separação incluindo ultrafiltração, nanofiltração etc. para obtenção de produtos com melhor qualidade.

Segue abaixo o fluxo de processo de fermentação (Figura 3.3).

(a) Fermentação e neutralização

(b) Hidrólise por H_2SO_4

(c) Esterificação

(d) Hidrólise por H₂O

Figura 3.3 Rota de fermentação na obtenção de ácido láctico. ^[35]

3.1.1.2. Preparação de polímeros baseados em ácido láctico

As propriedades de polímeros baseados em ácido láctico variam muito dependendo da distribuição e composição dos dois estereoisômeros. Os polímeros podem ser fabricados por diversas rotas de polimerização, como mostrado esquematicamente na Figura 3.4. A nomenclatura para esses polímeros se distingue pelas diferentes rotas de preparação, como exemplos de polímeros derivados do ácido láctico pela policondensação (PC) são geralmente referidos como poli(ácido láctico) e outros preparados a partir do lactídeo pela polimerização de abertura de anel (*ring opening polymerization*, ROP) são chamados polilactídeo. Ambos os tipos podem ser encontrados na literatura, simbolizados por PLA, embora muitos autores definam lactídeo como dímero cíclico de ácido láctico. ^[33-34]

Figura 3.4 Processo esquematizado de polymerizações do PLA.

A desvantagem da PC é que os polímeros obtidos têm baixa massa molar, e então, vários estudos foram realizados para a elevação de massa molar como por exemplo manipulando o equilíbrio entre o monômero de ácido láctico, água e o poli (ácido láctico) em um solvente orgânico ou adição de agentes ramificados multifuncionais para obtenção de estruturas “estrelares” por exemplo. Na presença de agentes bifuncionais (dióis, diácidos, etc) dão formas telequêlicas aos polímeros os quais podem aumentar suas massas molares com o uso de agentes ligantes de cadeias. A massa molar do poli(ácido láctico) sintetizado pela policondensação partindo do monômero de ácido láctico é relativamente baixa, por isso, somente o processo de PC não seria suficiente para a produção de polímeros de alta massa molar.

A segunda categoria de polymerização é pela abertura de anel. Esse processo também inclui policondensação do ácido láctico seguido por uma depolimerização para

um dímero cíclico desidratado, lactídeo (3, 6-dimetil-1,4-dioxano-2,5-diono), o qual pode ser polimerizado pela ROP (ring opening polymerization) para obtenção de polímeros com alta massa molar. A despolimerização é convencionalmente feita pelo aumento da temperatura da PC e abaixamento da pressão, e destilação do lactídeo produzido. Devido aos dois estereoisômeros do ácido láctico, o lactídeo opticamente ativo correspondente pode ser encontrando em duas formas diferentes, isto é, D,D-lactídeo e L,L-lactídeo (Figura 3.5). Além disso, o lactídeo pode ser formado por uma molécula de D- e outra de L-ácido láctico, formando D,L-lactídeo (meso-lactídeo). O aumento da cristalinidade pode ser manipulado também pela aplicação de uma tensão de orientação, induzida a aproximadamente 10°C acima da T_g , reorientando as cadeias durante o processamento do material.

Figura 3.5 Estereoisômeros de lactídeos.

A preparação dos polímeros baseados em ácido láctico pela ROP pode ser realizada em polimerização em solução, em massa, em suspensão ou polimerização em estado fundido. O mecanismo envolvido em ROP pode ser reação iônica ou inserção por coordenação, dependendo do sistema do catalisador usado. Diversos tipos de catalisadores foram testados ao longo do tempo: compostos metálicos de estanho (II), alumínio, zinco, potássio, etc. Entre eles, o $Sn(Oct)_2$, 2-etil-hexanoato de estanho é mais utilizado, pois ele é

aceito pela FDA (Food and Drug Administration) para fins alimentícios e médicos em inúmeros países.^[37] Assim, o $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ é facilmente encontrado comercialmente (ex.Cargill/Dow e Purac) para síntese do poli(ácido láctico) para usos em área médica. Além disso, o $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ apresenta solubilidade em solventes orgânicos e em monômeros de ésteres cíclicos, facilitando a reação. O sistema reativo do l,l-lactídeo com o $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ gera produtos de alta massa molar com baixa taxa de racemização, conseqüentemente, melhorando as propriedades mecânicas dos poli(l,l-lactídeo).

O homopolímero de l-lactídeo tem característica semicristalina. Portanto, seus copolímeros exibem alta resistência à tração e pouco alongamento e, esse módulo elevado faz com que eles sejam mais adequados do que os outros polímeros amorfos para aplicações ortopédicas.^[34] O poli(d,l-lactídeo) é um polímero amorfo o qual contém uma distribuição estatística de seus dois isômeros, assim, impossibilitando a cristalização da sua cadeia, provocando redução de suas propriedades mecânicas em relação ao primeiro.^[38] Porém, a degradação mais rápida desse material torna-o mais atrativo para sistemas de liberação de drogas.

3.1.2. Poli (Ácido Glicólico)

Poli (ácido glicólico) é um material termoplástico rígido com alta cristalinidade (46 a 50%). Sua temperatura de transição vítrea e temperatura de fusão são 36°C e 225°C, respectivamente. Por causa desta alta cristalinidade, PGA é insolúvel na maioria dos solventes orgânicos. E pelo mesmo motivo, PGA tem a melhor propriedade mecânica entre todos os poliésteres biodegradáveis (veja na Tabela 3.1). Semelhante ao PLA, o método preferencial para a produção de polímeros de alta massa molar é ROP, quando $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ é

usado como iniciador do sistema, a temperatura mais usual da reação é de 175°C e a polimerização dura entre 2 a 6 horas.^[39] As técnicas de processamento por extrusão, injeção e termoformagem viabilizam a produção de PGA em várias formas, porém, a alta sensibilidade à degradação hidrolítica do material requer um controle muito cuidadoso das condições do processamento.^[40] O material, ao sofrer a biodegradação, produz ácido glicólico, o qual é um resultado natural do metabolismo corpóreo, com caráter inofensivo ao organismo. Numerosos estudos foram feitos, provando a simplicidade de seu processo de biodegradação por erosão homogênea, reduzindo o tempo de sua biodegradação total. Por isso, o PGA tem demonstrado maior aplicação na área médica como suturas bioreabsorvíveis. (Dexon, American Cyanamide Co)^[41]

Na literatura, encontra-se uma quantidade considerável de estudos sobre copolímeros de PLA-PGA, também denominado como PLGA. Pois o PLGA apresenta uma degradação mais rápida comparado a quaisquer outros homopolímeros.^[34] Um fio de sutura pode ser absorvido pelo corpo em 3 meses, o que é observado para o copolímero PLGA (10/90), com nome comercial de Vicryl, desenvolvido pela Ethicon. Publicada em 1977, a pesquisa que analisou os copolímeros PLGA de várias composições, comprovou que o material PLGA (50/50) tem a menor meia-vida (Figura 3.6). Isto se deve ao fato da estrutura do copolímero com 25-70% de glicolídeo ser amorfa, assim, a regularidade da cadeia pode ser facilmente interrompida por outro monômero. O mesmo acontece com outros copolímeros de poli(ε-caprolactona) e poli(ácido láctico).^[38]

Figura 3.6 Gráfico de degradação de PLGA (tempo de meia vida X composição).^{[5] [38]}

3.1.3. Poli(ϵ -caprolactona)

Poli(ϵ -caprolactona) é um poliéster alifático linear e semicristalino. A utilização de diferentes mecanismos de polimerização pode afetar a massa molar, a sua distribuição e a estrutura química de seus copolímeros produzidos. O método mais comum é a polimerização por ROP como no caso da polimerização de PLA e PGA.^[36]

A temperatura ambiente, o material é solúvel em vários solventes orgânicos, tais como clorofórmio, diclorometano, benzeno, tolueno, ciclohexano e 2-nitropropano. É pouco solúvel em acetona, 2-butanona, acetato de etila e dimetilformamida e é insolúvel em álcoois e éteres.

Poli(ϵ -caprolactona) apresenta uma temperatura de transição vítrea na faixa de -60°C e a temperatura de fusão por volta de 60°C. O homopolímero PCL apresenta um

tempo de degradação de aproximadamente 2 anos.^[42-44] Os copolímeros de CL com D,L-lactídeo foram sintetizados e investigados para elevar a taxa de degradação. Por ter propriedades mecânicas inferiores como visto na Tabela. 1, blendas e copolímeros com outros poliésteres biodegradáveis são produzidos e testados em inúmeras pesquisas para atingir as propriedades desejadas. Por exemplo, a presença do poli(ε-caprolactona) com PGA apresenta rigidez inferior, quando comparado com homopolímero de ácido glicólico (PGA),^[45-46] já existente no mercado, vendido como sutura monofilamentoso MONOCRYL®, também fabricado pela Ethicon.^[5]

3.2. POLI(GLICOL ETILÊNICO)/POLI(ÓXIDO DE ETILENO)

Os polímeros poli(glicol etilênico)s ou popularmente conhecidos como poli(etileno glicol) e PEG, são moléculas aparentemente simples. Eles apresentam estrutura linear ou ramificada e são poliéteres neutros, solúveis em água e na maioria dos solventes orgânicos.

[47]

Figura 3.7 Esquema de reação de síntese de poli(glicol etilênico)

PEGs possuem uma variedade de propriedades aplicáveis na área biomédica e biotécnica. Isso porque primeiramente o PEG é raramente efetivo para excluir outros polímeros quando estão presentes num ambiente aquoso^[48]. Essa propriedade mostra-se na sua conjugação com proteínas e na formação de sistemas bifásicos com outros polímeros. Além disso, o polímero é atóxico e não é prejudicial às atividades protéicas e celulares, embora interaja com membranas celulares. Os PEGs também estão sujeitos às modificações químicas e associações com outras moléculas, esse último afeta muito pouco sua propriedade química original, porém controla sua solubilidade e aumenta o seu tamanho de cadeia, dependendo da quantidade da cadeia adicional.^[49]

3.2.1. Propriedades do PEG

PEGs são chamados também de poli(óxido de etileno), de modo geral, o poli(glicol etilênico) se refere aos de massa molar abaixo de 20.000, poli(óxido de etileno) se refere a polímeros de massa molar mais elevada.

Com o aumento da massa molar da cadeia, aumenta a cristalinidade da estrutura e, conseqüentemente, a viscosidade torna-se mais elevada, por isso, os PEGs que apresentam massa molar abaixo de 1000 g.mol⁻¹ são líquidos viscosos e incolores, os que apresentam massa molar acima desse valor são brancos e quebradiços. O ponto de fusão do sólido é proporcional à sua massa molar e varia na faixa de 30 a 60°C. Os PEGs utilizados em aplicações médicas e biotécnicas são os de massa molar desde 200 até 20000 g.mol⁻¹. O PEG é geralmente preparado por uma iniciação aniônica com pouca transferência de cadeia e terminação. Pode-se notar que, entretanto, os éteres monometílicos do PEG exibem uma larga distribuição da massa molar, por causa da presença do PEG de alta massa molar. Esse PEG é produzido a partir do seu terminal hidroxila agindo como um iniciador, por ser um polímero bifuncional, ele cresce em ambos os lados e, sendo assim, apresenta um aumento maior de massa molar. ^[50]

Quando o poli(glicol etilênico) é adicionado à água, há uma redução de volume e a dissolução envolve desprendimento de calor de 50-59 J/g (12-14cal/g) para uma mistura de 50/50 de água e PEG de massa molar de 300-600, como se pode esperar para um estado altamente estruturado na solução. Para PEGs em estado sólidos, essa redução é neutralizada por um calor de fusão endotérmico maior, 155-192 J/g (37-46 cal/g), porque o calor de dissolução do PEG sólido é negativo, assim, uma aplicação do calor externo facilita sua dissolução.

A solubilidade em água e em diferentes solventes orgânicos de diferentes PEGs é mostrada nas Tabelas 3.2 e 3.3, respectivamente. Geralmente, quanto menor for a massa molar do PEG, maior é a sua solubilidade. A solubilidade dos PEGs em solventes orgânicos polares é boa, mas é pouco solúvel em hidrocarbonetos e outros solventes com pouca polaridade. Pode-se perceber pela tabela que a solubilidade também é fortemente afetada pela temperatura.

Tabela 3.2 Propriedades de poli(glicol etilênico) Carbowax® ^[50]

PEGs	Massa molar / u.m.a	Ponto de fusão (T _m)/ °C	Solubilidade em água a 20°C/ %, p/p	Viscosidade em 99°C/ (cSt)
300	285-315	-15 até -8	completo	5,8
400	380-420	4-8	completo	7,3
600	570-630	20-25	completo	10,5
1000	950-1050	37-40	70 ^a	17,4
4600	4400-4800	57-61	50 ^a	160-230
8000	7000-9000	60-63	50 ^a	700-900
20M *	15000-20000	50-55 ^b	65 ^a	14500

^a aproximadamente.

^b ponto de amolecimento

*PEG20M** composto do Carbowax, preparado pela condensação de PEGs de peso 8M com o epóxido multifuncional.

Tabela 3.3 Solubilidade de poli(glicol etilênico)s Carbowax®, em % em peso. ^[50]

Solvente	400		Blenda 540 ^a		3350	
	20°C	50°C	20°C	50°C	20°C	50°C
Água	S	S	73	97	62	84
Metanol	S	S	48	96	35	S
Acetona	S	S	20	S	<1	99
Acetato etílico	S	S	15	S	<1	93
Éter etílico	insolúvel	1 ^b	insolúvel	1 ^b	insolúvel	1 ^b
Tolueno	S	S	13	S	<1	S
heptano	insolúvel	insolúvel	0,5	0,01	<0,01	<0,01

S = > 100g/100ml do solvente.

^a poli(glicol etilênico)s Carbowax® a mistura de 41/59 em peso do PEG 300 e PEG 1450.

^b insolúvel em ponto de ebulição.

3.2.2. Aplicações do PEG

PEGs são largamente utilizados em sistemas para liberação controlada de drogas e em produtos cosméticos de cuidados pessoais, e aqueles com massa molar abaixo de 4000 u.m.a. podem ser eliminados do organismo, sendo que 98 % do seu total ingerido pode ser excretado do corpo humano através da urina. ^[51-54] Por último, a solução de PEG forma um ambiente hospedável para a sobrevivência de células, demonstrando a sua alta biocompatibilidade e por isso, PEG é amplamente utilizado em culturas de tecidos e também na preservação de órgãos, sendo, por isso, considerado um biomaterial na área de medicina hospitalar. ^[47-48]

3.3. POLIMERIZAÇÃO POR ABERTURA DE ANEL

O mecanismo de polimerização por abertura de anel de 1,1-lactídeo pode ser dividido em 3 classes de reação: catiônica, aniônica e coordenação-inserção. As duas primeiras são consideradas rotas alternativas, sendo que a última é mais utilizada industrialmente. ^[55-57]

A rota catiônica precisa de ácidos extremamente fortes para iniciar a reação e, além disso, a substituição nucleófila em carbono quiral pode causar a racemização do produto, assim, impedindo a obtenção de polímero com taticidade e massa molar elevada. Essas características tornam-na uma rota pouco viável. ^[57-58]

A segunda alternativa de reação aniônica é normalmente iniciada por alcóxidos de metais alcalinos. Tanto a iniciação quanto a propagação consiste em um ataque nucleofilo de um ânion ao carbono carbonila do 1,1-lactídeo seguido pela clivagem da ligação CO-O do anel. A técnica possibilita a desprotonação do monômero 1,1-lactídeo, gerando um ânion lactídeo planar. Devida a essa planaridade, as reações de protonação e desprotonação podem levar ao produto racêmico também e, conseqüentemente, ao baixo controle estereoquímico e à baixa massa molar do produto. ^[59-61]

A rota mais provável e mais importante é via inserção por coordenação. Essa é também a rota selecionada para sintetizar os copolímeros nesse trabalho. Os compostos organometálicos têm sido utilizados nas copolimerizações e copolimerizações de poli(α -hidróxi ácidos), com o objetivo de desenvolver catalizadores metálicos ativos de baixa toxidez e controlar a microestrutura do polímero, o que afeta as suas propriedades mecânicas e taxa de biodegradação. ^[62-64]

Neste trabalho foi usado o iniciador mais utilizado atualmente, di(2-etil-hexanoato) de estanho (II) ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$). A reação envolve duas etapas. Na primeira, o catalisador

Sn(Oct)₂ reage com compostos doadores de hidrogênio (hidroxilas, álcool, umidade contida no sistema), co-catalisador, gerando o alcóxido de estanho, considerado o verdadeiro iniciador da reação. (1)

O sistema reacional deve ser mantido seco, pois a umidade pode provocar reações indesejáveis^[37]:

- a) Competir com o co-iniciador impedindo a formação do copolímero de massa molar elevado;
- b) Decompor o catalisador e inativando-o a altas temperaturas no meio reacional;
- c) Induzir a ocorrência de reação de hidrólise do poliéster.

Em uma segunda etapa, o monômero cíclico se insere entre a ligação –Sn-OPEG formada na etapa anterior, promovendo o crescimento da cadeia. (etapa da propagação). Pesquisas foram anteriormente descritas^{[28],[65-67]} descrevendo a formação de cadeia de copolímeros de ε-caprolactona com 1,1-lactídeo com estrutura estatística. Assim, acredita-se que a inserção de 1,1-lactídeo e ε-caprolactona seja totalmente estatística como mostram as equações esquematizadas (2 e 3) na Figura 3.8.

(1)

Figura 3.8 Representação esquemática das reações da síntese do copolímero.

O aumento da concentração do co-iniciador resulta em polímeros com massas molares reduzidas. Kowalski^[55] atribuiu este comportamento ao duplo papel desempenhado pelo co-iniciador na formação do verdadeiro iniciador e como agente de transferência. Na ausência de reação de transferência, o M_n (massa molar média numérica) do polímero cresce linearmente com a conversão do monômero. Transferências reduzem a massa molar e aumentam a polidispersidade do homopolímero ou do copolímero final.

3.4. BIODEGRADAÇÃO

O processo de biodegradação e bioabsorção dos poli(α -hidróxi ácidos) é descrito na literatura como sendo uma sucessão de eventos. Exposto ao ambiente aquoso, inicialmente o material sofre hidratação. Com a presença das moléculas de água, o processo de degradação dá-se através da hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de oligômeros (ou monômeros) solúveis e não tóxicos. A degradação prossegue por um processo biologicamente ativo (por enzimas) ou pela clivagem hidrolítica passiva, sendo caracterizada pela perda de massa, diminuição de massa molar ponderal média e pela perda das suas propriedades mecânicas, como a resistência à tração e à compressão.^[68-70]

A reação de hidrólise pode ser descrita pela equação cinética cuja constante de velocidade é k e os reagentes são grupos carboxila e éster.

Nos estágios iniciais da reação temos a equação cinética que relaciona a formação de grupos carboxílicos ($[COOH]$) com o desaparecimento de grupos éster ($-[éster]$) em função do tempo:

$$\frac{d[COOH]}{dt} = -k[COOH][éster] \Rightarrow \frac{\int d[COOH]}{[COOH]} = \int -k[éster] dt$$

Nos estágios iniciais da reação a concentração $[éster]$ é muito elevada e a sua variação é muito pequena, de forma que se pode assumir nestas condições $[éster]$ como constante:

$$[éster] = a$$

Integrando-se a equação cinética obtém-se:

$$\ln \frac{[COOH]}{[COOH]_0} = -kat$$

ou ainda:

$$[COOH] = [COOH]_0 e^{(-akt)}$$

Como $[COOH]$ é diretamente proporcional a η e M_n pode-se escrever:

$$\eta = \eta_0 e^{(-ak_\eta t)}$$

$$M_n = M_n^o e^{(-ak_M t)}$$

Relacionando essas duas últimas equações de η e M_n , chega-se à dedução de equação relacionada àquela de Mark-Houwink, demonstrando o decréscimo exponencial da viscosidade intrínseca (η) em relação à massa molar (M_n).

$$\ln \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{k_\eta}{k_M} \ln \frac{M_n}{M_n^o}$$

ou ainda:

$$\eta = \frac{\eta_0}{M_n^o} M_n^{\left[\frac{k_\eta}{k_M} \right]}$$

isto é:

$$\eta = K_v M_v^\alpha \text{ (equação Mark-Houwink)}$$

Não é observada a perda de massa na fase inicial da biodegradação, pois acontecem apenas quebras de cadeias nessa etapa, transformando cadeias longas em pequenas. A segunda fase é caracterizada pela evidente perda de massa do material. Após a primeira etapa, as cadeias com baixa massa molar continuam produzindo fragmentos ainda menores, facilitando a sua própria difusão, aumentando a chance da ação da fagocitose. ^[71-76]

Dentre os produtos da hidrólise das ligações ésteres, a presença de terminais ácidos catalisa a reação de degradação. Tal fenômeno é chamado efeito autocatalítico dos poli(α -

hidróxi ácidos). O processo é homogêneo inicialmente, quando os produtos da superfície difundem para o meio, entretanto, quando é baixa a taxa de difusão dos produtos da reação no interior do material, gera um acúmulo de ácidos, fazendo com que estruturas densas tenham uma erosão inicial na superfície, mas apresentem uma degradação mais acentuada no centro. [77-82]

O efeito autocatalítico foi avaliado e confirmado em estudos de degradação *in vitro* de copolímeros dos poli(α -hidróxi ácidos). Os testes *in vivo* também demonstram essa degradação de forma heterogênea.

A bioabsorção pelo organismo ocorre quando a biodegradação gera produtos e subprodutos com as características dos metabólitos orgânicos, especificamente os ácidos do Ciclo de Krebs. Para os PLAs, ao terminar a hidrólise do material, a degradação segue o processo de oxidação do ácido láctico, que por sua vez são convertidos em ácido pirúvico. Na presença da acetil coenzima A, ocorre a liberação de CO₂ e, conseqüentemente, a decomposição em citrato. O citrato será então incorporado no Ciclo de Krebs, resultando em CO₂ e H₂O, podendo sua eliminação ser feita através da urina, fezes e da respiração. Nenhuma quantidade significativa de acúmulo de resíduos da degradação é encontrada em órgãos vitais. O material então foi absorvido e metabolizado. [83-86]

Já o mecanismo da biodegradação do PCL é iniciado por uma hidrólise abiótica do polímero para ácido ϵ -hidróxi capróico. Em seguida, esse produto é degradado em ciclo de TCA (ácido tricarboxílico). [87-88]

Há muitos fatores que influenciam a reação do corpo à presença de um implante biodegradável. A resposta pode estar relacionada com o tamanho e com a composição do implante, da mesma forma que o local do implante. A taxa de degradação do polímero e a

capacidade do local do implante de eliminar o composto degradado têm um papel muito importante na reação do tecido ao implante.^[89-90] Se o tecido do local não puder eliminar os produtos ácidos de um implante de rápida degradação, então poderá haver uma reação inflamatória ou tóxica.^[91]

A degradação *in vitro* mostra-se como uma boa alternativa quando comparados aos estudos *in vivo*, sendo fundamentais e necessários. Os custos são menores, o processo pode ser acelerado e as condições do ensaio, como temperatura, pH, produtos e subprodutos de degradação, podem ser quantificados e monitorados.

3.4.1. Fatores que Influenciam a Degradação

A taxa de degradação é influenciada por fatores de configuração estrutural, tais como o grau de copolimerização, cristalinidade, massa molar, morfologia, quantidade de monômero residual e porosidade, ambiente do implante etc.^[92-95]

3.4.1.1. Localização do Implante

Na localização do implante, deve-se levar em conta a vascularização local e a solicitação mecânica. Se um polímero bioabsorvível é implantado num local de alta vascularização (grande atividade vital), sua velocidade de degradação será mais rápida em relação a uma região menos vascularizada, de funções passivas. Locais de grande solicitação mecânicos também têm sido descritos como aceleradores da degradação.

3.4.1.2. Composição Química

No exemplo do poli(ácido láctico), a quiralidade do carbono α permite a síntese de compostos enantiômeros, dando origem à uma família de polímeros: poli(L-ácido láctico) (PLLA), poli(D,L-ácido láctico) (PDLLA) e copolímeros em diferentes proporções. Devido à distribuição aleatória das unidades L e D na cadeia polimérica, o polímero racêmico não possui domínios cristalinos, sendo um material amorfo e com propriedades mecânicas significativamente menores quando comparado ao semicristalino PLLA, o que já foi relatado com mais detalhes no item anterior 3.1.1. Por isso, enquanto o PLLA demora mais de 2 anos para degradar, o PDLLA leva um tempo bem menor em sua degradação.

Os grupos hidrofílicos, tais como -NH, -COOH, -OH e -NCO, entre outros, auxiliam o processo de degradação. Assim, o grupo metila presente nas cadeias de PLA é responsável pelo impedimento estéreo na reação de hidrólise. Dessa forma, a presença de unidades de ácido glicólico favorece a penetração da água e conseqüentemente a taxa de degradação. Várias pesquisas e estudos foram feitos baseados nessas informações a fim de descobrir um copolímero PLGA que melhor atenda às necessidades de controle do tempo de degradação e ao mesmo tempo, não deixe a desejar em suas propriedades mecânicas.^[38]

Os estudos de biodegradação realizados tanto *in vivo* quanto *in vitro* verificaram a biocompatibilidade do PLA e PGA. Bergsma e seus colaboradores realizaram um estudo em pacientes que receberam implantes de PLLA para fraturas zigomáticas. Eles removeram e analisaram o material depois de 3,3 até 5,7 anos. Algumas partículas de alta cristalinidade de PLLA ainda permaneceram depois desse período. Essas partículas não são danosas às células, mas induzem uma reação na forma de inchamentos locais.

3.4.1.3. Cristalinidade

Devido à disposição espacial das cadeias poliméricas, o efeito da cristalinidade influi na taxa de absorção de água pelo polímero. O primeiro estágio de degradação consiste na penetração e difusão das moléculas de água nas regiões amorfas do material, e subsequente cisão hidrolítica das ligações ésteres das cadeias poliméricas. A segunda etapa se dá quando parte considerável da região amorfa está degradada, e prossegue no centro dos domínios cristalinos. A literatura descreve um aumento porcentual da porção cristalina devido à absorção dos fragmentos pela rede cristalina e pela formação de novos cristais, através do rearranjo das cadeias de menor massa molar originadas no processo de degradação. [72]

3.4.1.4. Massa molar

Polímeros com alta massa molar são extremamente duráveis. As amostras de pequena massa molar são mais susceptíveis à degradação, devido à habilidade de fácil transporte intracelular. Entretanto, essas macromoléculas com baixa massa molar têm utilidades muito limitadas apesar dessa propriedade vantajosa. [70]

3.4.1.5. Reticulação

As ligações cruzadas reduzem consideravelmente a taxa de degradação mesmo quando uma molécula apresente massa molar pequena. As cadeias lineares aumentam a susceptibilidade da molécula ao ataque enzimático, promovendo assimilação do micro organismo. [70]

3.4.1.6. Morfologia

A influência da porosidade e geometria do suporte polimérico é também relatada como um dos fatores determinantes na velocidade de degradação e indução ao crescimento celular.

Vários estudos revelam que a invasão e o crescimento celular estão diretamente relacionados com o tamanho dos poros e a cristalinidade do material. Para muitos polímeros biodegradáveis e bioabsorvíveis, na faixa de 50-150µm, quanto maior o tamanho do poro do material maior é a facilidade de ancorar e crescer as células devido à facilidade de difusão dos nutrientes dos fluidos orgânicos locais.

Em muitos casos, durante a degradação *in vivo*, PLA e PGA produzem soluções tóxicas provavelmente em consequência da degradação produzir ácido. Esta é a preocupação principal nas aplicações ortopédicas onde requerem os implantes com tamanhos consideráveis, que pode resultar em uma liberação de produtos de degradação com concentrações ácidas locais elevadas. Um outro ponto preocupante é a liberação de partículas pequenas durante a degradação, podendo provocar uma resposta inflamatória.^[73]

3.5. ENGENHARIA DE TECIDOS

Engenharia de tecidos é um novo campo multidisciplinar que envolve a aplicação dos princípios e métodos de engenharia de materiais junto aos conhecimentos das áreas biológicas e médicas. A grande vantagem da engenharia de tecidos é a superação dos limites de tratamentos convencionais baseados em transplantes de órgãos ou implantes de biomateriais dentro do corpo humano. ^[50-54] Em princípio, pode-se produzir substitutos “artificiais” imunologicamente tolerantes de órgãos e de tecidos danificados que podem crescer no paciente. Isso conduzirá a uma solução permanente, sem a necessidade de terapias suplementares a longo prazo. ^{[71],[74]}

Essa nova engenharia trata resumidamente de um cultivo de células *in vitro* e em seguida, introdução em estudos *in vivo*. A dificuldade de inserção direta e proliferação de células trouxeram a necessidade de uma matriz pré-implantação a qual chama-se *scaffold*, suporte de crescimento celular. Antes do implante, o processo de cultura de células segue o fluxograma abaixo:

(a)	Oxigênio e nutrientes apropriados são fornecidos, através do scaffold poroso para criar um ambiente adequado para o crescimento celular.
(b)	As células são depositadas na superfície do <i>scaffold</i> .
(c)	As células começam a proliferar-se e migram para dentro dos poros da matriz.
(d)	As células colonizam inteiramente os poros do <i>scaffold</i> e começam a construir a sua própria matriz extracelular.
(e)	Muitas vezes, as camadas superiores de células consomem a maior parte do oxigênio e nutrientes, dificultando a difusão deles e conseqüentemente a imigração das mesmas.	<p>Pp simboliza a profundidade de penetração</p>

Figura 3.9 Diagrama esquemático de cultivo de células. ^[77]

Vários requisitos foram identificados para a produção de scaffolds na engenharia de tecidos.

- (1) O *scaffold* deve possuir poros interconectados de escala apropriada para favorecer a integração e a vascularização do tecido.
- (2) O material do *scaffold* deve apresentar biodegradabilidade para que eventualmente seja substituído pelos tecidos vivos.
- (3) Deve ter superfícies com propriedades químicas adaptadas para favorecer o ancoramento e crescimento de células.
- (4) Possuir propriedades mecânicas adequadas de acordo com o local pretendido de implante.
- (5) Não devem induzir nenhuma resposta inflamatória.
- (6) Sejam fabricados facilmente em uma variedade de formas e tamanhos.

Atendendo a todas essas exigências, diversos materiais podem ser selecionados para a fabricação do *scaffold*.

Inicialmente, materiais cerâmicos sintéticos e naturais inorgânicos (hidroxiapatita e fosfato tricálcio) foram investigados como candidatos de confecção de *scaffold* na área de engenharia de tecidos ósseos. Isso é porque estes materiais cerâmicos assemelham-se ao componente inorgânico natural do osso e tem propriedades de osteocondutividade. Entretanto, esses cerâmicos são inerentemente frágeis embora se ajustem às propriedades naturais do osso. Pode-se interpretar que o sistema ósseo funciona como uma matriz polimérica reforçada com partículas cerâmicas, o polímero é a proteína colágeno, e representa aproximadamente 30% do peso total, e a hidroxiapatita, 70%.

Porém, os *scaffolds* cerâmicos não podem ser apropriados para crescimentos de células de tecidos macios (tecido do músculo de coração) os quais requerem propriedades mecânicas diferentes. Assim, os polímeros sintéticos e naturais tornaram-se uma alternativa versátil para a construção de *scaffolds* da maioria dos tecidos. ^[79]

Existem vários métodos na fabricação desses suportes: evaporação de solvente com adição e lixiviação de sal, inversão de fase, extrusão, FDM (Fused Deposition Modelling), essa ultima técnica permite a confecção de *scaffolds* com maior precisão em escala nanométrica.

Os poliésteres sintéticos e seus copolímeros ou blendas citados no capítulo anterior são muito usados para a fabricação de *scaffolds*.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Materiais

Os reagentes e solventes químicos utilizados neste trabalho foram utilizados como recebidos, quando não mencionado nenhum tratamento específico para purificação:

- 2-Etil-hexanoato de estanho – procedência: Aldrich;
- Clorofórmio P.A - procedência: Casa Americana, Vetec;
- Clorofórmio-d – procedência: Cambridge Isotope laboratories.Inc;
- ϵ -caprolactona - procedência: Aldrich, pureza 99%;
- Hexano-1,6-diisocianato – procedencia: Sigma;
- Hexano P.A – procedência: Casa Americana;
- L,1-lactídeo (3,6,dimetil-1,4 dioxano-2,5 diona) - procedência: Aldrich, pureza 98%;
- Poli(glicol etilênico) de massa molar 4000 u.m.a (PEG4K) - procedência: Oxiteno do Brasil;
- Poli(glicol etilênico) de massa molar 20.000 u.m.a Carbowax 20 M (PEG20K) – procedência: Supelco.;
- Tetrahidrofurano (sem inibidor) – procedência: Tedia Brasil;

4.2. Equipamentos:

Além dos equipamentos comuns necessários para a realização da pesquisa, tais como vidraria, balança analítica, etc. Utilizaram-se também os seguintes equipamentos:

- Câmara “Glove-box”;

- Calorímetro diferencial exploratório - DSC 50 da Shimadzu; - equipamento pertencente ao IPEN
- Analisador termogravímetro – TGA 50 da Shimadzu; - equipamento pertencente ao IPEN
- Analisador térmico dinâmico-mecânica (DMTA) – Rheometric Scientific modelo DMTA-V.
- Microscópio ótico de luz polarizada (MOLP) – Olympus BX50; aquecedor Mettler Toledo FP82HT; processador Mettler Toledo FP90.
- Microscópio eletrônico de varredura (MEV) – Phillips modelo XL-30.
- Difractometro de Raio-X – Phillips modelo MPD 1880.
- Espectrometro de ressonância magnética nuclear (RMN) – modelo Bruker 200 – equipamento pertencente a Central Analítica do Instituto de Química – USP

4.3. Metodologia

Como dito anteriormente, a parte experimental engloba 3 etapas: (1) síntese de copolímero tribloco com PEG20K, (2) síntese de PEG4K modificado, e por último, (3) síntese do copolímero tribloco utilizando o PEG4K modificado. A polimerização foi efetivada através da reação por abertura de anel, a razão molar entre os reagentes foi pré-determinada segundo *Castro e Wang* ^[28] As cadeias desses copolímeros foram planejadas para manter um trecho de PEG como segmento central, enquanto segmentos formados por LA e CL crescem com estrutura aleatória a partir de seus grupos terminais.

4.3.1. Procedimento geral para síntese de copolímero tribloco com PEG20K (1)

Na câmara *glove-box*, purgada com nitrogênio, foram realizadas as pesagens dos reagentes. Para o copolímero 1, foi mantida na alimentação, a seguinte proporção mássica entre os reagentes: LA:CL:EO = 30:45:25. Preparou-se primeiramente o PEG e o catalisador (octanoato de estanho) no balão, fechado com parafilme para evitar qualquer contato com a umidade do ar. Feito isso, o balão foi levado para um banho de silicone pré-aquecido a 70°C a fim de obter uma ativação mais homogênea. Após 1 hora de ativação, o balão foi retirado do banho, transferido para dentro da câmara seca e introduzidos os reagentes restantes LA e CL. O recipiente foi selado novamente em atmosfera seca e levado a outro banho de silicone a 120°C sob agitação magnética. Esta reação teve a duração de 168 horas (1 semana). O copolímero obtido foi dissolvido em clorofórmio e precipitado em hexano a baixa temperatura (8-10°C). O produto então foi seco ao ar livre por 24 horas e a vácuo por 72 horas.

O copolímero 2 seguiu a mesma rota de síntese do primeiro, diferindo-se do anterior no tempo das reações, 2 horas e 336 horas (2 semanas) para a ativação e a polimerização, respectivamente.

O copolímero 3 apresentou uma composição diferente na alimentação, com um pequeno aumento da fração do LA, objetivando uma melhoria na propriedade mecânica do material, a razão mássica LA:CL:EO = 45:30:25 foi utilizada. E o tempo da ativação e o da reação é igual a do copolímero 2, 2 horas e 336 horas (2 semanas), respectivamente.

A rota desses procedimentos é simplificada no seguinte fluxograma.

Figura 4.1 Fluxograma do procedimento da copolimerização.

Esses três copolímeros obtidos apresentam a cor branca fosca levemente amarelada com aspecto elastomérico.

4.3.2. Síntese de PEG modificados (PEG-MODIF) a partir de PEG com 4000 u.m.a. (PEG 4K) (2)

4.3.2.1. Fundamentos teóricos e cálculos

Para promover a melhoria de sua propriedade mecânica, foi necessário sintetizar um poli(glicol etilênico) com massa molar mais elevada baseado em trechos menores a fim de facilitar a quebra de cadeias e sucessivamente a sua biodegradação.

Foi selecionado o reagente hexano-1,6-diisocianato (industrialmente chamado HDI) como extensor para reagir com o PEG de massa molar de 4.000 u.m.a, aumentando o tamanho da cadeia. O procedimento para a sua obtenção está esquematizado na Figura 4.2:

Figura 4.2 Esquema da extensão da cadeia de PEG 4000 com 1,6-hexametileno-diisocianato

O diisocianato reage como um “ligante” entre as cadeias PEGs, assim a cadeia cresce, tendo sua maior parte constituída por poli(glicol etilênico). Segundo Carothers, o controle estequiométrico é expresso pela Equação 1:

$$X_n = (1+r)/(1+r-2rp) \quad \text{Equação 1.}$$

Onde: r = razão molar dos reagentes;

p = conversão dos grupamentos funcionais;

X_n = grau de polimerização.

Supondo que a reação tenha conversão completa, ou seja, o valor do p é igual a 1, a equação pode ser reescrita:

$$X_n = (1+r)/(1-r) \quad \text{Equação 2.}$$

Para uma massa molar de 50.000 u.m.a como produto da reação, sendo massa molar de HDI igual a 168,2 u.m.a, e PEG 4.000 u.m.a, tem-se:

$$50.000/(168,2+4000) = (1+r)/(1-r)$$

Obtendo-se, então o valor de r = 0,846;

$$n_{\text{HDI}}/n_{\text{PEG}} = 0,846$$

O valor pré-estabelecido de PEG foi de 20g para esta reação, assim:

$$n_{\text{HDI}} = 0,846 \times (20/4000); n_{\text{HDI}} = 0,00423;$$

A quantidade a ser adicionada de HDI é: $168,2 \times 0,00423 = 0,712\text{g}$;

Uma quantidade mínima de solvente, no caso, o clorofórmio, foi adicionado para homogeneizar os reagentes a fim de promover uma completa reação.

A reação de formação de uretano é extremamente rápida e exotérmica, porém, neste trabalho estabelecemos o tempo da reação em 15 horas para garantir conversão completa, possibilitando que alta massa molar seja atingida. A temperatura da reação foi 75°C .

4.3.2.2. Procedimento da síntese de poli(glicol etilênico)s a partir de PEG com 4000 u.m.a. (2)

Os reagentes e a vidraria necessários foram introduzidos na câmara *glove-box*, purgada com nitrogênio. A umidade relativa foi mantida abaixo de 15%. As quantidades pré-estabelecidas de reagentes foram pesadas dentro da câmara e colocadas no balão de reação. Este balão foi fechado e selado com parafilme e em seguida, retirado da câmara seca e imerso num banho aquecido de silicone a 75°C . A reação durou 15 horas sob agitação constante tanto do banho, como na reação dentro do balão. O copolímero obtido foi dissolvido em clorofórmio e precipitado em hexano e, em seguida, foi seco ao ar livre primeiramente por 24 horas e depois a vácuo por 72 horas. O produto final apresentou-se como sólido com cor branca.

4.3.3. Síntese de copolímero tribloco Poli(PLLA-CL-*b*-PEG-*b*-PLLA-CL)a partir de PEG

-MODIF (3)

Foi utilizado um procedimento semelhante àquele descrito em 4.3.1, porém o PEG modificado necessitou de ser dissolvido em quantidade mínima de tetrahidrofurano (THF) seco antes de ser ativado. Por causa da evaporação do solvente na temperatura relativamente alta da reação, foi necessário o uso de sistema de refluxo purgado com N₂ para manter a reação em ambiente seco e inerte.

Os copolímeros 4 e 5 foram preparados através desse procedimento, diferem-se um do outro pela composição na alimentação. O copolímero 4 tem a razão mássica LA:CL:EO = 30:45:25, igual aos copolímeros 1 e 2, enquanto o copolímero 5 tem a razão mássica LA:CL:EO = 45:30:25, igual ao copolímero 3.

Tabela 4.1 Condições utilizadas para preparação dos copolímeros triblocos estudados.

Amostra	Composição (%)	Tempo de ativação	Tempo de reação	Solvente
	LA:CL:EO			
Copolímero 1	30:45:25	1 hora	168 horas	—
Copolímero 2	30:45:25	2 horas	336 horas	—
Copolímero 3	45:30:25	2 horas	336 horas	—
Copolímero 4	30:45:25	2 horas	336 horas	THF
Copolímero 5	45:30:25	2 horas	336 horas	THF

5. CARACTERIZAÇÃO E RESULTADOS

5.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN- ^{13}C e RMN- ^1H)

RMN é uma técnica bastante usada para determinação de estruturas de compostos. O princípio do funcionamento é baseado na aplicação de um campo magnético externo, com a interação spin-spin apresentando uma energia envolvida para cada próton na molécula. Conseqüentemente, consegue-se identificar a configuração estrutural. Desde que a eficiência da relaxação longitudinal seja tal que se verifique a distribuição de Boltzman, a razão entre as intensidades das bandas de absorção medida pelas áreas que elas envolvem, é a própria razão do número de prótons em cada grupo. [96-100]

Neste trabalho, a análise dos espectros RMN- ^1H e RMN- ^{13}C dos copolímeros dissolvidos em CDCl_3 , permitiu a sua caracterização qualitativa e quantitativa.

No caso do copolímero tribloco poli(l,l-lactídeo-stat- ϵ -caprolactona)-bloco-poli(óxido de etileno)-bloco-poli(l,l-lactídeo-stat- ϵ -caprolactona), foi preciso a análise das duas técnicas em conjunto, pois em RMN- ^1H , os sinais de metila e metilenos, multipletos, de LL e CL, respectivamente, são muito próximos, dificultando a interpretação devido à baixa resolução dos espectros. Já no RMN- ^{13}C , com a ampliação na região de 170ppm, os picos de carbonila de caproíla e lactidila podem ser facilmente distinguidos. Por outro lado, no espectro de RMN- ^1H , o metileno da cadeia principal do PEG é observado com grande intensidade na região 3,6-3,7ppm.

Os espectros das cinco amostras de RMN- ^{13}C ampliados na região 170ppm são apresentados nas Figuras 5.1 a 5.5. E os deslocamentos químicos da carbonila das tríades

relevantes são mostrados na Tabela 5.1. Os resultados estão de acordo com os dados da literatura.

Figura 5.1 Espectro de RMN- ^{13}C do copolímero 1.

Figura 5.2 Espectro de RMN- ^{13}C do copolímero 2.

Figura 5.3 Espectro de RMN- ^{13}C do copolímero 3.

Figura 5.4 Espectro de RMN- ^{13}C do copolímero 4.

Figura 5.5 Espectro de RMN- ^{13}C do copolímero 5.

Tabela 5.1 Diferentes tríades e seus picos característicos em copolímeros. ^[28]

Seqüência Tríade	Ressonância de carbonila, ppm	Seqüência Tríade	Ressonância de carbonila, ppm
CL- <u>CL</u> -CL	$173,504 \pm 0,026$	LL- <u>LL</u> -CL	$170,344 \pm 0,012$
LL- <u>CL</u> -CL	$173,434 \pm 0,020$	CL- <u>LL</u> -CL	$170,244 \pm 0,013$
CL- <u>CL</u> -LL	$172,852 \pm 0,028$	CL- <u>LL</u> -LL	$170,098 \pm 0,012$
LL- <u>CL</u> -LL	$172,796 \pm 0,017$	LL- <u>LL</u> -CL	$169,741 \pm 0,012$
		LL- <u>LL</u> -LL	$169,588 \pm 0,010$

A Tabela 5.1 mostra os picos característicos dos trechos caproíla e lactidila na região de 169 – 174 ppm. Nos copolímeros 3 e 5, a área onde indica a participação do PLA é maior em relação à área do PCL, compatível com a maior alimentação de LL nessas duas amostras. A integração de cada sinal de carbonila no espectro é considerada

quantitativamente proporcional à concentração relativa das unidades caproíla e lactato (meia unidade do lactídeo). A conversão de mols de carbonila, determinados por RMN-¹³C, em quantidades molares relativas permite a obtenção de concentrações relativas de segmentos LL e segmentos CL (Tabela 5.2), sendo o cálculo feito pela equação 3.:

$$\frac{LL}{CL} = \frac{\frac{a}{2}}{b} = \frac{a}{2b} \quad \text{Equação 3.}$$

Onde: a = área integrada dos sinais de carbonila do LA.

b = área integrada dos sinais de carbonila do CL.

Utilizando-se o cálculo da razão molar, a razão em massa também pode ser obtida multiplicando pela massa molar de cada componente.

Tabela 5.2 Razão molar e razão mássica obtidas dos espectros de RMN-¹³C.

	Copolímero 1	Copolímero 2	Copolímero 3	Copolímero 4	Copolímero 5
LA:CL (molar %) ^a	48:52	53:47	71:29	59:41	77:23
LL:CL (molar %) ^b	32:68	36:64	55:45	42:58	63:37
PLA:PCL (massa %)	37:63	42:58	61:39	48:52	68:32

^a razão molar obtida diretamente do espectro de RMN-¹³C.

^b razão molar obtida da Equação 3.

Nota-se a coerência entre as porcentagens de PLA:PCL calculadas pelo espectro RMN-¹³C e as da alimentação. Nos copolímeros 1, 2 e 3, a variação oscila em torno de 2% comparando com os dados da alimentação. Entretanto, no caso do copolímero 4 e do copolímero 5, essa alteração subiu para mais de 8%. Apesar disso, a presença de LA ainda

está muito abaixo da esperada ^[28]. O resultado também esclarece o porquê do material apresentar um aspecto predominante de sólido viscoso. Segundo Castro e Wang^[28], no copolímero estatístico de PLA-PCL, a reatividade de LL apresenta-se maior em relação a CL. Isto é, para 40% e 60% de monômero de lactídeo na alimentação, obteve-se 76% e 90% de LL calculado pela RMN-¹³C, o que não ocorreu neste trabalho. O anel lactídeo é considerado apolar por apresentar sua estrutura simétrica, em oposição ao ϵ -caprolactona que apresenta polaridade. Contudo, a cadeia PEG é extremamente polar, por ter massa molar elevada, a sua polaridade ao longo da cadeia pode afetar a reatividade do LL em relação ao CL, diminuindo a velocidade de reação do LL, por limitar a sua solubilidade local. No caso dos copolímeros 4 e 5, a presença do solvente THF serviu como “minimizador” das interações dipolares entre o PEG e LL, por ter polaridade relativamente menor que PEG e pelo fato do PEG estar dissolvido nele. Outro motivo pode ser atribuído ao fato do tempo de reação relativamente mais longo, comparado aos observados na literatura. O tempo prolongado pode promover a maior homogeneização na incorporação dos reagentes.

Na Figura 5.6, analisando-se os espectros de RMN-¹H dos cinco copolímeros com o auxílio da Tabela 5.3, confirma-se a efetivação da reação de copolimerização com formação da estrutura tribloco, pois na região 4,1 ppm, apareceram em todos os espectros, os sinais característicos da ligação metileno da cadeia PEG com a PLA e PCL, indicando o sucesso da ativação nas extremidades da PEG e, conseqüentemente, a reação por inserção dos trechos PLA e PCL. Porém, na mesma região, um tripleto típico de CL é observado em

conjunto. Esse sinal aparece mais forte nos copolímeros 1, 2 e 4, onde há maior presença da unidade caproíla, coerente com a análise anterior de RMN- ^{13}C .

Figura 5.6 Picos característicos dos copolímeros por RMN- ^1H

Tabela 5.3 Picos característicos do RMN-¹H.

Estrutura	Pico de RMN- ¹ H ^[51]	Nos copolímeros
(ppm)		
$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{CH}_3 \\ \parallel \quad \\ \text{Lac}-\text{C}-\text{CH}-\text{Lac} \end{array}$ <p>a</p>	5,2	presente
$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{CH}_3 \\ \parallel \quad \\ \text{Lac}-\text{C}-\text{CH}-\text{Cap} \end{array}$ <p>b</p>	5,12	presente
$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{CH}_3 \\ \parallel \quad \\ \text{Cap}-\text{C}-\text{CH}-\text{Lac} \end{array}$ <p>c</p>	5,02	presente
$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{CH}_3 \\ \parallel \quad \\ \text{Cap}-\text{C}-\text{CH}-\text{Cap} \end{array}$ <p>d</p>	4,95	ausente
$\text{PEG}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Cap}$ <p>e f</p>	3,6 (e); 4,05 (f)	presente
$\text{PEG}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Lac}$ <p>g h</p>	3,7 (g); 4,1 (h)	presente
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{Cap}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Cap} \end{array}$ <p>i</p>	3,9	ausente

O pico singleto em 3,65 ppm é atribuído aos prótons metilenos centrais do bloco PEG. A grande intensidade desse sinal demonstra o grande bloco da cadeia, de acordo com a quantidade de PEG introduzida na alimentação. Para calcular a proporção molar entre as

unidades óxido de metileno e lactídeo, foi escolhida a área correspondente à região dos picos 5,0-5,2 ppm, os quais marcam a presença de metino do PLA, e o pico relativo à cadeia de PEG a 3,4-3,7.

O cálculo foi feito pela integração das áreas. O PEG utilizado tem a massa molar inicial de 20.000 u.m.a, isto corresponde ao grau de polimerização, DP = 454. Assim, pode-se obter o número de unidades constitutivas de lactato, LA_n , ou lactídeo, LL_n .

$$LA_n = \frac{4.DP.b}{a} = 2LL_n \Rightarrow LL_n = \frac{2DP.b}{a} \quad \text{Equação 4.}$$

onde: a= integração da área relativa aos metinos da unidade LA (5,1-5,3ppm).

b= integração da área relativa aos metilenos do PEG (3,4-3,7ppm).

A estimativa da concentração relativa de PCL pode ser feita por diferença, tendo-se a concentração relativa de PEG/ PLA e conhecendo-se a concentração relativa PLA/PCL, obtida por RMN-¹³C (Tabela 5.2). Além disso, conhecendo-se a massa molar inicial do PEG utilizado igual a 20.000 u.m.a, é possível calcular a massa molar média numérica.

$$Mn_{\text{copolímero}} = LL_n.Mn_{PLA} + CL_n.Mn_{PCL} + 20.000 \quad \text{Equação 5.}$$

$$Mn_{PLA} = 144g.mol^{-1}$$

$$Mn_{PCL} = 114g.mol^{-1}$$

Tabela 5.4 Composição dos copolímeros triblocos por RMN-¹³C e RMN-¹H.

Amostra	Composição (em massa %)						M _n do copolímero (g.mol ⁻¹)
	Nominal			Copolímero			
	PEG20K	LA	CL	PEG20K	LA	CL	
Copolímero 1	25	30	45	26,2	27,2	46,6	76300
Copolímero 2	25	30	45	27,0	30,4	42,6	74200
Copolímero 3	25	45	30	25,6	45,2	29,2	78300

Calculou-se a massa molar apenas para os copolímeros 1, 2 e 3. A massa molar do PEG estendido com 1,6-hexametilenodisocianato ainda não foi determinada devido a dificuldades experimentais para a sua realização, impedindo no momento a avaliação das M_ns dos copolímeros 4 e 5.

Entre os primeiros três copolímeros, o copolímero 3 se destaca com uma maior concentração de LL, reafirmando a sua maior conversão. Todos os resultados confirmaram que nos copolímeros formados, a proporção PEG/PLA/PCL apresenta valor próximo à da alimentação.

A pequena diferença observada entre a composição na alimentação e composição calculada pode ser causada pelas diferenças nas constantes de velocidade das reações envolvidas. O objetivo foi sintetizar o copolímero tribloco poli(l,l-lactídeo-stat-ε-caprolactona)-bloco-poli(óxido de etileno)-bloco-poli(l,l-lactídeo-stat-ε-caprolactona), tendo a cadeia PEG como o segmento central ligado aos blocos formados por PLA-PCL. Como as ligações LL e CL à cadeia PEG são estatísticas, isto é, não apresentam uma ordem

específica, a composição depende das condições experimentais, tais como, temperatura, pressão, meio reacional, composição dos reagentes, entre os fatores mais relevantes. Além disso, pode existir outra arquitetura de cadeia no produto final, tal como o copolímero dibloco PEG-b-(PLA-stat-PCL), quando somente uma extremidade do PEG for ativada, ao invés da ativação em ambas as extremidades.

De forma geral, pode-se concluir através das análises RMN que, primeiramente, houve a copolimerização com formação do copolímero tribloco esperado poli(l,l-lactídeo-stat- ϵ -caprolactona)-bloco-poli(óxido de etileno)-bloco-poli(l,l-lactídeo-stat- ϵ -caprolactona). O tempo mais longo de reação favorece a formação do copolímero. A incorporação de grupos lactídeo não apresentou a reatividade relativa maior em relação aos grupos caproíla, como reportado na literatura ^[28]. A não homogeneidade dos produtos (formação de copolímeros dibloco e tribloco) pode ser evitada pela diminuição da quantidade de iniciador e maiores cuidados durante manuseio para impedir a entrada de umidade e oxigênio.

5.2. Análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA)

Com a aplicação de uma pequena tensão senoidal de uma frequência angular, é possível obter os valores de propriedades como módulo de armazenamento, módulo de perda e demais informações a respeito do comportamento viscoelástico do material. A partir dessas variáveis, pode-se correlacionar propriedades mecânicas dos materiais poliméricos, tais como tenacidade, resistência ao impacto, etc. Uma das utilizações mais comuns da técnica de DMTA ocorre também na determinação da temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m) e temperatura de cristalização (T_c). Essas temperaturas características são detectadas por uma mudança brusca no módulo de armazenamento do material ou definidas através de máximos nas curvas do amortecimento mecânico ($\tan\delta$) como uma função da temperatura. ^[101-103]

Os corpos de prova foram prensados a vácuo para redução de espessura e eliminação de bolhas de ar. Após a prensagem, foram cortadas “tiras” com dimensões aproximadas de 1 x 6 x 30 (espessura x largura x comprimento) em unidades de milímetro. A análise foi feita no modo de tração, utilizando a frequência de 1 Hz e a faixa de temperatura de teste de -120°C a temperatura ambiente com taxa de aquecimento de 2°C/min. Utilizou-se o N₂ líquido para o resfriamento do sistema. Os resultados são mostrados em gráficos representados em módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e amortecimento (tangente delta) cujo valor é igual a E''/E' . Por ser material elastomérico, os copolímeros apresentam uma contração significativa a baixa temperatura, por isso, as amostras foram reapertadas a -60°C para evitar a descontinuidade nas medidas, quando a amostra escorrega das garras.

Por dificuldades na preparação de corpo de prova, não foi possível a realização dos testes dos copolímeros 4 e 5, foram feitas análises somente dos copolímeros 1, 2 e 3. Nas Figuras 5.8 a 5.10, pode-se observar que esses três copolímeros apresentaram comportamentos dinâmico-mecânicos similares: iniciam-se com um valor de E' alto e sofrem uma redução suave até determinada temperatura e, por fim, é observado um trecho de decaimento brusco, o qual é atribuído à relaxação devido a T_g do material. Além disso, percebe-se facilmente que os copolímeros apresentam miscibilidade entre as fases poliéter e poliéster. Isto é cada copolímero apresentou somente uma única etapa de relaxação acentuada correspondente à fase amorfa. Isso nos dá idéia de que houve a modificação de ligações químicas entre as cadeias e a cadeia principal é o copolímero de poliésteres e poliéter. Porém, cada um desses copolímeros apresentou sua própria relaxação deslocada em relação ao outro, em termos de temperatura (Figura 5.7). A temperatura do pico da relaxação da $\tan \delta$ de cada copolímero foi registrado, assim como a faixa de temperatura em que ocorre a relaxação devido à transição vítrea, observada por DMTA (Tabela 5.5).

Figura 5.7 Gráfico de análise de DMTA do copolímero 1, 2 e 3 em conjunto.

Tabela 5.5 Temperaturas de transição obtidas pela interpretação dos gráficos de DMTA.

	Copolímero 1	Copolímero 2	Copolímero 3
T _g (°C)	(-35,5) – (4,5)	(-31,4) – (8,4)	(-21,4) – (32,8)
Pico de tangente δ (°C)	(-15,8)	(-10,3)	(12,6)

Tabela 5.6 Comparação de valores de E' dos três copolímeros em diferentes temperaturas.

Módulo de Armazenamento (E') (Pa)			
Temperatura (°C)	Copolímero 1	Copolímero 2	Copolímero 3
-60	$3,11 \times 10^9$	$3,57 \times 10^9$	$3,44 \times 10^9$
-40	$2,76 \times 10^9$	$3,31 \times 10^9$	$3,21 \times 10^9$
-20	$6,59 \times 10^8$	$1,23 \times 10^9$	$2,85 \times 10^9$
0	$3,46 \times 10^7$	$7,32 \times 10^7$	$1,05 \times 10^9$
20	$1,69 \times 10^7$	$3,26 \times 10^7$	$8,78 \times 10^7$

O pico de tangente δ indica a maior taxa de transição de 2ª ordem. Nota -se que há um aumento da T_g, em outras palavras, um aumento do ponto de deflexão do amortecimento, quando vai do copolímero 1 para o copolímero 3. Porém, de 1 a 2, a mudança é pouco mais de 4°C, é muito pequena comparada com a variação do copolímero 1 a 3 ou do copolímero 2 a 3, cujas diferenças apresentaram-se maiores que 10°C. Os dados obtidos mostraram que a composição dos reagentes tem maior influência do que o tempo de reação, sobre o produto formado e que, com o acréscimo da quantidade do lactídeo, melhora-se a propriedade mecânica do copolímero final.

Todos os três copolímeros apresentaram seus valores de módulo de armazenamento superiores àqueles observados para a borracha natural a temperatura ambiente (aproximadamente 1,2MPa), apontando assim a vantagem dos copolímeros por serem materiais elastoméricos com boa propriedade mecânica, juntamente com sua característica de biodegradabilidade. ^[104]

Figura 5.8 Gráfico de análise DMTA do copolímero 1.

Figura 5.9 Gráfico de análise DMTA do copolímero 2.

Figura 5.10 Gráfico de análise DMTA do copolímero 3.

5.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

DSC é um tipo de análise no qual se acompanha a variação da energia entre a amostra e a referência, mantendo-se a temperatura de ambas igual. Existem dois modelos de DSC: DSC de fluxo de calor e DSC de compensação de potência. Na primeira técnica, a amostra e a referência são colocadas em suas respectivas cápsulas, posicionadas sobre um disco de metal, a troca de calor entre o forno e a amostra ocorre preferencialmente pelo disco por uma única fonte de calor. A diferença de temperatura detectada entre a amostra e a referência por meio de termopares é proporcional à variação de entalpia, à capacidade calorífica e à resistência térmica total ao fluxo calórico. A DSC de fluxo de calor é o mais comum e é utilizado neste trabalho para determinação de temperatura de transição vítrea (T_g) e temperatura de fusão (T_m) dos materiais poliméricos ^[101-104]

Uma pequena quantidade dos copolímeros (10mg) é pesada dentro de cadinho de alumínio, o qual é posteriormente selado antes de submeter a amostra à análise por DSC. Foi utilizado Al_2O_3 selado em cadinho de alumínio como referência. Para evitar a umidade e interferir no resultado da análise, as amostras dentro dos cadinhos foram levados para estufa a vácuo para a secagem a temperatura ambiente por 2 horas, antes da realização da análise.

Utilizou-se o nitrogênio líquido para o resfriamento do sistema e a taxa de aquecimento foi 10°C/min. Durante o processo, o gás N_2 com taxa de 30mL/min. foi introduzido e circulado dentro do forno para manter o ambiente inerte. O equipamento foi calibrado com índio ($T_m = 156,6\text{ °C}$ e $\Delta H_f = 3,26\text{ kJ.mol}^{-1}$) nas mesmas condições das análises.

A Tabela 5.7 mostra resumidamente as informações obtidas pela análise das curvas de DSC.

Tabela 5.7 Caracterização dos homopolímeros de partida e dos polímeros preparados.

Amostra	T _g (°C)	T _m (°C)	ΔH _m (J/g)
PEG 20K	-106,16	62,46	130,75
PEG 4K	—	52,01	91,34
PEG 4K modificado	-86,53	54,79	87,71
Copolímero 1	-34,99	47,20	19,12
Copolímero 2	-36,12	45,25	23,32
Copolímero 3	-17,06	43,73	26,73
Copolímero 4	-39,43	37,24 157,37	28,33 8,81
Copolímero 5	-31,58	33,30 158,51	12,92 0,47

Através dos gráficos de análise de DSC (Figura 5.11 a Figura 5.15), verifica-se que as amostras apresentam uma única fase amorfa, uma vez que apenas uma única T_g para cada curva foi observada. Este resultado sugere que a copolimerização foi bem sucedida, pois os segmentos apresentam estruturas químicas bastante distintas, mas a introdução de ligações covalentes entre eles inibe uma separação de fases. Foram observados dados variados de T_g e T_m, conforme as diferenças massas molares dos segmentos PCL, PLA e PEG. Para o homopolímero PLA, a T_g observada na literatura varia ao redor de 65°C enquanto a T_m, ao redor de 170°C; para o homopolímero PCL, a T_g observada na literatura fica por volta de -60°C e a T_m normalmente está ao redor de 60°C.^{[5][29][52][70]}

Os copolímeros 1, 2 e 3 foram obtidos a partir do PEG20K, cujos valores de T_g e T_m foram determinados e eram -106°C e 62°C , respectivamente.

Os resultados obtidos foram analisados com base na regra de mistura, anteriormente sugerida por Fox-Flory:

$$\frac{1}{T_{g \text{ copolímero}}} = \frac{W_A}{T_{gA}} + \frac{W_B}{T_{gB}} + \frac{W_C}{T_{gC}} \quad \text{Equação 5.}$$

Onde $T_{g \text{ copolímero}}$ é Temperatura de transição vítrea do copolímero;

W_A , W_B , W_C são frações mássicas do LA, CL e EO;

T_{gA} , T_{gB} , T_{gC} são temperaturas de transição vítrea em Kelvin dos respectivos homopolímeros PLA, PCL e PEG.

$$\text{Para o copolímero 1: } T_{g \text{ copolímero}} = \frac{1}{\frac{0,272}{338} + \frac{0,466}{213} + \frac{0,262}{167}} = 219,23\text{K} = -53,77^\circ\text{C}$$

$$\text{Para o copolímero 2: } T_{g \text{ copolímero}} = \frac{1}{\frac{0,304}{338} + \frac{0,426}{213} + \frac{0,270}{167}} = 221,43\text{K} = -51,57^\circ\text{C}$$

$$\text{Para o copolímero 3: } T_{g \text{ copolímero}} = \frac{1}{\frac{0,452}{338} + \frac{0,292}{213} + \frac{0,256}{167}} = 235,79\text{K} = -37,21^\circ\text{C}$$

$$\text{Para o copolímero 4: } T_{g \text{ copolímero}} = \frac{1}{\frac{0,3}{338} + \frac{0,45}{213} + \frac{0,25}{186,5}} = 230,4\text{K} = -42,6^\circ\text{C}$$

$$\text{Para o copolímero 5: } T_{g \text{ copolímero}} = \frac{1}{\frac{0,45}{338} + \frac{0,3}{213} + \frac{0,25}{186,5}} = 245,1\text{K} = -27,9^\circ\text{C}$$

Os resultados calculados apresentam-se diferentes daqueles observados experimentalmente através de análises DSC. Os valores calculados de T_g para copolímeros 1,2 e 3 são

aproximadamente 20 °C inferiores. Esta diferença é atribuída à reação incompleta, a qual ocasiona baixas massas molares e diferenças entre as razões mássicas na alimentação e no copolímero, assim como à formação da(s) fase(s) cristalina(s). Além disso, as temperaturas de T_g dos homopolímeros utilizadas foram aquelas observadas na literatura, cujas massas molares são elevadas, enquanto no caso destes copolímeros, os segmentos apresentam massas molares relativamente baixas, estando, portanto, ainda sujeitos à grande influência da presença das terminações das cadeias na T_g .

No caso dos copolímeros 4 e 5 (Figura 5.14 e 5.15), foram identificados dois picos de fusão, um em torno de 37°C e outro em 158 °C, os quais são atribuídos a PEG e PLA, respectivamente. Essa diferença de comportamento em relação àquele observado para os copolímeros 1,2 e 3, pode ser atribuída à cadeia de PEG modificado. As ligações uretanas podem interferir na reatividade do SnOct_2 , na ativação, ao mesmo tempo, a adição do solvente THF, aumenta a mobilidade do sistema, facilita o encontro do catalisador com os grupos hidroxilas nas extremidades da cadeia PEG modificado, uma vez que todas as cadeias PEG estejam ativadas pelo SnOct_2 , quantidades remanescentes deste reagente podem ser prejudiciais à reação seguinte, pois podem iniciar as reações de homopolimerização de lactídeo e ϵ -caprolactona. No caso dos copolímeros 4 e 5, a presença predominante de PLA pode ser entendido pela sua maior reatividade em relação ao PCL. ^[28]

A obtenção de copolímeros em bloco neste Trabalho requer a eliminação de resíduos indesejáveis, impedindo a ocorrência de reações paralelas, como já citadas, o que inclui a redução da quantidade de SnOct_2 , para tornar a polimerização específica a partir do PEG modificado.

Para todos esses copolímeros, é difícil determinar a cristalinidade de cada um somente pela interpretação de suas curvas DSC, porque trata-se de um sistema tribloco e a escassez de informações sobre estes sistemas poliméricos na literatura, dificultam mais ainda esta finalidade. Todavia, o uso de outros métodos de análise, principalmente, por difratometria de raios-X pode oferecer esclarecimento sobre a estrutura cristalina presente nos copolímeros.

Figura 5.11 Curva de DSC do copolímero 1.

Figura 5.12 Curva de DSC do copolímero 2.

Figura 5.13 Curva de DSC do copolímero 3.

Figura 5.14 Curva de DSC do copolímero 4.

Figura 5.15 Curva de DSC do copolímero 5.

Figura 5.16 Curva de DSC do PEG20K.

Figura 5.17 Curva de DSC do PEG4K.

Figura 5.18 Curva de DSC do PEG4K modificado.

5.4. Termogravimetria / Termogravimetria Derivada (TG/DTG)

A termogravimetria (TG) é uma técnica da análise térmica na qual a variação da massa da amostra (perda ou ganho) é determinada em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. A TG pode ser usada para monitorar qualquer evento térmico que envolve uma fase de gás como a oxidação ou desidratação, possibilitando a determinação da temperatura de decomposição e detecção de alterações químicas na faixa de temperatura definida. Este método é útil para determinar a pureza e a água na amostra, os conteúdos de carboneto e orgânicos e para o estudo das reações de decomposição. Existem três tipos de TGs: TG isotérmica, TG quase-isotérmica e TG dinâmica. Neste trabalho, foi utilizado a TG dinâmica em que a amostra é aquecida num termobalança num ambiente purgado por nitrogênio e sob variação linear pré-fixada de temperatura.

Na termogravimetria derivada (DTG), as curvas são registradas a partir das curvas da TG e correspondem à primeira derivada do termograma da TG. Essas curvas podem ser obtidas por métodos de diferenciação manual da curva TG ou por diferenciação eletrônica do sinal de TG. Com a complementação da DTG, as curvas tornam a interpretação mais fácil, permitindo a visualização com maior nitidez de reações sobrepostas as quais são dificilmente detectados somente baseados nas curvas de TG. ^[101-104]

Foram efetuadas análises termogravimétricas para os cinco copolímeros, PEG20K e PEG modificado. As amostras com massa aproximada de 6mg foram colocadas no recipiente aberto de platina e o aquecimento foi programado a 5°C/min sob atmosfera de gás N₂ até 600°C, quando toda decomposição de materiais orgânicos é usualmente

observada. Semelhante a análise de DSC anterior, as amostras primeiramente foram secas a vácuo para impedir o aparecimento de sinais de umidade nas curvas de análise.

Foi observado nitidamente que, para PEG20K e PEG modificado (Figura 5.19 e Figura 5.20), suas curvas termogravimétricas mostram uma única etapa de degradação. Esta etapa estende de 250°C a 450°C, e ocorre uma perda de massa total acima de 96%. Junto com a interpretação da DTG, verifica-se que a maior taxa de degradação para PEG20K e PEG modificado acontece a 416°C e a 425°C, respectivamente, o que indica pico de degradação característica das ligações da cadeia PEG. Além da perda maior e temperatura mais alta, também pode ser notada facilmente que o PEG modificado tem a perda de massa total menor em relação ao PEG20K. O motivo é dado novamente à ligação uretana por sua estabilidade na alta temperatura, assim, retarda a degradação da cadeia.

Figura 5.19 Curva de análises TG e DTG do PEG20K.

Figura 5.20 Curva de análises TG e DTG do PEG4K modificado.

Já os copolímeros, apresentam duas etapas visíveis de degradação, uma por volta de 420°C, indicando a degradação de cadeia PEG. Essa suposição também pode ser confirmada pela porcentagem da perda de massa que é na faixa de 25% da massa total, correspondente à massa do PEG na alimentação. Outro pico de degradação ocorre a aproximadamente 380°C para os copolímeros 1 e 2 (Figura 5.21 e Figura 5.22), e 320°C para os copolímeros 4 e 5 (Figura 5.24 e Figura 5.25). A razão dessa alteração de temperatura pode ser atribuída à labilidade térmica dos trechos PLA no copolímero, como explicado na parte de análise de DSC. Por ser copolímero tribloco, estas etapas de degradação podem estar relacionadas com a quebra da cadeia polimérica nos diferentes segmentos do poliéster PLA-PCL e do poliéster PEG. Um indício de reações sobrepostas na primeira etapa confirma essa hipótese, embora ambos PLA e PCL apresentem ligação éster,

o mecanismo de degradação destes trechos especificamente, podem apresentar diferenças em função da estabilidade térmica e da facilidade de formação e volatilização dos produtos de decomposição, dímeros cíclicos lactídeo e monômero cíclico ϵ -caprolactona para trechos de PLA e PCL, respectivamente. PLA comparado com PCL apresenta maior número de ligação éster por peso de amostra, isso o torna menos estável termicamente, provocando o primeiro estágio de degradação logo seguido por outra do PCL, ocasionando os picos sobrepostos de degradação.^[37] Foi relatado na literatura ^{[105][106]}, que a temperatura do pico de decomposição de PLA e PCL encontra-se ao redor de 295°C e 385°C, respectivamente, o que são confirmados pelos resultados obtidos experimentalmente nesse trabalho. Quanto maior era a concentração de LL no copolímero, os picos de degradação apresentam-se suavemente deslocados para temperaturas mais baixas, tornando os picos de degradação mais difíceis de serem resolvidos, como mostra a Figura 5.23. O copolímero 3 mostrou uma perda de massa diferenciada dos outros copolímeros, isso tornou-se forte indício de uma possível redução do rendimento na polimerização.

Figura 5.21 Curva de análises TG e DTG do copolímero 1.

Figura 5.22 Curva de análises TG e DTG do copolímero 2.

Figura 5.23 Curva de análises TG e DTG do copolímero 3.

Figura 5.24 Curva de análises TG e DTG do copolímero 4.

Figura 5.25 Curva de análises TG e DTG do copolímero 5.

5.5. Análise por Difração de Raio-X (*Wide Angle X-ray Scattering WAXS*)

A difração de raio-X é uma técnica bastante utilizada na caracterização e identificação de materiais de estrutura cristalina. No caso de polímeros semicristalinos, é possível a observação de espectros de difração característicos decorrentes dos seus parâmetros de rede cristalina. A análise do espectro de difração possibilita a determinação dos planos de difração e em comparações com os espectros de materiais conhecidos de referência, é possível ainda a identificação da presença de diferentes componentes nas amostras. Além disso, a técnica tem sido utilizada pelos pesquisadores para a determinação da fração cristalina dos polímeros semicristalinos. A aplicação do método para esta finalidade, no estudo de polímeros sintéticos, foi primeiramente sugerida por Natta, na pesquisa de polipropileno isotático.^[107]

A porcentagem de cristalinidade de polímero semicristalino a partir da técnica de difração de raio-X apresenta como principal problema a separação dos picos de difração dos planos cristalinos da curva contínua de espalhamento (halo amorfo), a qual é decorrente de estruturas desordenadas provenientes de movimentos térmicos e imperfeições cristalinas.^[108-111] O método mais utilizado para o delineamento da área amorfa sob os picos cristalinos foi proposto por Hermans e Weidinger^[109-111]. O método baseia-se na correlação linear entre as áreas amorfa e cristalina, conforme a equação a seguir:

$$X_c = \frac{1}{1 + k \frac{O_{am}}{O_c}}$$

Onde X_c é a porcentagem de cristalinidade, O_{am} e O_c são as áreas de difração normalizadas do halo amorfo e dos picos cristalinos, respectivamente, e k é o coeficiente de difração

correspondente à razão entre as áreas para amostras 100% cristalinas e 100% amorfas, que podem ser determinadas a partir de amostras com diferentes graus de cristalinidade.

Para a maior parte dos estudos comparativos de cristalinidade, os dados de áreas dos difratogramas são utilizados sem a aplicação do coeficiente k , cuja determinação requer um número razoável de amostras com diferentes graus de cristalinidade.

Neste trabalho, as cristalinidades dos copolímeros foram determinadas por difração de raios-X usando radiação de Cu, a 40kV e 40mA, com ângulo inicial de 2,5° e ângulo final de 70°, e o tamanho de passo de 0,02. As amostras foram preparadas sem qualquer tratamento térmico prévio, para não ocorrer nenhum tipo de alteração da cristalinidade nas amostras. As **Figura 5.26** a **Figura 5.29** mostram os difratogramas de raio-X e suas respectivas decomposições de picos, para os 3 copolímeros sintetizados e o PEG 20K. Os ajustes de picos e áreas foram feitos com o auxílio do programa de gráficos Origin 5.0.

Figura 5.26 Difratogramas de raio-X da amostra PEG20K.

Figura 5.27 Difratomogramas de raio-X da amostra L1.

Figura 5.28 Difratomogramas de raio-X da amostra L2.

Figura 5.29 Difratomogramas de raio-X da amostra L3.

Observando-se as Figuras 5.26-5.29, pode-se notar que os picos características correspondentes aos planos cristalinos do PEG20K localizam-se nos ângulos (2θ) $18,9^\circ$ e $23,5^\circ$, em todas as amostras. Nos copolímeros triblocos, houve uma grande diminuição de intensidade dos picos, aumentando, ao mesmo tempo, o halo da parte amorfa. Pela literatura, sabe-se que a estrutura cristalina do PLL é atribuída à estrutura pseudoortorrômbica α , com uma conformação de cadeia helicoidal, com os picos principais de difração encontrados nos ângulos (2θ) $16,5^\circ$ e $18,9^\circ$, os quais correspondem aos planos (0 1 0) e (1 0 1 0), respectivamente^[28]. Já no caso de PCL, a estrutura cristalina é atribuída a uma célula unitária ortorrômbica, com os principais picos de difração localizados nos ângulos (2θ) $21,35^\circ$, $21,9^\circ$ e $23,75^\circ$, os quais correspondem aos planos (1 1 0), (2 0 0) e (0 2 0), respectivamente. Devido à estrutura PCL-PLL estatística e a cristalização dos

segmentos apresenta-se dificultada e o aparecimento dos picos características de PCL e PLL é minimizado, valorizando-se somente os da cadeia de PEG20K.

Para cada difratograma, a soma das áreas dos picos foi considerada como área da parte cristalina do material, o restante da área foi avaliado como área da parte amorfa. O grau de cristalinidade é o percentual que representa a relação entre a área cristalina e área total (área cristalina + área amorfa).

Os resultados dos cálculos dos graus de cristalinidade das amostras estão apresentados na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 Graus de cristalinidade calculados pelo difratograma de raio-X.

Amostra	Cristalinidade (%)
PEG20K	63,8
L1	9,5
L2	13,5
L3	14,5

Os dados obtidos de grau de cristalinidade confirmam o resultado esperado. O tempo longo de reação e maior quantidade de LL na reação de copolimerização torna o copolímero tribloco mais cristalino. Entretanto, existe uma diferença bastante notável entre a cristalinidade de PEG20K e os três copolímeros, houve uma redução brusca de grau de cristalinidade, de 63,8% do PEG20K para 14,5% do L3, 13,5% do L2 e 9,5% do L1. A intensidade dos picos também segue a mesma tendência. Essa diminuição pode ser explicada pela estrutura do copolímero tribloco. A cadeia central de PEG, por ter ligado nas duas extremidades com segmentos de PLA-PCL, não consegue atingir a mesma

cristalinidade do seu homopolímero correspondente, porque não é capaz de obter os mesmos dobramentos uniformes da cadeia polimérica e as cadeias estatísticas de PLA-PCL, também não contribuem de forma significativa no grau de cristalinidade do copolímero tribloco.

As cristalinidades calculadas para cada amostra via difratometria de raio-X apresentam coerência em relação às análises anteriores (DSC, TG). Baseado nos dados ΔH_m obtido pela DSC na Tabela 5.7 e a cristalinidade calculado pela WAXS na Tabela 5.8, ambos para caso de PEG20K, supondo que as cristalinidades apresentadas nos copolímeros tratam-se de contribuição da cadeia PEG20K, pode-se calcular as cristalinidades das amostras L1, L2 e L3. Como por exemplo, a fusão da fase cristalina da PEG20K apresenta um calor $\Delta H_m = 130,75\text{J/g}$, e ela corresponde 63,8% de cristalinidade obtido pelo WAXS, por tanto, para amostra L1 a qual tem $\Delta H_m = 19,12\text{J/g}$, ela corresponderá 9,33%. Assim aplicando para todas os copolímeros, tem-se:

Tabela 5.9 Comparação de graus de cristalinidades DSC x WAXS

Amostra	Cristalinidade (%)	
	WAXS	DSC
L1	9,5	9,33
L2	13,5	11,38
L3	14,5	13,04

Os dados comparativos mostram que a coerência é evidente e a suposição para aplicação de todos os calculos torna-se verdadeira, ou seja, a cristalinidade dos copolímeros resume na maior contribuição da cadeia de PEG20K.

5.6. Microscopia ótica de luz polarizada (MOLP)

Durante a solidificação de um polímero fundido, pode haver o chamado de processo de rearranjo de cadeias. Quando ocorre a nucleação, as cadeias poliméricas frequentemente se organizam tangencialmente e as regiões solidificadas crescem em direção radial denominados de esferulitos. Estes podem ser vistos na microscopia ótica de luz polarizada como os formatos de Cruz de Malta. Quando estes esferulitos aumentam de tamanho e se encontram, a fronteira que os separam tornam-se poligonal.

A análise de polímeros por microscopia ótica de luz polarizada é uma alternativa para verificar a cristalinidade e, conseqüentemente, a propriedade mecânica do material, através de sua formação de esferulitos em diferentes condições. Portanto, trata-se de uma técnica complementar junto aos demais métodos de análise.

As amostras dos copolímeros são preparadas sob lâminas de vidro e recobertas por lamínulas apropriadas para microscopia. Em seguida, elas são aquecidas rapidamente até 70°C e resfriadas a uma velocidade de 10°C/min até a temperatura ambiente. As transformações são observadas pelo microscópio ótico com lentes para luz polarizada, como mudanças na textura da amostra.

Foram tiradas fotos dos copolímeros 1, 2 e 3 (Figura 5.30-5.32); e dos PEG 20K e PEG modificado (Figura 5.33-5.35). Pode-se verificar na tabela 5.9 a diferença de temperatura do surgimento dos primeiros esferulitos para cada amostra analisada, a qual também é chamada de início de nucleação.

Tabela 5.10 As temperaturas de nucleação dos copolímeros e dos PEG's.

Amostra	Copolímero 1	Copolímero 2	Copolímero 3	PEG 20K	PEG modificado
$T_{\text{nucleação}} (^{\circ}\text{C})$	37	36	32	56	35

Os aspectos dos cristalitos podem ser vistos nas seguintes fotos.

Figura 5.30 Copolímero 1 a 30°C, 100X.

Figura 5.31 Copolímero 2 a 30°C, 100X.

Figura 5.32 Copolímero 3 a 30°C, 100X.

Figura 5.33 PEG 20K a 32°C, 50X

Figura 5.34 PEG modificado a 35°C, 50X.

Figura 5.35 PEG modificado a 32°C, 50X.

No processo de nucleação (Figura 5.34 e Figura 5.35), nota-se naturalmente que, os esferulitos das cadeias de PEG modificado são maiores, e a taxa do crescimento respectivo é também maior em relação à do PEG 20K (Figura 5.33). O fato pode ser explicado pela diferença em morfologia e estrutura das cadeias poliméricas. Para PEG20K, por ser uma cadeia homogênea e simples, os esferulitos aparecem logo abaixo da sua temperatura de fusão (T_m), analisado junto com as curvas de DSC. Por outro lado, a cadeia apresenta um elevado comprimento por causa da sua alta massa molar, sendo assim, o “rearranjo” estrutural é dificultado. Ao contrário do anterior, a ligação uretana do PEG modificado atrapalha os dobramentos das cadeias durante a nucleação, por isso, nesse caso, apareceram tardiamente os primeiros esferulitos, mas uma vez organizada a cadeia, os esferulitos crescem com maior facilidade por causa do menor número de núcleos formados.

A temperatura de cristalização (T_c) dos copolímeros 1, 2 e 3 são similares, porém a distância entre T_m e T_c é de aproximadamente 10°C, maior do que da PEG20K. Isso é devido à sua estrutura de copolímero tribloco, cujas ligações covalentes unindo os segmentos diversos prejudicam a movimentação dos trechos para formação de núcleos e

lamelas. Todos os homopolímeros apresentam sua própria T_m e T_c , porém juntos, um bloco eventualmente dificulta o processo de fusão e de cristalização dos outros. Isto também explica o fato dos três copolímeros apresentarem tamanho menor de esferulitos em relação aos do PEG20K. Pode-se afirmar que quando o bloco PEG estiver na temperatura de fusão isotrópica, são miscíveis com os trechos PLA-PCL. Comparando somente o copolímero 1 e 2, percebe-se que há pouca diferença entre as $T_{nucleação}$, porém a temperatura ambiente, os esferulitos do copolímero 2 mostram tamanho maior. Já no copolímero 3, o retardamento de nucleação e o menor tamanho dos esferulitos indica que a maior quantidade de poliéster no copolímero dificulta a cristalização.

Os copolímeros 4 e 5 não foram analisados porque não havia nucleação mesmo a temperatura ambiente.

Para esta classe de copolímeros, semicristalinos, o tamanho dos cristalitos tem uma grande influência sobre suas propriedades mecânicas. Porém, uma análise mais profunda sobre a estrutura dos esferulitos, utilizando uma combinação da MOLP com outras técnicas de análise como a microscopia de força atômica será mais precisa para caracterizar a morfologia presente nestas amostras. ^[52]

5.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

No MEV, os elétrons são acelerados na coluna através de duas ou três lentes eletromagnéticas por tensões de 1 a 30kV. Estas lentes obrigam um feixe de elétrons bastante colimado (50 a 200Å de diâmetro) a atingir a superfície da amostra. Bobinas de varredura obrigam o feixe a varrer a superfície da amostra na forma de uma varredura quadrada similar a uma tela de televisão. A corrente que passa pela bobina de varredura, sincronizada com as correspondentes bobinas de deflexão de um tubo de raios catódicos, produz uma imagem similar, mas aumentada. Os elétrons emitidos atingem um coletor e a corrente resultante é amplificada e utilizada para modular o brilho do tubo de raios catódicos. Os tempos associados com a emissão e coleta dos elétrons, comparados com o tempo de varredura, são desprezíveis, havendo assim uma correspondência entre o elétron coletado de um ponto particular da amostra e o brilho de mesmo ponto na tela do tubo. O limite de resolução de um MEV é cerca de uma ordem de grandeza melhor do que o do microscópio óptico, e as imagens formadas são tridimensionais, nítidas e facilitando a interpretação da mesma. ^[112]

Neste trabalho de mestrado, as amostras são prensadas primeiramente sob vácuo para reduzir a espessura até menor que 2 mm, tendo também outra finalidade que é a redução de bolhas de ar dentro delas. Em seguida, elas foram imersas no nitrogênio líquido durante 3 minutos e fraturadas logo depois ao retirar do ambiente de N₂ líquido. Os corpos de prova passaram por recobrimento de ouro antes de serem submetidos à análise pela MEV.

As fotos apresentadas abaixo correspondem às imagens de fratura frágil dos copolímeros 1, 2 e 3.

Comparando-se as micrografias obtidas para essas três amostras, o copolímero 1 apresenta uma fratura não totalmente frágil, mesmo a temperatura baixa, e filamentos típicos de fratura de elastômeros podem ser observados em algumas regiões da superfície. Comparando-se o copolímero 1 e o copolímero 2, o segundo demonstra sua superioridade em dureza e fragilidade. A superfície de fratura é relativamente lisa na região central e com relevos nas bordas sem apresentar os filamentos da amostra anterior. Já a fragilidade propriedade mecânica do copolímero 3 foi verificada pelas micrografias, nas quais superfícies homogêneas e com baixa rugosidade são observadas. Os copolímeros 4 e 5 não foram analisados por MEV devido às dificuldades na preparação de amostra.

Essas fotos mostram certa coerência em comparação aos resultados anteriores como, por exemplo, as cristalinidades calculadas em análise de difração de Raio-X. Uma vez, o copolímero 1 é menos cristalino entre os 3 copolímeros, nele também é identificada a propriedade de fratura de elastômeros, o único apresentado entre os 3.

Figura 5.36 MEV do copolímero 1, 500X de aumento.

Figura 5.37 MEV do copolímero 1, 2000X de aumento.

Figura 5.38 MEV do copolímero 2, 350X de aumento.

Figura 5.39 MEV do copolímero 2, 5000X de aumento.

Figura 5.40 MEV do copolímero 3, 2000X de aumento.

Figura 5.41 MEV do copolímero 3, 5000X de aumento.

5.8. Testes de biocompatibilidade

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, surge a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de materiais para uso em seres humanos, principalmente os biomateriais os quais não devem causar inflamação tecidual significativa e nem lesar o organismo do paciente.

Vários métodos *in vitro* são utilizados para avaliar a toxicidade de biomateriais, utilizando culturas celulares. Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares.

A determinação da citotoxicidade pode ser através de avaliação qualitativa ou quantitativa. A primeira é realizada pelo exame microscópio das células para verificação de mudanças na morfologia geral, vacuolização, destacamento, lise celular ou de membranas e o resultado é relatado como atóxica, leve, moderada ou severa citotoxicidade. ^[113-115] Na avaliação quantitativa é realizada medida de morte celular, proliferação celular ou formação de colônias celulares.

Neste Trabalho, a avaliação consistiu somente em análise qualitativa efetuada em laboratório do INCOR (Instituto do Coração), orientada pela Dr^a Helena Oyama. O corpo de prova foi preparado do copolímero 1 em formato de filme fino e as células escolhidas para a cultura foram células renais (COS-7) obtidas pela sua exposição à tripsina por 5 minutos, e cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium, Cellgro, Herndon, VA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, juntamente com 100 U/mL

de penicilina e 100µL/mL de estreptomicina. A cultura foi mantida em estufa umidificada a 37°C, a 5% de CO₂ para simular o ambiente corpóreo.

As células foram marcadas com o composto fluorescente CM-Dil (chloromethyl-benzamidodialkylcarbocyanine) e MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) que cora mitocôndrias e colocadas no polímero. A visualização foi realizada após 24 horas e 96 horas em microscópio ótico com 6,3X de aumento.

Figura 5.42 Visualização de células marcadas por CM-Dil após 24 horas.

Figura 5.43 Visualização de células marcadas por MTT após 96 horas.

As células aparecem como pontos vermelhos brilhantes e pretos, respectivamente, na Figura 5.42 e Figura 5.43. Pode-se verificar após 4 dias, que há ainda células vivas aderidas na superfície do copolímero, além disso, as células que ficaram no frasco juntamente com a amostra também permaneceram vivas, tornando perceptível a viabilidade do material.

A não-citotoxicidade do copolímero confirmada pelos testes valida o uso deste como biomaterial.

Há vários fatores que podem ter grande influência na aderência celular e, conseqüentemente, na futura proliferação celular no material. Um dos fatores importantes é

a porosidade, sendo mais porosa a amostra, aumenta a área de contato, as células penetram e se fixam com maior facilidade. Como se pode observar comparando Figura 5.44 com Figura 5.45 e 5.46, num exemplo de amostra de poliuretano poroso, onde houve uma adesão bem maior das células em relação à amostra anterior.

Figura 5.44 Superfície lisa da amostra anterior antes de ser submetida à cultura celular.

Figura 5.45 Poliuretano poroso antes de **Figura 5.46** Poliuretano poroso com células adesão de células. aderidas.

Com o objetivo de melhorar o desempenho biológico das membranas dos copolímeros, foram feitas várias tentativas não bem sucedidas para a preparação de membranas com maior porosidade, em que foram utilizados como porôgenos cloreto de sódio e PEG.

6. CONCLUSÕES

- O poli(óxido de etileno) modificado pode ser sintetizado a partir do PEG4K utilizando o HDI como extensor de cadeia. No entanto, quando empregado para sintetizar o copolímero tribloco, a presença das ligações uretanas dificulta a incorporação dos monômeros LL e ϵ -CL.
- O tempo prolongado da reação induz a melhoria nas propriedades mecânicas do material como mostrado pelos resultados obtidos pela análise DMTA, a temperatura ambiente, para os copolímeros 1 e 2, ambas com a mesma composição na alimentação. O módulo de armazenamento do copolímero 1 (168 horas de reação) foi de 16,9 MPa, enquanto o copolímero 2 (336 horas de reação) apresentou 32,6 MPa, um valor bem maior.
- O aumento da concentração de LL nos copolímeros promove a melhoria nas propriedades mecânicas do produto sintetizado, como verificado também pela análise DMTA, para as amostras 2 e 3, ambas com os mesmos tempos de ativação e reação, a amostra 2, tendo 40% de LL na alimentação, o seu módulo de armazenamento é de 32,6MPa, enquanto amostra 3 com 60% de LL na alimentação, o seu módulo é de 87,8MPa, um aumento de 170% em relação ao anterior.
- As diversas técnicas de caracterização utilizadas confirmaram a formação do copolímero tribloco anfifílico poli(l,l-lactídeo-stat- ϵ -caprolactona)-bloco-poli(óxido de etileno)-bloco-poli(l,l-lactídeo-stat- ϵ -caprolactona), a partir dos monômeros LL, ϵ -CL, PEG e o iniciador Sn(Oct)₂ e apresentam aspectos elastoméricos.
- A presença de bloco estatístico foi observada pelas análises dos espectros RMN-¹³C.

- O meio reacional influenciou na reatividade do segmento LL, a qual foi reduzida pela presença da cadeia de PEG, diferentemente da sua maior reatividade em relação a CL, citada na literatura ^[28].
- A cristalinidade do copolímero é abaixo de 15%, este fato torna os copolímeros vantajosos na rápida biodegradação.
- O copolímero tribloco tem sua morfologia modificada como se observa pela MOLP. A cadeia extensa e não homogênea prejudica a cristalização do copolímero, o que pode ser considerado como um indicativo de maior facilidade de biodegradação.
- A não citotoxicidade foi verificada pelo cultivo de células renais, confirmando a biocompatibilidade do copolímero tribloco sintetizado.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1]. OKADA, M. Chemical syntheses of biodegradable polymers. *Progress in polymer science*, 2002, v. 27, p. 87-133.
- [2]. GRIFFIN, G.J.L.; Chemistry and technology of biodegradable polymers. Ed. Blackie academic & professional.
- [3]. DOI, Y.; FUKUDA, K. Biodegradable plastics and polymers. Ed. Elsevier. 1994.
- [4]. MOORE, G.F.; SAUNDERS, S.M. Advances in biodegradable polymers. *Rapra technology*, 1997, v. 9, N°2.
- [5]. MIDDLETON, J.C.; TIPTON, A.J. Synthetic biodegradable polymer as medical devices. *Medical Plastics and Biomaterials Magazine*, 1998, March.
- [6]. KUMAR, N.; RAVIKUMAR, M.N.V.; DOMB, A.J. Biodegradable block copolymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, v. 53, p. 23-44.
- [7]. SHALABY, S.W. Biodegradable polymers. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. SWARBRICK, J.; BOYLAN, J.C. Eds. v. 1.
- [8]. EL-TAWHEEL, S.H.; STOLL, B.; HÖHNE, G.W.H.; MANSOUR, A.A.; SELIGER, H. Stress-Strain behavior of blends of bacterial polyhydroxybutyrate. *J.Appl.Polym.Sci.*, 2004, v. 94, p. 2528-2537.
- [9]. AMASS, W.; AMASS, A.; TIGHE, B. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. *Polymer international*, 1998, v. 47, p. 89-144.
- [10]. inventabrasilnet.t5.com.br/plastico.htm

- [11]. HASIRCI, V.; LEWANDROWSKI, K.; GRESSER, J.D.; WISE, D.J.; TRANTOLO, D.J. Versatility of biodegradable biopolymers: degradability and in vivo application. *Journal of biotechnology*, 2001, v. 86, p.135-150.
- [12]. RILEY, T.; STOLNIK, S.; HEALD, C.R.; XIONG, C.D.; GARNETT, M.C.; ILLUM, L.; DAVIS, S.S. Physicochemical evaluation of nanoparticles assembled from poly(lactic acid) – poly(ethylene glycol) (PLA-PEG) block copolymers as drug delivery vehicles. *Langmuir*, 2001, v. 17, p. 3168-3174.
- [13]. YASUGI, K.; NAGASAKI, Y.; KATO, M.; KATAOKA, K. Preparation and characterization of polymer micelles from poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymers as potential drug carrier. *J. Control. Release*, 1999, v. 62, p. 89-100.
- [14]. KWON, G.S.; OKANO, T. Polymeric micelles as new drug carriers. *Adv. Drug. Rev.*, 1996, v. 21, p. 107-116.
- [15]. ERTL, B.; PLATZER, P.; WIRTH, M.; GABOR, F. Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for sustained delivery and stabilization of camptothecin. *J. Control. Release*, 1999, v. 61, p. 305-317.
- [16]. GE, H.; HU, Y.; YANG, S.; JIANG, X.; YANG, C. Preparation, characterization, and drug release behaviors of drug-loaded ϵ -caprolactone /L-lactide copolymer nanoparticles. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2000, v. 75, p. 874-882.
- [17]. STORCK, M.; OREND, K.H.; SCHMITZRIXEN, T. Absorbable suture in vascular surgery. *Vasc. Surg.*, 1993, v. 27, p. 413-424.
- [18]. ELKE, M.; ROLF-JOACHIM, M.; WOLF-DIETER, D. Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters I. Low molecular mass model esters and aliphatic polyesters. *Polymer degradation and stability*, 2000, v. 80, p. 485.

- [19]. HUTMACHER, D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 2000, v. 21, p. 2529.
- [20]. HAYASHI, T. Biodegradable polymers for biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 1994, v. 19, p. 663-702.
- [21]. KULIG, K.M.; VACANTI, J.P. Hepatic tissue engineering. *Transpl.Immunol*, 2004, v. 12, p. 303-310.
- [22]. ABUKAWA, H.; SHIN, M.; WILLIAMS, W.B.; VACANTI, J.P.; KABAN, L.B.; TROULIS, M.J.J. A novel fused interconnected scaffold for bone tissue engineering. *Oral Maxillofac.Surg.*, 2004, v. 62, p. 36.
- [23]. KOMIYAMA, T.; NAKAO, Y.; TOYAMA, Y.; VACANTI, C.A.; VACANTI, M.P.; IGNOTZ, R.A. Novel technique for peripheral nerve reconstruction in the absence of an artificial conduit. *J.Neurosci.Methods.*, 2004, v. 134, p. 133-140.
- [24]. ATALA, A. What's new in urology. *Journal of the American College of Surgeons*, 2004, v. 199, p. 446-461.
- [25]. OPITZ, F.; SCHENKE-LAYLAND, K.; COHNERT, T.U.; STARCHER, B.; HALBHUBER, K.J.; MARTIN, D.P.; STOCK, U.A. Tissue engineering of aortic tissue: dire consequence of suboptimal elastic fiber synthesis in vivo. *Cardiovasc.Res.*, 2004, v. 63, p. 719.
- [26]. ISHAUG, S.L.; CRANE, G.M.; YASZEMSKI, M.J.; MIKOS, A.G. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials*, 1998, v. 19 p. 1405.
- [27]. MATSURA, L.T.; WANG, S.H. New synthetic routes to lactic acid polymers. *Dept.de Engenharia de Metalurgica e de materiais – POLI – USP*.

- [28]. CASTRO, M.L.; WANG, S.H. Statistical copolymers of 1,l-lactide and ϵ -caprolactone. *Polymer Bulletin*, 2003, v. 51, p. 151-158.
- [29]. SÖDERGÅRD, A.; STOLT, M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Progress in polymer science*, 2002, v. 27, p. 1123-1163.
- [30]. AJIOKA, M.; SUIZU, H.; HIGUCHI, C.; KASHIMA, T. Aliphatic polyesters and their copolymers synthesized through direct condensation polymerization. *Polymer degradation and stability*, 1998. v. 59, p. 137-143.
- [31]. REED, A.M.; GILDING, D.K. Biodegradable polymers for use surgery-poly(glycolic)/poly(lactic acid) homeo and copolymers 2. *in-vitro* degradation. *Polymer*, 1981. v. 22, p.497-504.
- [32]. KRICHELDORF, H.R.; SAUNDERS, I. Polylactides-Syntheses, characterization and medical applications. *Macromol.Sym*, 1996. v.103, p.149-162.
- [33]. KRICHELDORF, H.R. Syntheses and application of polylactides. *Chemosphere*, 2001. v.43, p. 49-54.
- [34]. MIDDLETON, JOHN C.; TIPTON, ARTHUR J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 2000. v. 21, p. 2335-2346.
- [35]. NARAYANAN, NIJU.; ROYCHOUDHURY, PRADIP K.; SRIVASTAVA, ARADHANA. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Eletronic Journal of biotechnology*. [Vol. 7 No. 2, Issue of August 15, 2004](#).
- [36]. LUNT, JAMES. Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. *Polymer Degradation and Stability*, 1998. v.59, p.145-152.

- [37]. DRUMOND, W.S. Estudo do poli(l,l-lactídeo)-b-poli(glicol etilênico)-b-poli(l,l-lactídeo): síntese, caracterização e preparação de micropartículas. *Tese de doutorado. Departamento de engenharia metalúrgica e de materiais – POLI-USP.*
- [38]. MILLER, R.A.; BRADY, J.M.; CUTRIGHT, D.E. Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios. - *J. Biomed. Mater. Res.*, 1977. v.11, p.711.
- [39]. AGRAWAL, C.M.; ATHANASIOU, K.A.; HECKMAN, J.D. Biodegradable PLA/PGA polymers for tissue engineering in orthopaedica. *Material Science Forum* 1997, v.250, p.115-128.
- [40]. LANDO, GILAD.; COHN, DANIEL. Introducing lactide-based biodegradable tissue adhesives. *Journal of Material Science: materials in medicine* 2003, v.14, p. 181-186.
- [41]. BURG, K.J.L.; POTER, S.; KELLAM, J.F. Biomaterials development for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2000, v. 21, p. 2347-2359.
- [42]. DUDA, A.; PENCZEK, S.; DUBOIS, P.; MECERREYES, D.; JÉRÔME, R. Block and random copolymers of ϵ -caprolactone. *Polymer Degradation and Stability*, 1998, v.59, p.215-222.
- [43]. YOUNES, H.M.; BRAVO-GRIMALDO, ELDA.; AMSDEN, BRIAN.G. Synthesis, characterization and in vitro degradation of a biodegradable elastomer. *Biomaterials* 2004, v. 25, p.5261-5269.
- [44]. QIAN, HAITAO.; BEI, JIANZHONG.; WANG, SHENGUO. Synthesis, characterization and degradation of ABA block copolymer of L-lactide and ϵ -caprolactone. *Polymer Degradation and Stability*, 2000, v. 68, p. 423-429.

- [45]. LEE, S.H.; KIM, B.S.; KIM, S.H.; CHOI, S.W.; JEONG, S.I.; KWON, I.K.; KANG, S.W.; NIKOLOVSKI, J.; MOONEY, D.J.; HAN, Y.K.; KIM, Y.H. Elastic poly(glicolide-co-caprolactone) scaffold for tissue engineering. *J. Biomed.Mater Res* 2003, v. 66A, p. 29-37.
- [46]. COHN, D.; SALOMON, A.HOTOVELY. Designing biodegradable multiblock PCL/PLA thermoplastic elastomers. *Biomaterials* 2004, v.7.
- [47]. HARRIS, J.MILTON.; Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: *Biotechnical and Biomedical Applications*. The University of Alabama, Huntsville, USA.
- [48]. GLASS,J.E. *Hidrophilic polymers, performance with environmental acceptability*. Ed. Advances in chemistry series 248. ACS. 1996.
- [49]. STEVENS, M.P. *Polymer chemistry, an introduction*. 3^a Ed. Oxford university press. 1999.
- [50]. LU, S.; ANSETH, K.S. Release behavior of high molecular weight soluts from poly(ethylene glycol)-basead degradable networks. *Macromolecules* 2000, v.33, p. 2509-2515.
- [51]. CHO, HANJIN.; CHUNG, DONGJUN.; AN, JEONGHO. Poly(D,L-lactide-ran- ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide-ran- ϵ -caprolactone) as parenteral drug-delivery systems. *Biomaterials* 2004, v. 25, p.3733-3742.
- [52]. SUN, JINGRU; HONG,ZHONGKUI.; YANG,LIXIN.; TANG, ZHAOHUI.; CHEN, XUESI.; JING, XIABIN. Study on crystalline morphology of poly(L-lactide)-poly(ethylene glycol) diblock copolymer. *Polymer* 2004, v. 45, p. 5969-5977.
- [53]. DENG, XIANMO.; ZHU, ZHIXUE.; XIONG, CHENGDONG.; ZHANG, LIANLAI. Synthesis and Characterizaiton of Biodegradable Block Copolymers of ϵ -

- caprolactone and D,L-Lactide initiated by Potassium poly(ethylene glycol)ate. *Journal of Polymer Science: Part A: polymer chemistry*, 1997, v.35, p. 703-708 (1997).
- [54]. HUANG, M.H.; LI, S.; HUTMACHER, D.W.; SCHANTZ, J.T.; VACANTI, C.A.; BRAUD, C.; VERT, M. – *J. Biomed. Mater. Res.*, 1999, v. 69A. p.342.
- [55]. KOWALSKI, A.; DUDA, A.; PENCZEK, S. Kinetics and Mechanism of Cyclic Esters Polymerization Initiated with Tin(II) Octoate – Polymerization of L,L-Dilactide. *Macromolecules* 2000, v.33, p. 7395-7370.
- [56]. KRICHELDORF, H. R.; KREISER-SAUNDERS, I.; BOETTCHER, C. Sn(II)octoate-initiated polymerization of L-lactide: a mechanistic study. *Polymer*, 1995, v.36, p. 1253-1259.
- [57]. STOREY, R.F.; TAYLOR, A.E. Effect of stannous octoate on the composition, molecular weight, and molecular weight distribution of ethyleneglycol-initiated poly(ϵ -caprolactone). *J.Macromol Sci – Pure Appl Chem*. 1998, v.A35, p.723-750.
- [58]. DONG, C.M.; QIU, K.Y.; GU, Z.W.; FENG, X.D. Synthesis of star-shaped poly(D,L-lactic acid-alt-glycolic acid) with multifunctional initiator and SnOct₂ catalyst. *Polymer* 2001, v. 42, p.6891-6896.
- [59]. KRICHELDORF, H.R.; HAACK, J.M. ABA triblock copolymers of L-lactide and poly(ethylene glycol). *Makromol. Chem.* 1993, v. 194, p. 715-725.
- [60]. STOREY, R.F.; SHERMAN, J.W. Kinetics and mechanism of the stannous octoate catalyzed bulk polymerization of ϵ -caprolactone. *Macromolecules* 2002, v. 35, p. 1504-1512.
- [61]. ODIAN, G. *Principles of polymerization*, (2nd ed). New York: Wiley Interscience, 1981.

- [62]. FREED, L.E.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; BIRON, R.J.; EAGLES, D.B.; LESNOY, D.C.; BARLOW, S.K.; LANGER, R. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotechnology* 1994, v. 2, p. 689-693.
- [63]. ALI, S.A.M.; ZHONG, S.P.; DOHERTY, P.J.; WILLIAMS, D.F. - *Biomaterials*, 1993, v. 14, p.648.
- [64]. MASAKI, H.; TOSHIKAZU, Y.; MINORU, U.; KOJI, K. Cartilage formation by cultured chondrocytes in a new scaffolds made of poly(L-lactide- ϵ -caprolactone) sponge. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000, v. 58, p.767-775.
- [65]. KWEON, H.Y.; YOO, M.K.; PARK, I.K.; KIM, T.H.; LEE, H.C.; LEE, H.S.; OH, J.S.; AKAIDE, T.; CHO, C.S. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. *Biomaterials*, 2003, v. 24, p.801-808.
- [66]. ZHANG, LEYANG.; HU, YONG.; JIANG, XIQUN.; YANG, CHANGZHENG.; LU, WEI.; YANG, YONGHUA. Camptothecin derivative-loaded poly(caprolactone-co-lactide)-b-PEG-b-poly(caprolactone-co-lactide) nanoparticles and their biodistribution in mice. *Journal of Controlled Release* 2004, v. 96, p.135-148.
- [67]. WANG, Y.; AMEER, G.A.; SHEPPARD, B.J.; LANGER, R. A tough biodegradable elastomer. *Nature* 2002, v.20, p. 602-606.
- [68]. PITT, C.G.; JEFFCOAT, A.R.; ZWEIDINGER, R.A.; SCHIDLER, A. Sustained drug delivery systems I: the permeability of poly(ϵ -caprolactone), poly(DL-lactic acid) and their copolymers. *J.Biome.Mater.Res.* 1979, v.13, p. 497-507.
- [69]. CHEN, D.; CHEN, H.; BEI, J.; WANG, S. Morphology and Biodegradation of microspheres of polyester-polyether block copolymer based on polycaprolactone /polylactide /poly(ethylene oxide). *Polymer. Int.* 2000, v.49, p.269-276.

- [70]. GUNATILLAKE, PATHIRAJA A.; ADHIKARI, RAJU. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials* 2003, v. 5, p. 1-16.
- [71]. JEONG, SUNG IN.; KIM, BYUNG-SOO.; KANG, SUN WOONG.; KWON, JAE HYUN.; LEE, YOUNG MOO.; KIM, SOO HYUN.; KIM, YOUNG HA. In vivo biocompatibility and degradation behavior of elastic poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) scaffolds. *Biomaterials* 2004, v.25, p. 5939-5946.
- [72]. KOHN, J.; LANGER, R. *Bioresorbable and bioerodible materials. In: An introduction to materials in medicine.* Ed.Academic Press, San Diego. (1997).
- [73]. YE, WEI PING.; DU, FU SHENG.; JIN, WEI HUA.; YANG, JI YUAN.; XU, YONG. In vitro degradation of poly(caprolactone), poly(lactide) and their block copolymers: influence of composition, temperature and morphology. *Reactive & Functional Polymers* 1997, v. 32, p.167-168.
- [74]. THOMSON, R.C.; WAKE, M.C.; YASZEMSKI, M.J.; MIKOS, A.G. Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs. *Adv. Polymer Sci* 1995, v. 122, p.245-274.
- [75]. BERGSMA, J.E.; DE BRUIJN, W.C.; ROZEMA, F.R.; BOS, R.R.M.; BOERING, G. Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials* 1995, v.16, p. 25-31.
- [76]. TAYLER, M.S.; DANIELS, A.U.; ANDRIANO, K.P.L.; HELLER, J. Six bioabsorbable polymers: in-vitro acute toxicity of accumulated degradation products. *J.Appl. Biomaterial* 1994, v. 5, p.151-157.

- [77]. SACHLOS,E.; CZERNUSZKA, J.T. Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *European cells and materials* 2003, v.5, p. 29-40.
- [78]. SAWHNEY, A.S.; DRUMHELLER, P.D. *Polymer synthesis. In: Frontiers in tissue engineering*. Ed. Pergamon, New York. P. 83-106.
- [79]. WONG, W.H.; MOONEY, D.J. *Synthesis and properties of biodegradable polymers used as synthetic matrices for tissue engineering. In: Synthetic biodegradable polymer scaffolds.*; Ed. Burkhäuser, Boston.
- [80]. SINHA, V.R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TRECHAN, A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics* 2004, v. 278, p.1-23.
- [81]. NG, S.Y.; VANDAMME, T.; TAYLER, M.S.; HELLER, J. Synthesis and erosion studies of self-catalysed poly(orthoester)s. *Macromolecules* 1997, v.30, p.770-772.
- [82]. PRANAMUDA, H.; TSUCHII, A.; TOKIWA, Y. Poly(L-lactide) – Degrading enzyme produced by amycolatopsis sp. *Macromol. Biosci.* 2001, v.1, p. 25-29.
- [83]. RASHKOV, I.; MANOLOVA, N.; LI, S.M.; ESPARTERO, J.L.; VERT, M. Synthesis, characterization, and Hydrolytic Degradation of PLA/PEO/PLA triblock copolymers with short poly(L-lactic acid) chains. *Macromolecules* 1996, v. 29, p.50-56.
- [84]. HUH, K.M.; Y.H.B. Synthesis and characterization of poly (ethylene glycol)/poly (L-lactic acid) alternating multiblock copolymers. *Polymer* 1999, v. 40, p.6147-6155.
- [85]. COHN, D.; STERN, T.; GONZALEZ, M.F.; EPSTEIN, J. Biodegradable poly(ethylene oxide)/poly(ϵ -caprolactone) multiblock copolymers. *J.Biomed Mater Res.* 2002, v. 59, p.573-581.

- [86]. GE, H.; HU, Y.; JIANG, X.; CHENG, D.; YUAN, Y.; BI, H.; YANG, C. Preparation, characterization, and drug release behaviors of drug nimodipine-loaded poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene oxide)-poly(ϵ -caprolactone) amphiphilic triblock copolymer micelles. *J. Pharm. Sci.* 2002, v. 91, p.1463-1473.
- [87]. KASPERCZYK, J.; BERO, M. Microstructure determination of poly(L,L-lactide)-co-(ϵ -caprolactone) with ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Makromol.chem.* 1991, v.192, p.1777-1787.
- [88]. TSUJI, H.; FUKUI, I.; DAIMON, H.; FUJIE, K. Poly(L-lactide) XI lactide formation by thermal depolymerisation of poly(L-lactide) in a closed system. *Polymer degradation and stability*. 2003, v. 81, p. 501-509.
- [89]. MATSUI, T.; NAKAMURA, T.; TSUDA, T. Bioabsorption of poly caprolactone and copolymer of ϵ -caprolactone and L-lactide. *J. Jpn Soc Biomater* 1993, v.11, p. 330-339.
- [90]. TEMENOFF, J.S.; MIKOS, A.G. Injectable biodegradable materials for ortopaedic tissue engineering, *Biomaterials* 2000, v.21, p. 2405-2412.
- [91]. KARJOMAA, S.; SUORTTI, T.; LEMPIÄINEN, R.; SELIN, J.F.; ITÄVAARA, M. Microbial degradation of poly (L-lactic acid) oligomers. *Polymer degradation and stability* 1998, v.59, p.333 – 336.
- [92]. ZHAO, Y.; HU, T.; LV, Z.; WANG, S.; WU, C. Laser light-scattering studies of poly(caprolactone-b-ethylene oxide-b-caprolactone) nanoparticles and their enzymatic biodegradation. *Journal of polymer science* 1999, v.37B, p.3288-3293.

- [93]. ROSA, D.S.; FRANCO, B.L.M.; CALIL, M.T. Biodegradabilidade e propriedades mecânicas de novas misturas poliméricas. *Polímero: ciência e tecnologia*. 2001, v.11, p.82-88.
- [94]. METTERS, A.T.; ANSETH, K.S.; BOWMAN, C.N. Fundamental studies of a novel, biodegradable PEG-b-PLA hydrogel. *Polymer* 2000, v. 41, p.3993-4004.
- [95]. BURKERSRODA, F.V.; GREF, R.; GÖPFERICH, A. Erosion of biodegradable block copolymers made of poly(d,l-lactic acid) and poly(ethylene glycol). *Biomaterials* 1997, v. 18, p. 1599-1607.
- [96]. SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. *Spectrometric identification of organic compounds*. 7ª Ed. John Wiley & Sons Inc. 2005.
- [97]. HARWOOD, L.M.; CLARIDGE, T.P.W. *Introduction to organic spectroscopy*. Ed. Oxford chemistry primers. 1997.
- [98]. FEINSTEIN, K. *Guide to spectroscopic identification of organic compounds*. Ed. CRC Press. 1995.
- [99]. DYER, J.R. *Application of absorption – spectroscopy of organic compounds*. Ed. Foundations of modern organic chemistry series. 1965.
- [100]. IBBETT, R.N. *NMR spectroscopy of polymers*. Ed. Blackie academic & professional. 1993.
- [101]. CAMPBELL, D.; .PATHRICK, R.A.; WHITE, J.R. *Polymer characterization – physical techniques*. 2ª Ed. Stainley thornes, 2000.
- [102]. RIESSEN, R.; SCHAWER, J. *The glass transition temperature measured by different TA techniques*. Catalogue Mettler Toledo thermal analysis, 2003.
- [103]. JAMSHIDI, K.; HYON, S.H.; IKADA, Y. Thermal characterization of polylactides. *Polymer* 1998, v.29, p.2229-2234.

- [104]. UserCom-information for users of mettler Toledo thermal analysis systems.
- [105]. SIVALINGAM, G.; MADRAS, G. Thermal degradation of binary physical mixtures and copolymers of poly(ϵ -caprolactone), poly(D,L-lactide), poly(glycolide). *Polymer degradation and stability* 2004, v.84, p.393-398.
- [106]. SIVALINGAM, G.; KARTHIK, R.; MADRAS, G. Blends of poly(ϵ -caprolactone) and poly(vinyl acetate): mechanical properties and thermal degradation. *Polymer degradation and stability* 2004, v.84, p.345-351.
- [107]. NATTA, G. Une Nouvelle classe de polymères d' α -oléfinés ayant une régularité de structure exceptionnelle. *Journal of Polymer Science* 1995, v.16, p. 143-154.
- [108]. RULAND, W. Crystallinity and disorder parameters in nylon 6 and nylon 7. *Polymer* 1964, v.5, p.89-102.
- [109]. WEIDINGER, A.; HERMANS, P.H. On the determination of the crystalline fraction of isotactic polypropylene from X-ray diffraction. *Makromol.Chem* 1961, v.50, p.98-115.
- [110]. HERMANS, P.H.; WEIDINGER, A. Estimation of crystallinity of some polymers from X-ray intensity measurements. *J. polym.sci* 1949, v.4, p.709-723.
- [111]. HERMANS, P.H.; WEIDINGER, A. On the determination of the crystalline fraction of isotactic polypropylene from X-ray diffraction. *Makromol. Chem.* 1961, p.44-46, 24-36.
- [112]. KOENIG, J.L. *Microspectroscopic imaging of polymers*. Ed. ACS professional Reference Book. 1998.

- [113]. LAURENCIN, C.T.; PIERRE-JACQUES, H.M.; LANGER, R. Toxicology and biocompatibility considerations in the evaluation of polymeric materials for biomedical applications. *Clin. Lab. Med.* 1990, v.10, p.549-570.
- [114]. VANSLEDREGT, A.; VANBLITTERSWIJK, C.A.; HESSELING, S.C.; GROTE, J.J.; DEGROOT, K. The effect of the molecular weight of polylactic acid on *in-vivo* biocompatibility. *Adv. Biomaterials*, 1990, v. 9, p.207-212.
- [115]. VANSLEDREGT, A.; RADDER, A.M.; DEGROOT, K.; VANBLITTERSWIJK, C.A. *In-vitro* biocompatibility testing of polylactides Part I: proliferation of different cell types. *J. Mater. Sci: Mater Med* 1992, v.3, p.365-370.