

André Eliezer Polloni

**POLIMERIZAÇÃO DE ω -PENTADECALACTONA E
FUNCIONALIZAÇÃO COM POLI(TIOÉTER-FOSFOÉSTER)
PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Química da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Doutor em
Engenharia Química

Orientador: Prof^a. Dr^a. Claudia Sayer

Coorientador: Prof. Dr. Pedro H.H. de
Araújo

Coorientador: Prof. Dr. José Vladimir
de Oliveira

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Polloni, André Eliezer
POLIMERIZAÇÃO DE ÔMEGA-PENTADECALACTONA E
FUNCIONALIZAÇÃO COM POLI(TIOÉTER-FOSFOÉSTER) PARA
APLICAÇÕES BIOMÉDICAS / André Eliezer Polloni ;
orientadora, Claudia Sayer, coorientador, Pedro
Henrique Hermes De Araújo, coorientador, José
Vladimir De Oliveira, 2018.
169 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós
Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Polimerização enzimática
por abertura de anel. 3. Poli(ômega
pentadecalactona). 4. Scaffolds. 5. Biodegradação.
I. Sayer, Claudia. II. De Araújo, Pedro Henrique
Hermes. III. De Oliveira, José Vladimir IV.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

André Eliezer Polloni

**POLIMERIZAÇÃO DE ω -PENTADICALACTONA E
FUNCIONALIZAÇÃO COM POLI(TIOÉTER-FOSFOÉSTER)
PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos” e aprovada em sua forma final pelo Programa Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Claudia Sayer
Orientadora

Prof. Dr. Pedro H.H. de Araújo
Coorientador

Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira
Coorientador

Prof^a. Dr^a. Cíntia Soares
Coordenadora do POSENQ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Claudia Sayer
UFSC

Prof. Dr. Claudio Dariva
UNIT

Prof. Dr. Ana Paula Serafini
Immich Boemo
UFSC

Dr. Paulo Emílio Feuser
UFSC

Florianópolis, 27 de março de 2018.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais, Helio e Lourdes, por toda dedicação e amor incondicional. Aos meus irmãos por todo apoio desde o princípio da minha graduação. Aos meus orientadores, professora Dr^a. Claudia Sayer, professor Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo e professor Dr. José Vladimir de Oliveira, pelas ideias e colaboração tão necessárias no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade e ensinamentos. À professora Dr^a Débora de Oliveira, pela amizade e por ter contribuído muito para a realização desse trabalho. Ao professor Dr. Andreas Heise, pela supervisão e oportunidade de realizar a etapa final deste trabalho no *Royal College of Surgeons in Ireland* (RCSI), Dublin - Irlanda. À Viviane, por todo suporte, carinho e compreensão durante todos esses anos. Aos meus amigos Evertan e Josamaique pelo auxílio na realização dos experimentos iniciais. Aos colegas do Laboratório de Controle e Processos de Polimerização (LCP), pela amizade e apoio em todos os dias de trabalho desses últimos 6 anos, em especial aos integrantes do grupo de miniemulsão. Ao João e Eduardo, pelo trabalho desenvolvido como alunos de Iniciação Científica. Aos colegas do RCSI: Shona, Rob, Fernando, Heliane, Scott, Ruairí, Elena, Seamus, Ronaldo e Rita pela amizade e por todo suporte nesse período de grande aprendizado. À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e em especial ao LCP. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro no Brasil e exterior.

Muito obrigado!

RESUMO

Nos últimos anos, a polimerização por abertura de anel de macrolactonas tem sido intensamente estudada como um novo método para a síntese de poliésteres biodegradáveis. A utilização de enzimas como biocatalisadores nestas reações é uma rota promissora. Polímeros derivados de macrolactonas têm se mostrado eficazes para aplicações biomédicas, devido às suas excelentes propriedades mecânicas e de biocompatibilidade. Entre os polímeros produzidos a partir de macrolactonas, a poli(ω -pentadecalactona) ou poli(ω -PDL) é um poliéster semicristalino obtido a partir de um monômero amplamente disponível, conhecido como 15-pentadecanolídeo ou ω -pentadecalactona (ω -PDL). O comportamento de cristalização e as propriedades mecânicas da poli(ω -PDL) são semelhantes às do polietileno linear de alta densidade, mas com a vantagem de serem degradáveis, devido à presença de ligações éster hidrolisáveis ao longo de sua cadeia polimérica. Contudo, a hidrólise da cadeia de poliésteres alifáticos é um processo lento, devido à elevada cristalinidade e hidrofobicidade destes materiais. Ainda, a maioria dos trabalhos existentes na literatura relatando a síntese enzimática de poli(ω -PDL), utiliza tolueno, um solvente tóxico e com elevado ponto de ebulição, como solvente para o meio reacional. Com base nisso, o presente trabalho buscou estudar a polimerização enzimática por abertura de anel do monômero ω -pentadecalactona, funcionalizar o poliéster obtido para aumentar sua reatividade, conjugar o polímero funcionalizado com um poli(tioéter-fosfoéster) e utilizar o copolímero obtido na preparação de *scaffolds* poliméricos para uso na área de engenharia de tecidos. Desta forma, foi conduzida inicialmente a síntese enzimática de poli(ω -PDL) utilizando solventes menos tóxicos e mais fáceis de serem removidos do produto quando comparados ao tolueno, como diclorometano e clorofórmio. Na segunda etapa deste trabalho a polimerização enzimática de ω -PDL foi estudada utilizando-se dióxido de carbono supercrítico ($scCO_2$) como solvente. Na última etapa deste trabalho, realizou-se a funcionalização do homopolímero poli(ω -PDL), via método de iniciador, visando inserir grupamentos tiol na cadeia polimérica, com a finalidade de copolimerizar este material com um composto de interesse, como um fosfoéster, via reações de adição tioleno. Para tanto, um poli(tioéter-fosfoéster) foi sintetizado e o mesmo foi conjugado com a poli(ω -PDL) funcionalizada com tiol, na presença de um fotoiniciador. Por fim, o material produzido foi utilizado para a fabricação de *scaffolds* poliméricos pelo método de eletrofição. Os *scaffolds* foram então caracterizados em termos de viabilidade e

crescimento celular, degradação hidrolítica e enzimática. Os resultados obtidos indicam que o copolímero obtido é compatível com células do tipo osteoblastos, é degradável quando em meio enzimático e é um forte candidato para aplicação na área biomédica, principalmente para a regeneração de tecidos ósseos e cartilagosos.

Palavras-chave: Polimerização enzimática por abertura de anel. Poli(ω -pentadecalactona). Funcionalização. Tiol-eno. *Scaffolds*. Biodegradação.

ABSTRACT

In the last years, ring-opening polymerization of macrolactones has been intensively studied as a novel method for synthesis of biodegradable polyesters. The use of enzymes as biocatalysts in these reactions is a promising route. Polymers derived from macrolactones are effective for biomedical applications because of their excellent mechanical properties and biocompatibility. Among the polymers produced from macrolactones, poly(ω -pentadecalactone) or poly(ω -PDL) is a semicrystalline polyester obtained from a readily available monomer known as 15-pentadecanolide or ω -pentadecalactone (ω -PDL). The crystallization behavior and mechanical properties of poly(ω -PDL) are like those of linear high-density polyethylene but with the advantage of being degradable due to the presence of hydrolysable ester linkages along their main chain. Nevertheless, the hydrolysis of aliphatic polyester chain is a slow process due to the high crystallinity and hydrophobicity of these materials. Moreover, most of works in the literature reporting the enzymatic synthesis of poly(ω -PDL), uses toluene, a toxic solvent with high boiling point as solvent for the reaction medium. Based on this, the present work studied the enzymatic ring-opening polymerization of ω -PDL, functionalized the obtained polyester to increase its reactivity, conjugated the functionalized polymer with a poly(thioether-phosphoester) and then the obtained copolymer was used in the preparation of polymeric scaffolds for use in tissue engineering. Thus, we first performed the enzymatic synthesis of poly(ω -PDL) using solvents that are less toxic and easier to remove from the product when compared to toluene, such as dichloromethane and chloroform. In the second step of this work the enzymatic polymerization of ω -PDL was studied using supercritical carbon dioxide (scCO₂) as solvent. In the last step, the functionalization of the poly(ω -PDL) homopolymer was conducted via initiator method, aiming to insert thiol groups in the polymer chain, to copolymerize this material with a compound of interest, such as a phosphoester, via thiol-ene addition reactions. For this, a poly(thioether-phosphoester) was synthesized and it was conjugated with the thiol-functionalized poly(ω -PDL) in the presence of a photoinitiator. Finally, the material obtained was used to prepare polymeric scaffolds by electrospinning method. The scaffolds were then characterized in terms of viability and cell growth, hydrolytic and enzymatic degradation. The results indicated that the obtained copolymer is compatible with osteoblast cells, is degradable when in enzymatic medium and is a strong

candidate for application in the biomedical area, mainly for the regeneration of bone and cartilaginous tissues.

Keywords: Enzymatic ring-opening polymerization. Poly(ω -pentadecalactone). Functionalization. Thiol-ene. Scaffolds. Biodegradation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Representação esquemática dos mecanismos envolvidos entre o sítio ativo da lipase e a lactona ϵ -caprolactona durante a e-ROP. 38
- Figura 2: Representação esquemática da síntese de ω -PDL (1) funcionalizada com 6-mercaptop-1-hexanol (2) e γ -tiobutirolactona (3) ou acrilato de vinila (4), catalisada pela lipase Novozym 435. 47
- Figura 3: Copolímero aleatório de poli(ω -PDL-co- ϵ -caprolactona) antes (A) e após (B) o processo de formação de espuma pela evaporação de CO_2 54
- Figura 4: Formação de matriz porosa tridimensional utilizando a técnica de separação de fases termicamente induzida. 55
- Figura 5: Esquema ilustrativo simplificado do processo de eletrofiação. 57
- Figura 6: Esquema representativo do reator de alta pressão e volume variável. 65
- Figura 7: Esquema do mecanismo para a e-ROP da ω -PDL. 66
- Figura 8: Rendimentos das reações de e-ROP da ω -PDL a 70 °C após 2 h de reação em diferentes solventes (relação mássica de solvente para monômero = 2:1). 69
- Figura 9: Massas molares médias numérica e ponderada (M_n e M_w) de poli(ω -PDL) obtida via e-ROP em solução a 70 °C em 2 h de reação, utilizando diferentes solventes (razão molar de solvente para monômero = 2:1). 70
- Figura 10: Rendimento das reações em função da quantidade de água na enzima (% em massa) para a e-ROP de ω -PDL em solução, utilizando diclorometano ou clorofórmio como solventes a 70 °C. 73
- Figura 11: Massa molar média numérica e ponderada (M_n e M_w) de poli(ω -PDL) em função da quantidade mássica de água na enzima Novozym 435 durante a polimerização em solução utilizando diclorometano (a) ou clorofórmio (b) como solventes, a 70 °C. 74
- Figura 12: Efeito do tempo reacional no rendimento (% em massa) para a e-ROP de ω -PDL em solução, utilizando diclorometano ou clorofórmio como solventes a 70 °C. 76

Figura 13: Massa molar média numérica e ponderada (M_n e M_w) da poli(ω -PDL) em função do tempo reacional para a e-ROP em solução, utilizando diclorometano (a) ou clorofórmio (b) como solventes a 70 °C.	78
Figura 14: Vista interior do reator de volume variável no início da polimerização (a) e após 3 h de reação (b) para a e-ROP de ω -PDL a 70 °C utilizando diclorometano como solvente.	79
Figura 15: Vista interior do reator de volume variável no início da polimerização (a) e após 3 h de reação (b) para a e-ROP de ω -PDL a 70 °C utilizando clorofórmio como solvente.	80
Figura 16: M_n e M_w obtidas na e-ROP de ω -PDL utilizando scCO ₂ como solvente e diclorometano ou clorofórmio como cossolventes, em diferentes razões mássicas de monômero para cossolvente e monômero + cossolvente para scCO ₂ , 70 °C, em 2 h e com 10% de CALB.....	90
Figura 17: Massas molares médias (M_n e M_w) obtidas na e-ROP de ω -PDL utilizando scCO ₂ como solvente e diclorometano ou clorofórmio como cossolventes ^(a) , a 70 °C, catalisadas pela enzima Novozym 435 ^(b) com diferentes conteúdos de água em 2 h de reação.....	92
Figura 18: Distribuição das massas molares obtidas na e-ROP de ω -PDL utilizando scCO ₂ como solvente e diclorometano como cossolvente ^(a) , a 70 °C, catalisada pela enzima Novozym 435 ^(b) com diferentes conteúdos de água em 2 h de reação.	93
Figura 19: Distribuição das massas molares obtidas na e-ROP de ω -PDL utilizando scCO ₂ como solvente e clorofórmio como cossolvente ^(a) , a 70 °C, catalisada pela enzima Novozym 435 ^(b) com diferentes conteúdos de água em 2 h de reação.	94
Figura 20: Massas molares médias obtidas na e-ROP de ω -PDL utilizando scCO ₂ como solvente e diclorometano como cossolvente ^(a) a 70 °C, catalisadas pela enzima Novozym 435 ^(b) em diferentes tempos de reação.	97
Figura 21: Massas molares médias obtidas na e-ROP de ω -PDL utilizando scCO ₂ como solvente e clorofórmio como cossolvente ^(a) a 70 °C, catalisadas pela enzima Novozym 435 ^(b) em diferentes tempos de reação.	98
Figura 22: Distribuição das massas molares média ponderadas obtidas nas reações de e-ROP de ω -PDL usando scCO ₂ com solvente e diclorometano	

como cossolvente ^(a) a 70 °C, catalisadas pela enzima Novozym 435 ^(b) em 1 h (exp. 28) e 2 h (exp. 29) de reação.	99
Figura 23: Distribuição das massas molares média ponderadas obtidas nas reações de e-ROP de ω -PDL usando scCO ₂ com solvente e clorofórmio como cossolvente ^(a) a 70 °C, catalisadas pela enzima Novozym 435 ^(b) em 1 h (exp. 33) e 2 h (exp. 34) de reação.	100
Figura 24: Esquema da e-ROP de ω -PDL (1) com o iniciador 6-mercaptop-1-hexanol (2) para a síntese do oligômero de ω -PDL monofuncionalizado (3).	106
Figura 25: Esquema da esterificação de diclorofosfato de fenila (1) com 10-undecen-1-ol (2) na presença de trietilamina (3) para a formação do monômero fenil di(undec-10-en-1-il) fosfato (4).	108
Figura 26: Esquema da polimerização dos monômeros fenil di(undec-10-en-1-il) fosfato (1) e 1,5-pentanoditiol (2) na presença de um iniciador para formação do segmento poli(tioéter-fosfoéster) (3).	109
Figura 27: Esquema da conjugação entre a ω -PDL funcionalizada com tiol (1) com poli(tioéter-fosfoéster) (2) na presença de fotoiniciador para formação do copolímero em bloco (3).	110
Figura 28: Espectro de ¹ H-RMN (400 MHz) do oligômero de ω -PDL funcionalizada com 6M1H em clorofórmio-d. Reação conduzida a 80 °C por 24 h, resultando em 85 % das cadeias funcionalizadas com tiol... ..	115
Figura 29: Curva de fusão da ω -PDL funcionalizada com 6M1H - reação conduzida a 80 °C por 24 h, resultando em 85 % das cadeias funcionalizadas com tiol.....	117
Figura 30: Espectro de ¹ H-RMN (400 MHz) do fenil di(undec-10-en-1-il) fosfato em clorofórmio-d.	118
Figura 31: Espectro de ¹ H-RMN (400 MHz) do poli(tioéter-fosfoéster) (reação PTP 12) em clorofórmio-d.	120
Figura 32: Curva de fusão do poli(tioéter-fosfoéster) - reação PTP 12.	121
Figura 33: Espectro de ¹ H-RMN (400 MHz) do poli(ω -PDL-b-TEPE) (amostra PCJ 06), em clorofórmio-d.	125
Figura 34: Curva de fusão do copolímero poli(ω -PDL-co-TEPE) (amostra PCJ 06).	126

Figura 35: Partículas produzidas utilizando as amostras A1 (8 kV, 8 cm e 100 $\mu\text{L min}^{-1}$) (barra = 50 μm), A6 (10 kV, 12 cm e 50 $\mu\text{L min}^{-1}$) (barra = 50 μm) e A13 (10 kV, 10 cm e 100 $\mu\text{L min}^{-1}$) (barra = 10 μm), todas com concentração de 10 % em massa. Magnitude de ampliação igual a 20 vezes.....	128
Figura 36: Fibras produzidas utilizando as amostras B1 (8 kV, 8 cm e 100 $\mu\text{L min}^{-1}$), B6 (10 kV, 12 cm e 50 $\mu\text{L min}^{-1}$) e B13 (10 kV, 10 cm e 100 $\mu\text{L min}^{-1}$), todas com concentração de 15 % em massa. Magnitude de ampliação igual a 20 vezes.....	129
Figura 37: Fibras produzidas utilizando as amostras C1 (8 kV, 8 cm e 100 $\mu\text{L min}^{-1}$), C6 (10 kV, 12 cm e 50 $\mu\text{L min}^{-1}$) e C13 (10 kV, 10 cm e 100 $\mu\text{L min}^{-1}$), todas com concentração de 20 % em massa. Magnitude de ampliação igual a 20 vezes.....	130
Figura 38: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da amostra C13.....	130
Figura 39: Histograma de frequência do diâmetro médio das fibras da amostra C13 obtido a partir das imagens de SEM.	131
Figura 40: Partículas produzidas utilizando as amostras D1 (8 kV, 8 cm e 100 $\mu\text{L min}^{-1}$) (barra = 50 μm), D6 (10 kV, 12 cm e 50 $\mu\text{L min}^{-1}$) (barra = 50 μm) e D10 (12 kV, 10 cm e 50 $\mu\text{L min}^{-1}$) (barra = 10 μm), todas com concentração de 10 % em massa. Magnitude de ampliação igual a 20 vezes.....	133
Figura 41: Partículas produzidas utilizando as amostras E1 (8 kV, 8 cm e 100 $\mu\text{L min}^{-1}$), E6 (10 kV, 12 cm e 50 $\mu\text{L min}^{-1}$) e E10 (12 kV, 10 cm e 50 $\mu\text{L min}^{-1}$), todas com concentração de 20 % em massa (barra = 10 μm). Magnitude de ampliação igual a 20 vezes.....	133
Figura 42: Fibras produzidas utilizando as amostras F1 (8 kV, 8 cm e 100 $\mu\text{L min}^{-1}$), F6 (10 kV, 12 cm e 50 $\mu\text{L min}^{-1}$) e F10 (12 kV, 10 cm e 50 $\mu\text{L min}^{-1}$), todas com concentração de 30 % em massa. Magnitude de ampliação igual a 20 vezes.....	134
Figura 43: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da amostra F10.	135
Figura 44: Histograma de frequência do diâmetro médio das fibras da amostra F10 obtido a partir das imagens de SEM.....	135
Figura 45: Viabilidade e proliferação celular (células vivas: verde e mortas: vermelho) nos <i>scaffolds</i> de (A) poli(ω -PDL) - 100 vezes de	

magnificação e (B) poli(ω -PDL) misturada com poli(ω -PDL-b-TEPE) - 100 vezes de magnificação. A imagem C é uma região ampliada da imagem B - 200 vezes de magnificação..... 137

Figura 46: Viabilidade e proliferação celular em 1, 4 e 8 dias de acordo com os resultados obtidos no ensaio Alamar Blue para os *scaffolds* produzidos a partir de (\square) poli(ω -PDL) e (\bullet) poli(ω -PDL) + poli(ω -PDL-b-TEPE)..... 139

Figura 47: Degradação hidrolítica dos *scaffolds* de (A) poli(ω -PDL) e (B) poli(ω -PDL) + poli(ω -PDL-b-TEPE) em tampão PBS a 37 °C. Massa remanescente em função do tempo de degradação..... 141

Figura 48: Degradação enzimática dos *scaffolds* de (A) poli (ω -PDL) e (B) poli(ω -PDL) + poli(ω -PDL-b-TEPE) em tampão PBS a 37 °C, contendo 0,1 mg de lipase por 10 mL de tampão. Massa remanescente em função do tempo de degradação. 142

Figura 49: *Scaffolds* obtidos a partir de (A) poli(ω -PDL) e (B) a partir da mistura de poli(ω -PDL) com o poli(ω -PDL-b-TEPE) em diferentes tempos de degradação enzimática. 143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições de secagem para o monômero ω -PDL e para a enzima Novozym 435 (CALB) e resultados em termos de conteúdo final de água.	72
Tabela 2: Propriedades térmicas da poli(ω -PDL) produzida via e-ROP em solução, utilizando diclorometano ou clorofórmio como solventes a 70 °C com diferentes valores de massa molar, obtidas da segunda curva de aquecimento via DSC.....	81
Tabela 3: Resultados para a e-ROP de ω -PDL usando scCO ₂ como solvente, a 70 °C catalisada pela enzima Novozym 435 (10 % em massa em relação ao monômero) em 2 h de reação.	87
Tabela 4: Condições experimentais e rendimento das reações de e-ROP de ω -PDL, utilizando scCO ₂ como solvente e diclorometano ou clorofórmio como cossolventes a 70 °C, com 10% em massa em relação ao monômero de Novozym 435 em 2 horas de reação.....	89
Tabela 5: Tempo de secagem da Novozym 435 (70 °C e 0,4 bar) e rendimento da e-ROP de ω -PDL usando scCO ₂ como solvente e diclorometano ou clorofórmio como cossolventes a 70 °C, catalisadas pela Novozym 435 com diferentes quantidades de água em 2 h de reação.	91
Tabela 6: Condições experimentais e rendimento das reações de e-ROP de ω -PDL utilizando scCO ₂ como solvente e diclorometano ou clorofórmio como cossolventes ^(a) , a 70 °C, catalisadas por 10 % de enzima ^(b) em diferentes tempos de reação.	95
Tabela 7: Propriedades térmicas da poli(ω -PDL) produzida via e-ROP em solução, utilizando scCO ₂ como solvente e diclorometano ou clorofórmio (quando usados) como cossolventes, a 70 °C, 200 bar e Novozym 435 como catalisador.....	101
Tabela 8: Condições reacionais e resultados da síntese de ω -PDL funcionalizada com tiol. As reações foram conduzidas em solução, em uma razão mássica de 1:1 de clorofórmio para ω -PDL.....	114
Tabela 9: Condições reacionais e resultados em termos de massa molar para a polimerização radicalar de fenil di(undec-10-en-1-il) fosfato com 1,5-pentanoditiol.	119

Tabela 10: Condições reacionais e resultados em termos de massa molar (GPC) para a tentativa de síntese do copolímero em bloco.	122
Tabela 11: Condições reacionais e resultados em termos de massa molar para a síntese do copolímero poli(ω -PDL-b-TEPE).	123
Tabela 12: Parâmetros utilizados para a otimização da eletrofiação das soluções do homopolímero poli(ω -PDL).	128
Tabela 13: Parâmetros utilizados para a otimização da eletrofiação das soluções contendo a mistura de poli(ω -PDL-b-TEPE) (PCJ 06) com a poli(ω -PDL).	132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{H-RMN}$	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
6M1H	6-mercapto-1-hexanol
ADMET	<i>Acyclic diene metathesis</i>
AIBN	Azobisisobutironitrila
AROP	Polimerização aniônica por abertura de anel
ASTM	American Society for Testing and Materials
CALB	Fração B da lipase de <i>Candida antarctica</i>
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CNTP	Condições normais de temperatura e pressão
CROP	Polimerização catiônica por abertura de anel
DC_{50}	Dose letal mediana
DCM	Diclorometano
DMPA	2,2-dimetoxi-2-fenil acetofenona
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
Đ	Dispersidade
EAM	Espécies de monômero ativadas pela enzima
e-ROP	Polimerização enzimática por abertura de anel
FSC	Fluido supercrítico
H9c2	Células embrionárias cardíacas de camundongo
LC_{50}	Concentração letal mediana
MC3T3	Células de calvária de camundongo (osteoblastos)
M_n	Massa molar numérica média
MROP	Polimerização por abertura de anel via matátese
MTT	Ensaio de citotoxicidade padrão
M_w	Massa molar ponderada média
PBS	Tampão fosfato-salino
P_c	Pressão crítica
PEAD	Polietileno linear de alta densidade
PEG	Poli(etileno glicol)
PLA	Poli(ácido-láctico)
POM	Polioximetileno
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROP	Polimerização por abertura de anel
RROP	Polimerização radicalar por abertura de anel
scCO_2	Dióxido de carbono supercrítico
SEC	Cromatografia por exclusão de tamanhos
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
T_c	Temperatura crítica
T_g	Temperatura de transição vítrea

THF	Tetrahidrofurano
TIPS	Separação de fases termicamente induzida
T_m	Temperatura de fusão
ΔH_m	Entalpia de fusão
ω -PDL	Ômega-pentadecalactona

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	25
1 INTRODUÇÃO	25
1.1 OBJETIVOS	29
1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO.....	30
CAPÍTULO II	31
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1 POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS	31
2.2 POLIÉSTERES BIODEGRADÁVEIS	31
2.3 POLIMERIZAÇÃO POR ABERTURA DE ANEL	33
2.3.1 Polimerização radicalar por abertura de anel	34
2.3.2 Polimerização catiônica por abertura de anel	34
2.3.3 Polimerização aniônica por abertura de anel	35
2.3.4 Polimerização por abertura de anel via metátese	36
2.3.5 Polimerização enzimática por abertura de anel	36
2.3.5.1 Polimerização enzimática por abertura de anel de macrolactonas.....	39
2.3.5.2 Uso de fluidos pressurizados na e-ROP	41
2.4 COPOLÍMEROS DE POLI(ω -PDL)	43
2.5 FUNCIONALIZAÇÃO DA POLI(ω -PDL)	45
2.6 REAÇÕES DE ADIÇÃO TIOL-ENO	48
2.7 POLIFOSFOÉSTERES.....	49
2.8 USO DE SCAFFOLDS NA ENGENHARIA DE TECIDOS	52
2.8.1 Evaporação de solvente e lixiviação das partículas formadas	53
2.8.2 Formação de espumas pela saturação e evaporação de gás 54	
2.8.3 Separação de fases termicamente induzida (TIPS)	55
2.8.4 Eletrofiação (<i>electrospinning</i>)	55
2.9 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE	60

CAPÍTULO III.....	63
3 POLIMERIZAÇÃO ENZIMÁTICA POR ABERTURA DE ANEL DE ω-PDL EM DIFERENTES SOLVENTES UTILIZANDO UM REATOR DE VOLUME VARIÁVEL	63
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS	64
3.1.1 Materiais.....	64
3.1.2 Procedimento geral para a polimerização enzimática por abertura de anel	65
3.1.3 Determinação das massas molares	67
3.1.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	67
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES	67
3.2.1 Polimerização em solução utilizando diferentes solventes	67
3.2.2 Influência do teor de água no rendimento e massa molar da poli(ω -PDL).....	71
3.2.3 Influência do tempo reacional no rendimento e na massa molar da poli(ω -PDL).....	76
3.2.4 Propriedades térmicas da poli(ω -PDL).....	81
3.3 CONCLUSÕES	82
CAPÍTULO IV	83
4 POLIMERIZAÇÃO ENZIMÁTICA POR ABERTURA DE ANEL DE ω-PDL UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO.....	83
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS	84
4.1.1 Materiais.....	84
4.1.2 Aparato experimental.....	85
4.1.3 Procedimento experimental para a e-ROP utilizando scCO ₂ como solvente.....	85
4.1.4 Determinação das massas molares	86
4.1.5 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	86
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
4.2.1 e-ROP de ω -PDL utilizando scCO ₂ como solvente	86
4.2.2 Avaliação do uso de diclorometano e clorofórmio como cossolventes na e-ROP de ω -PDL utilizando scCO ₂ como solvente	87

4.2.3	Influência do conteúdo de água na e-ROP de ω -PDL utilizando scCO ₂ como solvente e diclorometano ou clorofórmio como cossolventes	90
4.2.4	Influência do tempo de reação na e-ROP de ω -PDL utilizando scCO ₂ como solvente e diclorometano ou clorofórmio como cossolventes	94
4.2.5	Propriedades térmicas	100
4.3	CONCLUSÕES	101
CAPÍTULO V		103
5	FUNCCIONALIZAÇÃO DE ω -PDL, CONJUGAÇÃO COM POLI(TIOÉTER-FOSFOÉSTER) E PREPARAÇÃO DE SCAFFOLDS	103
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS	105
5.1.1	Síntese do oligômero ω -PDL funcionalizado com tiol....	105
5.1.2	Síntese do monômero contendo grupamento fosfoéster.	106
5.1.3	Síntese do poli(tioéter-fosfoéster).....	108
5.1.4	Conjugação do poli(tioéter-fosfoéster) com ω -PDL funcionalizada com tiol	110
5.1.5	Produção dos <i>scaffolds</i> poliméricos	110
5.1.6	Ensaio de viabilidade celular	112
5.1.7	Ensaio de degradação enzimática e hidrolítica	113
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	113
5.2.1	Síntese do oligômero de ω -PDL funcionalizado com tiol	113
5.2.2	Síntese do poli(tioéter-fosfoéster).....	117
5.2.3	Conjugação do poli(tioéter-fosfoéster) com a ω -PDL funcionalizada com tiol	121
5.2.4	Produção dos <i>scaffolds</i> poliméricos	127
5.2.5	Viabilidade celular dos <i>scaffolds</i>	136
5.2.6	Ensaio de degradação.....	140
5.3	CONCLUSÕES	143
CAPÍTULO VI		145

CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS
.....145
REFERÊNCIAS..... 149

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

O número cada vez maior de consumidores buscando produtos ambientalmente favoráveis que proporcionem segurança e sustentabilidade para o planeta, aliado ao esgotamento de recursos naturais, tem acarretado em um aumento pela busca do uso de materiais renováveis nas indústrias química e farmacêutica. Os polímeros produzidos a partir de monômeros renováveis, tais como lactonas e macrolactonas, vêm ganhando cada vez mais espaço na indústria e isso motiva o desenvolvimento de novas técnicas de produção e novos materiais a serem utilizados a nível acadêmico e industrial. Embora existam muitas alternativas para substituir polímeros derivados de fontes fósseis, muitas pesquisas ainda são necessárias para o desenvolvimento e aplicação destes polímeros oriundos de fontes renováveis (ATES; THORNTON; HEISE, 2011).

Poliésteres se destacam na área da biomedicina, onde têm sido estudados principalmente para utilização como carreadores de fármacos e para regeneração de tecido ósseo, cartilaginoso e muscular (LIU et al., 2009; KORZHIKOV et al., 2013; BAUDIS; BEHL; LENDLEIN, 2014). Esta classe de polímeros possui repetidas ligações éster na cadeia principal e estas são susceptíveis a degradação hidrolítica, fato que os classifica como polímeros biodegradáveis. As vantagens da utilização de poliésteres para fins biomédicos incluem a sua elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade (SEYEDNEJAD et al., 2011).

Poliésteres alifáticos podem ser sintetizados por duas vias principais: policondensação e polimerização por abertura de anel (ROP) de ésteres cíclicos (lactonas). Esta segunda via é amplamente utilizada, uma vez que poliésteres com um elevado grau de polimerização podem ser obtidos. Além disso, durante a síntese de poliésteres por ROP geralmente não há formação de produtos secundários (ATES; THORNTON; HEISE, 2011).

A polimerização por abertura de anel de lactonas pode ser realizada utilizando diferentes tipos de catalisadores como, por exemplo, catalisadores orgânicos, organometálicos e enzimáticos. O uso de enzimas como catalisadores na polimerização enzimática por abertura de anel (e-ROP) é uma alternativa promissora, pois enzimas são consideradas catalisadores “verdes” que podem ser obtidos de fontes animais, vegetais e microbiológicas (KOBAYASHI et al., 2001; KOBAYASHI, 2010). Além disso, enzimas possuem elevada quimio-

regio- e enantio-seletividade, o que as destaca dos demais catalisadores orgânicos por serem altamente específicas para diferentes meios reacionais (ZHANG et al., 2014). Lipases, como a lipase de fração B de *Candida antarctica*, são altamente ativas na e-ROP de lactonas e apresentam taxas de reação elevadas para a polimerização de macrolactonas (ésteres cíclicos constituídos por anel de 12 a 17 membros) (BISHT et al., 1997; VAN DER MEULEN et al., 2008).

Comercialmente conhecida como Novozym 435, a lipase CALB (imobilizada em resina macroporosa de poli(metacrilato de metila)) é altamente estável em uma ampla faixa de pH e temperatura, o que permite sua aplicação em diferentes condições de polimerização (IDRIS; BUKHARI, 2012; MILETIĆ; NASTASOVIĆ; LOOS, 2012). Além disso, há a possibilidade de reuso do catalisador por diversos ciclos reacionais, sem que este perca seu poder catalítico, propiciando a diminuição do custo final do processo (SEYEDNEJAD et al., 2011).

Na e-ROP a enzima necessita de um nucleófilo, uma molécula pequena, como água, ácido ou amina, que além de regenerar a enzima, irá iniciar a polimerização ligando-se ao monômero aberto (THURECHT et al., 2006; VAN DER MEE et al., 2006). A água presente na superfície da enzima, além de atuar como iniciador da reação de polimerização irá manter a estrutura conformacional da enzima. A ausência de água no meio reacional resultará na desnaturação da enzima. Em contraponto, o excesso de água está relacionado a diversas desvantagens, como obtenção de polímeros de baixa massa molar, uma vez que uma maior quantidade de cadeias será iniciada, hidrólise das cadeias poliméricas formadas e inibição reversível da polimerização (ZHANG et al., 2014).

Nos primeiros estudos para a síntese de poliésteres via e-ROP, monômeros cíclicos como a ϵ -caprolactona e δ -valerolactona foram investigados (KNANI; GUTMAN; KOHN, 1993; UYAMA; TAKEYA; KOBAYASHI, 1993). Os autores constataram que a presença de enzima no meio reacional induzia a abertura do anel das lactonas e as moléculas de água presentes na superfície da enzima eram responsáveis pela iniciação da polimerização. Em seguida, diversos trabalhos foram desenvolvidos englobando a homo- e copolimerização de lactonas com diversos tamanhos de anel via e-ROP para produção de materiais poliméricos (JASINSKA-W et al., 2014; SARAZIN; CARPENTIER, 2015; WILSON et al., 2015a).

Apesar dos polímeros obtidos de lactonas e macrolactonas serem suscetíveis a degradação hidrolítica, a hidrólise de poli(macrolactonas) de cadeia alifática é um processo bastante lento em função da elevada cristalinidade e alta hidrofobicidade destes materiais (WILSON et al.,

2015b). Contudo, poliésteres derivados de macrolactonas são biocompatíveis e podem ser funcionalizados com o intuito de reduzir sua cristalinidade e inserir grupos funcionais de interesse em sua superfície, melhorando o desempenho destes biomateriais, ampliando assim sua gama de aplicações.

Dentre as principais macrolactonas investigadas nos últimos anos, pode-se citar a 15-pentadecanolide, comumente conhecida como ω -pentadecalactona (ω -PDL). Esta macrolactona é considerada atóxica (MCGINTY et al., 2011) e natural, pois pode ser obtida em abundância no óleo da raiz da planta *Angelica archangelica*. A ω -PDL é comumente utilizada na indústria de fragrâncias, xampus, cosméticos, produtos para limpeza e apresenta-se como uma alternativa em substituição a monômeros oriundos de fontes fósseis, sendo matéria-prima de interesse para indústria química e farmacêutica (DE GEUS et al., 2010).

Apesar da maioria dos trabalhos que relatam a síntese da poli(ω -PDL) utilizarem enzimas na polimerização, todos os trabalhos relacionados na literatura reportam o uso de tolueno, um solvente com elevado ponto de ebulição e que apresenta toxicidade (ALEXANDER; MCCARTY; BARTLETT, 1978; KHIGIENA, 1986), como solvente para o meio reacional (BISHT et al., 1997; KUMAR et al., 2000; VAN DER MEE et al., 2006; SIMPSON; TAKWA; HULT, 2008; VAN DER MEULEN et al., 2008; CAI et al., 2010; DE GEUS et al., 2010; KORZHIKOV et al., 2013; WILSON et al., 2015c; FERNÁNDEZ et al., 2015; WANG; JIA; ZHU, 2017).

A polimerização enzimática da ω -PDL vem sendo alvo de interesse de estudos nos últimos anos, principalmente devido às propriedades físicas, mecânicas e de cristalização que a poli(ω -PDL) apresenta e que são similares às daquelas do polietileno linear de alta densidade (PEAD), mas com a vantagem de a poli(ω -PDL) ser biodegradável, uma vez que apresenta repetidas ligações éster, passíveis de serem hidrolisadas, em sua cadeia (CAI et al., 2010).

Meulen e colaboradores (2008) estudaram a polimerização das macrolactonas ω -PDL, hexadecalactona e seus análogos insaturados globalide e ambrettolide catalisados pela lipase Novozym 435. Os estudos de degradação não mostraram degradação hidrolítica e enzimática dos poliésteres formados, o que está relacionado a alta cristalinidade e hidrofobicidade dos polímeros obtidos.

Com o objetivo de aumentar a biodegradabilidade e biocompatibilidade da poli(ω -PDL), a funcionalização da cadeia visa a obtenção de materiais com diferentes comportamentos e taxas de degradação. A modificação das características do poliéster pode ser

realizada pela redução da cristalinidade e aumento da hidrofiliidade do polímero, favorecendo a adesão celular em superfícies para fins de engenharia de tecidos e facilitando a biodegradação do mesmo (WEBB et al., 1998).

No caso de macrolactonas saturadas, como a ω -PDL, a funcionalização pode ser realizada utilizando um iniciador funcional (nucleófilo que possua um grupamento funcional além da hidroxila, como tiol, amina, acrilato ou metacrilato, por exemplo), que irá iniciar a e-ROP da macrolactona em substituição a água utilizada usualmente. A hidroxila desse iniciador irá atacar o intermediário formado entre a enzima e a macrolactona, abrindo a molécula e, posteriormente, regenerando a enzima. Desta forma, a molécula da macrolactona ficará aberta e possuirá o nucleófilo ligado à sua extremidade. Posteriormente, o grupamento funcional do nucleófilo poderá reagir com outras moléculas de interesse, formando um copolímero juntamente com a poli(ω -PDL) funcionalizada (TAKWA et al., 2006; TAKWA, 2008).

Diversos grupos de interesse podem ser adicionados à cadeia polimérica da poli(ω -PDL) com o intuito de, além da redução de sua cristalinidade e hidrofobicidade, adicionarem propriedades que a torne apta para futuras aplicações biomédicas específicas. Dentre os métodos de interesse, a funcionalização pelo método do iniciador, onde o grupamento do nucleófilo utilizado poderá reagir com um monômero contendo fosfato, por exemplo, é uma alternativa para a produção de materiais biodegradáveis, uma vez que a presença de fosfato é essencial durante a deposição mineral para o desenvolvimento de tecidos da pele e dentes, tornando viável a aplicação de materiais fosforados para engenharia de tecidos e adesivos dentais (OHKAWA et al., 2009; DAS; KAR; GUPTA, 2013).

Dentre os compostos contendo grupamento fosfato, o grupo dos fosfoésteres é constituído de monômeros incorporados com fósforo. Com o intuito de agregar propriedades físicas desejáveis, os poliésteres podem ser funcionalizados ou copolimerizados com fosfoésteres e estes novos materiais podem ser aplicados em quimioterapia, dispositivos de liberação controlada de fármacos/DNA e *scaffolds* em engenharia de tecidos. Associadas a estas aplicações, os fosfoésteres apresentam flexibilidade química, similaridade a biomacromoléculas como ácido nucleico, produtos de degradação altamente biocompatíveis e sua degradação no organismo é rápida, uma vez que podem ser degradados enzimática- e hidroliticamente, o que os torna interessantes para uso *in vivo* já que não há acúmulo no organismo. Apesar das diversas vantagens associadas, seu uso ainda é bastante limitado devido à complexidade de

síntese (ULERY et al., 2011; TIAN et al., 2012; ALEXANDRINO et al., 2014).

Nesse sentido, o presente trabalho propõe inicialmente a síntese enzimática de poli(ω -PDL) utilizando solventes menos tóxicos e/ou que possam ser mais facilmente separados do produto que o tolueno. Além disso, será estudada a posterior funcionalização do homopolímero poli(ω -PDL), via método de iniciador, utilizando um nucleófilo com um grupo funcional que possa viabilizar a copolimerização do material obtido. Em uma etapa posterior, esse trabalho propõe realizar a copolimerização da poli(ω -PDL) funcionalizada com um fosfoéster e utilizar o copolímero obtido na produção de materiais porosos tridimensionais (*scaffolds*) para posterior caracterização visando seu uso na engenharia de tecidos.

1.1 OBJETIVOS

A partir do exposto acima, este trabalho de doutorado tem como objetivo principal a criação de estruturas porosas poliméricas tridimensionais (*scaffolds*) para uso em engenharia de tecidos, tendo como material de partida a macrolactona saturada (ω -PDL). Para tanto, o material será polimerizado enzimaticamente, funcionalizado com uma molécula contendo tiol e copolimerizado/conjugado com uma molécula contendo fosfoéster. Desta forma, são objetivos específicos deste trabalho:

- a) Síntese de poli(ω -PDL) via polimerização enzimática por abertura de anel da macrolactona ω -PDL na presença da lipase Novozym 435 utilizando diferentes solventes, como diclorometano, clorofórmio e $scCO_2$;
- b) Avaliação da cinética de polimerização da ω -PDL em relação as diferentes variáveis do sistema (razão molar entre solvente e monômero, quantidade de água no meio reacional);
- c) Síntese de um monômero contendo grupamento fosfato para futura funcionalização dos poliésteres obtidos via e-ROP;
- d) Síntese de ω -PDL com grupamento funcional no final de sua cadeia, usando um iniciador que, além de hidroxila, contenha tiol em sua estrutura;
- e) Copolimerização/conjugação da ω -PDL funcionalizada com uma molécula que contenha grupamento fosfato;
- f) Caracterização dos materiais obtidos em relação a distribuição de massas molares (GPC), estrutura química (RMN) e propriedades térmicas (DSC);

- g) Avaliação da biocompatibilidade e biodegradabilidade dos copolímeros obtidos;
- h) Produção de *scaffolds* utilizando o material biocompatível obtido e sua avaliação em termos de viabilidade celular e degradação hidrolítica e enzimática.

1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO

Para facilitar a apresentação e compreensão, este trabalho foi estruturado em diferentes capítulos. Os procedimentos adotados, resultados, discussões e conclusões foram divididos por assunto, e cada tema é apresentado separadamente em capítulos. O Capítulo I faz uma breve introdução ao trabalho, enfatizando seus objetivos e ambientando o leitor ao assunto abordado. O Capítulo II traz uma revisão da literatura com relação aos poliésteres biodegradáveis, abordando a forma de produção dos mesmos, com destaque para a polimerização enzimática. A revisão ainda aborda o uso de fluidos pressurizados na polimerização por abertura de anel, a síntese de copolímeros a partir de ω -PDL, a síntese de polifosfoésteres e a produção de *scaffolds* poliméricos usando diferentes técnicas. No Capítulo III é descrita a polimerização enzimática por abertura de anel da ω -PDL em diferentes solventes. No Capítulo IV é abordada a polimerização enzimática por abertura de anel de ω -PDL utilizando dióxido de carbono supercrítico como solvente e diclorometano ou clorofórmio como cossolventes. O Capítulo V traz o estudo da síntese de copolímeros a partir da ω -PDL funcionalizada com tiol e conjugada com poli(tioéter-fosfoéster) e a preparação de *scaffolds*. As conclusões gerais são apresentadas no Capítulo VI, bem como algumas sugestões para trabalhos futuros que complementem o estudo. E, por último, são apresentadas as referências bibliográficas utilizadas ao longo do trabalho.

CAPÍTULO II

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste Capítulo será apresentada uma breve revisão da literatura acerca dos assuntos pertinentes a este trabalho. Primeiramente, serão apresentados os conceitos de polimerização de lactonas e macrolactonas, as principais rotas utilizadas, incluindo a polimerização enzimática. Também será mostrada uma discussão sobre a polimerização da ω -PDL e aplicação do polímero obtido. Por fim, são discutidas as informações referentes à funcionalização de macrolactonas e seu uso como materiais na área biomédica e farmacêutica.

2.1 POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS

Segundo a *American Society for Testing and Materials* (ASTM), biodegradável é o material “capaz de sofrer degradação em dióxido de carbono, metano, água, compostos inorgânicos ou biomassa no qual o mecanismo predominante é a ação enzimática de bactérias, fungos ou algas, que pode ser medida por testes padronizados, em um período especificado de tempo...”. (ASTM-D-883, 2011). Ainda, segundo Vert (2009), um polímero biorreabsorvível é um material polimérico sólido que pode se degradar, reduzindo seu tamanho, diminuindo sua massa molar e gerando compostos não tóxicos que podem ser excretados pelo organismo no qual estão inseridos sem o surgimento de efeitos colaterais.

Recentemente, muitos estudos surgiram tendo como objetivo aliar a biodegradabilidade de alguns polímeros, a seu uso na área biomédica e farmacêutica, produzindo materiais que possam ser utilizados para seus devidos fins e após seu uso sejam descartados ou excretados do organismo sem causar efeitos colaterais (OLIVEIRA et al., 2010; EATEMADI et al., 2016; BAUER et al., 2017; ELSAWY et al., 2017).

2.2 POLIÉSTERES BIODEGRADÁVEIS

Poliésteres são uma categoria de polímeros que contém grupos funcionais éster em sua cadeia polimérica principal. A fórmula química geral para a representação da estrutura de um poliéster pode ser resumida como $-(\text{COOR})_x-$, onde R representa diferentes grupos funcionais que trazem diferentes propriedades para os poliésteres finais. Por serem materiais bastante versáteis, poliésteres são normalmente utilizados para uma ampla gama de aplicações, como vestuário e decoração, embalagens

para alimentos e embalagens em geral, móveis estofados e tapetes, fibras de uso industrial, fios e cordas, reforços em pneus, material de isolamento, revestimentos e tintas, etc.

O conceito de poliéster biodegradável começou a ser encontrado na literatura a partir de 1930 (CAROTHERS; DOROUGH; VAN NATTA, 1932), com trabalhos relatando a síntese de poli(ácido láctico) (PLA) derivado do lactídeo, um éster cíclico composto por 6 carbonos. O material obtido, PLA é um poliéster alifático termoplástico, formado pela polimerização por condensação de ácido láctico, que geralmente é isolado de amido fermentado. Para que o monômero derivado de ácido láctico se torne passível de polimerização, duas moléculas de ácido láctico são submetidas a uma esterificação e são cataliticamente ciclizadas, formando um éster cíclico. Este éster, ao ser polimerizado conduz a formação de produtos de alta massa molar, mas que apresentam possibilidade de degradação hidrolítica e enzimática (MARIN; BRICENO; CABALLERO-GEORGE, 2013). Trabalhos recentes relatam que o PLA é um material interessante para uso como revestimento de embalagens de papel, sistemas de liberação de pesticidas e fertilizantes, embalagens para adubo e produtos de uso na agricultura (GARLOTTA, 2001; GUZMÁN-LAGUNES et al., 2012), mas o PLA também possui propriedades que o tornam atrativo para uso como material para liberação controlada de fármacos, compósitos implantáveis, peças e próteses para fixação óssea (MIDDLETON; TIPTON, 2000; SÖDERGÅRD; STOLT, 2002; RAQUEZ et al., 2013), pois estudos histológicos indicam que o PLA não é tóxico, não reage com tecidos celulares, é biodegradável e os produtos de degradação não são acumulados no organismo. PLA também é adequado para suturas, enxertos vasculares e outros implantes cirúrgicos (EFTHIMIADOU et al., 2012; ELSAWY et al., 2017; GHALIA; DAHMAN, 2017).

Outro poliéster considerado biodegradável, biocompatível e com muitos trabalhos na literatura relatando desde sua síntese até sua aplicação, inclusive com usos comerciais já estabelecidos é a poli(caprolactona). A poli(caprolactona) é um poliéster alifático, semicristalino, com um grau de cristalinidade variável, mas que pode chegar até 70 %, e suas propriedades físicas, químicas e de cristalinidade variam de acordo com sua massa molar (LABET; THIELEMANS, 2009; XU; CHEN; WU, 2018). A poli(caprolactona) é um material altamente solúvel em clorofórmio, diclorometano, benzeno e tolueno e, além disso, é miscível com muitos outros polímeros, como, por exemplo o poli(cloreto de vinila), poli(estireno-acrilonitrila), policarbonatos, nitrocelulose e também é mecanicamente compatível com polietileno,

polipropileno, borracha natural, poli(acetato de vinila), entre outros, característica que, aliada a biodegradabilidade, a torna excelente para uso como copolímero, aditivo para materiais poliméricos existentes e plastificante compatível com uma ampla gama de materiais (MIDDLETON; TIPTON, 2000). A poli(caprolactona) apresenta diferentes comportamentos de degradação e geralmente é degradada em um período de alguns meses até anos, dependendo da sua massa molar e grau de cristalinidade (VERT, 2009). Outro fato que torna a poli(caprolactona) um material versátil e com amplo uso nas indústrias química e farmacêutica é que este polímero pode ser facilmente obtido por diferentes métodos de síntese, como a policondensação e polimerização por abertura de anel, que pode ser catalisada por ácidos, bases, complexos metálicos e enzimas (LABET; THIELEMANS, 2009).

2.3 POLIMERIZAÇÃO POR ABERTURA DE ANEL

A rota de síntese tradicional para o preparo de poliésteres alifáticos é a policondensação de dióis com diácidos (ou diésteres) ou a policondensação de hidróxiácidos. Apesar do seu baixo custo e metodologia estabelecida, a policondensação direta apresenta várias desvantagens, como a necessidade de altas temperaturas, a remoção contínua de subprodutos (na maioria das vezes água), e longos tempos de reação, que favorecem reações laterais. Além disso, as massas molares dos materiais obtidos são geralmente inferiores a $30.000 \text{ g mol}^{-1}$, resultando em poliésteres com baixas propriedades mecânicas (RAQUEZ; COULEMBIER; BUBOIS, 2012).

Em contraste com as limitações da policondensação, a polimerização por abertura de anel (ROP) de ésteres cíclicos pode produzir poliésteres alifáticos de elevadas massas molares sob condições menos severas. A ROP é uma rota de síntese muito utilizada na indústria e pode ser conduzida via polimerização em massa, solução e miniemulsão, diversificando as opções de síntese e levando à obtenção de materiais com características controladas (MOHANTY; MISRA; HINRICHSEN, 2000; NUYKEN; PASK, 2013; PASCUAL; LEIZA; MECERREYES, 2013; SARAZIN; CARPENTIER, 2015). Muitos polímeros de grande importância industrial são produzidos através da ROP, por exemplo, policicloocteno, polinorborno, óxido de polietileno, polisiloxanos, polifosfazenos, polioximetileno (POM) e a maior parte dos dióis utilizados na síntese de poliuretanos, assim como Nylon 6 (poli-ε caprolactama) são também produzidos via ROP (NUYKEN; PASK, 2013).

Salvo algumas exceções, a ROP não resulta na eliminação de moléculas durante a polimerização (água, álcoois e ácidos, por exemplo), como ocorre tradicionalmente na policondensação e esse fato resulta em condições de polimerização mais fáceis de serem controladas e na produção de materiais com características definidas (DUBOIS; COULEMBIER; RAQUEZ, 2009). Além disso, uma grande quantidade de monômeros cíclicos, geralmente variando de 3 a 17 carbonos em sua estrutura principal, pode ser utilizada como base para a ROP, uma vez que diversos tipos de catalisadores e diferentes mecanismos reacionais podem ser utilizados para esse tipo de polimerização.

2.3.1 Polimerização radicalar por abertura de anel

A polimerização radicalar por abertura de anel (RROP) é especialmente utilizada para a produção de polímeros que possuam uma densidade muito parecida ou até menor que o monômero utilizado para esta reação (NUYKEN; PASK, 2013). Isto torna esse tipo de polimerização interessante para aplicações em que é desejável manter um volume constante durante a polimerização, tais como obturações dentárias, revestimentos e moldagem precisa de componentes elétricos e eletrônicos. A RROP oferece novas rotas para a síntese de poliésteres e policetonas usando monômeros vinílicos cíclicos. Além disso, a RROP é usada na produção de polímeros com grupos funcionais incorporados na cadeia principal, como éteres, ésteres, amidas e carbonatos (MORI; MASUDA; ENDO, 2006; NUYKEN; PASK, 2013). O mecanismo da RROP é baseado na dissociação homolítica que a estrutura cíclica do monômero sofre durante o processo de polimerização. Essa dissociação pode ocorrer de duas formas distintas: os grupamentos vinílicos terminais do monômero aceitam um radical, que será transformado em um radical de carbono estabilizado por grupos funcionais e isto conduzirá à geração de uma olefina interna, ou então, quando o grupo exo-metileno é o aceptor de radicais, a reação de abertura de anel irá formar uma ligação éster, e o radical produzido é estabilizado por um grupo fenila (DUBOIS; COULEMBIER; RAQUEZ, 2009). Esta é a principal técnica utilizada para a obtenção de poliésteres a partir de monômeros como o ciclobutano, ciclopropano e acetais cíclicos.

2.3.2 Polimerização catiônica por abertura de anel

A polimerização catiônica por abertura de anel (CROP) é característica por fazer uso de um iniciador catiônico e um anel

intermediário. Esta técnica é utilizada para a produção de vários polímeros com importância industrial, como, por exemplo, poliacetais, copolímeros de 1,3,5-trioxano e oxirano, politetrahidrofuranos, polissiloxanos, polímeros de etilenoimina e polifosfazenos (MOTOKUCHO; SUDO; ENDO, 2007). O mecanismo em que a CROP irá ocorrer depende do tipo de monômero e iniciador utilizado, mas geralmente envolve uma cadeia em crescimento, com um centro catiônico no final da cadeia que contribuirá para a formação de uma molécula via mecanismo S_N1 ou S_N2 . Os iniciadores mais utilizados são os eletrofílicos (ácidos, ácidos de Lewis, ésteres alquílicos, ácidos orgânicos fortes como sulfúrico e clorídrico) e os monômeros capazes de sofrer ROP catiônica devem possuir ligações polarizadas, em que um átomo ou grupo funcional possui um par de elétrons isolado que possa atuar como base de Lewis para reagir com o composto eletrofílico. O carbono reativo contido no monômero que irá se tornar um centro catiônico após a CROP, deve estar ligado a um grupo rico em elétrons. Desta forma, a CROP vai ser desencadeada por um ataque nucleofílico do grupo funcional do monômero sobre o iniciador eletrofílico. As espécies catiônicas resultantes, que têm uma estrutura cíclica, podem ser então atacadas por outro grupo funcional de outra molécula do monômero para prosseguir a CROP e formação do polímero.

2.3.3 Polimerização aniônica por abertura de anel

A polimerização por abertura de anel aniônica (AROP) é uma espécie de polimerização que utiliza reagentes nucleofílicos como iniciadores para a abertura do anel. Monômeros capazes de sofrer AROP possuem ligações polarizadas de ésteres, carbonatos, amida, uretano ou fosfato. Quando os monômeros têm anéis de 3 membros, a grande tensão do anel permite que este seja aberto aniônicamente. O grupo funcional polarizado em monômeros cíclicos é atacado pelas cargas do iniciador e o átomo de carbono se torna deficiente (doar) de elétrons devido à alta afinidade do átomo do grupamento funcional com a carga negativa. Assim, a AROP é desencadeada por um ataque nucleofílico do iniciador ao átomo de carbono, liberando assim um outro átomo atrelado ao carbono. A espécie nucleofílica recém-formada atacará o átomo de carbono em outra molécula do monômero, repetidamente formando o polímero (LABET; THIELEMANS, 2009).

Na AROP os nucleófilos mais comuns utilizados na iniciação são compostos organometálicos, amidas metálicas, alcóxidos, álcoois e água. A propagação ocorre através de um ataque nucleofílico de uma cadeia

previamente ativada a outra cadeia, ainda não aberta, propagando assim a polimerização. A terminação ocorre quando existe a transferência de cadeia entre as espécies ativadas e o monômero ainda não aberto, desta forma, os centros ativos de AROP, por exemplo, alcoolatos ou carboxilatos não se tornam apenas nucleofílicos, mas agem também como bases e podem abstrair prótons do monômero (NUYKEN; PASK, 2013).

2.3.4 Polimerização por abertura de anel via metátese

A polimerização por abertura de anel via metátese (MROP) ocorre principalmente por meio da formação de complexos de metal-carbeno. A formação do carbeno ocorre através de diferentes vias, podendo ser por interação com o solvente, com substituintes ou com co-catalisadores. Após a formação das espécies de metal-carbeno, o carbeno ataca a ligação dupla na estrutura do anel do monômero, formando um intermediário metalocíclico altamente tensionado. O anel, então se abre dando o início à cadeia polimérica: uma cadeia linear com dupla ligação com o metal e outra dupla ligação terminal. Um novo carbeno reagirá com a dupla ligação no próximo monômero, propagando assim a reação. A polimerização por abertura de anel via metátese é um tipo de reação em cadeia e pertence, juntamente com polimerizações com catalisadores Ziegler-Natta, ao conjunto de polimerização por transferência de grupos e poli inserções (DUBOIS; COULEMBIER; RAQUEZ, 2009). Este tipo de polimerização pode ser conduzido em meio homogêneo ou heterogêneo e faz uso de catalisadores a base de metais de transição, como Rutênio ou Molibdênio, geralmente carregados por ácidos de Lewis. Uma ampla variedade de materiais poliméricos comerciais, geralmente plásticos de engenharia e materiais de alto desempenho, é produzida por polimerização por abertura de anel via metátese, dentre eles: poli(norboreno), poli(ciclopenteno), poli(cicloocteno) e poli(ciclopentadieno) (WILBON; CHU; TANG, 2013; TEATOR; LASTOVICKOVA; BIELAWSKI, 2016).

2.3.5 Polimerização enzimática por abertura de anel

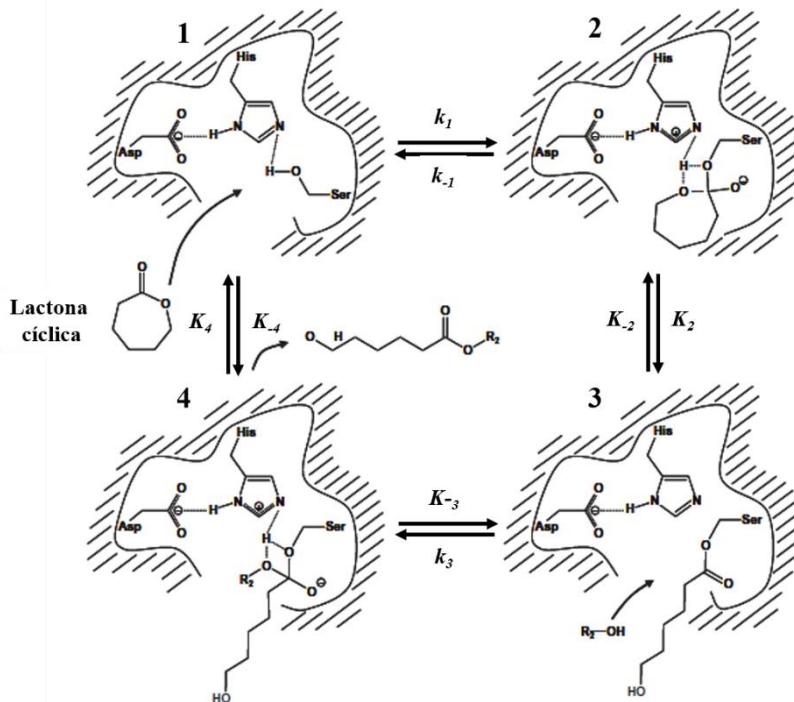
Enzimas são consideradas catalisadores biológicos e sua principal função é catalisar reações dentro de organismos animais ou vegetais (KOBAYASHI et al., 2001). Enzimas são tradicionalmente divididas em diferentes classes: oxido-redutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (GRISOLIA, 1965). Dentre a classe das hidrolases, as lipases são enzimas capazes de catalisar reações de hidrólise e

esterificação, normalmente em ambientes aquosos, e são utilizadas na natureza para a hidrólise de ácidos graxos. Quimicamente, lipases são enzimas ativas na interface água-lipídeo das células, podendo atuar tanto em reações de hidrólise como de condensação em meios orgânicos (DE GEUS, 2007).

Em meios orgânicos, lipases podem catalisar com eficiência a formação da ligação éster e por isso têm sido utilizadas extensivamente em sínteses de poliésteres via policondensação ou polimerização enzimática por abertura de anel (e-ROP) (DUBOIS; COULEMBIER; RAQUEZ, 2009). O mecanismo de polimerização enzimática por abertura de anel é uma forma de transesterificação e se baseia no fato de que o sítio ativo da lipase é formado por três aminoácidos: serina, histidina e aspartato, estabilizados eletronicamente. Durante a e-ROP, uma molécula com função éster sofre um ataque nucleofílico do grupo álcool primário da serina quando em contato com o sítio ativo da enzima, formando uma espécie intermediária, conhecida como primeiro estado de transição (TS-1). Após a entrada da molécula de monômero no sítio ativo da enzima, ocorre uma reação de transesterificação, onde um grupo alcóxi é liberado, formando um complexo ativado monômero-enzima que é o segundo estado de transição (TS-2). Subsequentemente, um nucleófilo pode atacar estas espécies ativadas monômero-enzima, e com a formação de novas espécies intermediárias, o produto final é liberado, regenerando assim a enzima (UYAMA; TAKEYA; KOBAYASHI, 1993; DE GEUS, 2007). Este nucleófilo pode ser água ou qualquer outra molécula pequena (tal como álcoois, tióis e aminas) (BISHT et al., 1997; THURECHT et al., 2006; TAKWA et al., 2008).

O esquema apresentado na Figura 1 mostra a representação dos mecanismos envolvidos entre o sítio ativo da lipase e a lactona durante o processo de polimerização enzimática por abertura de anel. Este mecanismo é também reportado por Johnson e colaboradores (2011) para a e-ROP da ϵ -caprolactona. A etapa 1 corresponde ao ataque nucleofílico do grupamento éster, proveniente da lactona cíclica, pelo grupamento álcool primário da serina, no sítio ativo da lipase. O grupamento alcóxi original é liberado pelas espécies intermediárias de enzima (etapa 2) originando espécies de monômero ativadas pela enzima (EAM), que podem ser visualizadas na etapa 3. Em seguida, um nucleófilo (água, álcool ou amina, por exemplo) pode atacar as espécies ativas formadas (EAM) por novas espécies intermediárias (etapa 4) sendo o produto liberado e o sítio ativo regenerado.

Figura 1: Representação esquemática dos mecanismos envolvidos entre o sítio ativo da lipase e a lactona ϵ -caprolactona durante a e-ROP.



Fonte: Adaptado de Heise e colaboradores (2009).

Na etapa de propagação, o complexo EAM é atacado nucleofilicamente pelo grupamento hidroxila terminal de um polímero em propagação para produzir a cadeia polimérica. As etapas de iniciação e propagação envolvem a desacilação da lipase.

A etapa determinante para a taxa da reação é a formação do complexo EAM, ou seja, a etapa de abertura do anel cíclico. Ainda, as reações de transesterificação devem ser consideradas, uma vez que a enzima não discrimina os grupamentos ésteres no monômero e nas cadeias poliméricas formadas (HEISE et al., 2009; YANG et al., 2011).

Os primeiros trabalhos relatando a síntese de poliésteres via e-ROP datam de 1993, quando Uyama, Takeya e Kobayashi (1993) realizaram a polimerização de ϵ -caprolactona catalisada por lipase de *Pseudomonas*

fluorescens, usando temperatura de 60 °C, por um período de 10 dias de reação. Os autores relataram a possível viabilidade de realizar este tipo de polimerização, uma vez que materiais com massas molares de até 3.700 g mol⁻¹ foram obtidos. Desde então, diversas lipases foram alvo de estudo para reações de polimerização, principalmente e-ROP.

Kobayashi e colaboradores (2001), apresentaram uma extensa revisão dos principais trabalhos que utilizaram lipases para reações de polimerização, envolvendo diferentes tipos de monômeros cíclicos, dentre eles lactonas como a β-propiolactona (anel com 4 membros), γ-butirolactona (anel com 5 membros), δ-valerolactona (anel com 6 membros), ε-caprolactona (anel de 7 membros), todas elas polimerizadas por diferentes lipases, como a lipase de *Candida antarctica*, *Candida rugosa* e de *Pseudomonas* sp.

Ao longo da última década, a maioria dos trabalhos que relatam a e-ROP de lactonas envolve o uso da enzima Novozym 435. A Novozym 435 é a fração B da lipase de *Candida antarctica*, comercialmente disponível, imobilizada em uma resina macroporosa reticulada de poli(metacrilato de metila), (Lewatit VP OC 1600, Bayer)(ZHANG et al., 2014). A Novozym 435 é produzida pela Novozymes S/A e é a enzima de maior aplicação em química orgânica, pois é um catalisador versátil, estável termicamente e possui atividade em ambiente aquoso e em vários solventes orgânicos (DE GEUS, 2007). Essa enzima tem sido aplicada com sucesso também na síntese de poliésteres derivados de macrolactonas, que são lactonas contendo 12 ou mais carbonos em sua estrutura principal (BISHT et al., 1997).

2.3.5.1 Polimerização enzimática por abertura de anel de macrolactonas

Macrolactonas, com anéis de 12 a 17 membros são comumente utilizadas na indústria cosmética e farmacêutica, como desodorantes, aromatizantes, xampus, entre outros (MCGINTY; LETIZIA; API, 2011b). Ao contrário de lactonas com anéis menores (3 a 8 membros), macrolactonas não apresentam grande tensão no anel, devido a conformação espacial do mesmo (COULEMBIER; DUBOIS, 2009).

A polimerização de lactonas com anéis menores utilizando catalisadores metálicos, ácidos ou básicos já é bem estabelecida na literatura. Por sua vez, a polimerização de macrolactonas utilizando catalisadores químicos convencionais gera somente materiais oligoméricos, de baixa massa molar e com baixos rendimentos (BISHT et al., 1997; COULEMBIER; DUBOIS, 2009).

Dentre as principais macrolactonas investigadas nos últimos anos, o 15-pentadecanolide ou ω -PDL vem recebendo atenção especial dos pesquisadores. A ω -PDL é constituída por 15 carbonos, distribuídos em uma cadeia alifática saturada (DE GEUS et al., 2010; MCGINTY; LETIZIA; API, 2011a).

A e-ROP de ω -PDL começou a ser estudada na década de 1990, quando Bisht e colaboradores (1997) realizaram a síntese enzimática de poli(ω -PDL) utilizando diferentes lipases (livres e imobilizadas em suportes porosos) como catalisadores e avaliaram qual das enzimas utilizadas foi mais eficiente na e-ROP. Os autores concluíram que o uso da lipase de *Pseudomonas* sp. resultou em maiores rendimentos e em polímeros com massas molares médias numéricas na faixa de 35.000 g mol⁻¹. Ainda, a mesma enzima, quando imobilizada pôde catalisar reações em temperaturas maiores (70 a 110 °C), resultando em materiais com rendimentos similares, mas com massas molares médias numéricas mais elevadas, em torno de 65.000 g mol⁻¹.

Namekawa e colaboradores (1998) também afirmaram que as macrolactonas possuem uma tensão no anel muito menor do que as lactonas, provavelmente devido ao favorecimento termodinâmico que o estado de transição do anel aberto possui sobre o anel fechado. Fazendo uso dessa vantagem, os autores realizaram a e-ROP em meio aquoso de várias lactonas e macrolactonas, incluindo a ω -PDL, utilizando lipases de *Pseudomonas cepacia* e de *Pseudomonas fluorescens* como catalisadores. Em meio aquoso, a polimerização de ω -PDL não se mostrou eficiente, gerando apenas oligômeros mesmo após 72 h de reação. Os autores apontam que o principal impedimento para que a e-ROP ocorresse em meio aquoso é o fato de que as enzimas utilizadas têm preferência por reações de hidrólise ao invés de abertura de anel, quando em meio aquoso.

A partir destes trabalhos iniciais, surgiram vários trabalhos realizando a polimerização enzimática por abertura de anel da ω -PDL, em massa (KUMAR et al., 2000), em solução (BISHT et al., 1997; KUMAR et al., 2000; KUMAR; GROSS, 2000; FOCARETE et al., 2001; VAN DER MEE et al., 2006; VAN DER MEULEN et al., 2008; SIMPSON; TAKWA; HULT, 2008; CAI et al., 2010; DE GEUS et al., 2010; KORZHIKOV et al., 2013; WILSON et al., 2015c; FERNÁNDEZ et al., 2015), em emulsão (PANLAWAN et al., 2013) e em miniemulsão (TADEN; ANTONIETTI; LANDFESTER, 2003; MÁLBERG; FINNE-WISTRAND; ALBERTSSON, 2010). É importante notar que a maioria dos trabalhos reporta a síntese de poli(ω -PDL) em solução, obtendo rendimentos geralmente maiores que 90 % e massas molares elevadas. Porém, apesar do apelo do uso de enzimas como catalisadores verdes e

que não deixam resíduos tóxicos nos materiais produzidos, todos os trabalhos que relatam a e-ROP de ω -PDL em solução utilizam tolueno como solvente.

O tolueno é um solvente orgânico, incolor e com odor característico. É um derivativo do benzeno, monossustituído, que consiste em um grupo CH_3 ligado a um grupo fenil (WIN-SHWE; FUJIMAKI, 2010). Uma possível explicação para a utilização de tolueno como solvente na e-ROP de ω -PDL é que as enzimas imobilizadas, normalmente utilizadas neste tipo de polimerização, têm uma temperatura ótima de ação em torno de 60 °C a 80 °C, geralmente acima da temperatura de ebulição da maioria dos solventes orgânicos, com exceção de tolueno, que tem uma temperatura de ebulição em torno de 111 °C. Os efeitos nocivos da exposição ao tolueno sobre o sistema nervoso central (KISHI et al., 1993; WIN-SHWE; FUJIMAKI, 2010) e disfunções cerebrais (DELEU D, 2000; WIN-SHWE; FUJIMAKI, 2010), aliados a dificuldade em remover completamente o solvente do polímero final (devido a sua alta temperatura de ebulição), tornam de grande necessidade encontrar um novo solvente, mais favorável, compatível com o uso de enzimas e que possa resultar em uma poli(ω -PDL) sem qualquer traço de solvente orgânico ou metal pesado em sua composição, visando seu uso para fins biomédicos e farmacêuticos.

2.3.5.2 Uso de fluidos pressurizados na e-ROP

Fluidos supercríticos são substâncias que se encontram em condições de temperatura e pressão acima dos seus valores críticos, passando a ter propriedades intermediárias entre um gás e um líquido (YEO; KIRAN, 2005; VENERAL, 2014). A principal vantagem do uso de um fluido supercrítico (FSC) como solvente é a combinação das propriedades das fases líquida e vapor que o FSC apresenta. Nas vizinhanças do ponto crítico o FSC possui massa específica próxima à do líquido, o que fortalece as suas propriedades de solvente. Por outro lado, a viscosidade, a difusividade e a tensão superficial apresentam valores próximos aos do estado gasoso, o que torna as propriedades de transporte desses fluidos bastante favoráveis, facilitando as transferências de massa entre reagentes e catalisadores.

Os fluidos supercríticos têm atraído o foco de muitas pesquisas como potenciais substitutos para solventes orgânicos convencionais, seja na extração de compostos (TOMASKO et al., 2003; COMIM et al., 2010), formação de micro e nanopartículas (REVERCHON; ADAMI, 2006; AGUIAR et al., 2016, 2017; DAL MAGRO et al., 2017) ou polimerização

utilizando fluidos supercríticos como solvente (LOEKER et al., 2004; THURECHT et al., 2006; KIRAN, 2016).

A maioria dos trabalhos encontrados até o momento na literatura, reportam o uso de dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) como solvente para a polimerização em meio supercrítico. Isso se deve ao fato de que o scCO₂ é um material barato, ambientalmente favorável, não tóxico, não inflamável e seus parâmetros críticos são facilmente obtidos ($T_c = 31^\circ\text{C}$, $P_c = 73,8 \text{ bar}$) (COMIM ROSSO et al., 2013).

O scCO₂ possui propriedades de transporte que podem acelerar a transferência de massa nas reações enzimáticas (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2000) e alguns trabalhos relatam que o uso de fluidos supercríticos, como o scCO₂, em uma etapa de pré-tratamento, pode melhorar a atividade enzimática e estabilidade da enzima em reações orgânicas (KUHN et al., 2011; MANERA et al., 2011). Além disso, o scCO₂ pode ser facilmente separado do produto final, simplesmente por despressurização do sistema, eliminando completamente traços do solvente.

Alguns trabalhos relatam a utilização de scCO₂ na e-ROP de lactonas. Loeker e colaboradores (2004) relataram pela primeira vez a síntese de poli(ϵ -caprolactona) via e-ROP em scCO₂, utilizando a enzima Novozym 435 como catalisador. Os autores obtiveram poli(ϵ -caprolactona) com massas molares (M_n) de 12.000 a 37.000 g mol⁻¹, dispersidade (\bar{D}) de 1,4 a 1,6 e rendimentos de até 98 % em 24 h de polimerização a 65 °C. Thurecht e colaboradores (2006) realizaram estudos cinéticos da e-ROP de ϵ -caprolactona em um reator de alta pressão, utilizando scCO₂ como solvente. Os autores obtiveram materiais com elevadas massas molares (até 50.000 g mol⁻¹, M_n), rendimentos em torno de 80 % e puderam concluir que a polimerização segue uma cinética de primeira ordem e as massas molares sofrem uma influência direta da quantidade de água no meio reacional. Adicionalmente, os autores concluíram que a cinética da e-ROP de ϵ -caprolactona em scCO₂ apresentou um comportamento similar a e-ROP em condições análogas, mas utilizando tolueno como solvente.

Mais recentemente, alguns autores também realizaram a e-ROP de ϵ -caprolactona utilizando scCO₂ como solvente, em diferentes tipos de reatores: de volume fixo, utilizando pressões de 150 até 200 bar, a 65 °C e com até 15 % de enzima (SANTOS et al., 2012), de volume variável, usando 3 % de enzima a 65 °C e 120 bar (COMIM ROSSO et al., 2013) e em reator contínuo de leito empacotado (ROSSO COMIM et al., 2015), podendo avaliar separadamente o efeito da concentração de enzima, da relação de monômero para scCO₂ e pressão do sistema. Apesar dos

resultados promissores apresentados nos trabalhos que realizaram e-ROP de ϵ -caprolactona em $scCO_2$, até o presente momento não foi possível encontrar na literatura aberta trabalhos que abrangessem a e-ROP de macrolactonas, como a ω -PDL, por exemplo, utilizando $scCO_2$ ou qualquer outro fluido supercrítico como solvente.

2.4 COPOLÍMEROS DE POLI(ω -PDL)

A poli(ω -PDL) é um poliéster linear e biocompatível, com temperatura de fusão de 95 °C, temperatura de transição vítrea em torno de -27 °C e cristalinidade em torno de 60 % (FOCARETE et al., 2001). As propriedades mecânicas e de cristalização da poli(ω -PDL) são similares às do polietileno linear de alta densidade (PEAD), porém com a vantagem de possuir ligações éster na sua cadeia polimérica, o que torna este polímero biodegradável, possibilitando seu uso em aplicações biomédicas e farmacêuticas (CAI et al., 2010). Entretanto, a hidrólise de poli(macrolactonas) de cadeia alifática é um processo bastante lento em função da elevada cristalinidade e alta hidrofobicidade destes materiais (VAN DER MEULEN et al., 2008; WILSON et al., 2015b). Contudo, os materiais obtidos podem ser copolimerizados e/ou funcionalizados com o intuito de reduzir sua cristalinidade e inserir grupos funcionais de interesse em sua superfície, melhorando o desempenho dos biomateriais e ampliando sua gama de aplicações.

Conhecendo as excelentes propriedades mecânicas da poli(ω -PDL) e sua afinidade pela polimerização enzimática, vários grupos de pesquisa começaram a realizar a copolimerização deste poliéster com o intuito de agregar propriedades interessantes a este material. Ademais, a copolimerização permite a mudança de parâmetros como hidrofiliicidade e cristalinidade, podendo ajustar o material obtido em termos de biodegradabilidade e biocompatibilidade.

Kumar e colaboradores (2000) realizaram um dos primeiros trabalhos buscando fazer uso da rápida cinética de polimerização enzimática da ω -PDL e conduziram a copolimerização de ϵ -caprolactona com ω -PDL, utilizando a enzima Novozym 435 como catalisador da polimerização em solução com tolueno como solvente. Os autores determinaram a conversão de cada um dos monômeros e investigaram a influência do controle cinético e termodinâmico na estrutura do copolímero. Os autores relataram que a copolimerização ocorreu a 70 °C com taxas de reação bastante elevadas e que a ω -PDL reagiu 13 vezes mais rápido do que a ϵ -caprolactona. Adicionalmente, a lipase Novozym 435 promoveu reações de transesterificação intermolecular, produzindo

um copolímero aleatório, com massas molares numéricas médias de até 22.000 g mol⁻¹ e dispersidade (\bar{D}) em torno de 2,0.

Em 2001, o mesmo grupo de pesquisa realizou a copolimerização de ω -PDL e trimetileno carbonato (um monômero que gera um policarbonato geralmente amorfo, muito utilizado com material biocompatível), catalisada por Novozym 435 e comparou a copolimerização enzimática com a copolimerização conduzida utilizando catalisadores organometálicos. Os autores concluíram que, ao contrário da copolimerização com catalisadores organometálicos, que demandou longos tempos de reação e altas temperaturas para gerar um copolímero em bloco, a polimerização catalisada por Novozym 435 ocorreu em condições mais brandas, gerando um copolímero aleatório, com 50 % em mol de cada um dos monômeros, M_n de até 19.000 g mol⁻¹, comprovando a habilidade da enzima de catalisar reações de transesterificação e transacilação entre as cadeias (KUMAR; GARG; GROSS, 2001).

O copolímero de ω -PDL com *p*-dioxano foi outro material que foi sintetizado enzimaticamente em condições brandas (80 °C e pressão ambiente), gerando copolímeros em bloco com excelentes propriedades térmicas, com massas molares ponderadas médias de até 30.000 g mol⁻¹ e rendimentos em massa de até 90 % para diferentes razões de ω -PDL e *p*-dioxano avaliados (JIANG et al., 2007). O mesmo material foi testado posteriormente frente a ensaios de biodegradação, biocompatibilidade e para a liberação controlada de fármacos. Experimentos *in vivo* utilizando camundongos mostraram que o copolímero é bem tolerado, gerando resultados similares àqueles obtidos para o homopolímero poli(*p*-dioxano). Os ensaios de biodegradação em condições fisiológicas, utilizando tampão fosfato, mostraram uma redução na massa molar em duas etapas, havendo uma degradação bastante rápida nos primeiros três dias de ensaio (atribuída à degradação das frações amorfas do copolímero), seguida de uma degradação mais lenta e uniforme nos 60 a 70 dias subsequentes (atribuída a degradação das frações cristalinas, menos acessíveis). Adicionalmente, os autores utilizaram duas formulações do copolímero, uma contendo 58 % e outra contendo 31 % em mol de ω -PDL, para sintetizar nanopartículas via técnica de emulsão óleo em água. O fármaco doxorrubicina foi encapsulado nas nanopartículas e sua liberação foi avaliada em condições fisiológicas, apresentando um perfil de liberação bifásico, com liberação de 30 a 40 % do fármaco no primeiro dia e 30 a 40 % nos 20 dias seguintes. Os autores também puderam verificar que quanto maior a fração molar de ω -PDL no copolímero, mais lenta foi a liberação do fármaco (LIU et al., 2011).

Recentemente, outros trabalhos foram publicados, realizando a copolimerização de ω -PDL com diferentes monômeros, como acrilatos ou derivados de estireno (PFLUGHAUPT et al., 2016), dietil succinato e 1,4-butanodiol (LIU et al., 2009; MAZZOCCHETTI; SCANDOLA; JIANG, 2009), ε -decalactona (FERNÁNDEZ et al., 2015), dialquil carbonato e 1,4-butanodiol (JIANG, 2011), δ -valerolactona, ε -caprolactona, η -caprilolactona e ω -dodecalactona (WILSON et al., 2015c), geralmente utilizando Novozym 435 como catalisador para essas copolimerizações e obtendo materiais com características físicas, de biodegradação e de liberação controlada de fármacos intermediárias às dos dois homopolímeros.

Outra característica encontrada por vários autores que realizaram a copolimerização de ω -PDL com diferentes monômeros é que copolímeros aleatórios de ω -PDL exibem alta cristalinidade, indiferente da composição do copolímero, mesmo quando monômeros altamente amorfos são utilizados. Essa característica tem relação com a orientação das estruturas cristalinas de cada homopolímero e é conhecida como sistema isodimórfico, uma vez que gera copolímeros com duas temperaturas de fusão diferentes (JIANG et al., 2007; LIU et al., 2009; MAZZOCCHETTI; SCANDOLA; JIANG, 2009).

2.5 FUNCIONALIZAÇÃO DA POLI(ω -PDL)

Poliésteres derivados de lactonas e macrolactonas são biocompatíveis e podem ter suas propriedades mecânicas facilmente ajustadas, possuindo assim amplo uso como biomateriais, por exemplo, em fios para sutura, engenharia de tecidos e liberação controlada de fármacos. No entanto, a poli(ω -PDL) é um poliéster de cadeia alifática, que possui alta cristalinidade e alta hidrofobicidade, o que dificulta muito o seu processo de biodegradação (VAN DER MEULEN et al., 2008; WILSON et al., 2015b).

Além da copolimerização, já referenciada no item anterior, outro método que pode ser utilizado para o ajuste das propriedades finais de poliésteres é a funcionalização destes materiais com outras moléculas de interesse. A funcionalização tem como objetivo melhorar as características físicas e químicas do material, incluindo viscosidade, solubilidade, hidrofiliabilidade, adesão a certos tipos de tecidos, além da capacidade de tornar as estruturas mais complexas para a síntese de novos materiais (TAKWA, 2008).

Existem dois tipos de polímeros funcionais, classificados dependendo da posição dos grupos funcionais: polímeros funcionalizados

com grupamentos pendentes (grupos funcionais enxertados como grupos laterais na cadeia de polímero) (YANG et al., 2013; ZHANG et al., 2013; CHEN et al., 2015) e polímeros com terminações funcionalizadas, também chamados de polímeros telequélcos (grupos funcionais ligados aos grupamentos finais do polímero) (GOETHALS, 1988; JEROME et al., 1991).

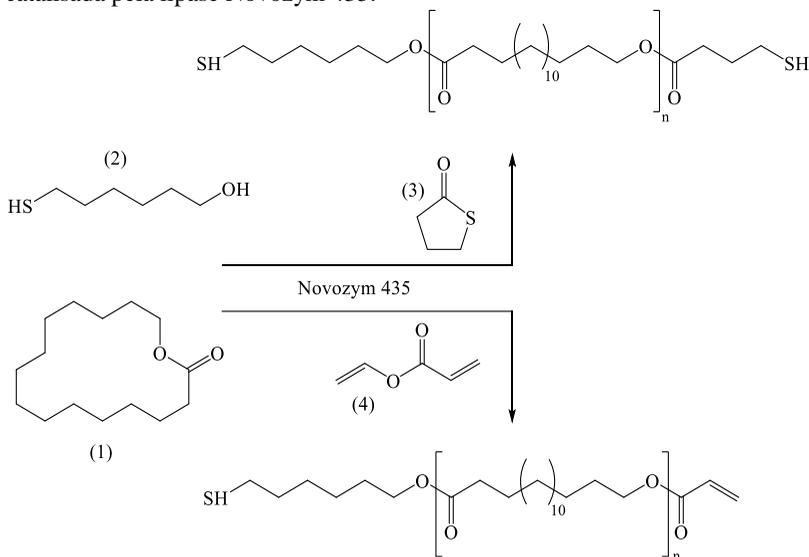
No caso de macrolactonas saturadas, como a ω -PDL, a funcionalização para a obtenção de um polímero ou oligômero telequélco pode ser realizada utilizando um iniciador funcional (nucleófilo que possua um grupamento funcional adicional, além da hidroxila, como tiol, amina, acrilato ou metacrilato, por exemplo), que iniciará a e-ROP da macrolactona em substituição a água utilizada usualmente. A hidroxila desse iniciador atacará o intermediário formado entre a enzima e a macrolactona, abrindo a molécula e, posteriormente, regenerando a enzima. Desta forma, a molécula da macrolactona ficará aberta e possuirá o nucleófilo ligado à sua extremidade. Posteriormente, o grupamento funcional do nucleófilo poderá reagir com outras moléculas de interesse, produzindo um novo material, a partir da poli(ω -PDL) funcionalizada (TAKWA et al., 2006; TAKWA, 2008).

Até o presente momento, poucos trabalhos que relatam a funcionalização da poli(ω -PDL) foram encontrados na literatura, confirmando, desta forma, que esse é um ramo pouco explorado na síntese e modificação de poliésteres provenientes de macrolactonas, mas que merece grande atenção, pois resulta em materiais com características excelentes a partir de reações relativamente simples.

Takwa e colaboradores (2006) relatam pela primeira vez a síntese de macromônmeros funcionais derivados de ω -PDL, utilizando um método em uma única etapa de reação, catalisada pela enzima Novozym 435, gerando materiais com grupamentos finais funcionalizados com grupos tiol-tiol ou tiol-acrilato. De uma forma geral, a e-ROP da ω -PDL (1) foi iniciada utilizando 6-mercaptop-1-hexanol (um tiol que contém uma hidroxila no final de sua cadeia) (2) em substituição a água da enzima (que foi previamente secada). Após 20 horas de reação, a e-ROP foi terminada utilizando γ -tiobutirlactona (3) ou acrilato de vinila (4), gerando um polímero funcionalizado em ambas extremidades, conforme apresentado na Figura 2. Os autores verificaram que quanto maior foi o tempo de secagem da enzima, maior foi a quantidade de cadeias iniciadas por 6-mercaptop-1-hexanol e quanto maior o tempo de terminação da e-ROP, maior foi o número de terminação funcional. Análises de ressonância magnética nuclear (RMN) mostraram que 97 % das cadeias foram iniciadas por 6-mercaptop-1-hexanol e, quando utilizada γ -

tiobutirilactona, 92 % das cadeias tiveram terminação funcional. Adicionalmente, os materiais sintetizados apresentaram valores de M_n de até 1.500 g mol^{-1} .

Figura 2: Representação esquemática da síntese de ω -PDL (1) funcionalizada com 6-mercaptop-1-hexanol (2) e γ -tiobutirilactona (3) ou acrilato de vinila (4), catalisada pela lipase Novozym 435.



Fonte: Adaptado de Takwa (2006).

Posteriormente, o macromonômero de ω -PDL funcionalizado utilizando 6-mercaptop-1-hexanol como iniciador e terminado utilizando γ -tiobutirilactona, foi aplicado na síntese de redes poliméricas semicristalinas, sintetizadas via reações tiol-eno (SIMPSON; TAKWA; HULT, 2008). Filmes poliméricos reticulados foram obtidos após a reticulação do macromonômero de ω -PDL com um monômero tetrafuncional a base de norboreno ou com um monômero trifuncional a base de éter dialílico de trimetilolpropano. Desta forma, os autores puderam avaliar a reatividade do macromonômero de ω -PDL e comparar as propriedades da rede polimérica resultante com materiais já existentes comercialmente. As redes poliméricas resultantes apresentaram diferentes graus de cristalinidade (29 a 43 %) e temperatura de fusão variando de 71 a 79 °C, enquanto que o macromonômero de ω -PDL funcionalizado apresentou uma cristalinidade de 64 % e temperatura de fusão de 86 °C. Como conclusão geral, os autores reportam a facilidade

da síntese do macromonômero e sua afinidade por reações do tipo tiol-eno, gerando materiais com alto rendimento e com propriedades físicas mais interessantes que os materiais já existentes comercialmente, tornando essas redes poliméricas excelentes candidatos para uso em fotolitografia, revestimentos biodegradáveis e materiais biomédicos como *scaffolds*, por exemplo.

Em outro trabalho, Takwa e colaboradores (2008), utilizaram 2-hidroxiethylmetacrilato (HEMA) como iniciador para a e-ROP de ω -PDL, obtendo poliésteres com diferentes estruturas e contendo nenhum, um ou dois grupamentos metacrilato no final da cadeia. Essa diferença encontrada nas estruturas obtidas se deve ao fato de que a enzima utilizada (Novozym 435) é capaz de clivar a ligação éster no grupamento HEMA dos poliésteres obtidos, resultando em dois principais mecanismos de transesterificação: transferência de cadeia entre os grupamentos metacrilato e transesterificação entre os grupamentos éster. Os resultados mostraram que iniciadores com grupos éster passíveis de clivagem possuem utilização limitada para a obtenção de macromonômeros funcionalizados. Essa dificuldade se dá devido ao processo de transesterificação catalisado pela enzima. Portanto, para evitar as reações de transesterificação, os tempos de reação devem ser curtos o que acarreta na geração de materiais com baixas massas molares e baixa conversão.

Além da copolimerização com outras lactonas, macrolactonas e compostos cíclicos, relatada no item anterior, a funcionalização da ω -PDL, relatada no presente item, é um método relativamente simples, que pode ser feito em uma única etapa, não exigindo etapas adicionais de purificação. Ainda, a funcionalização de macrolactonas utilizando um iniciador funcional em substituição a água é um método relativamente novo e pouco explorado, mas de grande potencial, pois permite, além da modificação das propriedades físicas e de biocompatibilidade da ω -PDL, a adição de grupos reativos ao final das suas cadeias (tióis, aminas, acrilatos ou grupos vinílicos, por exemplo), tornando possível sua copolimerização com outros materiais de interesse que não possam ser copolimerizados com a ω -PDL pela polimerização por abertura de anel.

2.6 REAÇÕES DE ADIÇÃO TIOL-ENO

No ano de 2001, Kolb e colaboradores descreveram um novo conceito para a condução de reações orgânicas que visam conectar duas ou mais moléculas, com altos rendimentos reacionais e formação de subprodutos inofensivos que podem ser removidos por métodos não-cromatográficos (KOLB et al., 2001). Estas características, aliadas a

possibilidade de síntese de moléculas funcionais e materiais orgânicos, condições simples de reação, materiais de partida de fácil acesso, exclusão de solvente do meio reacional ou uso de solventes atóxicos e facilidade de purificação do produto foram agrupadas para dar origem às reações *click*.

Reações de adição tiol-eno são consideradas reações *click* por atenderem diversos atributos desta classe de reações, como: altos rendimentos, rápidas taxas de reação, necessidade de pequenas concentrações de catalisadores (para reações de adição de *Michael*), reações em massa ou em solventes não-tóxicos, insensíveis ao oxigênio, produtos puros e uma alta gama de tióis e enos acessíveis.

Reações de adição tiol-eno possuem diversas vantagens em relação a reações tradicionais, uma vez que os produtos são formados rapidamente em atmosfera ambiente, geralmente são conduzidas via radicais livres, apresentam-se como um método simples, robusto e insensível à inibição por oxigênio e podem ser induzidas fotoquimicamente (ATES e HEISE, 2014). Além disso, durante a reação tiol-eno o átomo de hidrogênio é facilmente abstraído do grupo tiol devido à fraca ligação covalente enxofre-hidrogênio (S-H). A facilidade da quebra da ligação S-H independe do radical ligado ao átomo de enxofre. Após a quebra da ligação S-H, há a formação de radicais tiliil ($RS\cdot$), que podem ser facilmente adicionados a uma variedade de compostos insaturados - ligações C=C ricas ou pobres em elétrons - para formar novas ligações carbono-carbono. O sucesso da reação de adição depende de diversos fatores e, entre eles, pode se citar a posição das duplas -internas ou terminais-, mas, de uma forma geral, ligações duplas terminais reagem mais rapidamente com tióis do que ligações duplas internas (ROPER et al., 2004).

2.7 POLIFOSFOÉSTERES

Polifosfoésteres são materiais poliméricos que contêm ligações P-O-C em sua cadeia principal. Essas ligações fosfoéster são instáveis quando em meio aquoso o que torna esses materiais biodegradáveis (KRAICHEVA et al., 2014). Polifosfoésteres biodegradáveis têm sido investigados como biomateriais nas últimas duas décadas, inicialmente utilizados para a liberação controlada de fármacos e, mais recentemente, na liberação controlada de genes e em engenharia de tecidos (TIAN et al., 2012). No entanto, polifosfatos, polifosfonatos e polifosfitos, materiais que dão origem aos polifosfoésteres, vem sendo estudados há muito mais

tempo, mas para uso como materiais retardantes de chama (ZHAO et al., 2003b).

O uso de polifosfoésteres tem sido proposto para aplicações biomédicas devido sua potencial biodegradabilidade, biocompatibilidade e versatilidade química. Fazendo uso de diferentes estruturas, que podem ser incorporadas na cadeia principal do material, este pode ser biodegradado a subprodutos não tóxicos (LI et al., 2006). Além disso, polifosfoésteres são altamente versáteis e permitem a inserção de cadeias laterais e grupos terminais para adequar sua funcionalidade e solubilidade. Nenhum outro material polimérico possui essa elevada versatilidade, que se dá principalmente devido à capacidade de fósforo em formar triésteres e de interagir com cálcio. Ademais, a inserção de cadeias pendentes em polifosfoésteres gera materiais menos cristalinos e biodegradáveis enzimaticamente e hidroliticamente, tornando esses materiais interessantes para uso *in vivo* (ALEXANDRINO et al., 2014).

Recentemente, diversos grupos de pesquisa vêm explorando o potencial uso dos polifosfoésteres como materiais para a indústria médica e farmacêutica. Zhao e colaboradores (2003) realizaram um trabalho de revisão, focando na flexibilidade química e facilidade de adaptação das estruturas desses materiais. Os autores relataram que polifosfoésteres insolúveis em água, na forma de microesferas, são eficientes para a liberação controlada de fármacos quimioterápicos. Estudos pré-clínicos em animais e ensaios clínicos para câncer de ovário e de pulmão confirmaram a liberação controlada de agentes quimioterápicos. Os materiais produzidos mostraram uma cinética de biodegradação favorável e boa biocompatibilidade nos tecidos testados. No mesmo trabalho, os autores avaliaram uma família de polifosfoésteres solúveis em água, com cargas positivas nas ramificações laterais, gerando materiais catiônicos biodegradáveis, com grande flexibilidade no design molecular e potenciais para uso na liberação controlada de genes e DNA.

Li e colaboradores (2006) desenvolveram um hidrogel com cadeia principal de polifosfato e com ramificações conjugadas de polietileno glicol e acrilato. Diferentes macromônômeros foram sintetizados, variando as concentrações de acrilato. A toxicidade dos materiais foi estudada *in vitro*, bem como a taxa de degradação e propriedades mecânicas dos hidrogéis obtidos. Os autores também encapsularam células tronco ósseas nos hidrogéis e obtiveram resultados de viabilidade celular muito promissores.

Muitos outros trabalhos chamam a atenção para as excelentes propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade, semelhança estrutural com ácidos nucleicos e fácil funcionalização dos

polifosfoésteres quando comparados a outros poliésteres. Diversas metodologias e mecanismos para a síntese de polifosfoésteres e seus monômeros precursores têm sido estudadas, incluindo a ROP via metátese (MARSICO et al., 2012; DING et al., 2013), poliadição (KOSEVA et al., 2008), policondensação, transesterificação e polimerização enzimática (TIAN et al., 2012), produzindo polímeros versáteis, utilizados para a formação de micro e nanopartículas e para a encapsulação de fármacos, principalmente quimioterápicos (MARSICO et al., 2012; ALEXANDRINO et al., 2014) e avaliando suas propriedades mecânicas, antitumorais, de citotoxicidade e adesão a tecidos ósseos (ALEXANDRINO et al., 2014; KRAICHEVA et al., 2014).

Fazendo uso das propriedades de biodegradação e do potencial para condução de crescimento de tecidos ósseos dos polifosfoésteres, alinhados à facilidade de reação do fósforo pentavalente presente na estrutura desses polímeros, Yang e colaboradores (2009), realizaram a síntese de um copolímero em bloco de L-lactídeo com etileno fosfato. A escolha de um polifosfoéster foi primordial na copolimerização, uma vez que o poli(L-lactídeo) possui boas propriedades físicas e mecânicas, adequadas para a produção de *scaffolds*, porém sua superfície é inerte, não apresenta interação com ambientes celulares e é difícil de ser degradada, uma vez que o material é hidrofóbico. Assim, os autores sintetizaram um copolímero que apresentou capacidade de promover adesão e proliferação de células do tipo osteoblastos, favorecendo a deposição de cálcio mineral na superfície dos materiais sintetizados, pelo fato de que um dos produtos da degradação dos polifosfoésteres sintetizados é o ácido fosfórico, que dentro do organismo, atua na captação de íons de cálcio, auxiliando na formação de depósitos de cálcio do tipo hidroxiapatita. Assim, os autores afirmaram que os copolímeros sintetizados possuem grande potencial para uso em engenharia de tecidos, principalmente como *scaffolds*.

Baseado nos trabalhos existentes na literatura, que relatam a facilidade de síntese de ω -PDL funcionalizada, via método de iniciador, com as propriedades destacadas de biocompatibilidade, biodegradação, afinidade por tecidos ósseos e facilidade de interação com outras estruturas que os polifosfoésteres possuem, surge a demanda pela possível criação de um material que possa unir as propriedades físicas, mecânicas e de biocompatibilidade da poli(ω -PDL) com as propriedades de biodegradação e afinidade por tecidos celulares dos polifosfoésteres, produzindo um material de alto desempenho e com elevado potencial de aplicação para liberação controlada de fármacos ou em engenharia de

tecidos, como estruturas porosas ou semiporosas tridimensionais para a condução de crescimento de células.

2.8 USO DE SCAFFOLDS NA ENGENHARIA DE TECIDOS

Scaffolds são materiais porosos ou semiporosos que possuem propriedades desejáveis ao crescimento e interação com células de organismos vivos. As células de diferentes tipos de tecidos são “semeadas” nos poros desses materiais para a formação e regeneração do tecido nativo. *Scaffolds* têm a função de mimetizar a matriz extracelular do tecido nativo, proporcionando um ambiente adequado que permita a retenção de células, ligação e migração celular e ativação da difusão de nutrientes celulares (COSTA-PINTO; REIS; NEVES, 2011; DE OLIVEIRA et al., 2017). *Scaffolds* poliméricos tridimensionais porosos geralmente possuem uma rede de poros homogêneos interligados. Esses materiais têm sido utilizados especialmente para o crescimento de tecidos cartilagosos, ósseos e para a vascularização de órgãos. Sua rede porosa simula a arquitetura das matrizes extracelulares, permitindo que as células interajam efetivamente com o material polimérico (CHEN et al., 2005; SUN et al., 2014; DUQUE SÁNCHEZ et al., 2016).

Quando utilizados para regeneração de tecidos, os *scaffolds* podem ser classificados em dois tipos: os que induzem a migração e crescimento celular, provenientes de tecidos vizinhos, que, geralmente são introduzidos diretamente no paciente, sem uma cultura celular previamente implantada, necessitando desta forma, conter fatores de indução e proliferação para gerar atração e adesão celular para o tecido em questão ser reparado com eficiência (CHAN et al., 2009) e os carreadores, nos quais células específicas do tecido ou órgão em questão, são cultivadas *in vitro* sobre os *scaffolds* para então serem reinseridas no tecido desejado do receptor (OLIVEIRA et al., 2010; HU et al., 2014).

As propriedades mecânicas e de degradação dos *scaffolds* estão diretamente relacionadas com o material que os compõe. Assim, as interações biológicas, como adesão entre proteínas e peptídeos, adesão celular, migração, proliferação e diferenciação, são funções primárias das propriedades de superfície do material do qual o *scaffold* é fabricado (OLIVEIRA et al., 2010). Ainda, esses materiais devem possuir uma porosidade elevada e um tamanho adequado de poros para facilitar o crescimento e difusão celular ao longo de toda a sua estrutura tridimensional. A biodegradabilidade também é uma característica fundamental, uma vez que os *scaffolds* devem, preferencialmente, ser absorvidos pelo organismo sem a necessidade de remoção cirúrgica, os

produtos de sua degradação não podem ser tóxicos e a taxa em que a degradação ocorre deve coincidir com a velocidade de formação do novo tecido (AGRAWAL; RAY, 2001; COSTA-PINTO; REIS; NEVES, 2011).

Polímeros sintéticos biodegradáveis apresentam excelente viabilidade na produção de *scaffolds*, uma vez que as suas propriedades como porosidade, tempo de degradação e características mecânicas podem ser moldadas para aplicações específicas. *Scaffolds* derivados de polímeros sintéticos são normalmente mais viáveis comercialmente do que os produzidos a partir de polímeros naturais, pois podem ser produzidos em grande escala, com propriedades mais uniformes e apresentam uma vida útil maior, além disso, muitos polímeros sintéticos disponíveis comercialmente apresentam propriedades físico-químicas e mecânicas comparáveis às dos tecidos biológicos (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011).

Desde 1980, pesquisadores vem desenvolvendo diferentes técnicas para a fabricação de polímeros de arquiteturas complexas, que apresentam propriedades desejadas para aplicações específicas em engenharia de tecidos. *Scaffolds* típicos utilizados para a engenharia de tecidos incluem malhas poliméricas, fibras, esponjas e espumas. A técnica utilizada para a fabricação dos *scaffolds* depende majoritariamente das propriedades de volume e de superfície do material a ser utilizado como matéria-prima e a função proposta para o material final. A maioria das técnicas para a fabricação dessas estruturas tridimensionais envolve a aplicação de calor e pressão ou a dissolução do polímero em um solvente orgânico (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011).

Dentro das principais classes de *scaffolds* existentes, os mais utilizados são aqueles produzidos a partir de matrizes poliméricas tridimensionais porosas, principalmente os produzidos na forma de espuma sólida, os hidrogéis e os baseados em fibras e em microesferas poliméricas (JHON; ANDRADE, 1973; MORENO, 2014).

Existem diversas técnicas para a fabricação de *scaffolds* poliméricos, e geralmente a técnica escolhida para a fabricação do material é baseada nas propriedades do polímero matriz, como massa molar, cristalinidade, orientação da cadeia e rigidez. Algumas das principais técnicas para obtenção de *scaffolds* poliméricos são citadas a seguir.

2.8.1 Evaporação de solvente e lixiviação das partículas formadas

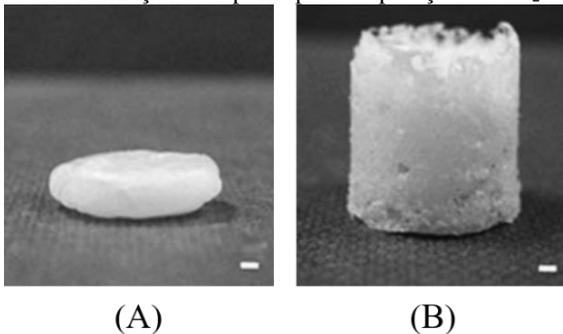
Essa técnica permite a formação de estruturas com porosidade regular, mas com espessura limitada. Inicialmente, o polímero é

dissolvido em solvente orgânico adequado. Em seguida, essa solução é injetada em um molde poroso, geralmente formado por algum sal inorgânico. Posteriormente, o solvente é evaporado e o sal inorgânico é lixiviado, restando a estrutura polimérica porosa (LIAO et al., 2002).

2.8.2 Formação de espumas pela saturação e evaporação de gás

A técnica de formação de espumas a partir de um gás contorna a necessidade do uso de um solvente orgânico. Para a formação do material, estruturas poliméricas em forma de disco são preparadas por técnicas de moldagem tradicional. Esses discos são expostos ao CO₂ ou outro gás sob alta pressão e o sistema é então despressurizado, formando a estrutura porosa. Durante este procedimento, os poros são formados pela ação das moléculas de gás que abandonam o polímero, resultando em uma estrutura do tipo esponja. Gualandi e colaboradores (2010) utilizaram esta técnica para a produção de *scaffolds* porosos a base de um copolímero aleatório de poli(ω -PDL-co- ϵ -caprolactona), obtendo um material altamente cristalino e com temperatura de fusão em torno de 82 °C. Conforme relatado pelos autores, os *scaffolds* apresentaram porosidades na faixa de 42 a 76% e um diâmetro de poros médio de 100 a 375 μ m, obtidos através do ajuste dos parâmetros durante o processo de formação de espuma. Adicionalmente, o estudo preliminar das propriedades mecânicas dos *scaffolds* revelou que os materiais possuem aplicação principalmente na regeneração de tecido cartilaginoso. A Figura 3 mostra o copolímero produzido antes e após o processo de formação de espuma pela evaporação de CO₂.

Figura 3: Copolímero aleatório de poli(ω -PDL-co- ϵ -caprolactona) antes (A) e após (B) o processo de formação de espuma pela evaporação de CO₂.

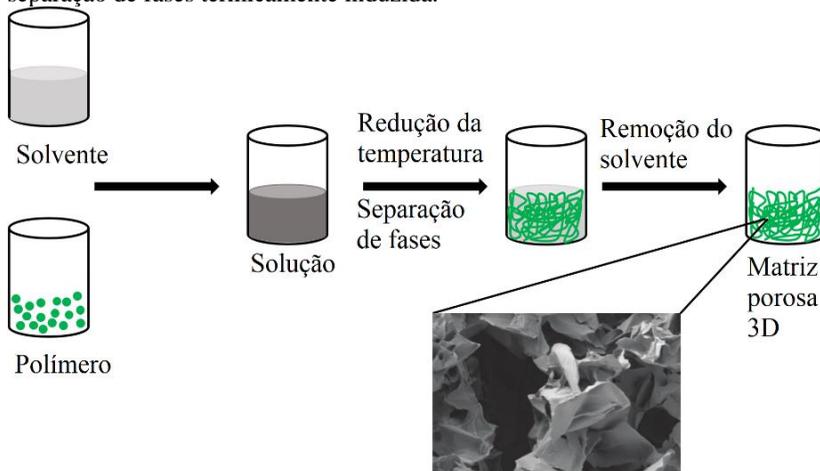


Fonte: Adaptado de Gualandi et al.(2010).

2.8.3 Separação de fases termicamente induzida (TIPS)

A técnica de separação de fases termicamente induzida requer o uso de um solvente com um baixo ponto de ebulição, que possa ser facilmente evaporado. O polímero é solubilizado nesse solvente em uma determinada temperatura e, em seguida, essa mistura é então resfriada e para a precipitação do polímero e secada, geralmente sob vácuo, para a retirada do solvente e formação da estrutura polimérica porosa. Korzhikov e colaboradores (2013) utilizaram a técnica de separação de fases termicamente induzida para produzir um *scaffold* de poli(ω -PDL) e poli(dioxano), com morfologia uniforme, poros interconectados e diâmetro de poros na faixa de 10 μm . A Figura 4 ilustra o esquema de formação de uma matriz porosa utilizando a técnica TIPS.

Figura 4: Formação de matriz porosa tridimensional utilizando a técnica de separação de fases termicamente induzida.



Fonte: Adaptado de Korzhikov et al. (2013).

2.8.4 Eletrofiação (*electrospinning*)

Dentre as técnicas utilizadas para a construção de biomateriais porosos tridimensionais a técnica de eletrofiação é a mais amplamente estudada e a que apresenta os resultados mais promissores em termos de aplicação. Embora a origem da eletrofiação seja datada de 1930, apenas no final do século 20, avanços notáveis em termos de instrumentação e

parâmetros de processo são relatados (BRAGHIROLI; STEFFENS; PRANKE, 2014).

Após os anos 2000, muitos trabalhos foram publicados explorando o potencial da técnica (AGARWAL; WENDORFF; GREINER, 2009; IMMICH et al., 2013, 2017; CHEN et al., 2017). Os motivos do crescente interesse pela técnica de eletrofiação são principalmente devido a facilidade de manuseio dos equipamentos utilizados, o baixo consumo de solução polimérica, a facilidade de controlar o diâmetro das fibras formadas, além de ser um processo rentável, simples e reprodutível, principalmente no que tange o aumento de escala (THENMOZHI et al., 2017). Além disso, a eletrofiação gera estruturas tridimensionais altamente porosas e com grande área superficial, que podem imitar as estruturas de matrizes extracelulares em termos de dimensões e química (dependendo da escolha do material) (AGARWAL; WENDORFF; GREINER, 2009), tornando portanto, estas estruturas excelentes candidatas para uso na engenharia de tecidos.

O processo de eletrofiação funciona pelo princípio da eletrostática. De um modo geral, um equipamento para eletrofiação é composto de uma seringa com uma agulha de metal (*spinneret*), uma placa metálica coletora, com carga oposta, uma fonte elétrica de alta voltagem e uma bomba para a injeção da solução (BRAGHIROLI; STEFFENS; PRANKE, 2014). A alta voltagem é necessária para criar um jato carregado eletricamente com solução de polímero para fora da agulha, sendo que um eletrodo é fixado a essa agulha e outro eletrodo é fixado ao coletor ligado ao aterramento.

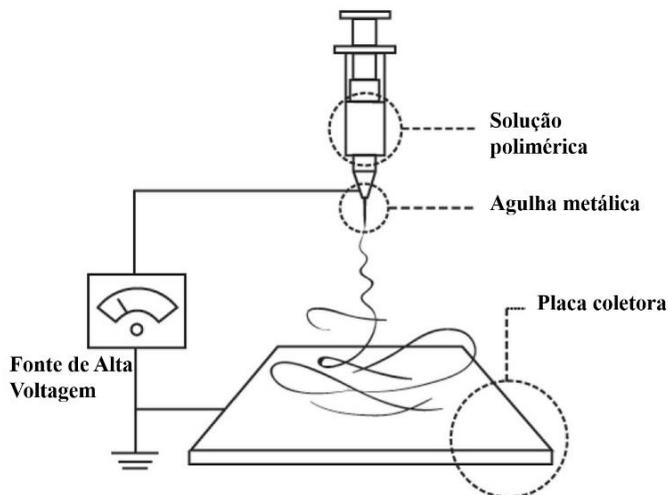
Essa tensão elétrica gerada pela fonte de alta voltagem provoca uma repulsão mútua de carga, causando uma contração das cargas superficiais, criando uma força diretamente proporcional à tensão superficial. À medida que a intensidade do campo elétrico é aumentada, a superfície do fluido na ponta do tubo capilar se alonga para formar uma forma cônica chamada “Cone de Taylor” (TAYLOR, 1969; HUAN et al., 2015). Após essa formação, jatos de solução são expelidos e vão de encontro a placa coletora, carregada com cargas opostas, formando filamentos sólidos, que são depositados na superfície de um coletor. Existem diferentes tipos de coletores, dentre eles, o de placas, coletor rotatório, coletor tipo grade, coletor de banho de água, coletor contínuo, entre outros (EATEMADI et al., 2016).

O solvente da solução polimérica evapora no seu caminho até o coletor e, no final do processo, filamentos sólidos contínuos são produzidos (AGARWAL; WENDORFF; GREINER, 2009; SUN et al., 2014). Geralmente, a extensão do fluido ocorre inicialmente através de

filamentos uniformes e, em seguida, esses filamentos lineares sofrem movimentos vigorosos de chicoteamento (*whipping*) e alongamento adicional do jato, que pode ou não ser acompanhado da ramificação e divisão do jato; solidificação do jato em micro/nanofibras e deposição no coletor (SUN et al., 2014).

É conveniente notar que forças gravitacionais não interferem no processo, pois a aceleração da formação de fibras é de até 600 m s^{-2} , o que é próximo a duas ordens de grandeza maior do que a aceleração das forças gravitacionais. Por isso, é possível formar fibras de cima para baixo, de baixo para cima ou em outras direções (GREINER; WENDORFF, 2007). A Figura 5 mostra um esquema simplificado de um equipamento de eletrofiação.

Figura 5: Esquema ilustrativo simplificado do processo de eletrofiação.



Fonte: Adaptado de Bhardwaj e Kundu (2010).

Embora o princípio de funcionamento da técnica de eletrofiação seja relativamente simples, existem diversos parâmetros que podem influenciar no formato, densidade, diâmetro e morfologia das fibras obtidas. Entre eles podemos citar:

a. Viscosidade da solução:

Geralmente, a viscosidade da solução está relacionada ao grau de emaranhamento das cadeias de polímero na solução. Quando a viscosidade da solução for muito baixa, poderá ocorrer a eletropulverização (formação de micro gotas) ao invés da formação de fibras. Além disso, em uma solução polimérica de baixa viscosidade, existem maiores chances de ocorrer a produção de fibras frisadas no lugar da formação de fibras lisas. Similarmente ao aumento da concentração da solução polimérica, a massa molar do polímero utilizado terá influência direta no entrelaçamento das cadeias poliméricas na solução, o que é necessário para manter a continuidade do jato durante o processo de eletrofiação (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011).

b. Tensão superficial:

A tensão superficial, desempenha um papel crítico no processo de eletrofiação, e é definida em função da composição dos solventes da solução polimérica. Geralmente, a alta tensão superficial de uma solução inibe o processo de eletrofiação por causa da instabilidade dos jatos e a geração de gotas pulverizadas, por sua vez, solventes com baixa tensão superficial facilitam a indução de um menor campo elétrico durante o processo de eletrofiação, levando a produção de fibras estáveis e sem a formação de defeitos do tipo contas ou grânulos (*beads*) (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Cabe, porém, ressaltar que uma tensão superficial mais baixa não será o único fator responsável pela formação de fibras com morfologia estável e sem a formação de *beads*, uma vez que a estabilidade das fibras geralmente é relacionada a uma combinação de fatores.

c. Condutividade elétrica

Quando uma diferença de potencial é aplicada a uma determinada solução, a intensidade da corrente será proporcional à quantidade de íons presentes. Geralmente, a condutividade elétrica da solução será determinada pelo tipo de polímero e solvente utilizados ou pela disponibilidade de sais ionizáveis na solução. De um modo geral, com o aumento da condutividade elétrica, haverá uma diminuição significativa no diâmetro das fibras obtidas, enquanto que, soluções com baixa condutividade resultarão em alongamento insuficiente do jato e produção de fibras disformes (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

d. Tensão aplicada

A aplicação de uma alta tensão, proveniente de uma fonte de alimentação, em uma solução fará com que a gota esférica se deforme, formando o cone de Taylor e conduzindo a formação de fibras quando a tensão crítica for atingida. Este valor de tensão crítica varia de polímero para polímero. Geralmente, um aumento na tensão irá favorecer a formação de fibras com diâmetro menor e esse fato pode ser atribuído a um maior estiramento da solução polimérica em conjunto com a maior repulsão de cargas dentro do jato formado. Porém, um aumento na tensão aplicada além do valor crítico resultará na formação de *beads* ou fibras frisadas (HAIDER; HAIDER; KANG, 2015).

e. Vazão

O controle sobre vazão de injeção da solução polimérica durante o processo de eletrofiação depende principalmente da volatilidade do solvente utilizado. Quando o polímero é dissolvido em um solvente altamente volátil, devem ser utilizadas vazões mais elevadas. No entanto, uma alta vazão deve ser acompanhada por uma tensão elevada, para garantir uma correta formação do cone de Taylor. Alguns trabalhos indicam que um aumento na vazão leva à formação de fibras mais espessas, devido à formulação de um jato mais espesso e que vazões elevadas podem levar a uma incompleta evaporação do solvente, formando fibras fundidas e achatadas, reduzindo a área superficial e modificando as propriedades mecânicas da estrutura porosa obtida (BHARDWAJ; KUNDU, 2010; PELIPENKO; KOCBEK; KRISTL, 2015). Além disso, uma distância mínima entre a agulha metálica e a placa coletora durante a eletrofiação é necessária para que as fibras produzidas tenham tempo suficiente para evaporar o solvente antes de atingir o coletor, caso contrário ocorrerá a formação de defeitos do tipo *beads* ou fibras fundidas/achatadas.

Além dos parâmetros citados acima, inerentes aos parâmetros da solução poliméricas e aos parâmetros de processamento, podem ainda ser citados os parâmetros ambientais, os quais incluem a umidade e temperatura ambiente, e que apresentam grande influência nas propriedades dos materiais porosos tridimensionais obtidos (HUAN et al., 2015).

Em face às técnicas para obtenção de *scaffolds* poliméricos porosos já referidas acima, muitas outras ainda merecem destaque, pois produzem estruturas de forma simples e com a possibilidade de ajuste das

características do material obtido. Entre elas, podemos citar a estereolitografia e impressão 3D (ELOMAA et al., 2011), lixiviamento de partículas e liofilização (AGRAWAL; RAY, 2001; LIAO et al., 2002).

2.9 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE

Os resultados promissores encontrados nos trabalhos publicados recentemente englobando a síntese de poliésteres alifáticos via e-ROP de lactonas e macrolactonas, os quais relatam a produção de materiais biocompatíveis, biodegradáveis, versáteis e com boas propriedades mecânicas, contribuem para o aumento do interesse em pesquisas na área de biomateriais, tanto para pesquisadores, quanto para as indústrias biomédica e farmacêutica. Estes atributos tornam os poliésteres alifáticos fortes candidatos para aplicações como dispositivos de suporte temporário (suturas e dispositivos de fixação óssea), barreira temporária (pele artificial), dispositivos de liberação controlada de fármacos (nano e micropartículas), engenharia de tecidos (*scaffolds*) e dispositivos multifuncionais (*stents* biodegradáveis) (ALBERTSSON; VARMA, 2003; MAHAPATRO; NEGRÓN, 2013).

Poliésteres alifáticos de poli(ω -PDL) têm sido mostrados como materiais com características mecânicas semelhantes às do polietileno de alta densidade, mas com a vantagem de ter um grupo éster na sua estrutura principal, que pode ser degradado via hidrólise ou via enzimática. Porém, alguns estudos mostram que, devido à sua alta cristalinidade e hidrofobicidade, esse material não pode ser degradado enzimaticamente ou hidroliticamente. Uma forma de aproveitar as excelentes características mecânicas da poli(ω -PDL) e torná-la mais biodegradável e compatível com tecidos celulares é realizar sua copolimerização com um monômero que contenha afinidade a tecidos celulares e que seja degradado facilmente quando em meio fisiológico.

Polifosfoésteres são materiais biodegradáveis, que vem recebendo grande atenção de pesquisadores devido a sua estrutura quimicamente versátil e que permite sua modificação ou funcionalização, tornando essa classe de polímeros fortes candidatos para uso na área médica e farmacêutica. Ainda, dentre as principais estruturas de regeneração de tecidos empregadas na biomedicina, *scaffolds* são estruturas tridimensionais que mimetizam tecidos extracelulares, favorecendo o crescimento e multiplicação celular, auxiliando na regeneração de tecidos danificados.

Nesta breve revisão, foram mostrados importantes resultados publicados na literatura relacionados diretamente com o tema deste

projeto de doutorado. No entanto, ainda existe um elevado número de parâmetros a serem explorados, principalmente no que diz respeito ao estudo e seleção das condições do processo de polimerização, permitindo a produção de materiais com características desejadas e a modificação das propriedades dos poliésteres alifáticos obtidos, visando melhorar suas características de biodegradação e hidrofiliabilidade.

A produção e estudo cada vez mais aprofundado de materiais poliméricos biodegradáveis e biocompatíveis tende a torná-los competitivos economicamente frente aos materiais poliméricos (não biodegradáveis) utilizados atualmente na indústria biomédica ou farmacêutica. Neste cenário, visando a ampla acessibilidade para tecnologias que supram a carência por materiais poliméricos biodegradáveis e/ou biorreabsorvíveis, ambientalmente corretos, justifica-se o estudo aprofundado dos fenômenos relacionados à síntese e funcionalização da poli(ω -PDL) via método de iniciador, utilizando um nucleófilo com um grupo funcional que possa futuramente realizar a copolimerização ou conjugação da poli(ω -PDL) com uma molécula de fosfoéster, visando a aplicação do copolímero formado na criação de estruturas poliméricas porosas tridimensionais que possuam características adequadas para uso no campo de engenharia de tecidos.

CAPÍTULO III

3 POLIMERIZAÇÃO ENZIMÁTICA POR ABERTURA DE ANEL DE ω -PDL EM DIFERENTES SOLVENTES UTILIZANDO UM REATOR DE VOLUME VARIÁVEL

A polimerização enzimática por abertura de anel (e-ROP) de ω -PDL é uma técnica promissora pois apresenta alto rendimento e uma rápida cinética reacional (BISHT et al., 1997; FERNÁNDEZ et al., 2015). No entanto, na maioria dos trabalhos encontrados até o momento na literatura, que realizam a e-ROP de ω -PDL em solução, usam tolueno como solvente (BISHT et al., 1997; VAN DER MEE et al., 2006; TAKWA et al., 2008; CAI et al., 2010; DE GEUS et al., 2010; KORZHIKOV et al., 2013; FERNÁNDEZ et al., 2015; WILSON et al., 2015c). Nenhum trabalho foi encontrado relatando sobre a síntese de poli(ω -PDL) utilizando um solvente menos tóxico ou mais ambientalmente favorável, e isso vai contra o uso de enzimas como catalisadores, uma vez que as enzimas são catalisadores que não deixam vestígios tóxicos no polímero final nem formam subprodutos tóxicos (KOBAYASHI; MAKINO, 2009).

Para permitir a utilização de solventes com pontos de ebulição inferiores a 70 °C na síntese de poli(ω -PDL), um aparato ou reator que mantenha o solvente na forma líquida, mesmo que a temperatura do meio reacional seja superior ao seu ponto de ebulição deve ser utilizado. Este tipo de reator, chamado reator de volume variável, é baseado em uma célula de equilíbrio para determinações de equilíbrio de fase (ROSSO COMIM et al., 2010) e faz uso de altas pressões para manter todo o solvente na fase líquida. Esse aparato já foi anteriormente utilizado para polimerização de ϵ -caprolactona (COMIM ROSSO et al., 2013). O reator possui um volume interno máximo de 27 mL, equipado com um pistão móvel para permitir controle de pressão e possui duas janelas de safira para observação visual do meio reacional. Assim, podem ser utilizadas pressões superiores à pressão de vapor dos solventes na temperatura de reação, uma vez que o pistão pressuriza o interior da célula, evitando a migração do solvente para sua forma gasosa (formação de *headspace*). Este sistema permite um controle preciso da pressão, temperatura e relação solvente/monômero durante a polimerização, evitando volumes mortos, normalmente produzidos por instrumentos ou dispositivos de amostragem.

Em vista disso, este estudo teve como objetivo investigar a vantagem de usar um reator pressurizado, de volume variável para

conduzir a e-ROP de ω -PDL a 70 °C usando diferentes tipos de solventes incluindo diclorometano (DCM) e clorofórmio e variando as proporções solvente/monômero. Estes últimos solventes são menos tóxicos do que o tolueno quando testados em camundongos (DL50 oral: 1600 mg kg⁻¹ e 695 mg kg⁻¹ para DCM e clorofórmio, respectivamente, em comparação com 636 mg kg⁻¹ para tolueno) (KHIGIENA, 1986), DCM apresenta melhores resultados ecotoxicológicos quando comparado ao tolueno (LC50 em peixes (96 horas): 310 mg L⁻¹ para DCM e 31,7 mg L⁻¹ para tolueno (ALEXANDER; MCCARTY; BARTLETT, 1978) e o clorofórmio possui dados de toxicidade dérmica mais baixos em coelhos do que tolueno (toxicidade dérmica LD50 > 20000 mg kg⁻¹ para clorofórmio e 12200 mg kg⁻¹ para tolueno) (JR. et al., 1969). Sendo assim, esta etapa inicial do trabalho relata pela primeira vez a síntese enzimática de poli(ω -PDL) via e-ROP em solução usando diclorometano e clorofórmio pressurizados como solventes.

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão descritos os reagentes e procedimentos adotados para a síntese de poli(ω -PDL) utilizando diferentes solventes em um reator de volume variável, bem como as técnicas utilizadas para a caracterização dos materiais obtidos.

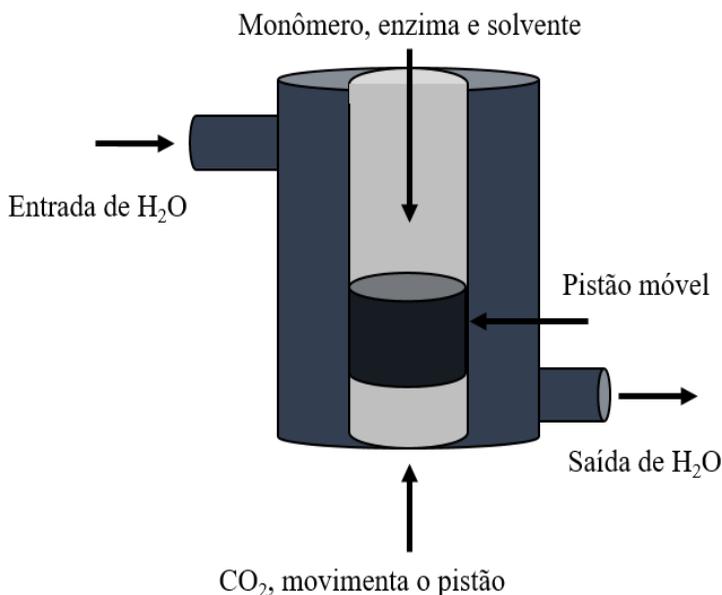
3.1.1 Materiais

O monômero utilizado, ω -PDL, foi adquirido da Sigma-Aldrich (98% de pureza), previamente seco a 100 °C em estufa a vácuo (0,1 bar, 48 h). O teor de água da ω -PDL foi medido pelo método de titulação por Karl-Fischer (Mettler Toledo, modelo DL 50, Columbus, EUA), resultando em uma quantidade de água de 0,56 ± 0,06 % em massa. A lipase imobilizada Novozym 435 (CALB, fração B da lipase comercial de *Candida Antarctica*, com atividade de esterificação de 28 U g⁻¹, medida de acordo com um procedimento adaptado de trabalhos anteriores (OLIVEIRA et al., 2006; CHIARADIA et al., 2016)) foi gentilmente doada pela Novozymes S/A, Brasil e anteriormente ao uso foi secada em uma estufa a vácuo (0,4 bar, 40 °C) por diferentes tempos. Diclorometano (DCM, 99,8%, Vetec Química), clorofórmio (99,8%, Panreac), tetrahidrofurano (THF, 99,0%, Vetec Química), tolueno (99,8%, Sigma-Aldrich) e n-hexano (99,0%, Vetec Química) foram utilizados como recebidos. O dióxido de carbono utilizado (99,9% de pureza) foi comprado da White Martins S/A, Brasil.

3.1.2 Procedimento geral para a polimerização enzimática por abertura de anel

As reações de polimerização enzimática foram conduzidas em um reator de alta pressão encamisado, de volume variável, similar a aquele utilizado em trabalhos conduzidos por Rosso e colaboradores (ROSSO et al., 2009; COMIM et al., 2010; ROSSO COMIM et al., 2010; COMIM ROSSO et al., 2013), conforme ilustrado na Figura 6.

Figura 6: Esquema representativo do reator de alta pressão e volume variável.

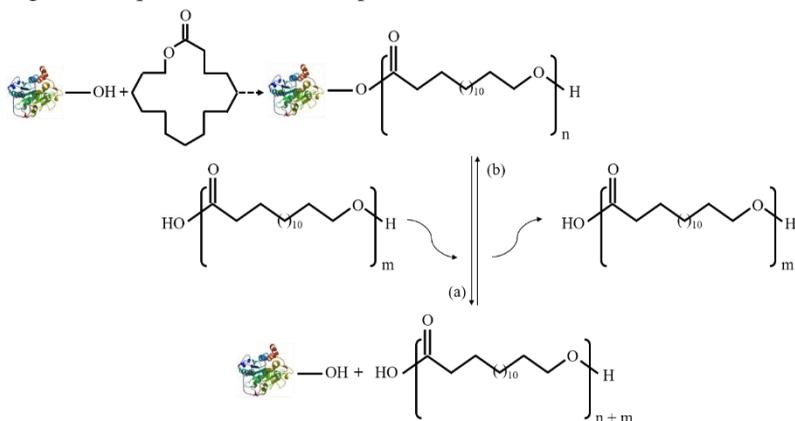


A agitação do meio reacional durante a polimerização foi fornecida por meio de uma barra de agitação magnética. A enzima Novozym 435 (0,4 g) previamente seca, o monômero ω -PDL (4,0 g) e o solvente (8,0 g) foram pesados em uma balança de precisão e adicionados ao interior do reator de volume variável, que foi imediatamente fechado. Para controle da temperatura reacional, água foi circulada na camisa do reator como fluido de aquecimento. Uma vez que a temperatura desejada foi atingida, com controle de ± 1 °C, a pressão na parte de trás do pistão do reator de volume variável foi aumentada pela injeção de CO₂ até que não houvessem mais bolhas de gás no meio reacional. Essa pressão

geralmente variou entre 18 a 20 bar. Após a estabilização da temperatura no interior e da pressão no fundo do reator (em torno de 10 minutos), o tempo de reação começou a ser contado. Após cada reação, a pressão no fundo do reator foi diminuída e o reator foi cuidadosamente aberto. As reações foram então terminadas pela adição de excesso de clorofórmio e retirada do catalisador enzimático por filtração (filtro de vidro poroso, de porosidade média). O resíduo do filtro foi lavado várias vezes com clorofórmio quente (40 °C) e os permeados combinados foram concentrados em estufa de convecção (60 °C). O polímero contido na fração permeada foi precipitado por adição de etanol frio. O precipitado foi isolado por filtração e seco em uma estufa de convecção (60 °C, 24 h). O rendimento da reação foi determinado por gravimetria (massa final de polímero em relação a massa de monômero utilizada na reação).

A Figura 7 mostra o mecanismo para a e-ROP de ω -PDL, resultando na macrolactona aberta e enzima regenerada (a) ou na hidrólise de uma macrolactona aberta anteriormente (b). Este mecanismo baseia-se na via cinética enzimática para a polimerização de lactonas e macrolactonas descrito por Johnson e colaboradores (2011) e a estrutura enzimática se baseia no modelo proposto por Uppenbergh e colaboradores (1994).

Figura 7: Esquema do mecanismo para a e-ROP da ω -PDL.



Fonte: Adaptado de Johnson et al. (2011) e Uppenbergh et al. (1994 b).

3.1.3 Determinação das massas molares

As massas molares dos materiais obtidos foram determinadas por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (LC 20A, Shimadzu) equipado com um detector de índice de refração (RID-10A), uma pré-coluna (PL gel, 5 μm MINIMIX-C guard, 50 por 4 mm, Agilent, EUA) e um conjunto de duas colunas de 250 por 4,6 mm em série (PL gel 5 μm Mini MIX-C, Agilent, USA). As massas molares foram calculadas em relação a padrões de poliestireno, em uma faixa de 580 a 3.000.000 g mol^{-1} . Clorofórmio foi utilizado como eluente a um fluxo de 0,3 mL min^{-1} . Previamente a análise, as amostras poliméricas foram dissolvidas em clorofórmio a 40 °C durante 12 horas e as soluções obtidas, com concentração de 0,5 % em massa foram filtradas (filtro de nylon, 0,450 μm) antes da injeção.

3.1.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As análises de calorimetria diferencial de varredura foram conduzidas no Laboratório de propriedades físicas dos alimentos (PROFI) do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos da UFSC. O equipamento utilizado foi o Perkin Elmer/Jade DSC (Intracooler SP), calibrado com padrões de índio e zinco. Para a análise dos resultados foi utilizado o software Pyris Series da Perkin Elmer. As medidas foram realizadas utilizando aproximadamente 9,0 mg de polímero seco. As amostras foram aquecidas inicialmente de -30 °C até 150 °C a uma taxa de aquecimento de 20 °C min^{-1} , sob atmosfera de N_2 a 20 mL min^{-1} , de modo a eliminar o histórico térmico. Em seguida, as amostras foram resfriadas a -30 °C a uma taxa de resfriamento de 20 °C min^{-1} , mantidas a esta temperatura durante 1 minuto e novamente aquecidas até 150 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} . A temperatura de fusão foi determinada a partir da segunda curva de aquecimento. A cristalinidade dos materiais poliméricos foi determinada utilizando a entalpia de fusão (ΔH_m) a partir da segunda curva de aquecimento.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.2.1 Polimerização em solução utilizando diferentes solventes

O uso do reator de volume variável possibilitou que as reações de polimerização enzimática fossem conduzidas a 70 °C, mesmo quando

foram utilizados solventes com temperatura de ebulição menores que essa temperatura. A pressão produzida pela injeção de CO₂ no fundo da célula foi suficiente para mover o pistão no interior da célula, comprimindo e aumentando a pressão no meio reacional (18 – 20 bar). Essa pressão atingida foi suficiente para evitar a formação de bolhas ou de *headspace* durante todo o tempo reacional. O uso do reator de volume variável pressurizado com CO₂ permitiu o uso de solventes que são amplamente utilizados em polimerizações enzimáticas em temperaturas inferiores a 70 °C, utilizando reatores convencionais, como, por exemplo, clorofórmio, diclorometano, THF e n-hexano (KUMAR; GROSS, 2000; LABET; THIELEMANS, 2009).

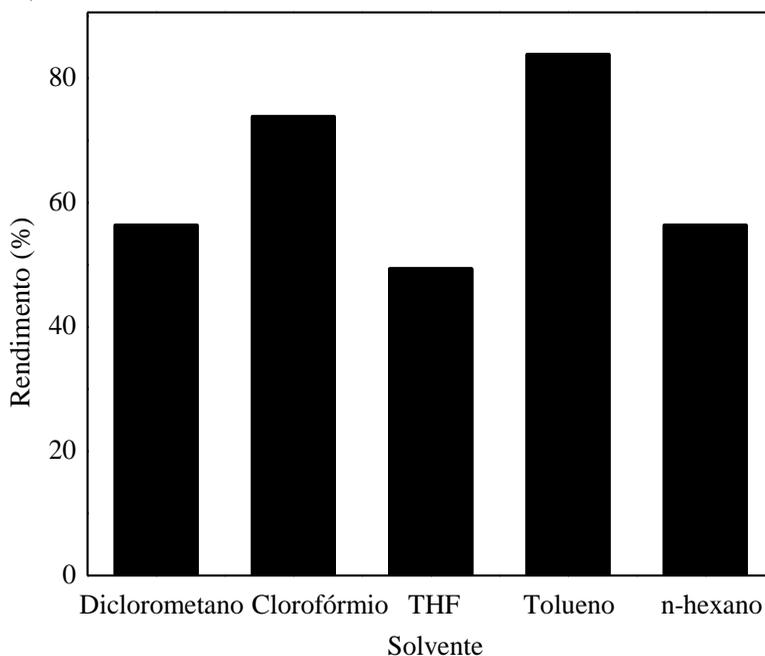
Inicialmente, esses cinco solventes foram utilizados com o intuito de determinar a influência do uso de diferentes tipos de solventes no rendimento da reação e nas características finais dos polímeros formados. As polimerizações em solução foram conduzidas mantendo sempre uma relação em massa de solvente para monômero de 2:1 e de enzima para monômero de 1:10, 70 °C e em duas horas de reação. Essas condições foram escolhidas com base nos resultados obtidos por outros grupos de pesquisa que realizaram a síntese de poli(ω -PDL) em solução utilizando tolueno como solvente (BISHT et al., 1997; VAN DER MEULEN et al., 2008).

Os rendimentos das polimerizações em solução utilizando diferentes solventes como meio reacional são mostrados na Figura 8, onde é possível observar que todas as polimerizações realizadas resultaram em rendimentos acima de 49 % em duas horas de reação. O maior rendimento, 84 %, foi obtido quando se usou tolueno como solvente. Este comportamento está de acordo com a literatura para a e-ROP em solução de ω -PDL, onde os autores realizaram a polimerização utilizando tolueno como solvente, em diferentes razões mássicas (sem solvente até 10:1), e a razão mássica de 2:1 (tolueno:monômero) resultou em um rendimento de 82% (KUMAR et al., 2000). Os rendimentos das polimerizações usando os demais solventes foram menores quando comparados com rendimento obtido quando se utilizou tolueno, mas não existem na literatura relatos da polimerização de ω -PDL utilizando solventes como o clorofórmio, diclorometano, THF e n-hexano até o presente momento, sendo assim, este é o primeiro trabalho a relatar a síntese de poli(ω -PDL) utilizando diferentes solventes.

As massas molares médias numérica e ponderada, M_n e M_w respectivamente, obtidas quando a poli(ω -PDL) foi produzida utilizando diferentes solventes a 70 °C em duas horas de reação são mostradas na Figura 9, onde pode ser observado que as maiores massas molares foram

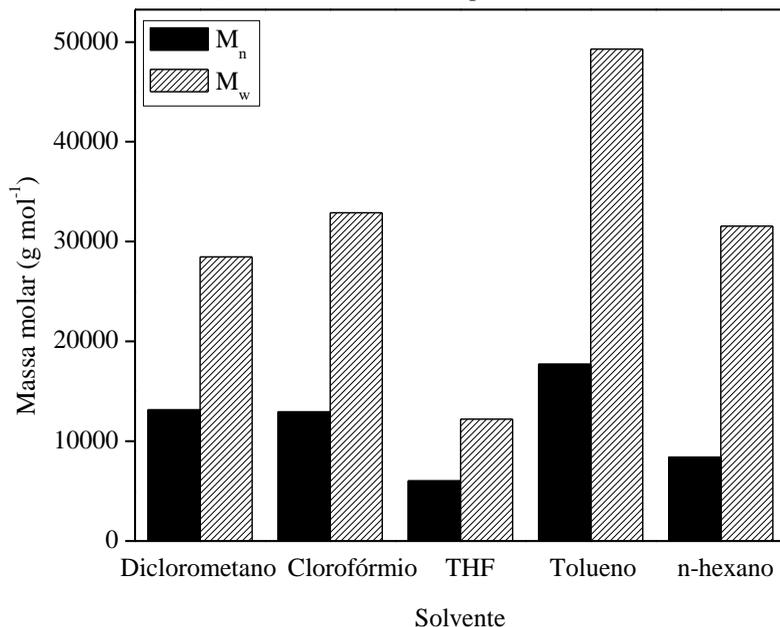
obtidas quando se usou tolueno como solvente ($M_n = 17.000 \text{ g mol}^{-1}$ e $M_w = 49.300 \text{ g mol}^{-1}$), cabe ressaltar que essa condição também resultou no maior rendimento. As massas molares estão de acordo com resultados de outros trabalhos encontrados na literatura, onde os autores obtiveram poli(ω -PDL) utilizando Novozym 435 como catalisador e tolueno como solvente (2:1 solvente para monômero, em massa) (KUMAR et al., 2000; KORZHIKOV et al., 2013).

Figura 8: Rendimentos das reações de e-ROP da ω -PDL a 70 °C após 2 h de reação em diferentes solventes (relação mássica de solvente para monômero = 2:1).



Quando THF e n-hexano foram utilizados como solventes, rendimentos menores e massas molares mais baixas foram obtidas em comparação às reações nas quais se usou tolueno. Esses resultados podem ser atribuídos a diferentes interações entre o solvente, a enzima e o monômero, afetando a velocidade de reação.

Figura 9: Massas molares médias numérica e ponderada (M_n e M_w) de poli(ω -PDL) obtida via e-ROP em solução a 70 °C em 2 h de reação, utilizando diferentes solventes (razão molar de solvente para monômero = 2:1).



Um fato que pôde ser observado quando se utilizou THF ou n-hexano como solventes, foi que com o decorrer da reação, o aumento da massa molar do material obtido levou a formação de regiões de maior viscosidade e formação de precipitados ou agregados poliméricos e a agitação do meio reacional parou completamente após 30 min de reação. Esse comportamento vem sendo relatado por alguns autores que apontam que após uma hora de reação a viscosidade do meio reacional é tão elevada a ponto de parar completamente a agitação, fornecida pelo agitador magnético (CAI et al., 2010), e este aumento na viscosidade pode reduzir a interação entre os nucleófilos e as cadeias abertas de ω -PDL com o sítio ativo da lipase, resultando em massas molares mais baixas e em uma menor conversão de monômero para polímero. Quando diclorometano e clorofórmio foram utilizados como solventes, o polímero formado permaneceu solúvel até o final da reação (2 h) e a agitação do meio reacional permaneceu constante, pois não houve a formação de precipitado polimérico.

Para estudar mais detalhadamente a polimerização da ω -PDL, dois solventes (diclorometano e clorofórmio) foram selecionados para avaliar a influência da quantidade de água no meio reacional sobre a massa molar e o rendimento das polimerizações. Estes solventes foram escolhidos devido ao menor ponto de ebulição em comparação com o tolueno, facilitando sua remoção do polímero formado. Além do tolueno, diclorometano e clorofórmio foram os solventes que resultaram em poli(ω -PDL) com maiores valores de massa molar (M_n e M_w) em 2 h de reação. Uma vez que outros autores relataram problemas tais como dificuldade de agitação, gradientes de temperatura e de transferência de massa, devido à elevada viscosidade do meio reacional conforme a massa molar da poli(ω -PDL) aumenta com o decorrer da reação (CAI et al., 2010; MEULEN et al., 2011; BOUYAHYI et al., 2012), clorofórmio foi escolhido como solvente pois é o único capaz de solubilizar completamente o polímero formado, conforme relatado em outros trabalhos na literatura (MAZZOCCHETTI; SCANDOLA; JIANG, 2009; DE GEUS et al., 2010; WILSON et al., 2015c). Por sua vez, diclorometano foi escolhido como solvente devido a sua elevada pressão de vapor (350 mmHg a 20 °C) e baixa temperatura de ebulição (39,6 °C), o que o torna um excelente solvente para a produção de materiais biodegradáveis, tais como *scaffolds* poliméricos (KEUN KWON; KIDOAKI; MATSUDA, 2005; XIE et al., 2009; ELOMAA et al., 2011), uma vez que o diclorometano pode ser facilmente separado do material obtido por um leve aumento na temperatura ou mesmo em temperatura ambiente sob vácuo.

3.2.2 Influência do teor de água no rendimento e massa molar da poli(ω -PDL)

Conforme já relatado na literatura (DE GEUS, 2007) em reações de esterificação e transesterificação, o sítio ativo de uma lipase é geralmente formado por uma tríade catalítica de aminoácidos que consiste em serina, histidina e aspartato, estabilizados eletronicamente. As moléculas com função éster sofrem um ataque nucleofílico do grupo álcool primário da serina no sítio ativo das lipases. Na e-ROP, ésteres cíclicos (lactonas) são usados como substrato e o anel cíclico é aberto pela enzima. Diversos autores (BISHT et al., 1997; LEE et al., 1998; MATSUMOTO; ODACHI; KONDO, 1999; DE GEUS et al., 2010) mencionam que a água, que está intrinsecamente ligada ao meio reacional, atua como um nucleófilo (iniciador) eficiente na polimerização enzimática. Assim, diferentes quantidades de água na enzima e no meio

reacional como um todo, tendem a influenciar a cinética de polimerização. Baseado nisso, e com o intuito de controlar a taxa de iniciação da polimerização, uma etapa prévia de secagem da enzima e do monômero foi realizada. Desta forma, o teor de água (% em massa) no monômero e na enzima antes e após o procedimento de secagem, foi obtido por análises em Karl Fischer realizadas pela Central de Análises do Departamento de Química da UFSC. Os teores de água, e as condições operacionais das secagens como: temperatura, pressão e tempo são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Condições de secagem para o monômero ω -PDL e para a enzima Novozym 435 (CALB) e resultados em termos de conteúdo final de água.

Amostra	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Conteúdo final de água (% em massa)
CAL-B	16	70	0,4	1,24
CAL-B	20	70	0,4	0,99
CAL-B	24	70	0,4	0,77
ω -PDL	48	100	0,1	0,56

Conteúdo de água na enzima CAL-B sem secar = 1,74 % em massa.

Conteúdo de água no monômero ω -PDL sem secar = 2,10 % em massa.

Com o objetivo de avaliar a influência da quantidade de água no meio reacional na e-ROP em solução de ω -PDL utilizando diclorometano e clorofórmio como solventes, as reações foram conduzidas no reator de volume variável a 70 °C utilizando o monômero previamente seco e enzima com diferentes conteúdos de água.

Como pode ser observado na Figura 10, utilizando diclorometano como solvente em uma razão mássica de 2:1 (solvente para monômero), a 70 °C em 2 h de reação, quando a quantidade de água da enzima foi reduzida de 1,74 % para 1,24 % (em massa), o rendimento de polimerização diminuiu de 85 % para 79 %. Novamente, quando a quantidade de água foi reduzida para 0,99 % e 0,77 %, o rendimento diminuiu para 70 % e 56 %, respectivamente. Um comportamento semelhante pode ser observado quando clorofórmio foi utilizado como solvente, apesar de uma maior redução no rendimento quando o teor de água foi reduzido de 0,99 % para 0,77 %, (72 % e 36 % de rendimento, respectivamente) Os resultados obtidos para o rendimento da e-ROP em solução estão de acordo com resultados descritos por outros grupos de pesquisa, em que a ω -PDL foi polimerizada em solução, utilizando tolueno como solvente a 70 °C, para os quais a redução do teor de água na enzima imobilizada de *Pseudomonas sp.* de 5,6 para 0,2 %, em três horas de reação, resultou numa diminuição no rendimento de 67 % para

10 %. Da mesma forma, quando utilizada a enzima não imobilizada de *Pseudomonas sp.* nas polimerizações com tempo reacional de 1 hora, a diminuição do teor de água de 0,5 % para 0,2 % diminuiu a conversão de monômero de 95 % para 35 % (BISHT et al., 1997; KORZHIKOV et al., 2013).

Figura 10: Rendimento das reações em função da quantidade de água na enzima (% em massa) para a e-ROP de ω -PDL em solução, utilizando diclorometano ou clorofórmio como solventes a 70 °C.

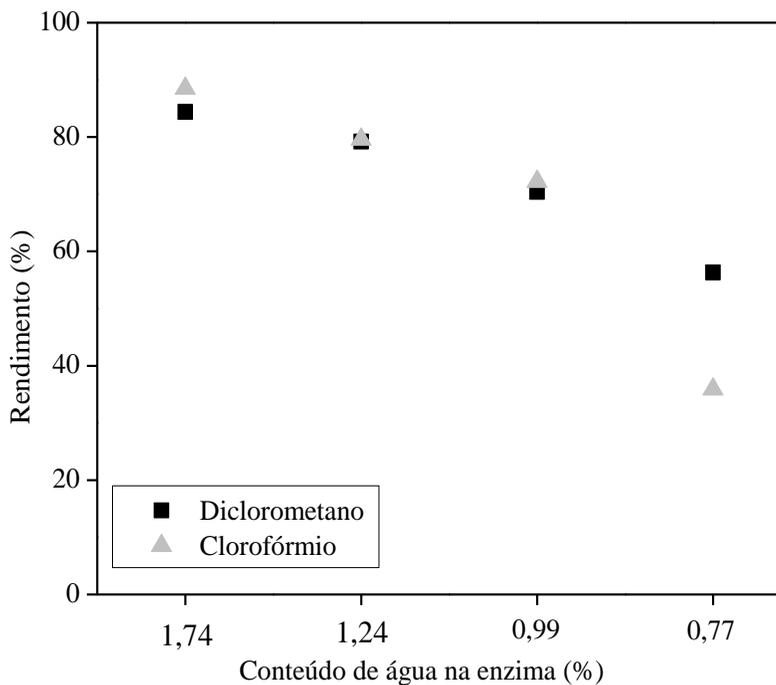
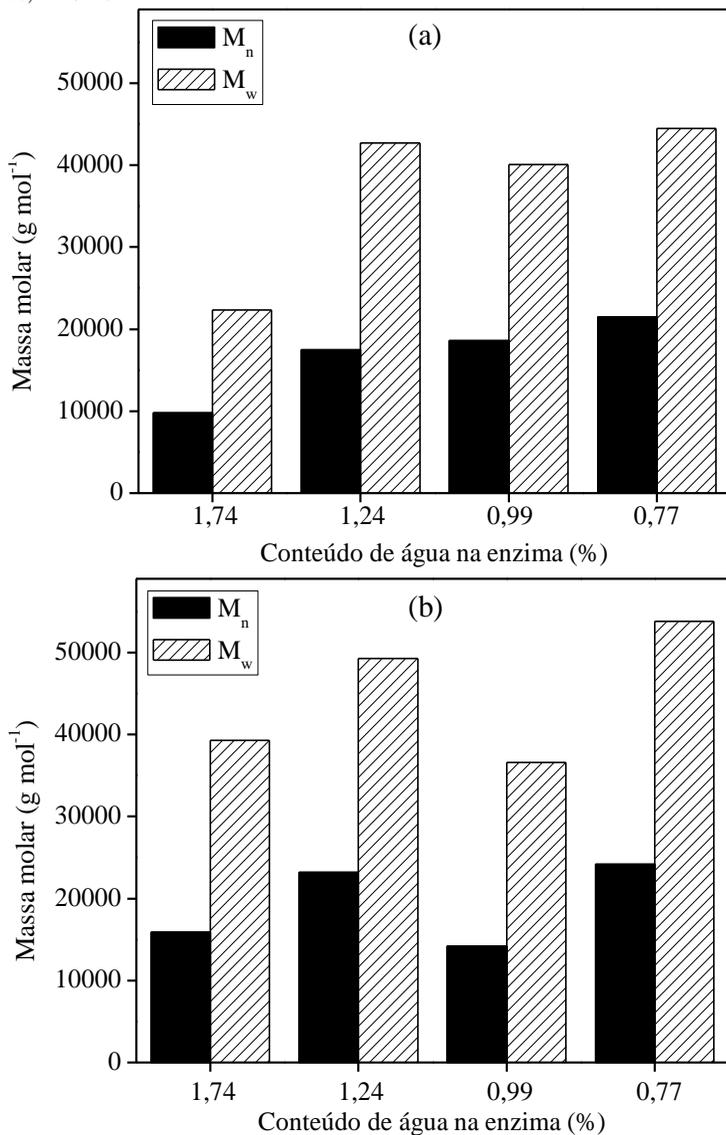


Figura 11: Massa molar média numérica e ponderada (M_n e M_w) de poli(ω -PDL) em função da quantidade mássica de água na enzima Novozym 435 durante a polimerização em solução utilizando diclorometano (a) ou clorofórmio (b) como solventes, a 70 °C.



O decréscimo na quantidade de cadeias de propagação durante a polimerização pode levar a um aumento na massa molar do produto formado. Desta forma, os resultados em termos de massa molar média numérica e ponderada, M_n e M_w , respectivamente, são mostrados na Figura 11, onde pode ser observado que, tanto quando diclorometano (a) ou quando clorofórmio (b) foram usados como solvente, reduzindo o conteúdo de água na enzima obteve-se poli(ω -PDL) de maior massa molar, porém esse aumento na massa molar não foi tão pronunciado em comparação com resultados obtidos por outros autores (BISHT et al., 1997). Quando diclorometano foi utilizado como solvente (razão mássica de 2:1 de solvente para monômero), a diminuição da quantidade de água da enzima de 1,74 % em massa para 1,24 %, levou a um aumento na massa molar de 9800 g mol^{-1} para $17.500 \text{ g mol}^{-1}$ (M_n). Diminuições no conteúdo de água da enzima para 0,99 % e 0,77 % levaram somente a leves aumentos na massa molar dos materiais obtidos.

Da mesma forma, quando clorofórmio foi utilizado como solvente, uma diminuição no conteúdo de água da enzima de 1,74 % em massa para 1,24 % resultou em um aumento em M_n de $15.900 \text{ g mol}^{-1}$ para $23.200 \text{ g mol}^{-1}$. Quando a quantidade de água na enzima foi novamente reduzida para 0,99 % uma diminuição na massa molar do polímero obtido foi encontrada e quando a reação foi conduzida utilizando a enzima com conteúdo de água de 0,77 % uma massa molar de $24.200 \text{ g mol}^{-1}$ foi encontrada. Bisht e colaboradores (1997) encontraram um comportamento similar quando realizaram a e-ROP de ω -PDL utilizando tolueno como solvente e enzima de *Pseudomonas sp.* não imobilizada como catalisador. Os autores puderam observar que reduzindo o conteúdo de água da enzima de 0,99 % para 0,50 %, houve um aumento na massa molar do polímero produzido de 6200 g mol^{-1} para 9300 g mol^{-1} . Os mesmos autores utilizaram também a enzima de *Pseudomonas sp.* imobilizada e quando o teor de água foi reduzido de 5,6 % para 0,3 % houve um aumento na massa molar numérica média de 9100 g mol^{-1} para $15.300 \text{ g mol}^{-1}$.

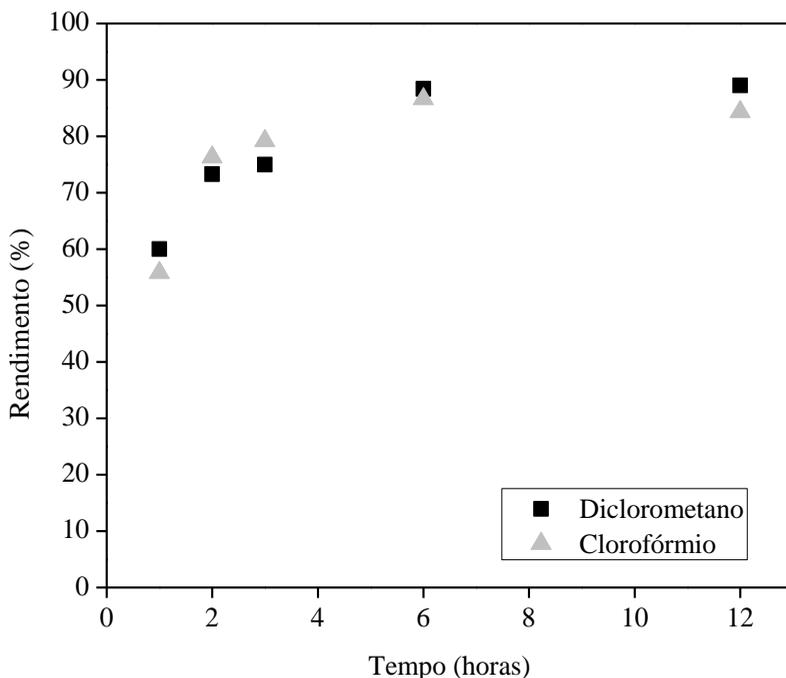
Com base nos resultados obtidos nesta etapa do trabalho, utilizando diclorometano e clorofórmio como solventes na e-ROP de ω -PDL, em duas horas de reação e também em resultados obtidos na literatura para as mesmas condições de reação, mas utilizando tolueno como solvente, um estudo cinético foi realizado, com o intuito de correlacionar o rendimento da reação e a massa molar da poli(ω -PDL) com o tempo de reação, levando em consideração que maiores tempos reacionais geralmente favorecem a formação de polímeros com massa

molar mais elevada, mas podem também favorecer reações secundárias, como a hidrólise das cadeias, gerando materiais de baixa massa molar.

3.2.3 Influência do tempo reacional no rendimento e na massa molar da poli(ω -PDL)

Para o estudo da influência do tempo reacional no rendimento e massa molar, poli(ω -PDL) foi sintetizada a 70 °C, com uma razão mássica de solvente para monômero de 2:1, utilizando como solvente diclorometano e clorofórmio, enzima e monômero previamente secos (0,77% e 0,56% em massa de água, respectivamente). Os resultados em termos de rendimento são mostrados na Figura 12.

Figura 12: Efeito do tempo reacional no rendimento (% em massa) para a e-ROP de ω -PDL em solução, utilizando diclorometano ou clorofórmio como solventes a 70 °C.

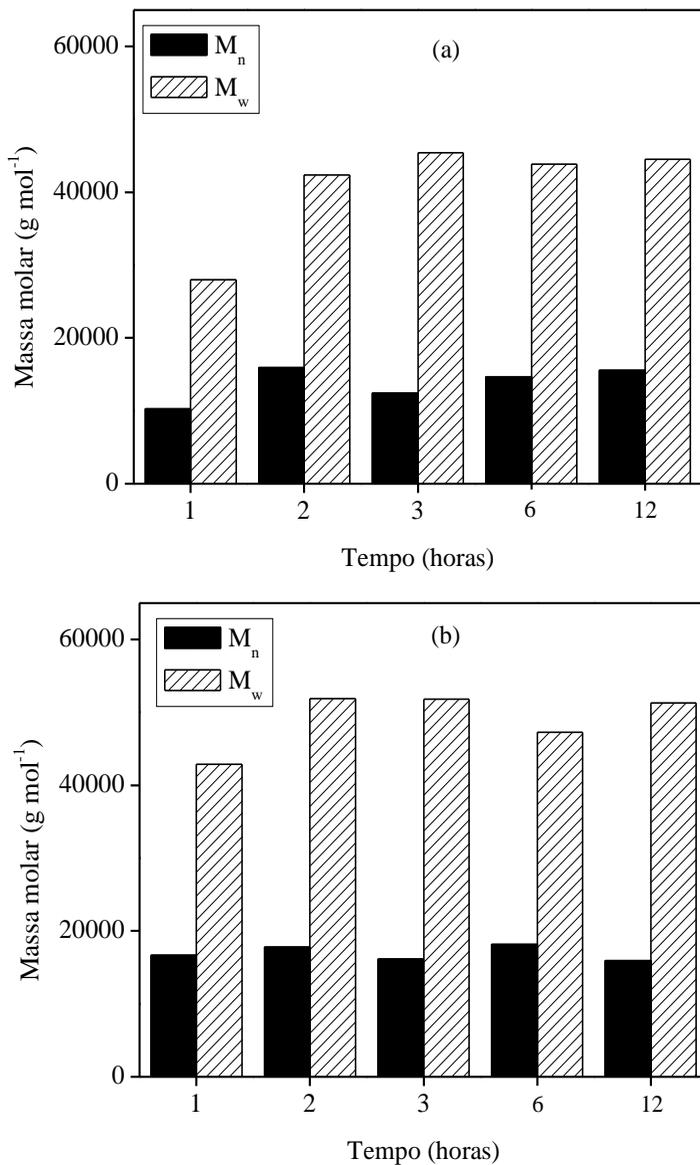


A Figura 12 mostra uma rápida cinética reacional, com rendimento em torno de 60 % em uma hora de reação quando diclorometano foi usado como solvente. O rendimento aumentou para 73 e 75 % em 2 e 3 horas de

reação, respectivamente. Com um novo aumento no tempo reacional para 6 horas de reação um rendimento de 88 % foi observado e em 12 horas de reação o rendimento se manteve estável. Estes resultados mostram que, sob estas condições de reação, utilizando diclorometano como solvente, o maior rendimento foi obtido em 6 horas de reação (cerca de 90%). Observou-se um comportamento semelhante quando clorofórmio foi usado como solvente. Rendimentos de 56 % em 1 hora de reação a 76 e 79 % em 2 e 3 horas de reação com um máximo de 87 % em 6 horas. Novamente, um aumento adicional no tempo reacional para 12 horas não levou a um aumento no rendimento.

Os resultados em termos de massa molar são mostrados na Figura 13, onde pode ser observado que quando diclorometano foi utilizado como solvente (Figura 13-a), os valores de M_n e M_w respectivamente foram de $10.200 \text{ g mol}^{-1}$ e $28.000 \text{ g mol}^{-1}$.

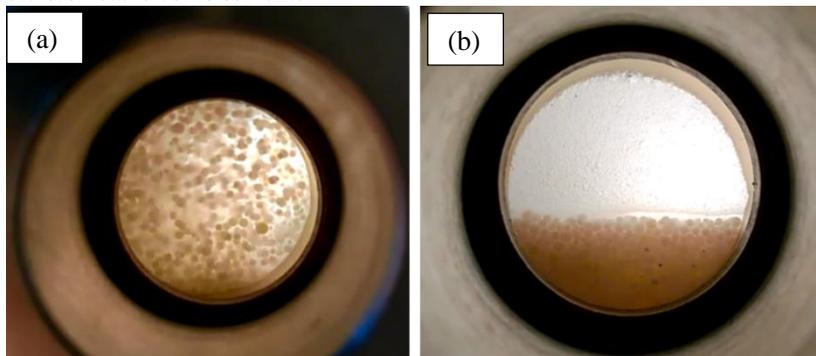
Figura 13: Massa molar média numérica e ponderada (M_n e M_w) da poli(ω -PDL) em função do tempo reacional para a e-ROP em solução, utilizando diclorometano (a) ou clorofórmio (b) como solventes a 70 °C.



Aumentando o tempo reacional para 2 horas de reação, M_n e M_w aumentaram para 15.950 e 42.350 g mol^{-1} . Estes valores estão de acordo com os obtidos por outros autores, que realizaram a e-ROP nas mesmas condições, porém utilizando tolueno como solvente (BISHT et al., 1997; KUMAR et al., 2000). Um aumento adicional no tempo de reação para 3, 6 e 12 horas não levou a um aumento pronunciado na massa molar. Isto pode ser explicado pelo fato de que em tempos mais elevados do que 2 horas, o polímero produzido formou agregados que, juntamente com a enzima precipitaram em torno do agitador magnético, parando a agitação. Alguns autores relatam que, em sistemas de polimerização de ω -PDL, a alta viscosidade do meio reacional aliada a agitação ineficiente pode aumentar a concentração de água na superfície da enzima, conduzindo a reações enzimáticas secundárias, como a hidrólise, por exemplo. Reações de hidrólise em poliésteres podem degradar a cadeia do polímero, gerando materiais de baixa massa molar e aumentando a dispersidade das amostras (DE GEUS et al., 2010).

Conforme já mencionado, o reator de volume variável possui duas janelas de safira, as quais possibilitam a visualização do meio reacional durante a reação, mesmo quando altas pressões são empregadas. A formação de um precipitado polimérico na parte inferior do reator pode ser verificada na Figura 14.

Figura 14: Vista interior do reator de volume variável no início da polimerização (a) e após 3 h de reação (b) para a e-ROP de ω -PDL a 70 °C utilizando diclorometano como solvente.



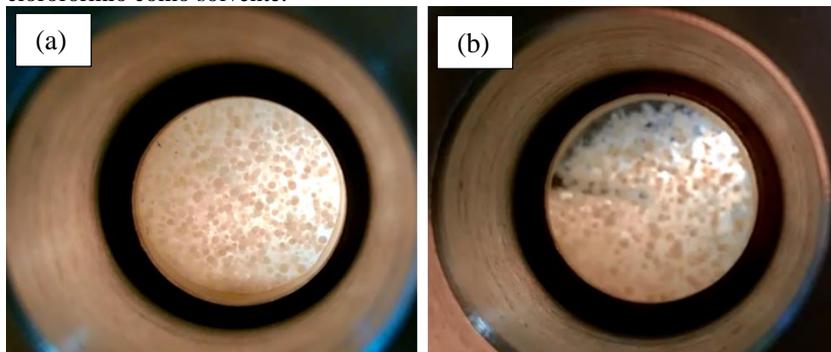
Na Figura 14-a, pode-se observar que no início da reação a 70 °C, utilizando diclorometano como solvente e 10 % de Novozym 435 previamente seca (0,77 % em massa de água), a agitação é eficiente e a enzima imobilizada está completamente dispersa no meio reacional. A

Figura 14-b mostra a mesma reação após 3 horas, onde pode ser observada a sedimentação do polímero e da enzima e a formação de agregados na parte inferior do reator, cessando completamente a agitação do sistema, fato que dificulta a transferência de massa e a solubilização do sistema reacional (polímero, monômero, solvente e H_2O).

Quando clorofórmio foi utilizado como solvente (Figura 13-b), as massas molares obtidas apresentaram valores mais elevados, mas mantiveram um comportamento semelhante ao observado quando diclorometano foi usado como solvente. Em 1 hora de reação, os valores de M_n e M_w obtidos foram de 16.700 e 42.900 $g\ mol^{-1}$, respectivamente. Após 2 horas de reação, aumentaram para 17.800 e 51.900 $g\ mol^{-1}$. Mais uma vez, tempos de reação mais longos não conduziram grandes diferenças de massa molar.

Nas polymerizações realizadas usando clorofórmio como solvente, a agitação fornecida pelo agitador magnético se tornou mais lenta após 2 horas de reação, devido ao possível aumento da viscosidade do meio reacional, mas, ao contrário do que foi observado quando diclorometano foi usado como solvente nas mesmas condições, a agitação não parou completamente. A Figura 15 mostra o início da reação, utilizando clorofórmio como solvente (15-a) e depois de 3 horas de reação (15-b). Este comportamento já era esperado uma vez que o clorofórmio foi o único solvente capaz de solubilizar poli(ω -PDL) após as etapas de purificação e secagem da mesma.

Figura 15: Vista interior do reator de volume variável no início da polymerização (a) e após 3 h de reação (b) para a e-ROP de ω -PDL a 70 °C utilizando clorofórmio como solvente.



3.2.4 Propriedades térmicas da poli(ω -PDL)

Para a realização das análises térmicas da poli(ω -PDL), as amostras com diferentes massas molares, foram produzidas utilizando diclorometano e clorofórmio como solventes (sempre em uma razão mássica de 2:1 (solvente para monômero)), 70 °C e 10 % de enzima Novozym 435 previamente seca (0,77 % em massa de água) em relação ao monômero. As amostras 1 e 3 foram produzidas em 1 hora de reação e as amostras 2 e 4 em duas horas. A Tabela 2 resume os resultados em termos de massa molar (M_n e M_w), entalpia de fusão (ΔH_m), temperatura de fusão (T_m) e cristalinidade (X_c). Pode ser observado que para as amostras sintetizadas utilizando diclorometano como solvente, com o aumento da massa molar de 28.000 para 42.350 g mol⁻¹ (M_w), a entalpia de fusão aumentou de 123,8 para 131,7 J g⁻¹. A temperatura de fusão das duas amostras não sofreu grandes variações com o aumento da massa molar e a cristalinidade calculada apresentou um leve aumento de 53,1 para 56,5 %. Um comportamento similar foi encontrado para as amostras produzidas utilizando clorofórmio como solvente, com todas as outras condições mantidas iguais. Quando a massa molar das amostras aumentou de 42.900 para 51.900 g mol⁻¹ (M_w) a entalpia de fusão aumentou de 117,8 para 126,7 J g⁻¹. Novamente, a temperatura de fusão não variou substancialmente e a cristalinidade do polímero aumentou de 50,5 para 54,4 %. Comparando as amostras 2 e 3, que apresentam valores de massa molar semelhantes, mas foram sintetizadas utilizando diclorometano ou clorofórmio como solventes, pode-se observar que a utilização deste último solvente resultou em um polímero ligeiramente menos cristalino.

Tabela 2: Propriedades térmicas da poli(ω -PDL) produzida via e-ROP em solução, utilizando diclorometano ou clorofórmio como solventes a 70 °C com diferentes valores de massa molar, obtidas da segunda curva de aquecimento via DSC.

Amostra	Solvente	M_n (g mol ⁻¹)	M_w (g mol ⁻¹)	ΔH_m (J g ⁻¹)	T_m (°C)	X_c (%) ^a
1	Diclorometano	10200	28000	123,8	94,2	53,1
2	Diclorometano	15950	42350	131,7	94,9	56,5
3	Clorofórmio	16700	42900	117,8	93,4	50,5
4	Clorofórmio	17800	51900	126,7	94,2	54,4

^a Calculado a partir de uma amostra 100 % cristalina da literatura (LEBEDEV; YEVESTROPOV, 1984).

Os resultados em termos de entalpia de fusão, temperatura de fusão e cristalinidade das amostras estão em concordância com resultados encontrados na literatura, para a poli(ω -PDL) produzida em massa ou em

solução utilizando tolueno como solvente, com massas molares na mesma faixa das obtidas no presente trabalho (FOCARETE et al., 2001; CAI et al., 2010). Na literatura, os autores relatam também que a poli(ω -PDL) possui uma temperatura de transição vítrea (T_g) em torno de $-27\text{ }^\circ\text{C}$, que não pode ser detectada pela análise de DSC, devido ao elevado grau de cristalinidade do polímero. A curva de resfriamento conduzida no equipamento não é rápida o suficiente para produzir uma fração considerável do polímero no estado amorfo e não pode ser descrita em uma curva de DSC (FOCARETE et al., 2001).

3.3 CONCLUSÕES

Polímeros produzidos a partir de monômeros renováveis, tais como as macrolactonas, vêm ganhando cada vez mais espaço na indústria e isso tem motivado o desenvolvimento de novos materiais e métodos para a produção de polímeros. Nesta etapa do presente trabalho, foi relatado pela primeira vez a e-ROP de ω -PDL utilizando diclorometano, clorofórmio, THF e n-hexano como solventes. O uso de um reator de volume variável tornou possível um controle preciso da pressão interna, temperatura e razão mássica de solvente e monômero durante as reações de polimerização, permitindo a utilização de uma pressão maior do que a pressão de vapor dos solventes na temperatura utilizada durante a polimerização, mantendo os mesmos em sua fase líquida.

As polimerizações realizadas utilizando diclorometano e clorofórmio como solventes apresentaram os melhores resultados em termos de rendimento e massa molar. Amostras de poli(ω -PDL) com massas molares numéricas médias de 28.000 g mol^{-1} até 42.350 g mol^{-1} foram obtidas quando se utilizou enzima com o menor teor de água (0,77 % em massa), resultando em rendimentos de 80 a 90% em massa, quando se utilizou diclorometano e clorofórmio como solventes, respectivamente. O estudo cinético mostrou uma taxa de polimerização enzimática rápida com elevadas massas molares, obtidas em 2 horas de reação.

Cabe ressaltar que os dados referentes a este capítulo foram publicados no periódico “*Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*”, volume 55, páginas 1219-1227, 2017.

CAPÍTULO IV

4 POLIMERIZAÇÃO ENZIMÁTICA POR ABERTURA DE ANEL DE ω -PDL UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

Ao longo dos últimos anos, a polimerização de macrolactonas tem sido intensamente estudada como um novo método para a síntese de poliésteres biodegradáveis (BISHT et al., 1997; JIANG et al., 2007; COULEMBIER; DUBOIS, 2009; CAI et al., 2010; MEULEN et al., 2011; PANLAWAN et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2017). A e-ROP de macrolactonas pode ser conduzida utilizando diferentes catalisadores, tais como catalisadores orgânicos, organometálicos e enzimáticos. O uso de enzimas como biocatalisadores nas polimerizações é uma técnica promissora, uma vez que as enzimas são consideradas biocatalisadores e a reação enzimática geralmente ocorre sob condições brandas de reação resultando em produtos sem vestígios de catalisadores metálicos tóxicos (KOBAYASHI et al., 2001; VAN DER MEULEN et al., 2008; KOBAYASHI, 2010).

Como pontuado nos capítulos anteriores, a grande maioria dos trabalhos relacionados na literatura relataram o uso de tolueno solvente na e-ROP de lactonas e macrolactonas (BISHT et al., 1997; KUMAR et al., 2000; VAN DER MEE et al., 2006; SIMPSON; TAKWA; HULT, 2008; VAN DER MEULEN et al., 2008; MAZZOCCHETTI; SCANDOLA; JIANG, 2009; CAI et al., 2010; DE GEUS et al., 2010; KORZHIKOV et al., 2013; WILSON et al., 2015c; FERNÁNDEZ et al., 2015). Isso pode ser explicado pelo fato de que, em geral, a polimerização enzimática usando Novozym 435 é realizada em temperaturas que variam de 60 a 80 °C (MEI; KUMAR; GROSS, 2003), que são maiores que os pontos de ebulição da maioria dos solventes orgânicos, enquanto que a temperatura de ebulição do tolueno é acima de 110 °C (sob condições normais de temperatura e pressão - CNTP).

O dióxido de carbono supercrítico ($scCO_2$) vem se mostrando como um forte substituto para diversos tipos de solventes nas mais variadas condições reacionais. O $scCO_2$ é um solvente de baixo custo, não tóxico e não inflamável que apresenta propriedades de transporte que podem acelerar a transferência de massa em reações enzimáticas (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2000; COMIM ROSSO et al., 2013), ainda, alguns trabalhos apontam que o uso de fluidos supercríticos, como o $scCO_2$, pode melhorar a atividade enzimática e a estabilidade enzimática após um pré-tratamento antes da reação (KUHN et al., 2011; MANERA

et al., 2011). Além disso, o scCO_2 pode ser facilmente separado do produto final, simplesmente por despressurização do sistema.

Nesta etapa do trabalho, para a e-ROP de ω -PDL, juntamente com o scCO_2 como solvente, dois diferentes cossolventes (diclorometano e clorofórmio) foram estudados, visando melhorar a solubilização do sistema, reduzindo as pressões necessárias e a viscosidade do meio reacional. Ambos os solventes foram escolhidos com base nas suas temperaturas de ebulição (39 - 40 °C para diclorometano e 61 - 62 °C para o clorofórmio) abaixo da temperatura de fusão (T_m) da poli(ω -PDL), em torno de 95 °C (FOCARETE et al., 2001).

Embora alguns autores já relatem a solubilidade do monômero ω -PDL em scCO_2 (MISHIMA et al., 2001), a síntese de poli(ω -PDL) usando um fluido supercrítico como solvente ainda não foi relatada na literatura aberta. Neste contexto, este trabalho tem como objetivo investigar e-ROP de ω -PDL utilizando scCO_2 como solvente e diclorometano e clorofórmio como cossolventes, avaliando sua influência nas propriedades finais do poliéster obtido.

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão descritos os reagentes e procedimentos experimentais utilizados para a síntese do polímero poli(ω -PDL) em um reator de volume variável, utilizando scCO_2 como solvente e diclorometano ou clorofórmio como cossolventes. Serão também descritas as técnicas empregadas para a caracterização dos materiais obtidos.

4.1.1 Materiais

O monômero ω -PDL e a enzima utilizados nesta etapa do trabalho são iguais aos descritos no item 3.1.1 do capítulo anterior. Antes de cada experimento, secou-se a quantidade de monômero necessária para efetuar a reação. Após a secagem, o monômero foi armazenado em um frasco selado. Dióxido de carbono, utilizado como solvente (99,9%) foi adquirido da White Martins S/A, Brasil, e os cossolventes clorofórmio (99,8%, Panreac) e diclorometano (DCM, 99,8%, Vetec Química) foram utilizados tais como recebidos. Etanol (99,5%, TecLab) foi utilizado sem purificação adicional.

4.1.2 Aparato experimental

Para a e-ROP da ω -PDL utilizando $scCO_2$ como solvente, um reator de alta pressão e de volume variável, já descrito anteriormente e também em outros trabalhos na literatura (para a polimerização de ϵ -caprolactona (COMIM ROSSO et al., 2013) e para a aquisição de dados de equilíbrio de fases (ROSSO et al., 2009; BENDER et al., 2010; COMIM et al., 2010; ROSSO COMIM et al., 2010; PINTO et al., 2012; REBELATTO et al., 2015)), foi utilizado, com o objetivo de verificar a influência do uso de $scCO_2$ em diferentes relações de solvente, cossolvente e monômero, avaliando independentemente o efeito da razão mássica entre monômero e cossolvente, monômero, cossolvente e $scCO_2$, conteúdo de água na enzima e tempo de reação, avaliando a influência dessas variáveis nas características do produto final, como o rendimento da polimerização (% em massa), a massa molar (M_n e M_w) e as propriedades térmicas da poli(ω -PDL) produzida.

4.1.3 Procedimento experimental para a e-ROP utilizando $scCO_2$ como solvente

A enzima Novozym 435, o monômero ω -PDL (previamente seco) e o cossolvente (quando usado) foram pesados em uma balança de precisão (Shimadzu, Modelo AY220, 0,0001 g) e colocados no interior do reator que foi imediatamente fechado. Em seguida, o reator foi carregado com CO_2 utilizando uma bomba de seringa até que a composição desejada (massa de $scCO_2$ em relação à massa de monômero) fosse alcançada. Uma vez que a temperatura desejada foi atingida (fixada em 70 °C, com base em trabalhos anteriores (BISHT et al., 1997; CAI et al., 2010; DE GEUS et al., 2010; LIU et al., 2011)), a pressão do sistema foi aumentada, com a injeção de CO_2 no fundo do reator, movimentando o pistão até a formação de uma única fase entre o monômero, $scCO_2$ e cossolvente (quando usado) (200 bar), em seguida (após aproximadamente 10 min), começou-se a contar o tempo reacional. Após o final da polimerização, o reator de volume variável foi lentamente despressurizado e o material produzido foi recolhido, solubilizado em clorofórmio quente (aproximadamente 40 °C) e a enzima foi separada por filtração com o uso de um funil sinterizado de porosidade média. Após filtração, a enzima foi novamente lavada com clorofórmio quente. Em seguida, o material filtrado foi precipitado em etanol frio (proporção volumétrica de etanol para solução polimérica = 10:1). O precipitado obtido foi seco em estufa de convecção a 60 °C até massa constante. O

rendimento da polimerização (% em massa) foi calculado levando em consideração a massa final de polímero seco obtido em relação a massa inicial de monômero utilizado para a e-ROP.

4.1.4 Determinação das massas molares

As massas molares dos materiais obtidos foram determinadas segundo metodologia já descrita no item 3.1.3 do capítulo anterior.

4.1.5 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As análises de calorimetria diferencial de varredura foram conduzidas de acordo com a metodologia descrita no item 3.1.4 do capítulo anterior.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 e-ROP de ω -PDL utilizando $scCO_2$ como solvente

As polimerizações enzimáticas de ω -PDL usando dióxido de carbono supercrítico como solvente foram realizadas em um reator de volume variável a 200 bar e 70 °C, utilizando a enzima Novozym 435, sem secagem prévia, como catalisador (10% em massa em relação ao monômero) e diferentes razões mássicas entre ω -pentadecalactona e $scCO_2$. As razões mássicas, o rendimento da reação, as massas molares médias numérica e ponderal (M_n e M_w), bem como a dispersidade das amostras obtidas (\bar{D}) são mostradas na Tabela 3, onde pode ser visto que os rendimentos das reações se mantiveram na faixa de 59 a 64 % em massa.

Na Tabela 3, também pode ser observado que o aumento da concentração de monômero em relação ao solvente de 1:2 para 2:1 (em massa), gerou um aumento na massa molar do material obtido (M_w) de 20.700 g mol⁻¹ (experimento 1) para 33.000 g mol⁻¹ (experimento 3), da mesma forma, a dispersidade da amostra produzido aumentou de 2,5 para 3,8. O mesmo comportamento já foi relatado na literatura para o e-ROP de ϵ -caprolactona usando $scCO_2$ (LOEKER et al., 2004; SANTOS et al., 2012), e um comportamento similar também foi observado quando a ω -PDL foi polimerizada utilizando tolueno como solvente (KUMAR et al., 2000). Tais resultados indicam que a concentração de monômero no meio reacional influencia a massa molar da poli(ω -PDL) produzida.

Tabela 3: Resultados para a e-ROP de ω -PDL usando $scCO_2$ como solvente, a 70 °C catalisada pela enzima Novozym 435 (10 % em massa em relação ao monômero) em 2 h de reação.

Exp.	Razão mássica entre monômero e $scCO_2$	Rendimento da reação (% em massa)	M_n ($g\ mol^{-1}$)	M_w ($g\ mol^{-1}$)	\bar{D} (dispersidade)
1	1:2	64	8300	20.700	2,5
2	1:1	59	8400	23.300	2,8
3	2:1	61	8600	33.000	3,8

Cabe também ressaltar que, quando a e-ROP ocorre usando $scCO_2$ como solvente a 200 bar e 70 °C, para todas as razões mássicas de solvente para monômero, a viscosidade do meio reacional aumenta visivelmente após 30 min de reação e, juntamente com a formação de precipitados poliméricos, leva a uma paralisação completa na agitação do meio reacional, fornecida pelo agitador magnético. Dando seguimento a esta etapa do trabalho, com o intuito de reduzir a viscosidade do sistema e a formação de precipitados poliméricos durante a reação e buscando aumentar o rendimento da reação e a massa molar da poli(ω -PDL) produzida por e-ROP, o uso de diclorometano e clorofórmio como cossolventes foi avaliado, buscando aumentar as interações intermoleculares entre monômero e enzima e favorecendo a transferência de massa no meio reacional.

4.2.2 Avaliação do uso de diclorometano e clorofórmio como cossolventes na e-ROP de ω -PDL utilizando $scCO_2$ como solvente

Baseado nos resultados de massa molar e rendimentos obtidos utilizando somente $scCO_2$ como solvente para o meio reacional e em dados da literatura que relatam que poliésteres, principalmente com elevada massa molar, apresentam uma solubilidade muito baixa em $scCO_2$ (CANELAS; DESIMONE, 1997; COOPER, 2000; LOEKER et al., 2004), esta etapa desse estudo faz uso de dois diferentes cossolventes, diclorometano e clorofórmio, com o intuito de promover a homogeneização do meio reacional, evitando a formação de precipitados e aglomerados poliméricos, favorecendo a transferência de massa durante a e-ROP.

Para avaliar a influência do uso de diclorometano e clorofórmio como cossolventes na e-ROP, os experimentos foram realizados utilizando diferentes razões mássicas entre o monômero e o cossolvente e em diferentes razões mássicas de monômero e cossolvente em relação ao $scCO_2$. As condições experimentais para a polimerização enzimática e

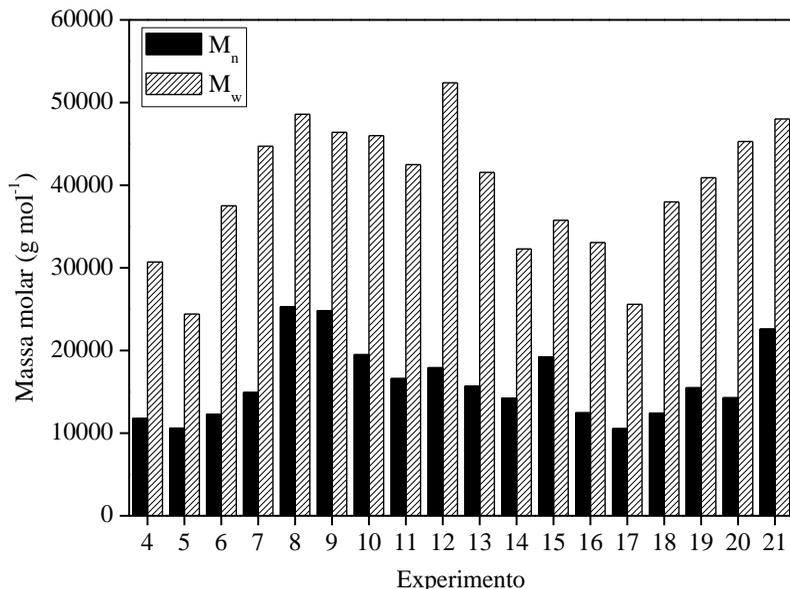
os resultados em termos de rendimento da polimerização são mostrados na Tabela 4. A partir dos resultados, pode-se observar que os experimentos 4 a 12, realizados utilizando diclorometano como cossolvente, apresentaram rendimentos variando de 67 a 82 % em massa. Os rendimentos obtidos foram superiores aos encontrados quando somente scCO₂ foi usado como solvente (58 a 64 % em massa). Esse aumento no rendimento das reações, mesmo quando a concentração mais baixa de diclorometano foi utilizada (2:1 de monômero para cossolvente, experimentos 10, 11 e 12) pode ser atribuído ao fato de que o uso de diclorometano como cossolvente auxiliou na redução da viscosidade do sistema, impedindo a formação de precipitados poliméricos durante todo tempo reacional (2 h). Observou-se o mesmo comportamento quando clorofórmio foi utilizado como cossolvente (experimentos 13 a 21), onde um ligeiro aumento no rendimento de polimerização, de 71 a 87 % em massa foi verificado, novamente atribuído à redução da viscosidade e a não formação de precipitados poliméricos e agregados de polímero e enzima no interior do reator quando clorofórmio foi utilizado como cossolvente.

As massas molares das amostras de poli(ω -PDL) obtidas via e-ROP, utilizando diclorometano e clorofórmio como cossolventes são mostradas na Figura 16. Para as determinações de massa molar, utilizou-se o mesmo conjunto de experimentos descritos na Tabela 4. Quando diclorometano foi utilizado como cossolvente (experimentos 4 a 12), valores de massa molar molecular de 24.300 até 52.400 g mol⁻¹ (M_w) foram obtidos. Nos experimentos 13 a 21, onde clorofórmio foi utilizado como cossolvente, as massas molares obtidas (M_w), permaneceram na faixa de 25.600 a 48.000 g mol⁻¹. Novamente, um maior valor de M_w foi obtido quando razão mássica 2:1 de monômero para cossolvente foi usada, confirmando a influência da concentração de monômero e de enzima na massa molar da poli(ω -PDL) obtida.

Tabela 4: Condições experimentais e rendimento das reações de e-ROP de ω -PDL, utilizando $scCO_2$ como solvente e diclorometano ou clorofórmio como cossolventes a 70 °C, com 10% em massa em relação ao monômero de Novozym 435 em 2 horas de reação.

Exp.	Razão mássica de monômero para diclorometano	Razão mássica de (monômero + diclorometano) para $scCO_2$	Rendimento da reação (% em massa)
4	1:2	1:2	77
5	1:2	1:1	80
6	1:2	2:1	78
7	1:1	1:2	76
8	1:1	1:1	68
9	1:1	2:1	76
10	2:1	1:2	82
11	2:1	1:1	82
12	2:1	2:1	67
Exp.	Razão mássica de monômero para clorofórmio	Razão mássica de (monômero + clorofórmio) para $scCO_2$	Rendimento da reação (% em massa)
13	1:2	1:2	71
14	1:2	1:1	80
15	1:2	2:1	83
16	1:1	1:2	86
17	1:1	1:1	87
18	1:1	2:1	84
19	2:1	1:2	73
20	2:1	1:1	81
21	2:1	2:1	72

Figura 16: M_n e M_w obtidas na e-ROP de ω -PDL utilizando $scCO_2$ como solvente e diclorometano ou clorofórmio como cossolventes, em diferentes razões mássicas de monômero para cossolvente e monômero + cossolvente para $scCO_2$, 70 °C, em 2 h e com 10% de CALB.



4.2.3 Influência do conteúdo de água na e-ROP de ω -PDL utilizando $scCO_2$ como solvente e diclorometano ou clorofórmio como cossolventes

De acordo com Thurecht e colaboradores (2006), na e-ROP de lactonas e macrolactonas, a presença de uma elevada quantidade de água no meio reacional conduz a formação de cadeias de baixa massa molar. Por outro lado, um teor muito baixo de água no meio reacional pode promover a desnaturação da enzima (OLIVEIRA et al., 2006; COMIM ROSSO et al., 2013). Portanto, para o estudo da influência da quantidade de água no meio reacional, as razões mássicas de monômero para cossolvente e de monômero e cossolvente para $scCO_2$ foram fixadas em 2:1 em massa. As reações foram conduzidas a 70 °C, durante 2 h a 200 bar utilizando Novozym 435 (10 % em massa em relação ao monômero) com diferentes quantidades de água, obtidas após a secagem e titulação por Karl Fischer. As condições experimentais para a secagem da enzima,

para a e-ROP, bem como os resultados em termos de rendimento das reações são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Tempo de secagem da Novozym 435 (70 °C e 0,4 bar) e rendimento da e-ROP de ω -PDL usando scCO₂ como solvente e diclorometano ou clorofórmio como cossolventes a 70 °C, catalisadas pela Novozym 435 com diferentes quantidades de água em 2 h de reação.

Exp.	Tempo de secagem da enzima (h)	Conteúdo final de água na enzima (% em massa)	Cossolvente	Rendimento da reação (% em massa)
22	Enzima sem secar	1,74	Diclorometano	67
23	20	0,99	Diclorometano	65
24	24	0,77	Diclorometano	59
25	Enzima sem secar	1,74	Clorofórmio	72
26	20	0,99	Clorofórmio	66
27	24	0,77	Clorofórmio	63

Razão mássica de monômero para cossolvente de 2:1 e de monômero + cossolvente para scCO₂ de 2: 1.

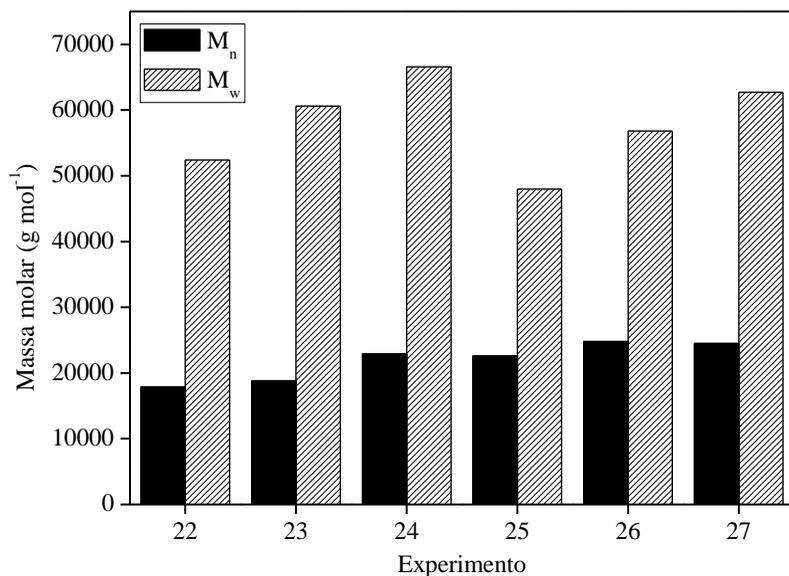
10 % em massa de enzima em relação ao monômero

Como pode ser observado na Tabela 5, para a e-ROP realizada utilizando diclorometano como cossolvente, no experimento 22, conduzido sem secagem prévia da enzima (teor de água de 1,74 % em massa), um rendimento de polimerização de 67 % em massa foi obtido, enquanto que nos experimentos 23 e 24, realizados utilizando enzima com conteúdo de água de 0,99 e 0,77 % em massa, os rendimentos encontrados foram de 65 e 59 %, respectivamente. Esta ligeira redução no rendimento da polimerização obtida quando se reduziu o conteúdo de água da enzima (1,74 para 0,99 e 0,77 % em massa) foi já demonstrada na literatura (BISHT et al., 1997; KORZHIKOV et al., 2013), uma vez que a água funciona como iniciador na e-ROP, diminuindo o teor de água, haverá uma consequente diminuição no número de cadeias iniciadas e propagadas, diminuindo o rendimento da reação. Resultados de rendimento similares foram encontrados para as reações conduzidas utilizando clorofórmio como cossolvente (reações 25, 26 e 27, Tabela 5).

As massas molares obtidas nas reações conduzidas utilizando enzimas com diferentes teores de água são mostradas na Figura 17. Nas amostras sintetizadas usando diclorometano como cossolvente (experimentos 22, 23 e 24) a 70 °C e 2 h de reação, observou-se uma influência direta do teor de água na massa molar dos polímeros obtidos. Ao reduzir o conteúdo de água da enzima de 1,74 para 0,77 % em massa, a massa molar (M_w) aumentou de 52.400 para 66.600 g mol⁻¹. As reações conduzidas utilizando-se clorofórmio como cossolvente (experimentos

25, 26 e 27) exibiram o mesmo comportamento. A massa molar média ponderada aumentou de 48.000 para 62.700 g mol^{-1} , reduzindo a quantidade de água na enzima de 1,74 para 0,77 % em massa. Resultados semelhantes foram relatados na literatura para e-ROP de ω -PDL usando a enzima não imobilizada NI-PS-30 de *Pseudomonas* sp., onde os autores relataram que a massa molar do polímero obtido aumentou de 9000 para 35.000 g mol^{-1} quando a quantidade de água do meio diminuiu de 5,60 para 0,20 % em massa (BISHT et al., 1997). Adicionalmente, Mei e colaboradores (2003), mostraram que, na e-ROP de lactonas catalisada por Novozym 435, as massas molares obtidas são inversamente proporcionais ao conteúdo de água no meio reacional.

Figura 17: Massas molares médias (M_n e M_w) obtidas na e-ROP de ω -PDL utilizando scCO_2 como solvente e diclorometano ou clorofórmio como cossolventes^(a), a 70 °C, catalisadas pela enzima Novozym 435^(b) com diferentes conteúdos de água em 2 h de reação.



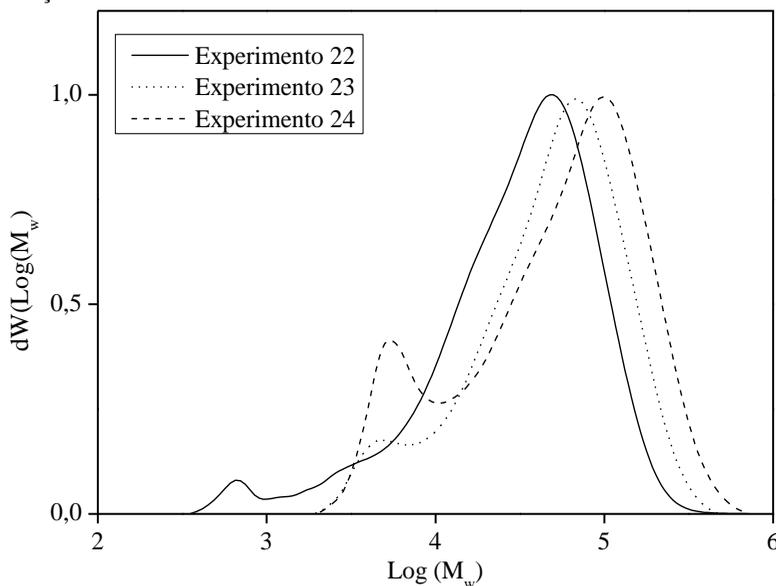
^(a) Razão mássica de monômero para cossolvente de 2:1 e de monômero + cossolvente para scCO_2 de 2:1.

^(b) 10 % em massa de enzima em relação ao monômero.

A Figura 18 mostra a distribuição de massas molares das amostras produzidas utilizando diclorometano como cossolvente (experimentos 22, 23 e 24). Como pode ser observado, na reação na qual a enzima não foi

seca (experimento 22; 1,74 % em massa de água na enzima), uma distribuição mais larga foi encontrada, além disso a distribuição apresentou uma cauda com cadeias de massa molar mais baixas. Como já descrito anteriormente, um conteúdo de água mais elevado na enzima leva a uma etapa de iniciação mais rápida, reduzindo a etapa de propagação, fato que conduz à formação de espécies de baixa massa molar (TAKWA et al., 2008) e uma maior quantidade de água presente no meio reacional também pode favorecer a hidrólise, levando à formação de uma cauda de produtos de baixa massa molar. Além disso, nas reações de e-ROP, podem ser produzidos dois tipos de moléculas: estruturas lineares e cíclicas, (KORZHIKOV et al., 2013). Quando a ciclização ocorre, esta conduz à produção de compostos cíclicos, com massas molares relativamente baixas.

Figura 18: Distribuição das massas molares obtidas na e-ROP de ω -PDL utilizando $scCO_2$ como solvente e diclorometano como cossolvente^(a), a 70 °C, catalisada pela enzima Novozym 435^(b) com diferentes conteúdos de água em 2 h de reação.

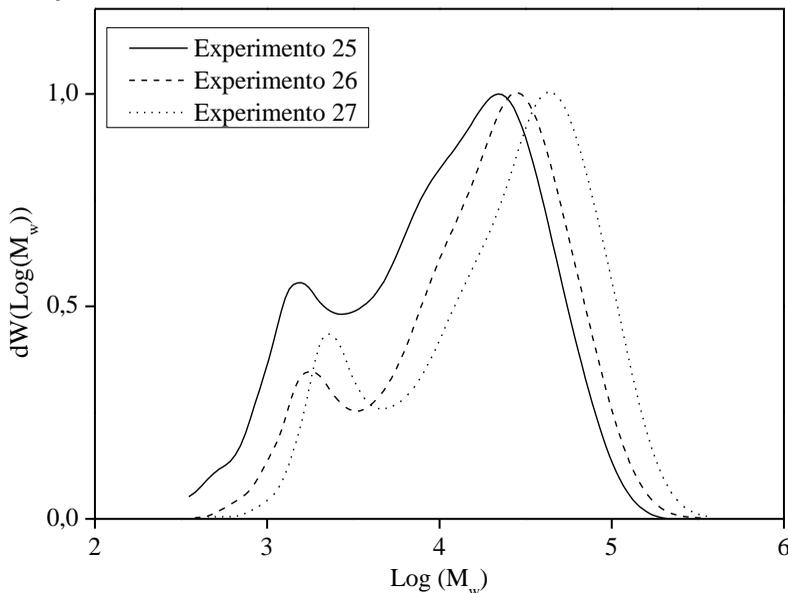


^(a) Razão mássica de monômero para cossolvente de 2:1 e monômero + cossolvente para $scCO_2$ de 2:1.

^(b) Conteúdo de água na enzima: 1,74, 0,99 e 0,77 % em massa, (respectivamente, exp. 22, 23 e 24) e 10 % em massa de enzima em relação ao monômero.

A Figura 19 mostra a distribuição das massas molares das amostras produzidas utilizando-se clorofórmio como cossolvente (experimentos 25, 26 e 27). Pode-se observar que um comportamento similar àquele obtido quando diclorometano foi utilizado como solvente foi encontrado.

Figura 19: Distribuição das massas molares obtidas na e-ROP de ω -PDL utilizando scCO_2 como solvente e clorofórmio como cossolvente^(a), a 70 °C, catalisada pela enzima Novozym 435^(b) com diferentes conteúdos de água em 2 h de reação.



^(a) Razão mássica de monômero para cossolvente de 2:1 e monômero + cossolvente para scCO_2 de 2:1.

^(b) Conteúdo de água na enzima: 1,74, 0,99 e 0,77 % em massa, (respectivamente, exp. 25, 26 e 27) e 10 % em massa de enzima em relação ao monômero.

4.2.4 Influência do tempo de reação na e-ROP de ω -PDL utilizando scCO_2 como solvente e diclorometano ou clorofórmio como cossolventes.

A síntese de poli(ω -PDL) em diferentes tempos de reação foi conduzida usando as melhores condições obtidas nas seções anteriores do presente trabalho: razão mássica de monômero para cossolvente de 2:1 e de monômero e cossolvente em relação ao scCO_2 igual a 2:1, 70 °C, 200 bar e 10 % em massa da enzima Novozym 435 em relação ao monômero

(enzima com conteúdo de 0,77 % em massa de água). As condições experimentais e os resultados em termos de rendimento das reações são apresentados na Tabela 6. Quando diclorometano foi utilizado como cossolvente, o rendimento de polimerização aumentou de 62 para 82 % em massa quando o tempo de reação foi aumentado de 1 para 3 h. Um aumento adicional no tempo de reação não conduziu a um aumento relevante no rendimento da reação, provavelmente devido ao fato de que, após 3 h de polimerização, o meio reacional se tornou altamente viscoso e foi possível observar a formação de precipitados poliméricos, que acarretaram na total paralisação da agitação magnética.

Tabela 6: Condições experimentais e rendimento das reações de e-ROP de ω -PDL utilizando $scCO_2$ como solvente e diclorometano ou clorofórmio como cossolventes^(a), a 70 °C, catalisadas por 10 % de enzima^(b) em diferentes tempos de reação.

Exp.	Cossolvente	Tempo de reação (h)	Rendimento da reação (% em massa)
28	Diclorometano	1	62
29	Diclorometano	2	67
30	Diclorometano	3	82
31	Diclorometano	6	84
32	Diclorometano	12	85
33	Clorofórmio	1	71
34	Clorofórmio	2	72
35	Clorofórmio	3	86
36	Clorofórmio	6	89
37	Clorofórmio	12	89

^(a) Razão mássica de monômero para cossolvente de 2:1 e de monômero + cossolvente para $scCO_2$ de 2:1.

^(b) Novozym 435, conteúdo de água de 0,77 % em massa, 10% em massa de enzima em relação ao monômero.

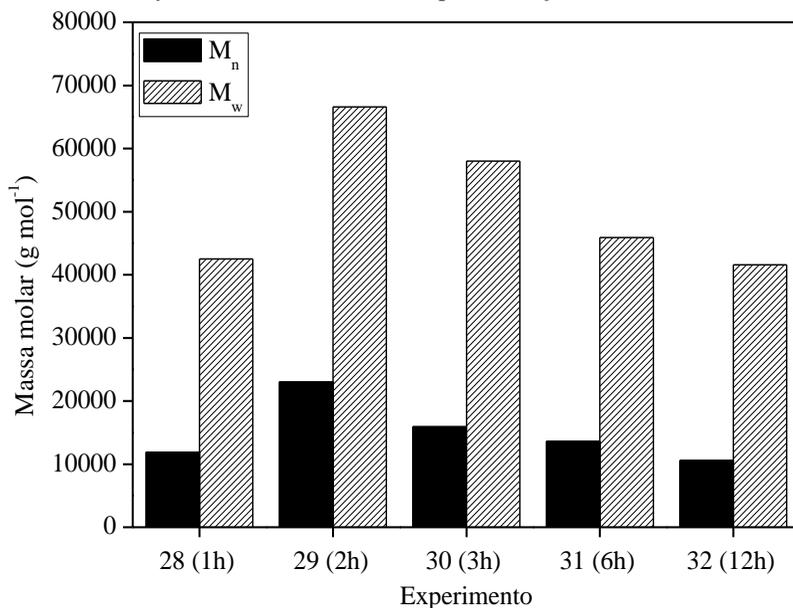
Um comportamento similar pode ser verificado quando clorofórmio foi utilizado como cossolvente. Rendimentos mais elevados foram obtidos em tempos de reação de 3 h (86 % em massa) e um aumento no tempo de polimerização para 6 e 12 h não resultou em um aumento relevante no rendimento das polimerizações. Estes resultados estão de acordo com valores encontrados na literatura (VAN DER MEULEN et al., 2008), onde os autores realizaram a e-ROP de diferentes macrolactonas, incluindo ω -PDL, usando tolueno como solvente e Novozym 435 como catalisador e obtiveram conversões mais elevadas que 80 % em massa em 3 h de reação a 60 °C.

A Figura 20 mostra os resultados de massa molar média numérica e ponderada das reações realizadas utilizando diclorometano como

cossolvente. Como pode ser visto, quando o tempo de reação foi aumentado de 1 para 2 h, a massa molar (M_w) aumentou de 42.500 para 66.600 g mol⁻¹. Também pode ser observado que um aumento no tempo de reação para 3, 6 e 12 h conduziu a formação de produtos com menor massa molar (M_w), 58.000, 45.900 e 41.600 g mol⁻¹, respectivamente. Este comportamento pode ser explicado levando em consideração o fato de que, após 3 h de reação, a viscosidade do sistema aumentou visivelmente e surgiram precipitados de polímero e enzima em torno do agitador magnético, cessando a agitação, reduzindo a mobilidade do sistema e a transferência de massa, criando micro regiões com elevada concentração de água e resultando em reações secundárias que conduzem a formação de compostos cíclicos ou hidrólise das cadeias existentes, diminuindo a massa molar dos materiais formados (MEI; KUMAR; GROSS, 2003; LOEKER et al., 2004; THURECHT et al., 2006; TAKWA et al., 2008; COMIM ROSSO et al., 2013).

A mesma tendência foi observada quando clorofórmio foi usado como cossolvente (experimentos 33 a 37, Figura 21). Após 1 h de reação, massa molar de 25.700 g mol⁻¹ (M_w) foi obtida. Em 2 horas de polimerização o valor de M_w aumentou para 62.700 g mol⁻¹. Um novo aumento no tempo de reação para 3, 6 e 12 h, provocou uma diminuição nas massas molares para 41.400, 45.000 e 48.220 g mol⁻¹, respectivamente.

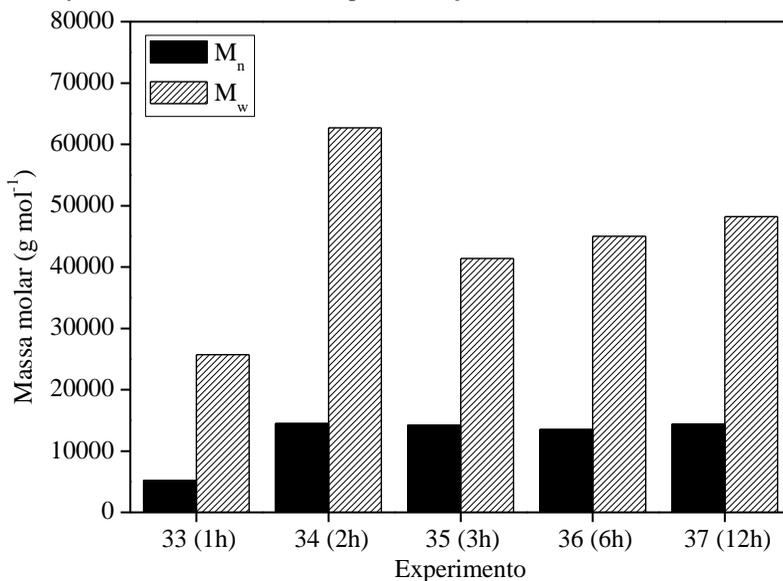
Figura 20: Massas molares médias obtidas na e-ROP de ω -PDL utilizando $scCO_2$ como solvente e diclorometano como cossolvente^(a) a 70 °C, catalisadas pela enzima Novozym 435^(b) em diferentes tempos de reação.



(a) Razão mássica de monômero para cossolvente de 2:1 e de monômero + cossolvente para $scCO_2$ de 2:1.

(b) Conteúdo de água na enzima de 0,77 % em massa e 10 % em massa de enzima em relação ao monômero.

Figura 21: Massas molares médias obtidas na e-ROP de ω -PDL utilizando scCO_2 como solvente e clorofórmio como cossolvente^(a) a 70 °C, catalisadas pela enzima Novozym 435^(b) em diferentes tempos de reação.



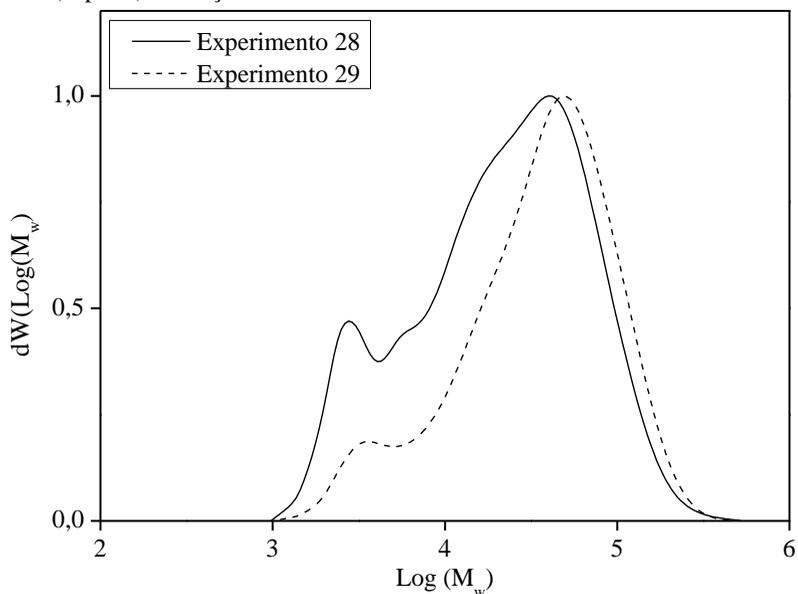
(a) Razão mássica de monômero para cossolvente de 2:1 e de monômero + cossolvente para scCO_2 de 2:1.

(b) Conteúdo de água na enzima de 0,77 % em massa e 10 % em massa de enzima em relação ao monômero.

As distribuições das massas molares médias ponderadas obtidas utilizando diclorometano como cossolvente em 1 e 2 h de reação (experimentos 28 e 29) são mostradas na Figura 22, onde pode ser observado que, em 1 h de reação, um maior número de cadeias com baixa massa molar é produzido, gerando uma distribuição mais ampla e a formação de uma cauda composta por material de baixa massa molar. Um comportamento semelhante pode ser observado quando clorofórmio foi usado como cossolvente (experimentos 33 e 34, Figura 23), onde é possível verificar uma maior produção de cadeias de baixa massa molar em 1h de reação e a formação de cadeias com massas molares mais elevadas em 2 h de reação. Além disso, as distribuições bimodais encontradas podem ser atribuídas à formação de compostos cíclicos, que possuem massas molares diferentes dos compostos lineares ou até mesmo a própria evolução da reação, formando inicialmente oligômeros que são,

com o passar do tempo, propagados, se tornando cadeias de elevada massa molar.

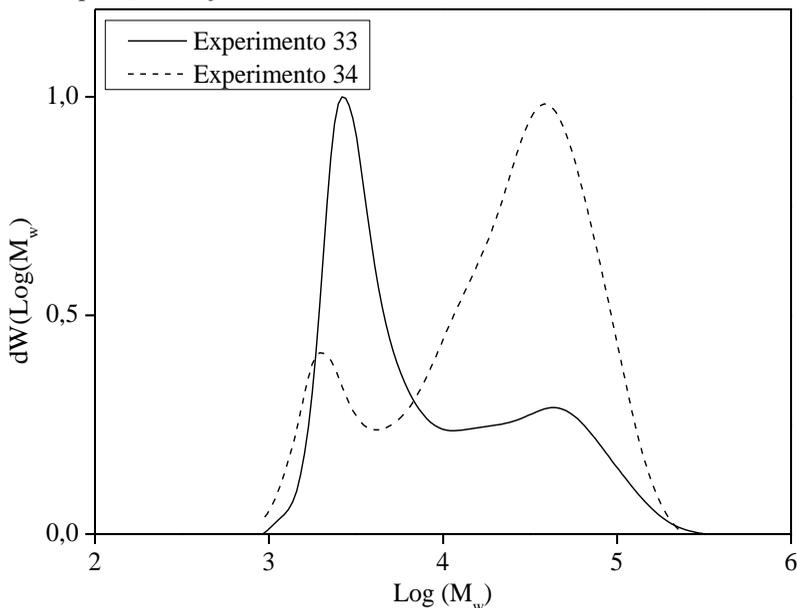
Figura 22: Distribuição das massas molares média ponderadas obtidas nas reações de e-ROP de ω -PDL usando scCO_2 com solvente e diclorometano como cossolvente^(a) a 70 °C, catalisadas pela enzima Novozym 435^(b) em 1 h (exp. 28) e 2 h (exp. 29) de reação.



^(a) Razão mássica de monômero para cossolvente de 2:1 e de monômero + cossolvente para scCO_2 de 2:1.

^(b) Conteúdo de água na enzima de 0,77 % em massa e 10 % em massa de enzima em relação ao monômero.

Figura 23: Distribuição das massas molares média ponderadas obtidas nas reações de e-ROP de ω -PDL usando scCO_2 com solvente e clorofórmio como cossolvente^(a) a 70 °C, catalisadas pela enzima Novozym 435^(b) em 1 h (exp. 33) e 2 h (exp. 34) de reação.



(a) Razão mássica de monômero para cossolvente de 2:1 e de monômero + cossolvente para scCO_2 de 2:1.

(b) Conteúdo de água na enzima de 0,77 % em massa e 10 % em massa de enzima em relação ao monômero.

4.2.5 Propriedades térmicas

A análise térmica da poli(ω -PDL) foi realizada por DSC. A entalpia de fusão (ΔH_m), cristalinidade (%) e temperatura de fusão (T_m) foram determinados a partir da segunda curva de aquecimento. A Tabela 7 resume os resultados obtidos para as amostras com diferentes massas molares, dispersidades e diferentes condições de polimerização (tempo, o uso de cossolvente, razão mássica entre monômero e cossolvente e entre monômero e cossolvente em relação ao scCO_2 , e conteúdo de água na enzima). Conforme já reportado na literatura, a poli(ω -PDL) é um polímero semi-cristalino com T_m de cerca de 97 °C, T_g de -27 °C (determinada por dispersão de raios X de grande ângulo) e com cristalinidade de 64 % (FOCARETE et al., 2001). Os resultados

apresentados neste trabalho estão de acordo com os valores descritos na literatura para a e-ROP de ω -PDL sintetizada via polimerização em massa ou em solução, utilizando tolueno como solvente (FOCARETE et al., 2001; CAI et al., 2010).

Tabela 7: Propriedades térmicas da poli(ω -PDL) produzida via e-ROP em solução, utilizando $scCO_2$ como solvente e diclorometano ou clorofórmio (quando usados) como cossolventes, a 70 °C, 200 bar e Novozym 435 como catalisador.

Amostra ^(a)	M_n (g mol ⁻¹)	M_w (g mol ⁻¹)	D (dispersidade)	T_m (°C)	ΔH_m (J g ⁻¹)	Cristalinidade (%) ^(b)
3	8.600	33.000	3,8	94	121	52
28	11.900	42.500	3,6	94	128	55
29	23.000	66.600	2,9	96	122	52
33	5.200	25.700	4,9	93	114	49
34	14.500	62.700	4,3	95	131	56

^(a) As amostras utilizadas para a análise de DSC foram descritas nas seções anteriores.

^(b) Calculado a partir de uma amostra 100 % cristalina, obtida da literatura (LEBEDEV; YEVSTROPOV, 1984).

4.3 CONCLUSÕES

Diferentemente dos trabalhos disponíveis na literatura, os quais utilizam tolueno como solvente do meio reacional, no presente trabalho, poli(ω -PDL) foi sintetizada pela primeira vez usando $scCO_2$ como solvente e diclorometano ou o clorofórmio como cossolventes. As reações conduzidas usando $scCO_2$ como solvente sem o uso de cossolvente resultaram em rendimentos de até 60 % e em polímeros com massas molares de 20.700 a 33.000 g mol⁻¹. Quando diferentes razões mássicas entre monômero e cossolvente e entre monômero e cossolvente para $scCO_2$ foram avaliadas, os melhores resultados em termos de rendimento e massas molares foram obtidos, atingindo rendimentos na faixa de 90 % e massas molares em torno de 50.000 g mol⁻¹. Em relação ao efeito da quantidade de água na enzima, observou-se uma forte relação inversa entre o teor de água no meio reacional e as massas molares dos polímeros obtidos. Quando a influência do tempo de reação da e-ROP de ω -PDL foi estudada, rendimentos mais elevados e maiores massas molares foram obtidas em 2 h de reação. Por fim, as propriedades térmicas do poliéster obtido foram avaliadas e os resultados apresentados neste trabalho estão de acordo com dados da literatura.

Esta etapa do trabalho mostrou uma rota alternativa e promissora para a síntese de novos materiais poliméricos via e-ROP com potenciais aplicações para a área biomédica. Os resultados apresentados neste capítulo foram publicados no periódico “*Journal of Supercritical Fluids*”, volume 119, páginas 221–228, 2017. Complementarmente, os dados de equilíbrio de fases obtidos a partir das reações de polimerização em scCO₂ foram publicados no periódico “*The Journal of Chemical Thermodynamics*” sob o título “*High-pressure phase equilibrium data for systems containing carbon dioxide, ω-pentadecalactone, chloroform and water*”, volume 122, páginas 125–132, 2018.

CAPÍTULO V

5 FUNCIONALIZAÇÃO DE ω -PDL, CONJUGAÇÃO COM POLI(TIOÉTER-FOSFOÉSTER) E PREPARAÇÃO DE SCAFFOLDS

A síntese de poliésteres com diferentes funcionalidades nas suas terminações (telequélcos) visa melhorar ainda mais as propriedades físicas e químicas desses materiais, incluindo a viscosidade, solubilidade, hidroflicidade, adesão e a capacidade de criar estruturas mais complexas para a síntese de novos materiais.

A catálise enzimática oferece um novo caminho para a síntese de poliésteres telequélcos via polimerização enzimática por abertura de anel, fazendo uso da seletividade enzimática, para que diferentes grupos funcionais possam ser inseridos no material a ser funcionalizado durante o ciclo de abertura de anel (SIMPSON; TAKWA; HULT, 2008).

A iniciação enzimática regioseletiva já foi relatada por Cordova e colaboradores (1998), que utilizaram uma enzima para combinar a polimerização por abertura de anel de ϵ -caprolactona com a acilação regioseletiva da hidroxila primária do grupo metila de β -D-glicopiranosídeo, produzindo metil 6-O-poly(caprolactona)- β -D-glicopiranosídeo. Por sua vez, iniciações quimiosseletivas, utilizando tioálcoois como iniciadores, por exemplo, já vem sendo relatadas por Hedfors e colaboradores (2010) e por outros grupos de pesquisa (SIMPSON; TAKWA; HULT, 2008; TAKWA et al., 2008). Dessa forma, grupos funcionais podem ser introduzidos enzimaticamente em uma cadeia de poliéster usando um iniciador que carregue um grupo funcional (α -funcionalização) ou com o uso de um agente terminador de cadeia (ω -funcionalização). Além disso, a adição de grupos funcionais a ambas as extremidades de uma cadeia de poliéster (α , ω -difuncionalização) pode também ser feita enzimaticamente (TAKWA et al., 2006).

Poli(fosfoésteres) são materiais que detiveram aplicações iniciais como retardantes de chama. Porém, nos últimos anos, grande atenção vem sendo dada a esses materiais e seu uso como polímeros altamente degradáveis e biocompatíveis, pois possuem repetidas ligações fosfoéster ao longo de sua cadeia polimérica principal. Além disso, a versatilidade química do fosfato permite que materiais com estruturas complexas possam ser sintetizados, pois a pentavalência do átomo de fósforo na cadeia principal do polímero permite conjugar grupos funcionais, incluindo grupos eletricamente carregados (ZHAO et al., 2003b; ALEXANDRINO et al., 2014; MALZAHN et al., 2014).

Ultimamente, os polifosfoésteres têm atraído o interesse de grupos de pesquisa por serem materiais promissores para sistemas de entrega de fármacos. Por exemplo, na potencial substituição de poli(etilenoglicol) (PEG) como agente de liberação controlada de fármacos e para entrega de RNA, uma vez que o PEG não é degradável. Além disso, essa classe de polímeros apresenta características físico-químicas favoráveis, além de possuir propriedades interessantes para aplicações em termos de regeneração óssea (BAUER et al., 2017).

Trabalhos recentes afirmam que moléculas sintéticas que contêm fósforo podem ser utilizadas para ligar os íons de cálcio e melhorar a formação óssea, catalisando a deposição de hidroxiapatita. Em uma revisão publicada em 2014, Mikos e colaboradores abordam a síntese de polímeros contendo grupos fosfatos e fosfonatos em sua cadeia principal ou como grupos enxertados. Esses materiais apresentam uso não somente para regeneração óssea, mas também para medicina regenerativa em geral (WATSON; KASPER; MIKOS, 2014).

Os procedimentos apresentados nesse trabalho até o presente momento se mostraram eficientes, levando a obtenção de poli(ω -PDL) sintetizada via e-ROP sem fazer uso de catalisadores metálicos e tóxicos e fazendo uso de solventes mais ambientalmente favoráveis e mais fáceis de serem removidos do produto final, como diclorometano, clorofórmio e scCO_2 . O material produzido apresentou massas molares elevadas, na faixa de até $66.000 \text{ g mol}^{-1}$ (M_w) e propriedades térmicas favoráveis (T_m em torno de $96 \text{ }^\circ\text{C}$ e cristalinidade de 49 a 56 %), mostrando que esse é um material com potencial uso nas áreas biomédicas e farmacêuticas, principalmente para a formação de estruturas porosas tridimensionais, *scaffolds*.

Sendo assim, nesta etapa do trabalho, o monômero ω -PDL foi polimerizado enzimaticamente na presença de um iniciador que contenha grupamento tiol ligado a uma hidroxila, para a síntese de um oligômero de ω -PDL com funcionalidade tiol no final de cada cadeia produzida.

Simultaneamente, um monômero contendo a função fosfoéster e duas duplas ligações terminais foi polimerizado juntamente com um ditiol na presença de um iniciador, gerando um poli(tioéster-fosfoéster). Após a síntese desses materiais, o oligômero de ω -PDL funcionalizada com tiol reagiu com o poli(tioéster-fosfoéster) na presença de um fotoiniciador, produzindo um material conjugado, o copolímero de bloco de poli(ω -PDL-b-tioéster-fosfoéster) que será denominado poli(ω -PDL-b-TEPE). Como última etapa deste trabalho, esse material obtido foi utilizado para a preparação de *scaffolds* poliméricos e os *scaffolds* obtidos foram

analisados em termos de viabilidade e proliferação celular, degradação enzimática e hidrolítica.

As sínteses, caracterização e análises conduzidas no presente capítulo foram realizadas no laboratório de química (*Chemistry laboratory*) do instituto *Royal College of Surgeons in Ireland*, em Dublin, Irlanda, sob supervisão do professor Andreas Heise.

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 Síntese do oligômero ω -PDL funcionalizado com tiol

A síntese do oligômero de ω -PDL monofuncionalizado com tiol se deu através da abertura de anel do monômero ω -PDL por via enzimática. O procedimento seguido neste trabalho foi adaptado de Takwa e colaboradores (2006). O catalisador, Novozym 435 (0,4 g), foi seco em um frasco de Schlenk, sob vácuo constante, a 50 °C por 24 h. O monômero ω -PDL (4,0 g) foi seco em frasco de Schlenk, sob vácuo, a 70 °C por 24 h. O iniciador, uma molécula contendo uma hidroxila em uma extremidade e um grupo tiol em outra, 6-mercapto-1-hexanol, foi adicionado a um terceiro frasco de Schlenk e mantido sob vácuo, a 50 °C por 24 h. Diferentes quantidades de iniciador em relação ao monômero foram testadas com o objetivo de se obter a maior quantidade de cadeias iniciadas por 6-mercapto-1-hexanol possível. Após a secagem, o monômero e o iniciador foram transferidos com o uso de uma seringa para o frasco contendo a enzima. Este frasco foi então purgado com argônio, a temperatura foi fixada em 70 °C e a reação ocorreu por 24 ou 48 h. Após a reação, o material obtido foi solubilizado em clorofórmio quente (40 °C), a enzima foi retirada do meio reacional por filtração utilizando um funil sinterizado de porosidade média e o filtrado foi precipitado em metanol gelado (10 partes de metanol para uma de filtrado). Ao final, o precipitado obtido foi seco sob vácuo até massa constante. Os materiais obtidos foram caracterizados via espectroscopia por ressonância magnética nuclear de ^1H , calorimetria exploratória diferencial (DSC) e por cromatografia de exclusão de tamanhos (SEC - GPC).

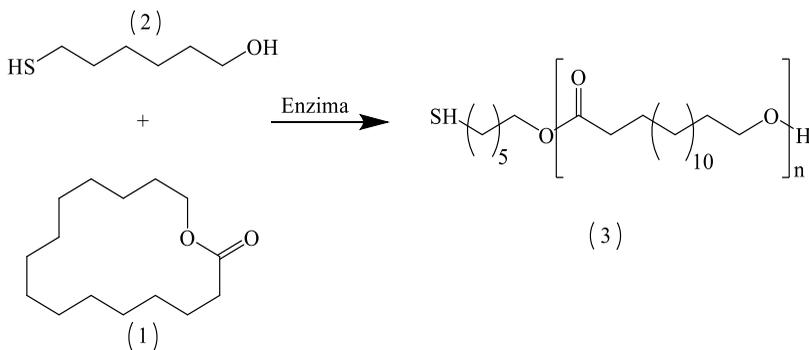
Todas as análises de ^1H -RMN foram conduzidas em clorofórmio deuterado (99,8% - CDCl_3) a temperatura ambiente, em um espectrômetro da marca Bruker de 400 MHz com deslocamentos químicos relatados em partes por milhão (ppm).

A temperatura de fusão (T_m) e a entalpia de fusão (ΔH_m) das amostras foram determinadas em um equipamento de calorimetria exploratória diferencial (DSC) da marca TA Instruments - Q200 DSC.

Para essas determinações as amostras foram inicialmente aquecidas de -30 °C a 120 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ sob atmosfera de nitrogênio, para eliminação do histórico térmico. Em seguida, foram resfriadas até -30 °C a uma taxa de resfriamento de 10 °C min⁻¹, mantidas a esta temperatura durante 1 min e aquecidas novamente até 120 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, sempre sob atmosfera de nitrogênio. As entalpias e temperaturas de fusão foram determinadas a partir da segunda curva de aquecimento.

As análises de GPC foram realizadas utilizando um equipamento Agilent 1200 equipado com software de controle. As medidas foram realizadas utilizando uma coluna da marca Polymer Laboratories Gel 5 μm Mixed-C 300 × 7.5 mm, a 40 °C com detecção por índice de refração - RID. Como eluente, foi utilizado clorofórmio a uma vazão de 1 mL min⁻¹. Os valores de massas molares obtidas foram calculados com base em padrões de poliestireno em uma faixa de 500 – 1.000.000 g mol⁻¹. A figura 24 apresenta um esquema geral para a síntese da ω-PDL monofuncionalizada com tiol. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): 4.10 - 4.04 (t, CH₂O(C=O)), 3.69 - 3.61 (t, CH₂OH) 2.57 - 2.50 (q, CH₂SH), 2.33 - 2.28 (t, CH₂(C=O)O), 1.69 - 1.54 (m, CH₂), 1.50 - 1.25 (m, CH₂).

Figura 24: Esquema da e-ROP de ω-PDL (1) com o iniciador 6-mercapto-1-hexanol (2) para a síntese do oligômero de ω-PDL monofuncionalizado (3).



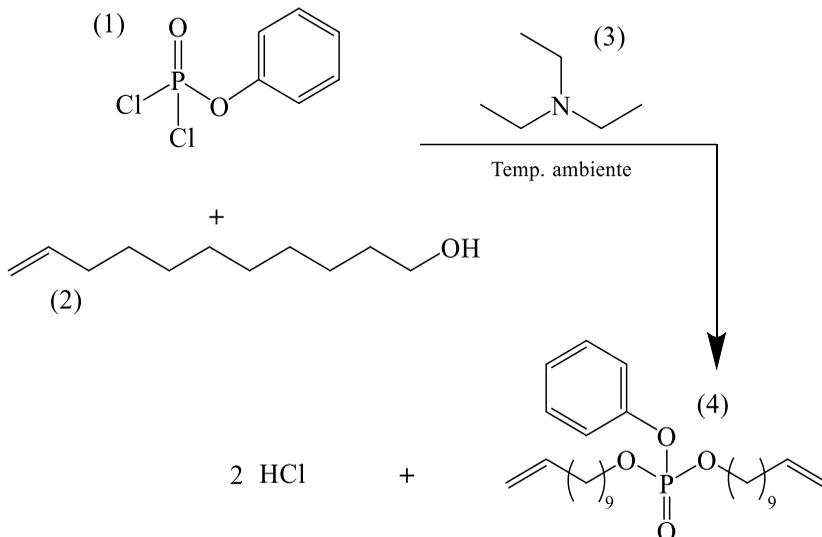
Fonte: Adaptado de Takwa e colaboradores (2006).

5.1.2 Síntese do monômero contendo grupamento fosfoéster

A síntese do monômero fenil di(undec-10-en-1-il) fosfato foi adaptada de um procedimento descrito anteriormente na literatura (MARSICO et al., 2012). Diclorofosfato de fenila foi esterificado na

presença do álcool 10-undecen-1-ol e trietilamina foi utilizada como catalisador básico. Dessa forma, um frasco de Schlenk de 250 mL, equipado com um funil de gotejamento, foi purgado com argônio e depois carregado com diclorofosfato de fenila (7,08 mL, 0,047 mol) e diclorometano, previamente seco sob peneiras moleculares, (40 mL). A solução foi resfriada a 0 °C com o uso de um banho de gelo. Adicionou-se então a trietilamina, previamente seca com hidreto de cálcio e destilada sob pressão reduzida, (11,8 mL, 1,8 eq.), 10-undecen-1-ol (16,90 mL, 1,8 eq.) e diclorometano seco (20 mL) ao funil de gotejamento (mantendo a atmosfera de argônio). Após a mistura destes componentes, os mesmos foram gotejados sob a solução contendo o diclorofosfato de fenila durante uma hora a 0 °C. Após a completa adição, a mistura foi deixada sob agitação em temperatura ambiente por 12 h. A mistura obtida foi concentrada sob pressão reduzida, dissolvida em éter dietílico e filtrada em filtro de celulose com diâmetro de corte de 2 - 3 µm. O procedimento de filtragem foi repetido por mais três vezes, até a obtenção de um líquido claro, sem presença de partículas sólidas. Após isso, o solvente foi removido com o uso de um rotaevaporador e o produto resultante foi purificado por cromatografia com alumina neutra utilizando diclorometano como eluente (aproximadamente 2 L), resultando em um líquido levemente amarelado. O rendimento em massa após a coluna de alumina foi em torno de 70 % e o produto obtido foi caracterizado por RMN e armazenado sob refrigeração para uso nas sínteses futuras. A Figura 25 mostra um esquema da síntese do monômero. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): 7.32 (t, J = 7.7 Hz = 2H), 7.21(d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.16(t, J = 7.7 Hz, 1H), 5.83-5.77 (ddt, J = 16.8Hz, J = 10Hz, J = 3.5 Hz, 2H), 5.00-4.97 (ddt, J = 10Hz, J = 3.5 Hz, J = 1.4 Hz, 2H), 4.93-4.91 (ddt, J = 10Hz, J = 1.4 Hz, 2H), 4.16-4.09 (m, 4H), 2.04-2.01 (m, 2H), 1.69-1.65 (m, 4H), 1.39-1.32 (m, 8H), 1.26 (m, 18H).

Figura 25: Esquema da esterificação de diclorofosfato de fenila (1) com 10-undecen-1-ol (2) na presença de trietilamina (3) para a formação do monômero fenil di(undec-10-en-1-il) fosfato (4).



Fonte: Adaptado de Marsico e colaboradores (2012).

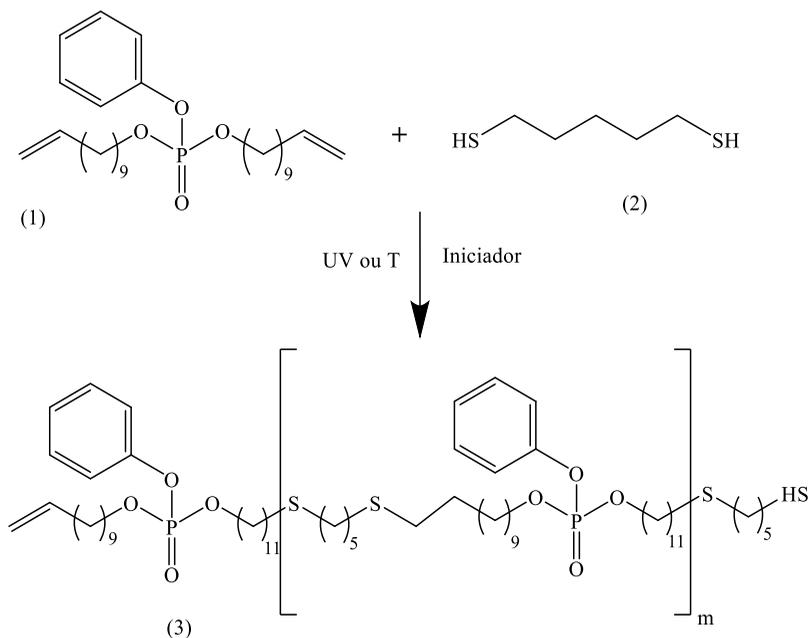
5.1.3 Síntese do poli(tioéter-fosfoéster)

Após a obtenção do monômero contendo duas duplas ligações terminais, fenil di(undec-10-en-1-il) fosfato, o mesmo foi polimerizado com um ditiol, 1,5-pentanoditiol, na presença de um iniciador. A polimerização foi conduzida utilizando 0,25 g do monômero contendo fosfato (0,525 mmol) e 70 μL do ditiol (0,525 mmol). A quantidade de iniciador utilizada foi de 1 ou 5 % em massa em relação a quantidade de fenil di(undec-10-en-1-il) fosfato. As reações foram conduzidas em massa ou em solução utilizando diclorometano ou clorofórmio como solventes. Quando 2,2'-azobis(2-metilpropionitrila) (AIBN) foi utilizado como iniciador, as reações foram conduzidas a 80 $^{\circ}\text{C}$ por 8 ou 24 h. Quando foi utilizado o fotoiniciador 2,2-dimethoxy-2-fenil acetofenona (DMPA) as reações foram conduzidas em massa ou em solução, sob temperatura ambiente, com o uso de um equipamento de emissão de luz ultravioleta – “UV light Hammer® 6” com sistema de emissão UV LC6E da empresa Fusion UV Systems Inc.® O equipamento utiliza uma lâmpada tipo H que opera a 200 W cm^{-2} quando ajustada em 100% de

intensidade. As amostras foram colocadas em frascos de vidro transparente, selados, e os frascos passaram pela zona de emissão de luz UV com o uso de uma esteira automática, ajustada com a velocidade de $3,5 \text{ m min}^{-1}$. O processo foi repetido por 6 vezes, resultando em um total de 5 min de exposição a luz UV.

Posteriormente ao processo de polimerização, as amostras foram dissolvidas em diclorometano e precipitadas em metanol gelado, filtradas e secas sob vácuo. Após a completa secagem, foram caracterizadas via GPC, $^1\text{H-RMN}$ e DSC. A Figura 26 apresenta um esquema da síntese do poli(tioéter-fosfoéster). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.38 - 7.30 (t, $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}$), 7.22 - 7.19 (d, $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}$), 7.18 - 7.14 (t, $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}$), 4.19 - 4.09 (m, CH_2O), 2.71 - 2.66 (t, $\text{CH}_2(\text{HC}=\text{C})$), 2.58 - 2.48 (m, CH_2S).

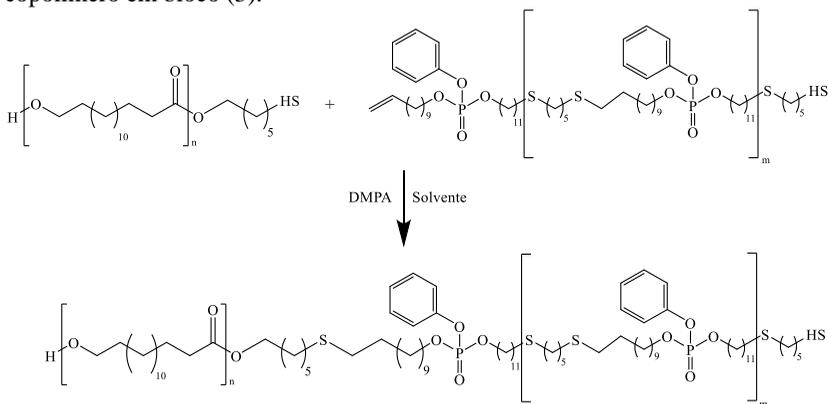
Figura 26: Esquema da polimerização dos monômeros fenil di(undec-10-en-1-il) fosfato (1) e 1,5-pentanoditiol (2) na presença de um iniciador para formação do segmento poli(tioéter-fosfoéster) (3).



5.1.4 Conjugação do poli(tioéter-fosfoéster) com ω -PDL funcionalizada com tiol

Após a síntese do polímero poli(tioéter-fosfoéster), o mesmo foi conjugado com a ω -PDL funcionalizada com tiol, na presença do fotoiniciador DMPA, para que a ω -PDL com funcionalidade tiol em uma das extremidades da cadeia agisse como um terminador da polimerização tiol-eno, se ligando ao segmento poli(tioéter-fosfoéster) formando o copolímero em bloco poli(ω -PDL-b-TEPE). As reações foram conduzidas em solução, utilizando clorofórmio como solvente, a temperatura ambiente, utilizando como fonte emissora de luz UV o mesmo equipamento descrito no item anterior, sob as mesmas condições de operação. Após a síntese, o material foi dissolvido em diclorometano e precipitado em metanol gelado, filtrado e seco sob vácuo até massa constante. Finalmente, o material foi caracterizado por GPC, $^1\text{H-RMN}$ e por DSC. A Figura 27 mostra o esquema da síntese do copolímero. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.38 - 7.30 (t, $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}$), 7.22 - 7.19 (d, $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}$), 7.18 - 7.14 (t, $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}$), 4.19 - 4.09 (m, CH_2O), 2.58 - 2.48 (m, CH_2S), 2.31 - 2.22 (t, CH_2O).

Figura 27: Esquema da conjugação entre a ω -PDL funcionalizada com tiol (1) com poli(tioéter-fosfoéster) (2) na presença de fotoiniciador para formação do copolímero em bloco (3).



5.1.5 Produção dos *scaffolds* poliméricos

A produção de *scaffolds* poliméricos foi realizada pelo método de eletrofiação, em um equipamento similar ao descrito por Oliveira e

colaboradores (2017). O equipamento é composto basicamente por uma fonte de alimentação de alta tensão, uma bomba de seringa, uma seringa, uma agulha de aço inoxidável (diâmetro interno 1,02 mm – 18 Gauge) conectada ao eletrodo da fonte de alimentação e um coletor de alumínio conectado ao aterramento.

As condições para a eletrofiação foram adaptadas das existentes na literatura para a eletrofiação de amostras de poli(ω -PDL) (LETIZIA FOCARETE et al., 2010). De uma maneira geral, a amostra de polímero foi solubilizada em uma mistura de solventes (clorofórmio, diclorometano e 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol) nas razões mássicas de 5:4:1. Uma série de soluções poliméricas foi preparada, tanto para o homopolímero poli(ω -PDL) quanto para o copolímero em bloco. Para o preparo das soluções de poli(ω -PDL-b-TEPE), o mesmo foi misturado com o homopolímero poli(ω -PDL) em uma razão mássica de 1:1. A concentração das soluções poliméricas variou de 10 a 30 % em massa em relação ao solvente.

As eletrofiações foram conduzidas em temperatura ambiente, com umidade relativa de 40 a 50 %. Os parâmetros de operação do equipamento foram otimizados para cada amostra e cada concentração, mas, usualmente, a voltagem variou de 8 a 15 kV, a vazão de injeção da solução de 50 a 150 $\mu\text{L min}^{-1}$ e a distância da agulha para o coletor foi variada entre 8 a 15 cm.

A caracterização da topografia da superfície dos *scaffolds* foi investigada pelo uso de microscopia eletrônica de varredura (SEM), utilizando um microscópio Hitachi SU 6600 Fe-SEM (Hitachi high Technologies Europe GMBH, UK). As amostras foram colocadas em *stubs* condutores de carbono e revestidas com Pt/Pd, gerando um revestimento de 5 nm. Foi utilizada uma tensão de aceleração de 2 kV, distância de trabalho de 10 mm e corrente de 20 μA para todas as amostras analisadas. As análises de microscopia confocal foram realizadas em um microscópio Carl Zeiss - “LSM 710 confocal microscope” e as imagens de microscopia óptica foram obtidas em um microscópio Nikon Eclipse “90i Fluorescence microscope”. As imagens obtidas no microscópio óptico foram utilizadas para a contagem do diâmetro das fibras. Para tanto, o aplicativo de tratamento digital de imagens “ImageJ - Fiji” foi utilizado (SCHINDELIN et al., 2012) e aproximadamente 150 fibras de cada amostra foram contadas.

5.1.6 Ensaios de viabilidade celular

A viabilidade celular pode ser monitorada por vários métodos como: integridade da membrana plasmática, síntese de DNA, conteúdo de DNA, atividade enzimática, presença de ATP, condições de redução celular, entre outros. O teste de viabilidade celular AlamarBlue® funciona como um indicador para medir quantitativamente a proliferação de células humanas, de animais, bactérias, plantas e fungos, permitindo estabelecer uma citotoxicidade relativa de agentes dentro de várias classes químicas. Quando as células estão vivas, a resazurina, o ingrediente ativo do reagente AlamarBlue®, um composto não tóxico e permeável às células, possui coloração azul. Ao penetrar na membrana celular, a resazurina é reduzida a resorufina, um composto de cor vermelha e altamente fluorescente.

Para estes ensaios, utilizou-se uma linhagem celular precursora de osteoblastos de camundongos da subfamília *Murinae*. As fibras obtidas de poli(ω -pentadecalactona) e da mistura 1:1 de poli(ω -pentadecalactona) com poli(ω -PDL-b-TEPE) foram cortadas em discos de 8 mm, esterilizadas com etanol a 70%, hidratadas com lavagens sucessivas com tampão fosfato salino e colocadas em placas de 24 poços. As fibras foram incubadas em meio de cultura - meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS; Hyclone) e 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich, Irlanda) - por 30 min em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37 ° C antes da adição de células. Ao final, as células foram tripsinizadas e cultivadas em um lado dos *scaffolds* a uma densidade de 2×10^3 células por amostra (8 mm). Os *scaffolds* foram mantidos em meio DMEM por 7 dias e durante esse período o meio foi trocado duas vezes. Posteriormente, o reagente AlamarBlue® foi adicionado às amostras, em uma razão de 10:1, conforme instruções do fabricante. Os discos poliméricos foram então incubados por 4 h a 37 °C. A absorbância (570 nm) resultante foi lida em um espectrofotômetro de placas.

Imagens da quantidade de células vivas/mortas foram utilizadas para avaliar qualitativamente a viabilidade celular. Os *scaffolds* foram corados com 4 mM de calceína-AM (verde = vivo) e 2 mM de homidimero-1 de etídio (vermelho = morto) em PBS durante 15 min a 37 °C, protegidos da luz (Live/dead viability/ cytotoxicity assay, Invitrogen), conforme a orientação do fabricante. As amostras foram examinadas em um microscópio confocal a uma excitação e comprimentos de onda de 515 e 615 nm, respectivamente.

Para avaliação da proliferação celular, os *scaffolds* com as células semeadas foram coletados nos dias 1, 4 e 8, secos e armazenados a -80 °C. Posteriormente, uma sequência de congelamento e descongelamento foi repetida por 3 vezes, a fim de romper a membrana celular e expor o conteúdo genético, e o DNA foi quantificado através do ensaio Picogreen (Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit, Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante. A intensidade de emissão de fluorescência foi medida a 528 nm em um leitor de placas (BioTek).

5.1.7 Ensaios de degradação enzimática e hidrolítica

Para avaliar a degradação hidrolítica das fibras produzidas, amostras com dimensões de 1 × 1 cm foram cortadas e pesadas em uma balança analítica. Estas foram incubadas em 10 mL de uma solução tampão fosfato (0,01 M, pH 7,4) durante 90 dias a 37 °C. Pontos experimentais foram retirados em determinados intervalos de tempo (5, 10, 30, 40, 50, 60 e 90 dias). Cada ponto experimental foi estudado em triplicata. Após os ensaios de degradação, as amostras foram rinsadas com 50 mL de água destilada, secas com papel absorvente e posteriormente sob vácuo durante 48 h. O nível de degradação foi medido pela diferença de massa (comparando a massa inicial seca das amostras com a massa final seca após incubadas em tampão fosfato) e de massa molar (GPC) das amostras.

Para os ensaios de degradação enzimática, amostras com dimensões de 1 x 1 cm foram colocadas em 10 mL de solução tampão fosfato juntamente com 1 mg da lipase B de *Candida antarctica* em seu estado livre, previamente concentrada por diálise de acordo com procedimento descrito por Chiaradia e colaboradores (2016) (atividade de esterificação da enzima = 22 U g⁻¹). Novamente, ao final de cada tempo especificado (5, 10, 30, 40, 50, 60 e 90 dias) três amostras foram retiradas, lavadas com água destilada, secas e avaliadas em termos de perda de massa e diferença de massa molar.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Síntese do oligômero de ω-PDL funcionalizado com tiol

Nesta etapa do trabalho, a ω-PDL funcionalizada em uma das extremidades com um tiol foi produzida, baseada em uma metodologia desenvolvida em 2006 por Takwa e colaboradores (TAKWA et al., 2006). Como já comentado anteriormente, o polímero poli(ω-PDL) é um

material semicristalino com propriedades mecânicas muito interessantes, porém, justamente pelo fato de ter uma alta cristalinidade, esse poliéster apresenta uma taxa muito baixa de degradação hidrolítica ou enzimática (VAN DER MEULEN et al., 2008). Desta forma, a funcionalização do ω -PDL com um tiol tem dois objetivos principais: diminuir a cristalinidade do material obtido, modificando de forma indireta suas propriedades de hidrofobicidade e degradação, e tornar esse material passível de reagir com uma molécula contendo uma dupla ligação, através de reações de adição tiol-eno.

A Tabela 8 mostra as condições reacionais utilizadas na síntese do ω -PDL funcionalizada com 6-mercaptop-1-hexanol (6M1H) e os resultados em termos de massa molar dos materiais obtidos e quantidade de cadeias funcionalizadas. Todas as reações foram conduzidas utilizando a enzima Novozym 435, seca, na quantidade de 10 % em massa em relação ao ω -PDL.

Tabela 8: Condições reacionais e resultados da síntese de ω -PDL funcionalizada com tiol. As reações foram conduzidas em solução, em uma razão mássica de 1:1 de clorofórmio para ω -PDL.

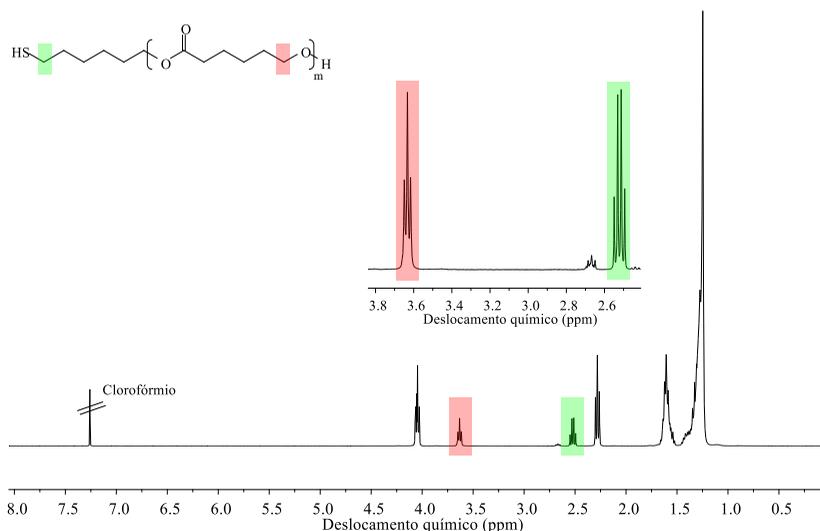
Razão molar entre ω -PDL e 6M1H	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Cadeias funcionalizadas com tiol (% via RMN)	M_n (g mol ⁻¹)	\bar{D}
1:1	70	24	72 ± 2,3	1400	2,2
2:1	70	24	63 ± 2,8	900	1,4
5:1	70	24	52 ± 1,3	1400	2,2
10:1	70	24	88 ± 0,9	3050	1,6
50:1	70	24	30 ± 3,4	1200	4,2
100:1	70	24	10 ± 0,8	1600	2,3
1:1	70	48	90 ± 2,3	930	1,3
1:1	80	24	92 ± 2,8	1050	1,4
10:1	70	48	53 ± 1,7	4550	2,2
10:1	80	24	85 ± 2,7	4300	2,1

Como pode ser verificado na Tabela 8, o percentual de cadeias funcionalizadas variou de 10 a 92 %, dependendo das condições reacionais utilizadas. De uma maneira geral, quanto maior a quantidade de tiol na reação, maior foi o rendimento da iniciação, com exceção da condição em que uma razão molar de 10:1 entre ω -PDL funcionalizada e 6-mercaptop-1-hexanol foi utilizada, a qual resultou nos rendimentos mais elevados de iniciação por tiol. Essa condição também é reportada por Takwa e colaboradores em 2006, para esse mesmo tipo de reação, como sendo a que levou a uma maior taxa de iniciação por tiol. Cabe ressaltar que a funcionalização com o grupamento tiol ocorre pelo fato da hidroxila da molécula de 6M1H ser utilizada pela enzima como um iniciador para a abertura do anel do ω -PDL, dessa forma, a presença de água no meio

reacional deve ser evitada ao máximo, uma vez que a água irá competir diretamente com o 6M1H, produzindo cadeias iniciadas pela hidroxila da molécula de água. Por outro lado, a água é fundamental para a estabilidade da enzima, pois a enzima possui água ligada química e fisicamente a sua estrutura, que não pode ser totalmente retirada, pois comprometeria a conformação estrutural da enzima. Dessa forma, convém ressaltar que, teoricamente, é muito difícil obter 100 % das cadeias iniciadas unicamente por tiol, pois uma quantidade mínima de água sempre estará presente no meio reacional.

A quantidade de cadeias iniciadas por 6M1H pode ser verificada pela análise de ^1H -RMN, utilizando clorofórmio deuterado como solvente. Os sinais levados em consideração na avaliação das estruturas foram aqueles em 3,65 ppm, relativos aos prótons inerentes a cadeia principal de ω -PDL (CH_2OH), presentes em 100 % das cadeias, e em 2,52 ppm, relativos aos prótons do segmento HSCH_2CH_2 , que estão presentes somente nas cadeias funcionalizadas/iniciadas com tiol. A Figura 28 mostra o espectro de ^1H -RMN da condição reacional que gerou um material com 85 % das cadeias iniciadas por tiol e M_n de 4300 g mol^{-1} .

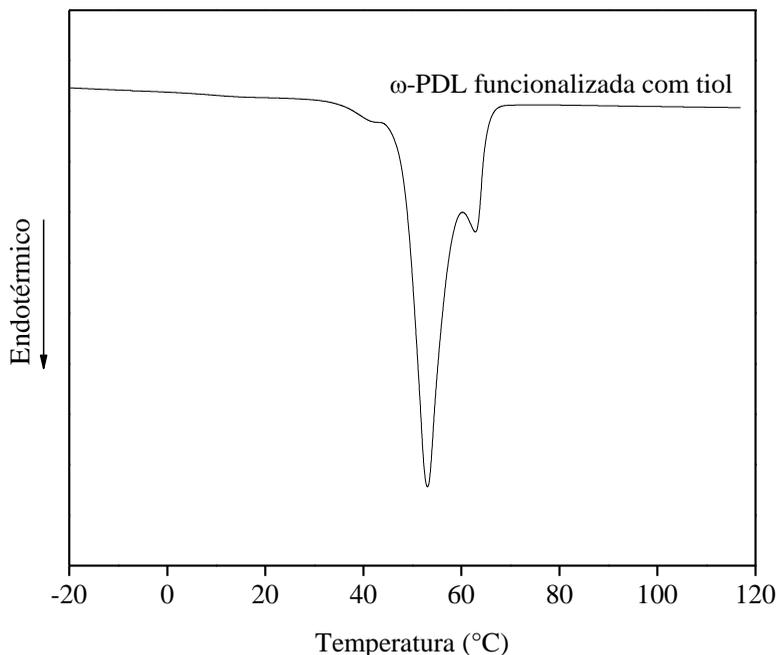
Figura 28: Espectro de ^1H -RMN (400 MHz) do oligômero de ω -PDL funcionalizada com 6M1H em clorofórmio-d. Reação conduzida a 80°C por 24 h, resultando em 85 % das cadeias funcionalizadas com tiol.



A Tabela 8 também mostra as massas molares médias numéricas e a dispersidade das amostras produzidas. É possível observar que a abertura de anel da ω -PDL iniciada por um tiol ocorre de forma bem mais lenta do que a abertura do anel iniciada pela água presente na superfície da enzima. Ainda, os produtos finais apresentam massas molares menores do que quando a mesma reação ocorre utilizando somente água como iniciador (vide capítulos anteriores). Assim, pode-se observar desde a formação de trímeros, com massas molares na faixa de 900 g mol^{-1} , até oligômeros com massas molares em torno de 4550 g mol^{-1} . De uma forma geral, nas condições reacionais com uma relação molar de 10:1 de ω -PDL para 6M1H maiores massas molares foram encontradas. Estudadas as condições de funcionalização da ω -PDL, a amostra produzida usando 10:1 de ω -PDL para 6M1H, a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h, resultou em um material com 85 % das cadeias funcionalizadas com tiol e com massa molar numérica média de 4300 g mol^{-1} . Esta amostra foi escolhida para as reações futuras de copolimerização da ω -PDL funcionalizada com tiol com o poli(tioéter-fosfoéster).

Os resultados de análise térmica da amostra com 85 % das cadeias funcionalizadas com tiol são mostrados na Figura 29, onde se pode observar uma temperatura de fusão em torno de $56 \text{ }^\circ\text{C}$, bem abaixo da T_m do homopolímero poli(ω -PDL) produzido nos capítulos anteriores deste trabalho (em torno de $93 \text{ }^\circ\text{C}$). Da mesma forma, a temperatura de transição vítrea (T_g) não pôde ser detectada pela análise de DSC, pois a mesma é baixa e a taxa de resfriamento conduzida no equipamento não é rápida o suficiente para produzir uma fração considerável do polímero no estado amorfo.

Figura 29: Curva de fusão da ω -PDL funcionalizada com 6MIH - reação conduzida a 80 °C por 24 h, resultando em 85 % das cadeias funcionalizadas com tiol.



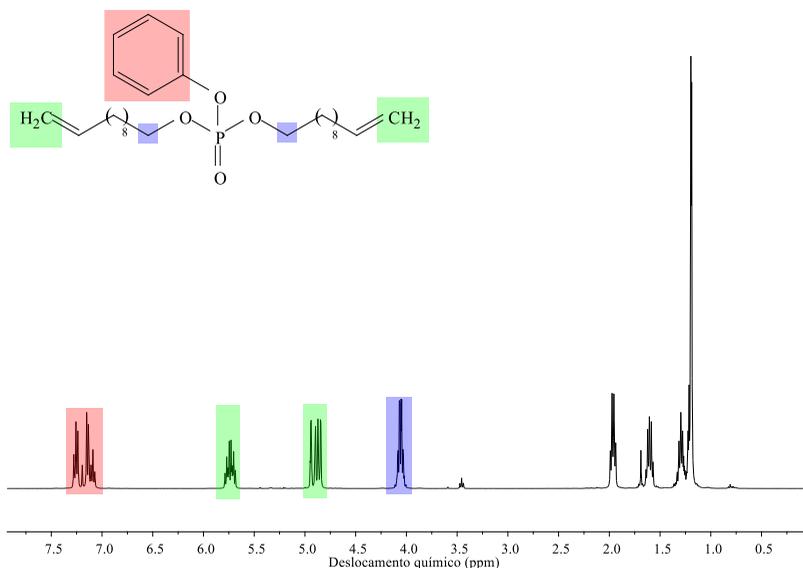
5.2.2 Síntese do poli(tioéter-fosfoéster)

Os polifosfoésteres são materiais que vem ganhando grande importância na área biomédica, pois são quimicamente versáteis e biodegradáveis (ALEXANDRINO et al., 2014). Além disso, estudos recentes mostram que esses materiais podem ser facilmente polimerizados via reações de ADMET (*Acyclic diene metathesis*) ou via reações de metátese cruzada (MARSICO et al., 2012; MALZAHN et al., 2014), porém, até o presente momento, não foram encontrados relatos de polimerização via radicalar de fosfoésteres que contenham duplas ligações terminais.

Para produzir um material que possa reagir com a ω -PDL funcionalizada com tiol, produzida conforme mostrado no item anterior, a olefina terminal, fenil di(undec-10-en-1-il) fosfato, foi inicialmente sintetizada. Após passar por purificação em coluna de alumina, o rendimento do material foi de aproximadamente 70 %, e a amostra foi

armazenada sob refrigeração o que garante uma estabilidade deste material por vários meses (MARSICO et al., 2012). A Figura 30 mostra o espectro de ^1H -RMN do fenil di(undec-10-en-1-il) fosfato.

Figura 30: Espectro de ^1H -RMN (400 MHz) do fenil di(undec-10-en-1-il) fosfato em clorofórmio-d.



Após a síntese e purificação do fenil di(undec-10-en-1-il) fosfato, o mesmo foi polimerizado com um ditiol comercial, via reações de adição tiol-eno. As condições para a síntese, tipo de iniciador e os resultados em termos de massa molar dos poli(tioéter-fosfoésteres) produzidos são mostrados na Tabela 9. Como já mencionado anteriormente, em todas as reações, uma razão molar de 1:1 entre o fenil di(undec-10-en-1-il) fosfato e o 1,5-pentanoditiol foi adotada. O objetivo desta síntese foi produzir cadeias com elevadas massas molares, e que possuam uma dupla ligação terminal em uma das extremidades dessa cadeia, para futura reação com a ω -PDL monofuncionalizada com tiol.

Como pode ser observado na Tabela 9, quando AIBN foi utilizado como iniciador, o material resultante apresentou massas molares numéricas médias que variaram de 4100 a 10.100 g mol^{-1} e tanto o aumento do tempo reacional quanto o uso de um solvente resultaram em aumentos na massa molar. Cabe ainda observar que a dispersidade das

massas molares se manteve em torno de 2,0. Para tornar as reações ainda mais eficientes, o fotoiniciador DMPA foi estudado, nas mesmas razões mássicas que o AIBN (1 e 5% em relação ao fenil di(undec-10-em-1-il) fosfato). Visivelmente, as reações conduzidas sob luz UV aconteceram de maneira muito mais rápida do que quando utilizado AIBN e ainda, sob temperatura ambiente, gerando materiais com massas molares numéricas médias que variaram de 6650 a 17.200 g mol⁻¹. Adicionalmente, a utilização de solvente favoreceu a polimerização, reduzindo a viscosidade do meio reacional, favorecendo a transferência de massa e a dispersão do fotoiniciador durante o período de reação. De uma forma geral a utilização de diclorometano levou à produção de materiais com massas molares ligeiramente mais elevadas. Esse fato, aliado com a baixa temperatura de ebulição do DCM, o que torna esse solvente fácil de ser removido do produto, fez com que a amostra PTP 12 fosse escolhida para a etapa seguinte deste trabalho, que consiste na conjugação do poli(tioéter-fosfoéster) com a ω -PDL funcionalizada com tiol.

Tabela 9: Condições reacionais e resultados em termos de massa molar para a polimerização radicalar de fenil di(undec-10-en-1-il) fosfato com 1,5-pentanoditiol.

Amostra	Iniciador ^(a)	Solvente ^(b)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	M _n (g mol ⁻¹)	D
PTP 01	AIBN 1%	Em massa	480	80	4.100	1,9
PTP 02	AIBN 1%	Em massa	1440	80	5.600	2,2
PTP 03	AIBN 1%	Clorofórmio	480	80	6.200	2,3
PTP 04	AIBN 5%	Em massa	480	80	5.500	2,2
PTP 05	AIBN 5%	Em massa	1440	80	8.800	2,0
PTP 06	AIBN 5%	Clorofórmio	480	80	10.100	2,1
PTP 07	DMPA 1%	Em massa	5	Ambiente	6.650	1,9
PTP 08	DMPA 1%	Clorofórmio	5	Ambiente	12.700	2,4
PTP 09	DMPA 1%	Diclorometano	5	Ambiente	13.200	2,3
PTP 10	DMPA 5%	Em massa	5	Ambiente	6.700	1,9
PTP 11	DMPA 5%	Clorofórmio	5	Ambiente	15.650	2,3
PTP 12	DMPA 5%	Diclorometano	5	Ambiente	17.200	2,2

^(a) A quantidade de iniciador foi calculada em massa, em relação ao fenil di(undec-10-em-1-il) fosfato utilizado nas reações.

^(b) Nas reações em solução, os solventes foram utilizados em uma razão mássica de 1:1 em relação ao fenil di(undec-10-em-1-il) fosfato.

A Figura 31 mostra o espectro de RMN da amostra produzida utilizando 5 % em massa de DMPA em relação ao fenil di(undec-10-en-1-il) fosfato, em temperatura ambiente e como diclorometano como solvente (PTP 12).

Figura 31: Espectro de ^1H -RMN (400 MHz) do poli(tioéter-fosfoéster) (reação PTP 12) em clorofórmio-d.

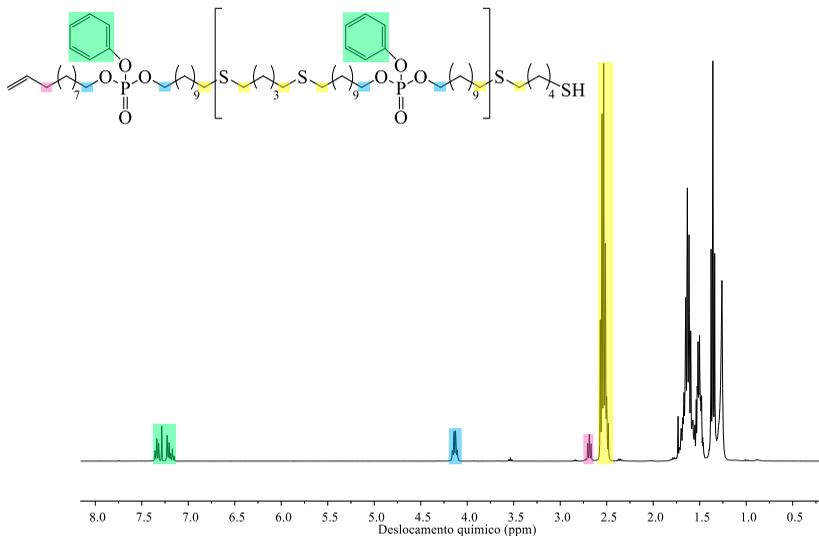
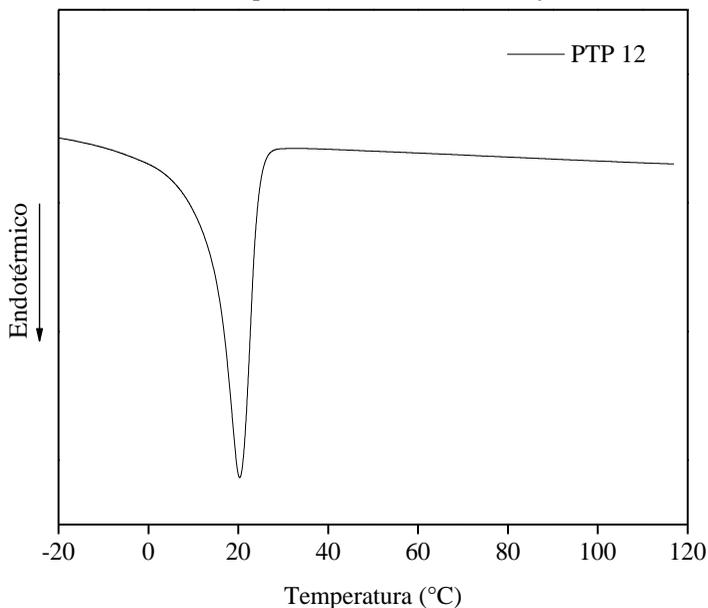


Figura 32: Curva de fusão do poli(tioéter-fosfoéster) - reação PTP 12.



Análises térmicas das amostras de poli(tioéter-fosfoésteres) foram conduzidas por DSC. De uma forma geral, as temperaturas de fusão, extraídas da segunda curva de aquecimento, variaram de 17 a 21 °C, e a variação da T_m foi proporcional ao aumento de massa molar, sendo que a amostra PTP 12 apresentou a maior T_m , em torno de 21 °C, conforme mostrado na Figura 32. Apesar desta ser a primeira vez que esse tipo de material, produzido via adição tiol-eno, é descrito na literatura, os trabalhos que relatam a síntese de polifosfoésteres apontam materiais com temperaturas de fusão variando entre -5 a 40 °C (MARSICO et al., 2012; DING et al., 2013). Da mesma forma, esses autores relatam que a temperatura de transição vítrea (T_g) desses mesmos materiais permanece na faixa de -30 a -50 °C, sendo que essa faixa de temperatura é difícil de ser detectada por DSC devido às limitações de temperatura e velocidade de resfriamento do equipamento.

5.2.3 Conjugação do poli(tioéter-fosfoéster) com a ω -PDL funcionalizada com tiol

Esta etapa do trabalho envolveu a junção das estruturas produzidas nos itens anteriores, com o objetivo de aproveitar as características desejáveis dos materiais obtidos: a ω -PDL funcionalizada com tiol possui

uma T_m ideal para uso na área biomédica (em torno de 56 °C) e o poli(tioéter-fosfoéster) conta com a flexibilidade das ligações P-O-C, alta taxa de degradação e biocompatibilidade e afinidade por tecidos ósseos (ZHAO et al., 2003; LI et al., 2006; ALEXANDRINO et al., 2014; KRAICHEVA et al., 2014).

A concepção original para a obtenção desse material consistia em misturar o monômero fenil di(undec-10-em-1-il) fosfato com um ditiol (1,5-pentanoditiol) e com a ω -PDL funcionalizada com tiol ao mesmo tempo, na presença de um iniciador. Algumas tentativas foram realizadas, mas, após a solubilização e precipitação do material obtido em metanol, era possível observar a formação de dois materiais distintos, um deles oriundo da reação entre o fenil di(undec-10-em-1-il) fosfato com o ditiol e o outro a ω -PDL não reagida. Essa abordagem de síntese foi posteriormente abandonada, uma vez que, teoricamente, a reatividade do dieno com o ditiol é muito mais elevada quando comparada a reatividade com a ω -PDL funcionalizada com tiol, principalmente devido ao menor tamanho da cadeia do ditiol e sua maior mobilidade no meio reacional. A Tabela 10 mostra as condições reacionais e os resultados de massa molar das tentativas de síntese em uma única etapa do copolímero em bloco entre o monômero fenil di(undec-10-em-1-il) fosfato com 1,5-pentanoditiol e com a ω -PDL funcionalizada com tiol.

Tabela 10: Condições reacionais e resultados em termos de massa molar (GPC) para a tentativa de síntese do copolímero em bloco.

Razão molar dieno:ditiol: ω -PDL ^(a)	Iniciador ^(b)	Temperatura (°C)	Tempo (min) ^(c)	M_n (g mol ⁻¹)	D
1:1:50	DMPA (5%)	Ambiente	5	5.300	1,9
1:1:10	DMPA (5%)	Ambiente	5	5.600	2,5
1:1:5	DMPA (5%)	Ambiente	5	5.200	2,3

^(a) M_n da ω -PDL funcionalizada com tiol utilizada = 4300 g mol⁻¹.

^(b) A quantidade de iniciador foi calculada em massa, em relação ao fenil di(undec-10-em-1-il) fosfato utilizado nas reações.

^(c) Todas as reações foram conduzidas no equipamento emissor de luz UV Light Hammer® 6” operando a 200 W cm⁻².

Pode-se observar na Tabela 10 que mesmo utilizando uma quantidade relativamente elevada de fotoiniciador (5 % em massa em relação ao fenil di(undec-10-em-1-il) fosfato) não houve um grande aumento na massa molar dos materiais obtidos. Este fato, aliado a clara separação dos materiais obtidos após a precipitação, fez com que o trabalho seguisse uma abordagem diferente para a síntese do material

final, conforme o que foi apresentado nos itens anteriores deste capítulo: produção do poli(tioéter-fosfoéster) e sua posterior copolimerização com a ω -PDL funcionalizada com tiol.

A Tabela 11 mostra as condições reacionais e os resultados em termos de massa molar das amostras do copolímero poli(ω -PDL-b-TEPE) produzido via adição tiol-eno entre o poli(tioéter-fosfoéster) e a ω -PDL funcionalizada com tiol, sob luz UV, usando o iniciador DMPA.

Tabela 11: Condições reacionais e resultados em termos de massa molar para a síntese do copolímero poli(ω -PDL-b-TEPE).

Amostra ^(a)	Razão molar ω -PDL:poli(tioéter-fosfoéster) ^(b)	Iniciador (em massa, em relação ao poli(tioéter-fosfoéster))	M_n (g mol ⁻¹)	\bar{D}
PCJ 01	2:1	1 %	14.500	2,1
PCJ 02	1:1	1 %	16.550	1,8
PCJ 03	1:2	1 %	21.400	2,4
PCJ 04	2:1	5 %	27.400	2,2
PCJ 05	1:1	5 %	28.500	2,1
PCJ 06	1:2	5 %	31.200	2,2

^(a) Todas as amostras foram produzidas no equipamento UV Light Hammer® 6” operando a 200 W cm⁻², em temperatura ambiente e usando clorofórmio como solvente (1:1 em massa em relação aos componentes da reação) com 5 min sob exposição a luz UV.

^(b) M_n da ω -PDL funcionalizada com tiol utilizada = 4300 g mol⁻¹ e M_n do poli(tioéter-fosfoéster) (PTP 12) = 17.200 g mol⁻¹.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 11, pode ser verificado que quando se aumentou a quantidade de poli(tioéter-fosfoéster) em relação a ω -PDL funcionalizada com tiol, as massas molares aumentaram, variando de 14.500 a 21.400 g mol⁻¹. Também se pode observar uma clara influência da quantidade de iniciador utilizado nas conjugações: quando 1 % em massa em relação ao poli(tioéter-fosfoéster) foi utilizado, as massas molares não foram maiores do que 21.500 g mol⁻¹ e quando utilizou-se 5 % em massa, as massas molares (M_n) ficaram na faixa de 31.000 g mol⁻¹, com a maior massa molar observada quando a razão molar entre ω -PDL funcionalizada com tiol e poli(tioéter-fosfoéster) foi 1:2 (reação PCJ 06).

Apesar deste copolímero, derivado de ω -PDL ser novo, a literatura acerca de conjugações utilizando o mecanismo de adição tiol-eno diz que, geralmente, as conversões desse tipo de conjugação variam drasticamente dependendo das condições reacionais utilizadas, mas de uma forma geral, iniciadores termais do tipo “azobis” não são eficientes para esse tipo de conjugação. Por outro lado, fotoiniciadores, como o DMPA, são os mais

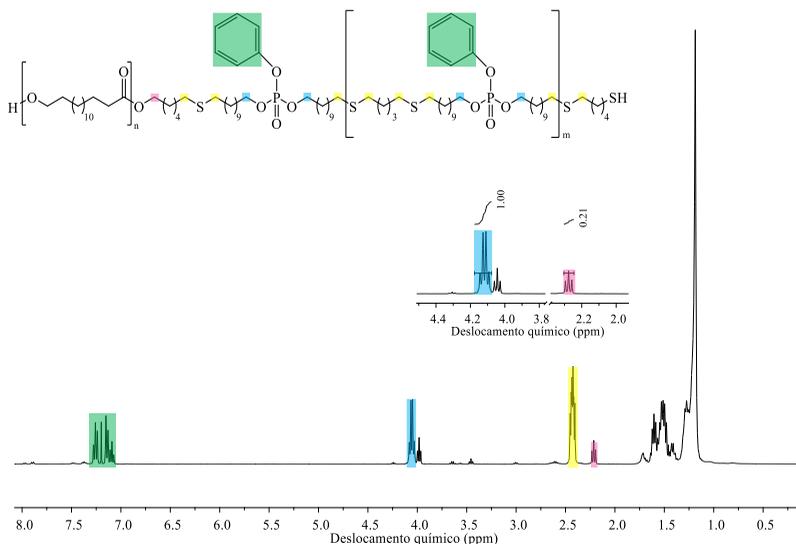
efetivos, geralmente levando a eficiências de conjugação acima de 90 % (FAIRBANKS; LOVE; BOWMAN, 2017).

A literatura recente afirma que o produto de uma conjugação entre diferentes tipos de polímeros irá, ao menos parcialmente, apresentar as características físicas dos materiais de partida, o que torna difícil uma completa separação dos materiais reagidos e não reagidos, dificultando a caracterização destes materiais. Nesse contexto, Koo e colaboradores (2010) sintetizaram dois precursores, poliestireno contendo funcionalidade tiol e um poli(acetato de vinila) contendo uma dupla terminal. Os autores acoplaram/conjugaram esses materiais sob luz UV, testando várias razões de tiol para eno e concluíram que apesar de o produto final possuir uma massa molar maior do que as dos precursores, os resultados de $^1\text{H-RMN}$ mostraram que as conjugações só foram eficientes quando uma maior quantidade de tiol em relação ao eno foi utilizada e, mesmo assim, conjugações com eficiência de, no máximo 25 % foram encontradas. Ainda, os autores atribuem essa baixa eficiência de conjugação ao fato de que reações de terminação bimoleculares podem ocorrer durante a exposição a luz UV, competindo com as adições tiol-eno e que essas reações laterais dependem da estrutura dos materiais precursores utilizados.

Complementarmente, alguns autores apontam que a conjugação via tiol-eno de moléculas pequenas ocorre, geralmente, com uma elevada eficiência e rapidez, porém, para moléculas maiores, o sistema se torna menos eficiente, muito provavelmente devido ao menor controle difusional das moléculas (COLAK et al., 2016).

A luz dessas afirmações, após a conjugação das duas estruturas para a obtenção do poli(ω -PDL-b-TEPE), o mesmo foi precipitado em metanol gelado, para a retirada de material não reagido e de fotoiniciador não dissociado. Após isso, o material resultante foi seco sob vácuo até massa constante e, uma vez seco, foi dissolvido em diclorometano para a remoção do poli(tioéter-fosfoéster) não conjugado, filtrado e seco novamente sob vácuo. Rendimentos em massa na ordem de 60 % foram obtidos para todas as reações e a Figura 33 mostra o espectro de $^1\text{H-RMN}$ da amostra PCJ 06 (M_n de $31.200 \text{ g mol}^{-1}$ e dispersidade (\mathcal{D}) de 2,2).

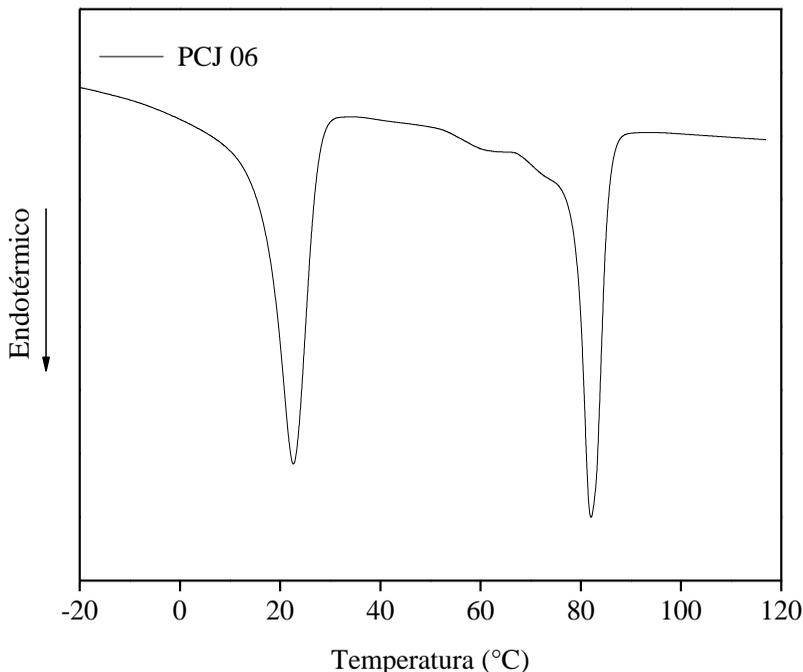
Figura 33: Espectro de ^1H -RMN (400 MHz) do poli(ω -PDL-b-TEPE) (amostra PCJ 06), em clorofórmio-d.



Como pode ser observado na Figura 33, os picos referentes aos hidrogênios inerentes ao carbono ligado ao grupamento fosfato do poli(tioéter-fosfoéster) estão presentes nas regiões de 4,19 a 4,09 ppm. Por sua vez os hidrogênios ligados aos carbonos adjacentes ao grupamento éster no precursor ω -PDL funcionalizada com tiol são mostrados nas regiões de 2,33 a 2,23 ppm. Essas duas regiões de deslocamento foram levadas em consideração na hora da integração dos resultados e cálculo da eficiência da conjugação, conforme pode ser visto no quadrado superior da Figura 33, o qual apresenta uma aproximação da região onde os deslocamentos são mostrados. Conforme pode ser visto nessa região, a eficiência da conjugação também se manteve na faixa de 21 %, valor similar a aqueles reportados anteriormente na literatura para a conjugação tiol-eno de outros precursores, mas com o mesmo mecanismo de conjugação (KOO; et al., 2010) Essa eficiência de conjugação relativamente baixa pode ser justificada pela falta de mobilidade de ambos precursores no meio reacional, devida a elevada massa molar de ambos componentes (ω -PDL funcionalizada com tiol = 4300 g mol^{-1} e poli(tioéter-fosfoéster) = $17.200 \text{ g mol}^{-1}$). Além disso, reações de terminação bimoleculares, principalmente entre as extremidades tiol e dupla ligação de algumas moléculas do poli(tioéter-

fosfoéster), podem também ter acontecido, competindo diretamente com a conjugação tiol-eno entre os dois precursores.

Figura 34: Curva de fusão do copolímero poli(ω -PDL-co-TEPE) (amostra PCJ 06).



A Figura 34 mostra a curva de fusão do poli(ω -PDL-b-TEPE) (amostra PCJ 06). Como pode ser observado, dois picos de fusão distintos, um em torno de 25 e outro em 85 °C são observados. A primeira impressão é de que se trata de dois materiais distintos, com duas temperaturas de fusão diferentes, mas, conforme já relatado anteriormente, quando os precursores possuem estruturas cristalinas diferentes, os copolímeros resultantes muitas vezes passam a possuir ambas as estruturas cristalinas (isodimorfismo), tendo assim diferentes temperaturas de fusão e cristalização para cada uma dessas estruturas. Baseados nesse conceito, Ceccorulli e colaboradores (2005) investigaram a copolimerização enzimática de ω -PDL com ϵ -caprolactona. Os autores concluíram que quando os monômeros foram utilizados para a copolimerização enzimática, o copolímero obtido apresentou uma única temperatura de fusão, intermediária à dos homopolímeros de referência,

porém, quando os precursores da copolimerização foram os homopolímeros de ω -PDL e ϵ -caprolactona previamente formados, os copolímeros obtidos mostraram diferentes temperaturas de fusão, cada uma delas atribuída a estrutura cristalina de um dos componentes do material formado. O mesmo grupo de pesquisa investigou também a copolimerização de ω -PDL com poli(etileno glicol), onde os autores relataram que a longa estrutura da macrolactona possui a capacidade incomum de induzir a cristalização do bloco de PEG ligado covalentemente na rede cristalina da poli(ω -PDL) (KALRA et al., 2004).

Mais recentemente, outros autores ainda afirmam que poliésteres alifáticos, derivados da copolimerização de 1,6-hexanodiol com diferentes diácidos possuem a propriedade de isodimorfismo, apresentando dois picos de fusão cristalina, os quais puderam ser verificados via DSC (YU et al., 2017).

Assim sendo, a amostra PCJ 06, que apresentou uma massa molar numérica média (M_n) em torno de 31.200 g mol⁻¹, com dispersidade de 2,2, eficiência de conjugação de 21 % e duas temperaturas de fusão, 25 e 85 °C, mostrando a característica de isodimorfismo, foi escolhida para ser eletrofiada e produzir fibras em uma conformação espacial tridimensional, formando os *scaffolds* poliméricos oriundos deste copolímero em bloco.

5.2.4 Produção dos *scaffolds* poliméricos

Inicialmente o homopolímero poli(ω -PDL) com massa molar numérica média de 30.700 g mol⁻¹ e dispersidade de 3,4, foi utilizado para a produção de fibras via eletrofiação. As condições para operação do equipamento foram adaptadas das existentes na literatura para a eletrofiação de amostras de poli(ω -PDL) (LETIZIA FOCARETE et al., 2010). Para isso, a poli(ω -PDL) foi dissolvida em uma mistura de solventes (clorofórmio, diclorometano e 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol nas razões mássicas de 5:4:1). Três diferentes concentrações de solução polimérica foram estudadas e as condições de operação do equipamento são mostradas na Tabela 12. Cabe ressaltar que a concentração de 20 % em massa é a concentração mais elevada possível de homopolímero que pode ser solubilizada na mistura de solventes utilizada.

Tabela 12: Parâmetros utilizados para a otimização da eletrofição das soluções do homopolímero poli(ω -PDL).

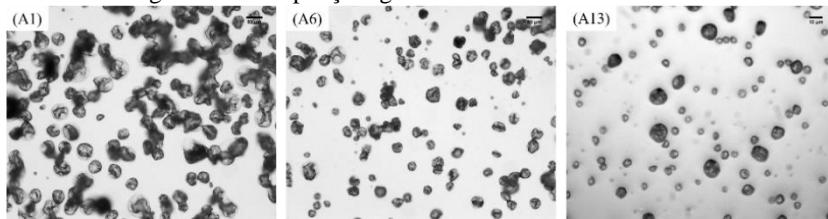
Amostras ^(a)			Voltagem (kV)	Distância do coletor (cm)	Vazão de alimentação ($\mu\text{L min}^{-1}$)
A1	B1	C1	8	8	100
A2	B2	C2	8	12	100
A3	B3	C3	12	8	100
A4	B4	C4	12	12	100
A5	B5	C5	10	8	50
A6	B6	C6	10	12	50
A7	B7	C7	10	8	150
A8	B8	C8	10	12	150
A9	B9	C9	8	10	50
A10	B10	C10	12	10	50
A11	B11	C11	8	10	150
A12	B12	C12	12	10	150
A13	B13	C13	10	10	100

^(a) As amostras poliméricas foram dissolvidas em uma mistura de clorofórmio, diclorometano e 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol e a concentração é expressa em massa de amostra por volume de solução. A1-A13 = 10 %, B1 - B13 = 15 % e C1-C13 = 20 %.

As três diferentes concentrações de solução de poli(ω -PDL) foram submetidas aos parâmetros estabelecidos na Tabela 12. Inicialmente 1 mL de cada amostra foi eletrofiado sobre uma lâmina de vidro para a visualização das fibras formadas com o uso de um microscópio óptico.

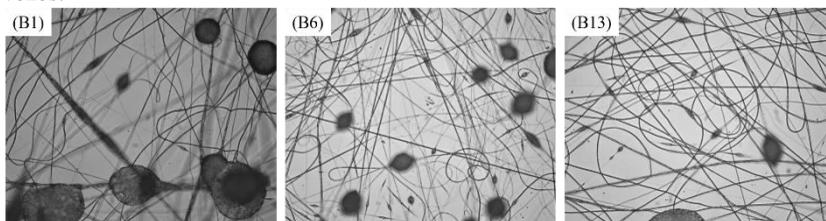
A Figura 35 mostra as estruturas produzidas quando a concentração de 10 % em massa foi utilizada, onde é possível verificar somente a formação de partículas (possível eletroaspersão) com formato irregular ao invés de fibras, indiferente dos parâmetros experimentais usados no equipamento, indicando que esta concentração é muito baixa para produzir uma solução com tensão superficial e emaranhamento de cadeias suficiente para a produção de fibras (GUPTA et al., 2005).

Figura 35: Partículas produzidas utilizando as amostras A1 (8 kV, 8 cm e $100 \mu\text{L min}^{-1}$) (barra = $50 \mu\text{m}$), A6 (10 kV, 12 cm e $50 \mu\text{L min}^{-1}$) (barra = $50 \mu\text{m}$) e A13 (10 kV, 10 cm e $100 \mu\text{L min}^{-1}$) (barra = $10 \mu\text{m}$), todas com concentração de 10 % em massa. Magnitude de ampliação igual a 20 vezes.



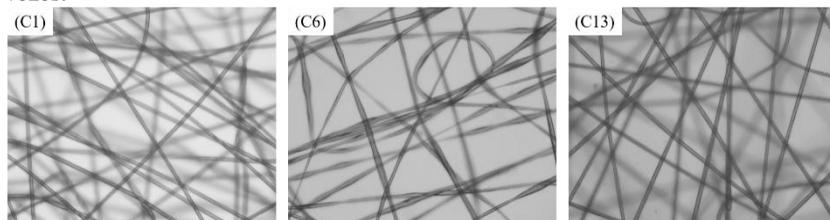
As amostras produzidas utilizando uma solução do homopolímero poli(ω -PDL) com concentração de 15 % em massa são mostradas na Figura 36, onde pode ser observada a formação de fibras não homogêneas, quebradiças e com a presença de contas ou grânulos “*beads*”, indiferente das condições operacionais utilizadas, fato que indica que a concentração utilizada (15 % em massa) ainda não é ideal, pois geralmente o aumento da concentração da solução polimérica leva a um aumento no diâmetro das fibras formadas e a redução ou desaparecimento de regiões com defeitos. Alguns autores afirmam que a formação de *beads* em fibras eletrofiadas está diretamente relacionada com a viscosidade da solução, mas também pode ser influenciada pela condutividade elétrica e pela tensão superficial desta mesma solução. De uma maneira geral, quanto maior for a viscosidade, a condutividade e a tensão superficial maior será a probabilidade de se obter fibras sem defeitos (LEE et al., 2002; LIANG; HSIAO; CHU, 2007; JANIK; MARZEC, 2015; RAJZER; MENASZEK; CASTANO, 2017).

Figura 36: Fibras produzidas utilizando as amostras B1 (8 kV, 8 cm e 100 $\mu\text{L min}^{-1}$), B6 (10 kV, 12 cm e 50 $\mu\text{L min}^{-1}$) e B13 (10 kV, 10 cm e 100 $\mu\text{L min}^{-1}$), todas com concentração de 15 % em massa. Magnitude de ampliação igual a 20 vezes.



Por fim, a terceira concentração de solução polimérica testada, 20 % em massa em relação a mistura de solventes resultou em fibras mais homogêneas e sem a formação aparente de *beads*, embora, em algumas condições operacionais testadas foi possível verificar uma evaporação incompleta do solvente, resultando em fibras irregulares e quebradiças. De uma maneira geral, as condições onde se utilizou 8 kV foram as que resultaram em fibras mais estáveis. A vazão de injeção da solução e a distância da agulha ao coletor também influenciaram a morfologia das fibras, pois quando uma vazão mais elevada e uma distância menor foram utilizados, não houve a completa evaporação do solvente. A Figura 37 mostra as fibras de poli(ω -PDL) produzidas a partir da solução com concentração de 20 % em massa.

Figura 37: Fibras produzidas utilizando as amostras C1 (8 kV, 8 cm e $100 \mu\text{L min}^{-1}$), C6 (10 kV, 12 cm e $50 \mu\text{L min}^{-1}$) e C13 (10 kV, 10 cm e $100 \mu\text{L min}^{-1}$), todas com concentração de 20 % em massa. Magnitude de ampliação igual a 20 vezes.



A amostra C13, produzida a partir da eletrofição do homopolímero com concentração de 20 % em massa e com condições operacionais de 10 kV de voltagem, 10 cm de distância da agulha para o coletor e vazão de injeção de solução de $100 \mu\text{L min}^{-1}$ foi eletrofiada sobre uma folha de papel alumínio e esta amostra foi utilizada para as análises de microscopia eletrônica de varredura (SEM). Ainda, esta mesma amostra foi eletrofiada sobre um coletor antiaderente, recoberto com teflon e foi utilizada nos ensaios de degradação hidrolítica e enzimática.

A Figura 38 mostra as imagens de microscopia eletrônica de varredura da amostra C13, onde pode ser verificada a formação de fibras altamente entrelaçadas, porém, com a presença de defeitos do tipo *beads* com diâmetros na faixa de 10 a $40 \mu\text{m}$. Cabe ressaltar que a formação desses defeitos ocorre apenas em regiões pontuais da amostra e pode ser atribuída a dificuldade de estiramento do polímero. Isso pode ocorrer devido as condições operacionais utilizadas e pelas características da solução polimérica.

Figura 38: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da amostra C13.

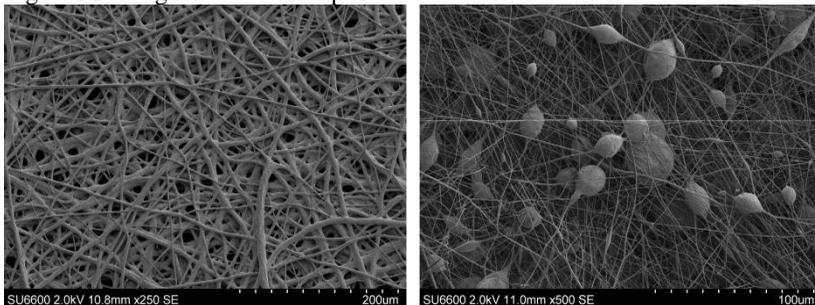
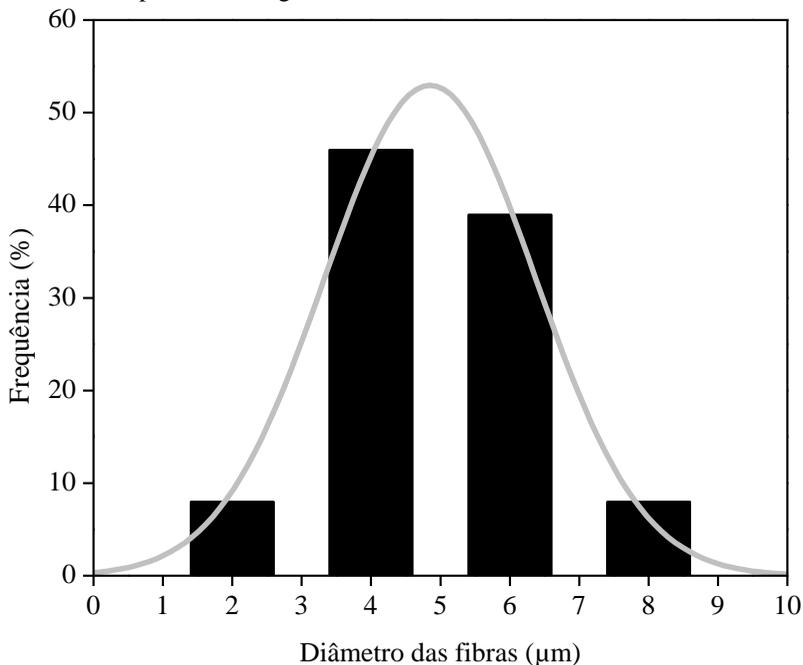


Figura 39: Histograma de frequência do diâmetro médio das fibras da amostra C13 obtido a partir das imagens de SEM.



A partir das imagens de microscopia eletrônica de varredura foi possível realizar a contagem do diâmetro médio das fibras produzidas. Conforme pode ser observado na Figura 39, aproximadamente 45 % das fibras possuem um diâmetro médio de 4 μm , enquanto que 39 % possuem diâmetro de até 6 μm . Diâmetros maiores que 6 e menores que 4 μm foram também encontrados, porém em quantidades menores, não passando de 10 % do total das fibras contadas.

Os valores médios de diâmetro das fibras apresentados neste trabalho encontram-se um pouco acima de valores reportados na literatura para a eletrofiação de poli(ω -PDL). Focarete e colaboradores (2010) realizaram a eletrofiação de poli(ω -PDL) com massa molar numérica média de $64.000 \text{ g mol}^{-1}$ e com uma concentração em solução de 7 % em massa, utilizando uma voltagem de 16 kV e vazão de injeção variando de 50 a 200 $\mu\text{L min}^{-1}$ e obtiveram fibras com diâmetro médio de 150 a 610 nm. Essa diferença no diâmetro das fibras pode ser explicada pelas diferentes condições operacionais do equipamento de eletrofiação, massa

molar dos polímeros utilizados e também pelo diâmetro da agulha utilizada no equipamento de eletrofição.

Após a otimização dos parâmetros de operação para a produção de *scaffolds* a partir do homopolímero poli(ω -PDL), o copolímero poli(ω -PDL-b-TEPE), produzido no item anterior desse capítulo (amostra PCJ 06, M_n de 31.200 g mol⁻¹, \bar{D} de 2,2 e eficiência de conjugação de 21 %), foi misturado em uma razão mássica de 50:50 com o homopolímero poli(ω -PDL) (M_n = 30.700 g mol⁻¹ e \bar{D} = 3,4), dissolvido em uma mistura de clorofórmio, diclorometano e 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (5:4:1 em massa) e as soluções com diferentes concentrações foram eletrofiadas sob as condições apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13: Parâmetros utilizados para a otimização da eletrofição das soluções contendo a mistura de poli(ω -PDL-b-TEPE) (PCJ 06) com a poli(ω -PDL).

Amostras ^(a)			Voltagem (kV)	Distância do coletor (cm)	Vazão de alimentação ($\mu\text{L min}^{-1}$)
D1	E1	F1	8	8	100
D2	E2	F2	8	12	100
D3	E3	F3	12	8	100
D4	E4	F4	12	12	100
D5	E5	F5	10	8	50
D6	E6	F6	10	12	50
D7	E7	F7	10	8	150
D8	E8	F8	10	12	150
D9	E9	F9	8	10	50
D10	E10	F10	12	10	50
D11	E11	F11	8	10	150
D12	E12	F12	12	10	150
D13	E13	F13	10	10	100

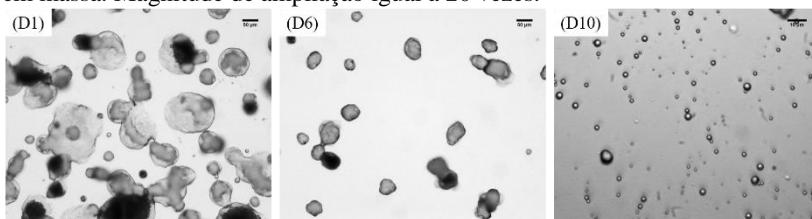
^(a) As amostras de copolímero PCJ 06 foram misturadas com o homopolímero poli(ω -PDL) e dissolvidas em uma mistura de clorofórmio, diclorometano e 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol, resultando em concentrações expressas em massa de amostra por volume de solução. D1-D13 = 10 %, E1 - E13 = 20 % e F1-F13 = 30 %.

Para a eletrofição das misturas de poli(ω -PDL-b-TEPE) com o homopolímero, aproximadamente 1 mL de solução polimérica foi eletrofiado sob uma lâmina de vidro e os resultados foram avaliados, inicialmente, com o uso de um microscópio óptico.

Quando as amostras D1 a D13, com concentração de 10 % em massa foram eletrofiadas, somente partículas não homogêneas, com diâmetros variando de 20 a mais de 50 μm foram obtidas, conforme pode ser observado na Figura 40. Cabe ressaltar que em todos os parâmetros operacionais testados somente partículas foram obtidas e as partículas menores e mais homogêneas foram obtidas quando se utilizou voltagem

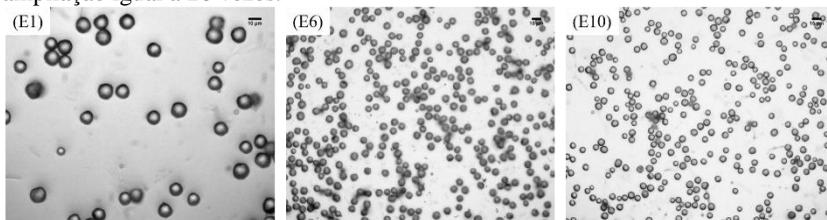
de 12 kV, distância da agulha para o coletor de 10 cm e fluxo de injeção de solução de $50 \mu\text{L min}^{-1}$ (amostra D10).

Figura 40: Partículas produzidas utilizando as amostras D1 (8 kV , 8 cm e $100 \mu\text{L min}^{-1}$) (barra = $50 \mu\text{m}$), D6 (10 kV , 12 cm e $50 \mu\text{L min}^{-1}$) (barra = $50 \mu\text{m}$) e D10 (12 kV , 10 cm e $50 \mu\text{L min}^{-1}$) (barra = $10 \mu\text{m}$), todas com concentração de 10 % em massa. Magnitude de ampliação igual a 20 vezes.



A Figura 41 mostra os resultados obtidos quando a solução com concentração de 20 % em massa foi eletrofiada (amostras E1 a E13). Conforme pode ser observado, o aumento na concentração levou a produção de partículas mais estáveis, com diâmetros médios variando de 10 a $15 \mu\text{m}$, indicando uma melhora nas propriedades da solução, porém essa concentração ainda não é elevada o suficiente para a produção de fibras estáveis da mistura do poli(ω -PDL-b-TEPE) com o homopolímero poli(ω -PDL).

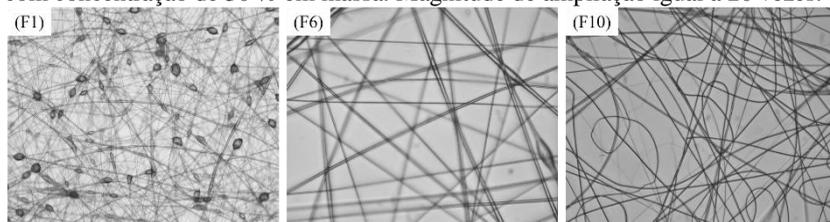
Figura 41: Partículas produzidas utilizando as amostras E1 (8 kV , 8 cm e $100 \mu\text{L min}^{-1}$), E6 (10 kV , 12 cm e $50 \mu\text{L min}^{-1}$) e E10 (12 kV , 10 cm e $50 \mu\text{L min}^{-1}$), todas com concentração de 20 % em massa (barra = $10 \mu\text{m}$). Magnitude de ampliação igual a 20 vezes.



Por fim, as amostras provenientes da solução com concentração de 30 % foram eletrofiadas e a Figura 42 mostra as imagens das fibras obtidas. Diferentemente do que aconteceu quando o homopolímero poli(ω -PDL) puro foi eletrofiado, quando a mistura de poli(ω -PDL-b-TEPE) com a poli(ω -PDL) foi eletrofiada, a concentração máxima que pode ser solubilizada na mistura de solventes utilizada chegou a 30 % em

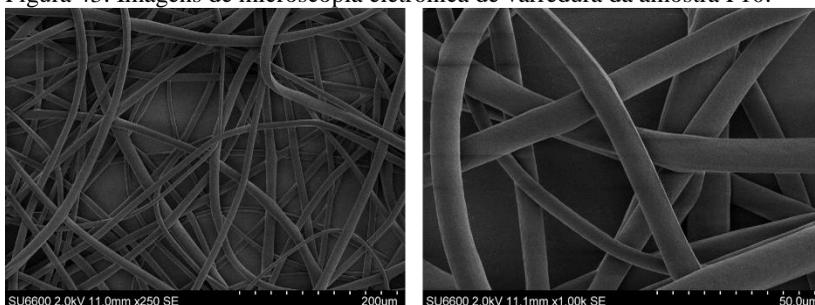
massa. Isso se deve provavelmente ao fato de que o poli(tioéter-fosfoéster) incorporado no copolímero apresenta uma solubilidade elevada nos solventes utilizados, ao contrário da poli(ω -PDL) que, em concentrações mais elevadas, é somente solúvel em clorofórmio. Dessa forma, verificou-se que essa concentração de 30 % em massa foi suficiente para a formação de fibras estáveis e que os parâmetros de operação do equipamento influenciaram a estabilidade e morfologia das fibras obtidas. Por exemplo, quando a voltagem de 8 kV foi utilizada, como na amostra F1 da Figura 42, pode-se observar uma acentuada formação de defeitos do tipo *beads* nas fibras, todavia, quando essa voltagem foi aumentada para 10 e 12 kV pode ser observado o desaparecimento dos defeitos do tipo *beads* e a formação de fibras mais homogêneas.

Figura 42: Fibras produzidas utilizando as amostras F1 (8 kV, 8 cm e $100 \mu\text{L min}^{-1}$), F6 (10 kV, 12 cm e $50 \mu\text{L min}^{-1}$) e F10 (12 kV, 10 cm e $50 \mu\text{L min}^{-1}$), todas com concentração de 30 % em massa. Magnitude de ampliação igual a 20 vezes.



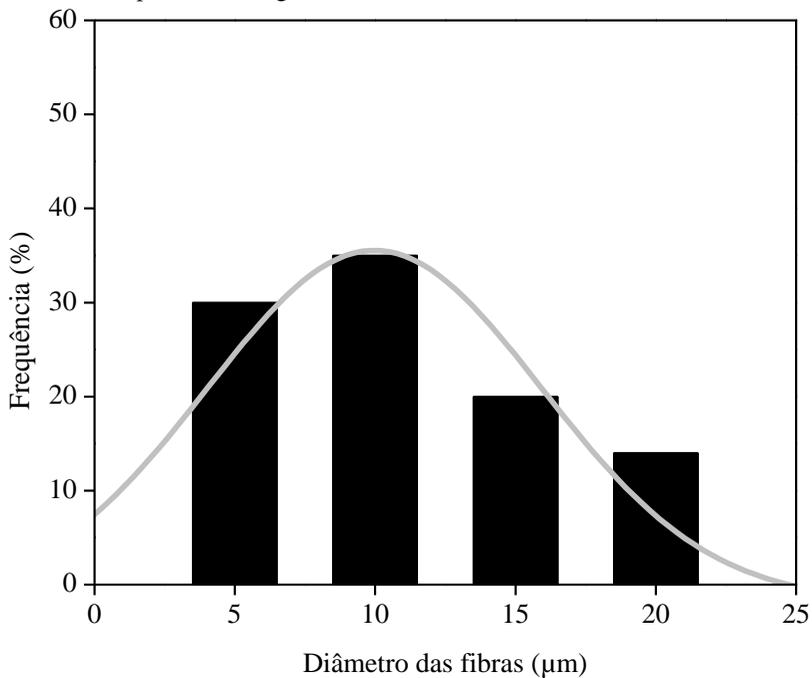
Após a obtenção desses resultados, a amostra F10, com condições operacionais de 12 kV de voltagem, 10 cm de distância da agulha para o coletor e fluxo de injeção de $50 \mu\text{L min}^{-1}$ foi eletrofiada sobre uma folha de papel alumínio (aproximadamente 1 mL de solução) e a amostra foi utilizada para as análises de microscopia eletrônica de varredura (SEM). Da mesma forma, a amostra foi eletrofiada sobre um coletor antiaderente, e foi utilizada para a realização dos ensaios de degradação hidrolítica e enzimática.

Figura 43: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da amostra F10.



A Figura 43 mostra as imagens de microscopia eletrônica de varredura da amostra F10 (12 kV, 10 cm e $50 \mu\text{L min}^{-1}$), com concentração de 30 % em massa, onde pode ser observada a formação de fibras altamente entrelaçadas e sem a presença de *beads*.

Figura 44: Histograma de frequência do diâmetro médio das fibras da amostra F10 obtido a partir das imagens de SEM.



A partir das imagens de microscopia eletrônica de varredura foi possível realizar a contagem do diâmetro médio das fibras produzidas quando a amostra F10 foi eletrofiada. Conforme pode ser observado na Figura 44, 31 % do total das fibras contadas possuíam diâmetro médio de até 5 μm , 36 % das fibras diâmetro de 5 a 10 μm , 19 % de 10 a 15 μm e 14 % das fibras possuíam diâmetro médio de 15 até 20 μm .

Quando comparadas com as fibras do homopolímero poli(ω -PDL) é possível observar a formação de fibras com diâmetros maiores. Enquanto que a maioria das fibras de homopolímero possuem diâmetros na faixa de 4 a 6 μm , na amostra F10 foi possível observar uma faixa mais elevada de distribuição de diâmetros, com maior concentração de fibras na faixa de 10 μm , mas com uma quantidade relativamente elevada de fibras de até 20 μm de diâmetro. Essa diferença de diâmetros pode ser justificada pela maior concentração da solução eletrofiada, pela vazão de eletrofição utilizada e pelo fato de que o poli(tioéter-fosfoéster) utilizado na conjugação apresenta uma solubilidade e interação com a mistura de solventes empregada diferente da poli(ω -PDL). Complementarmente, alguns autores pontuam que, ao aumentar a concentração e consequentemente a viscosidade de uma solução polimérica a ser eletrofiada, ao mesmo tempo em que diminui a tensão superficial favorece a formação de fibras sem *beads*, porém, as fibras formadas tendem a possuir diâmetros maiores (MCKEE et al., 2004; GUPTA et al., 2005)

5.2.5 Viabilidade celular dos *scaffolds*

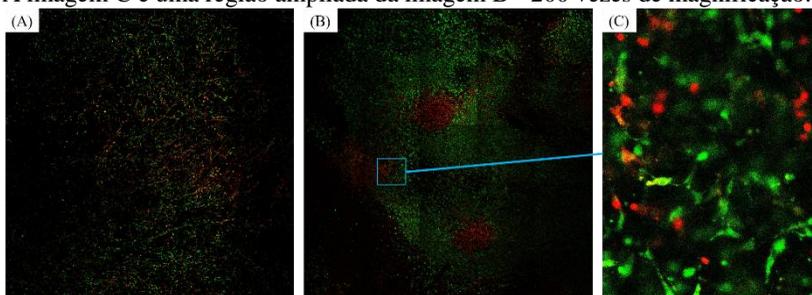
Polímeros derivados de macrolactonas são conhecidos por geralmente não apresentarem grande toxicidade. Em 2008, Van Der Meullen e colaboradores testaram a biocompatibilidade de uma série de macrolactonas, incluindo a poli(ω -PDL), utilizando um ensaio de citotoxicidade padrão (MTT - um ensaio colorimétrico que avalia a atividade metabólica celular). Resumidamente, a atividade metabólica de uma linha celular de fibroblastos primários provenientes de camundongos (3T3 – inóculo com 3×10^5 células) foi testada frente a soluções com diferentes concentrações de polímero. As células 3T3 foram cultivadas durante 96 h na presença de meio de cultura contendo poli(ω -PDL). Após estes testes preliminares, os autores puderam verificar que a poli(ω -PDL) não foi tóxica para as células quando se utilizou alta densidade de células (1×10^4 células por ensaio) e existiu uma toxicidade negligenciável para os ensaios com baixa densidade de células (5×10^3 células por ensaio – placas com poços). Os autores puderam concluir que os filmes do

homopolímero poli(ω -PDL) não apresentaram citotoxicidade detectável perante aos ensaios MTT.

A viabilidade celular de *scaffolds* do homopolímero poli(ω -PDL) foi também reportada através de ensaios de citotoxicidade indireta (FOCARETE et al., 2010). As avaliações de citotoxicidade dos *scaffolds* eletrofiados foram realizadas *in vitro* perante células cardíacas embrionárias de camundongos (H9c2). Os resultados obtidos pelos autores indicaram a ausência de toxicidade para este tipo de células, indicando que a biocompatibilidade da poli(ω -PDL) é mantida após a fabricação dos *scaffolds* por eletrofição, um procedimento que envolve o uso de solventes.

No presente trabalho, a citotoxicidade dos *scaffolds* produzidos a partir do homopolímero e daqueles resultantes da mistura da poli(ω -PDL) com o copolímero poli(ω -PDL-b-TEPE) foi avaliada perante células do tipo MC3T3, uma linhagem celular de calvaria de camundongo, especializada na produção de matriz celular óssea. A verificação da quantidade de células vivas/mortas foi realizada com o uso de um microscópio confocal de varredura e os resultados são mostrados na Figura 45.

Figura 45: Viabilidade e proliferação celular (células vivas: verde e mortas: vermelho) nos *scaffolds* de (A) poli(ω -PDL) - 100 vezes de magnificação e (B) poli(ω -PDL) misturada com poli(ω -PDL-b-TEPE) - 100 vezes de magnificação. A imagem C é uma região ampliada da imagem B - 200 vezes de magnificação.

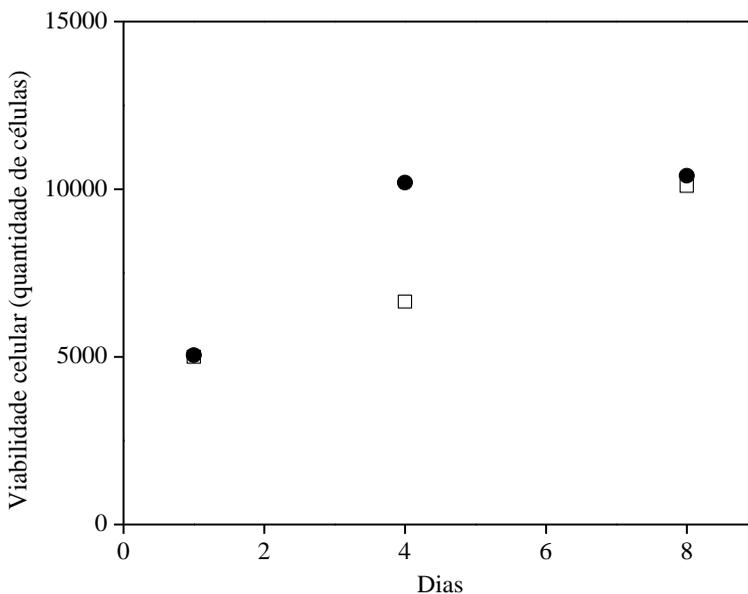


Conforme pode ser verificado na Figura 45-A, quando as células foram semeadas nos *scaffolds* produzidos a partir da eletrofição do homopolímero poli(ω -PDL) as mesmas permaneceram viáveis após 24 h, porém, com alguns pontos coloridos em vermelho, indicando regiões de morte celular. Cabe ressaltar que as células coloridas em vermelho estão distribuídas homoganeamente por toda a extensão do *scaffold* analisado. Por outro lado, quando as células foram semeadas nos *scaffolds* obtidos a

partir da mistura do homopolímero com o poli(ω -PDL-b-TEPE), pode-se notar um predomínio de células coloridas em verde, indicando uma viabilidade celular mais elevada (Figura 45-B). Finalmente, a Figura 45-C mostra uma região ampliada da Figura 45-B, onde é possível se observar a predominância de células vivas (verdes) em relação às células coloridas em vermelho/mortas. Apesar de ser um resultado qualitativo, este é representativo por ter sido observado por toda a extensão dos *scaffolds*.

Essa indicação de maior concentração de células vivas no *scaffold* que contém o poli(ω -PDL-b-TEPE) pode ser atribuída ao fato de que o fosfoéster, presente na fração poli(tioéter-fosfoéster) do copolímero possui uma afinidade muito elevada a esse tipo de célula, favorecendo assim a adesão e proliferação celular (ZHAO et al., 2003a; WANG et al., 2009). Em contrapartida, o surgimento de regiões pontuais em vermelho, indicando morte celular, pode ser atribuído a alguma remanescência de fotoiniciador não dissociado ou de tiol residual, que não foram completamente retirados do material produzido após as precipitações conduzidas em metanol. Por fim, deve-se notar que, apesar de a análise ser apenas qualitativa, esse comportamento de distribuição de células coloridas em verde e em vermelho pode ser observado por toda a extensão de ambos os *scaffolds* analisados.

Figura 46: Viabilidade e proliferação celular em 1, 4 e 8 dias de acordo com os resultados obtidos no ensaio Alamar Blue para os *scaffolds* produzidos a partir de (□) poli(ω -PDL) e (●) poli(ω -PDL) + poli(ω -PDL-b-TEPE).



A Figura 46 mostra os resultados em termos de quantidade de células, calculadas a partir da redução do reagente Alamar Blue e medidas por espectroscopia para os dois diferentes tipos de *scaffolds* produzidos. Conforme pode ser observado na quantificação das células no *scaffold* produzido utilizando somente o homopolímero poli(ω -PDL) (□), ocorre um crescimento na quantidade de células do primeiro ao quarto dia, partindo de aproximadamente 5×10^3 células para em torno de $6,2 \times 10^3$ células, finalizando com aproximadamente 1×10^4 células após 8 dias. Esse crescimento celular corrobora com os resultados de células vivas/mortas, obtidos por microscopia confocal, indicando que o homopolímero é um material que não apresenta toxicidade pronunciada para esse tipo de célula. Nos pontos que mostram o crescimento celular no *scaffold* produzido utilizando a mistura do homopolímero com o poli(ω -PDL-b-TEPE) (●), pode ser verificado um crescimento mais elevado entre o primeiro e o quarto dia, partindo de 5×10^3 para aproximadamente 1×10^4 células e estabilizando esse número de células após 8 dias de avaliação. Esse resultado mostra que, além do material obtido não apresentar citotoxicidade para este tipo de célula nos testes *in*

vitro, o *scaffold* é altamente compatível com as células, levando a um crescimento mais rápido das mesmas nos primeiros quatro dias.

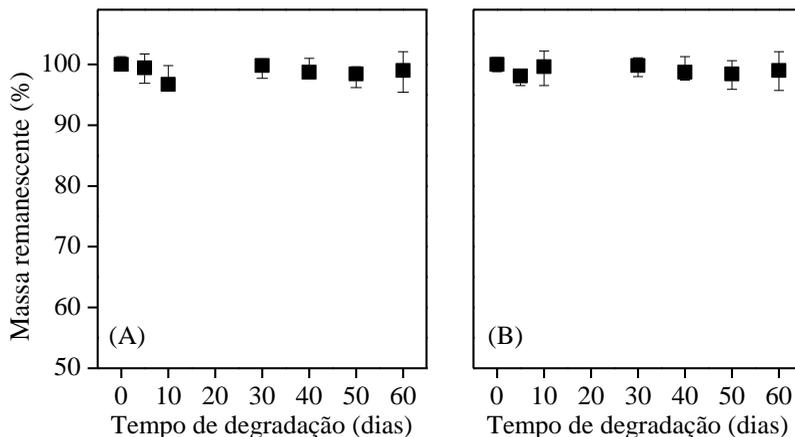
5.2.6 Ensaios de degradação

A degradação hidrolítica das amostras obtidas a partir da eletrofiação do homopolímero poli(ω -PDL) pode ser observada na Figura 47-A. Pode-se perceber que mesmo após 60 dias de degradação a 37°C em tampão fosfato as amostras não apresentaram perda de massa relevante. Esses resultados estão em concordância com os dados da literatura que mostram que fibras de poli(ω -PDL) não apresentam degradação hidrolítica. Van der Meulen e colaboradores (2008) estudaram a degradação hidrolítica de fibras de poli(ω -PDL) em 10 mL de tampão fosfato e verificaram que em até 2 anos não foi detectada perda de massa nem redução da massa molar do polímero. Além disso, a cristalinidade das amostras não mudou ao longo do período estudado.

Os resultados de degradação hidrolítica dos *scaffolds* obtidos pela eletrofiação da mistura de poli(ω -PDL) com o copolímero em bloco poli(ω -PDL-b-TEPE) são mostrados na Figura 47-B, onde também pode ser observado que não houve redução da massa das amostras mesmo após 60 dias de estudo. Isto sugere que a hidrofobicidade do homopolímero poli(ω -PDL) ainda é o principal motivo para a estabilidade hidrolítica encontrada, pois a entrada e contato com moléculas de água são dificultados, o que desfavorece o início da degradação.

Cabe ressaltar também que a massa molar das amostras estudadas não apresentou variação durante o período de degradação. A massa molar numérica média das fibras do *scaffolds* de poli(ω -PDL) era de 30.700 g mol⁻¹ com dispersidade em torno de 3,4 e após o período estudado as massas molares apenas apresentaram leves diferenças, muito provavelmente devido a variações do equipamento e não a uma mudança efetiva de massa molar das amostras. A massa molar numérica média das fibras obtidas a partir da mistura de poli(ω -PDL) com o poli(ω -PDL-b-TEPE) era de 31.200 g mol⁻¹, com dispersidade de 2,2 e esses valores não variaram substancialmente após os ensaios de degradação hidrolítica.

Figura 47: Degradação hidrolítica dos *scaffolds* de (A) poli(ω -PDL) e (B) poli(ω -PDL) + poli(ω -PDL-b-TEPE) em tampão PBS a 37 °C. Massa remanescente em função do tempo de degradação.

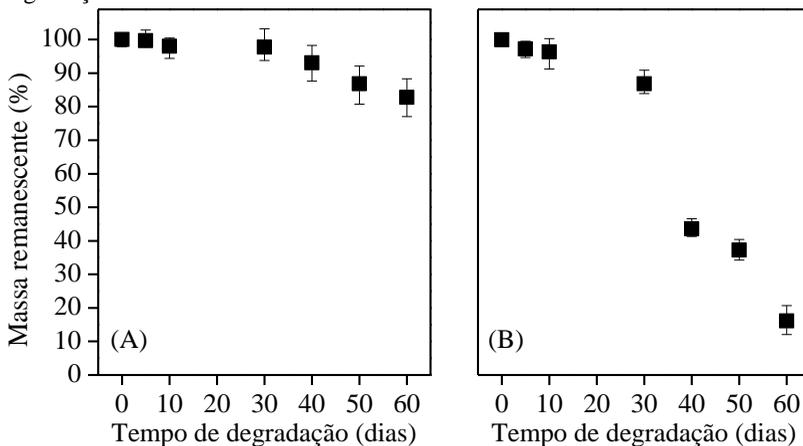


A degradação enzimática dos *scaffolds* de poli(ω -PDL) e dos produzidos a partir da mistura de poli(ω -PDL) + poli(ω -PDL-b-TEPE) é mostrada na Figura 48. A Figura 48-A mostra a perda de massa da amostra produzida a partir do homopolímero, onde é possível verificar que a amostra se manteve estável até o trigésimo dia. Uma perda de massa efetiva ocorreu somente a partir do quadragésimo dia, resultando em aproximadamente 18% de redução da massa ao final de 60 dias. Esses resultados diferem daqueles obtidos por Van der Meulen e colaboradores (2008) onde os autores estudaram a degradação enzimática de fibras de poli(ω -PDL) e não verificaram alterações na massa das amostras mesmo após 100 dias de estudo. Cabe ressaltar que para a degradação enzimática os autores utilizaram a lipase de *Pseudomonas cepacia* em tampão PBS, enquanto que no presente trabalho a lipase B de *Candida antarctica* com atividade de 22 U g⁻¹ foi utilizada. Além disso, as fibras do homopolímero apresentaram um diâmetro na faixa de 4 a 6 μ m, gerando um *scaffold* poroso e com uma elevada área de contato, favorecendo a troca de massa entre enzima e fibras, facilitando inclusive a remoção de espécies de baixa massa molar e compostos degradados.

A degradação enzimática do *scaffold* produzido a partir da mistura de poli(ω -PDL) com o poli(ω -PDL-b-TEPE) é mostrada na Figura 48-B, onde pode ser observada uma variação bastante pronunciada na massa do *scaffold* após 40 dias de degradação, resultando em uma perda de massa em torno de 90% após 60 dias de ensaio. Esta é a primeira vez que a

degradação desse tipo de material é estudada e os resultados obtidos mostram que o material é promissor para ser utilizado na área de engenharia de tecidos, uma vez que apresenta uma degradação acentuada após um período inicial de 40 dias.

Figura 48: Degradação enzimática dos scaffolds de (A) poli(ω -PDL) e (B) poli(ω -PDL) + poli(ω -PDL-b-TEPE) em tampão PBS a 37 °C, contendo 0,1 mg de lipase por 10 mL de tampão. Massa remanescente em função do tempo de degradação.

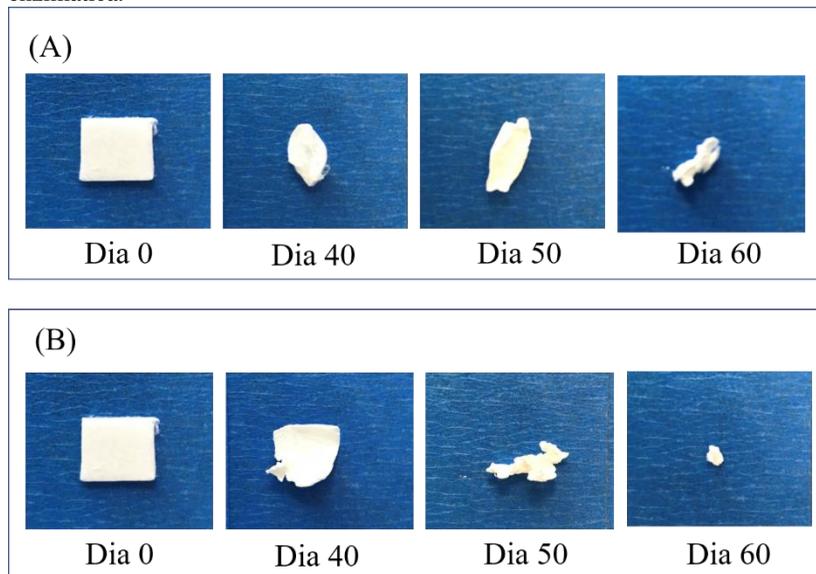


Em relação às massas molares das amostras após o período de degradação enzimática, os resultados não foram considerados confiáveis, uma vez que a quantidade de amostra restante após a degradação era muito pequena, resultando em amostras muito diluídas, gerando sinais pouco pronunciados, praticamente na região de ruído do equipamento. Essa mesma tendência foi observada tanto para os *scaffolds* produzidos a partir do homopolímero, quanto para aqueles produzidos da mistura de poli(ω -PDL) com o copolímero em bloco, poli(ω -PDL-b-TEPE).

Por fim, a Figura 49 mostra os *scaffolds* obtidos (49-A) a partir do homopolímero e (49-B) a partir da mistura de homopolímero com o poli(ω -PDL-b-TEPE) antes da degradação enzimática e após o período de degradação enzimática com a lipase B de *Candida antarctica* em tampão PBS com pH de 7,4, onde pode ser visualizada a degradação de ambos os tipos de *scaffolds*. Seguindo a tendência de perda de massa indicada na Figura 48. Cabe ressaltar que na imagem 49-A é possível verificar uma retração dos *scaffolds* de homopolímero, com perda de massa de no

máximo 20 %, enquanto que a Figura 49-B mostra os *scaffolds* onde a perda de massa chegou a até 90 % após 60 dias.

Figura 49: *Scaffolds* obtidos a partir de (A) poli(ω -PDL) e (B) a partir da mistura de poli(ω -PDL) com o poli(ω -PDL-b-TEPE) em diferentes tempos de degradação enzimática.



5.3 CONCLUSÕES

No presente capítulo, a poli(ω -PDL) foi funcionalizada com tiol, resultando em eficiências de funcionalização de até 90 %. Concomitantemente, um monômero contendo um grupamento fosfoéster e duas ligações duplas terminais foi produzido e reagido com um ditiol para a formação de um poli(tioéter-fosfoéster). A poli(ω -PDL) funcionalizada com tiol foi então reagida com esse material, formando um copolímero em bloco, que apresentou em torno de 21% de incorporação do poli(tioéter-fosfoéster). Finalmente, esse copolímero foi utilizado para a produção de *scaffolds* poliméricos pela técnica de eletrofiação. Da mesma forma, o homopolímero poli(ω -PDL) foi também eletrofiado e ambos os tipos de *scaffolds* produzidos foram comparados. Após otimizadas as condições para a eletrofiação de ambos materiais, puderam ser obtidas fibras estáveis, com diâmetros variando de 5 a 25 μm e sem a presença de defeitos do tipo *beads*. Os *scaffolds* produzidos a

partir da mistura do homopolímero com o poli(ω -PDL-b-TEPE) apresentaram uma aderência celular maior do que aqueles obtidos do homopolímero, provavelmente pelo fato de o copolímero possuir grupamentos fosfoéster, que apresentam grande afinidade ao tipo de células estudadas. Ainda os ensaios de degradação puderam sugerir que não foi verificada degradação hidrolítica em ambos os tipos de *scaffolds*. A degradação enzimática nos *scaffolds* de poli(ω -PDL) levou a uma redução de massa de até 20 % ao final de 60 dias de estudo enquanto que a degradação dos *scaffolds* produzidos a partir da mistura do homopolímero com o poli(ω -PDL-b-TEPE) resultou em uma perda de massa de até 90 % após 60 dias de degradação.

Dessa forma, essa etapa deste trabalho mostrou a síntese de um material novo, agregando propriedades interessantes de viabilidade celular e de degradação a poli(ω -PDL), uma vez que este poliéster é conhecido por possuir excelentes propriedades mecânicas, porém, por ter uma cristalinidade elevada, não possui boas propriedades de degradação. Adicionalmente, a biocompatibilidade dos *scaffolds* obtidos a partir do copolímero em bloco aumentou em relação à do homopolímero, mostrando que esse material é um forte candidato para aplicações biomédicas.

CAPÍTULO VI

6 CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho teve como objetivo principal estudar a polimerização por abertura de anel da macrolactona ω -pentadecalactona e aplicar o poliéster obtido na área de engenharia de tecidos, para a construção de estruturas porosas tridimensionais - *scaffolds*. Os resultados aqui discutidos são divididos em três capítulos, os quais envolvem: o estudo da síntese do homopolímero poli(ω -PDL) utilizando diferentes solventes em um reator pressurizado, a síntese da poli(ω -PDL) utilizando dióxido de carbono supercrítico como solvente e a funcionalização da poli(ω -PDL) com tiol e posterior conjugação com um poli(tioéter-fosfoéster) para a formação de *scaffolds* via técnica de eletrofiação.

Polímeros produzidos a partir de monômeros renováveis são excelentes candidatos para uso na área biomédica. Na etapa inicial do presente trabalho, foi relatado pela primeira vez a polimerização por abertura de anel da macrolactona ω -PDL utilizando diclorometano, clorofórmio, THF e n-hexano como solventes. As polimerizações realizadas utilizando diclorometano e clorofórmio apresentaram os melhores resultados em termos de rendimento e massa molar. Adicionalmente, o estudo cinético mostrou uma polimerização enzimática eficiente e rápida, resultando em materiais com elevadas massas molares em apenas 2 horas de reação.

Diferentemente dos trabalhos disponíveis na literatura, os quais utilizam tolueno como solvente do meio reacional, na segunda etapa deste trabalho, poli(ω -PDL) foi sintetizada pela primeira vez usando dióxido de carbono supercrítico como solvente e diclorometano ou o clorofórmio como cossolventes. As reações conduzidas usando scCO_2 como solvente resultaram em rendimentos de até 60 % e em massas molares até 33.000 g mol^{-1} . Quando cossolventes foram utilizados, massas molares de até 50.000 g mol^{-1} e rendimentos de até 87 % em massa puderam ser obtidos. Também pôde ser verificada a relação inversa entre o teor de água na enzima e as massas molares dos polímeros obtidos. Esta etapa do trabalho comprovou que o uso de scCO_2 é uma alternativa viável e promissora para a síntese de novos materiais poliméricos via e-ROP com potenciais aplicações para a área biomédica.

A última etapa deste trabalho, descrita no capítulo V, mostra a possibilidade de funcionalização do homopolímero de poli(ω -PDL) utilizando um tiol. Uma vez funcionalizado, o polímero apresentou a habilidade de conjugação, via reações radiculares tiol-eno, com uma

molécula contendo duplas ligações e grupamentos fosfoéster, viabilizando a síntese de um copolímero em bloco. Após a obtenção do copolímero, pôde ser verificado que o mesmo resultou em fibras estáveis quando submetido ao processo de eletrofiação para formação de um *scaffold*. Por fim, foi demonstrado a afinidade que esse material produzido possui por células do tipo osteoblastos.

Dessa forma, essa etapa deste trabalho agregou características de biocompatibilidade e degradação ao poliéster poli(ω -PDL), comprovando que o material obtido é um forte candidato para aplicações biomédicas, como por exemplo em dispositivos de regeneração temporária de tecidos ósseos ou cartilagosos.

Tendo em vista os resultados obtidos ao final deste trabalho, pode-se sugerir como perspectivas futuras, para a melhora ou continuação deste trabalho:

- Estudar a polimerização da ω -PDL em um reator contínuo, utilizando scCO_2 como solvente e usando ou não cossolventes, visando o aumento de escala e viabilidade econômica da produção deste poliéster;

- Utilizar um reator que permita o empacotamento do catalisador enzimático, facilitando a separação do catalisador e do polímero formado;

- Estudar os diferentes parâmetros de eletrofiação do copolímero em bloco obtido, modificando, por exemplo, a mistura de solventes utilizada, o diâmetro da agulha do equipamento e outros possíveis parâmetros de operação, como temperatura, tensão e distância da agulha para o coletor;

- Estudar a produção de fibras utilizando diferentes tipos de coletor, como por exemplo, coletor rotatório, coletor com solução para precipitação das fibras, etc;

- Realizar a caracterização mecânica dos *scaffolds* obtidos - de fato esta parte do trabalho está sendo realizada em parceria com o professor Andreas Heise nos laboratórios do RCSI;

Durante a execução deste trabalho, um material que chamou a atenção foi o monômero fenil di(undec-10en-1-il) fosfato. Esse composto foi inicialmente sintetizado em 2012, apresentando excelentes propriedades de biocompatibilidade e degradação (MARSICO et al., 2012). No presente trabalho, esse composto foi reagido com um ditiol para a formação de um poli(tioéster-fosfoéster). Uma das principais classes de polímeros estudada pelo grupo do professor Andreas Heise são os polipeptídios, que são polímeros que possuem repetidas cadeias de aminoácidos em sua estrutura principal, unidas por ligações peptídicas. A grande atração de pesquisadores por polipeptídios surgiu nos últimos anos devido a versatilidade química desses materiais, aliada à sua conhecida

biocompatibilidade e biodegradação. Sendo assim, surgiu, como uma etapa complementar deste trabalho, a ideia de aliar o monômero fenil di(undec-10en-1-il) fosfato com um polipeptídeo que possua grupamentos tiol em sua estrutura, produzindo um copolímero linear (no caso de o polipeptídeo possuir dois grupamentos tiol em sua estrutura) ou um copolímero reticulado, no caso de conter três ou mais tióis, para produzir um material com propriedades mecânicas, de biocompatibilidade e degradação interessantes e que possa ser utilizado, por exemplo, para a impressão 3D e aplicação na regeneração de tecidos. Esta etapa do trabalho também já está sendo estudada em parceria com o grupo do professor Andreas Heise.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, S.; WENDORFF, J. H.; GREINER, A. Progress in the field of electrospinning for tissue engineering applications. **Advanced Materials**, v. 21, n. 32–33, p. 3343–3351, 2009.

AGRAWAL, C. M.; RAY, R. B. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 55, n. 2, p. 141–150, 2001.

AGUIAR, G. P. S.; BOSCHETTO, D. L.; CHAVES, L. M. P. C.; ARCARI, B. D.; PIATO, A. L.; OLIVEIRA, J. V.; LANZA, M. Trans-resveratrol micronization by SEDS technique. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 350–355, 2016.

AGUIAR, G. P. S.; MARCON, M.; MOCELIN, R.; HERRMANN, A. P.; CHAVES, L. M. P. C.; PIATO, A. L.; LANZA, M.; OLIVEIRA, J. V. Micronization of N-acetylcysteine by supercritical fluid: Evaluation of in vitro and in vivo biological activity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 130, n. June, p. 282–291, 2017.

ALBERTSSON, A.-C.; VARMA, I. K. Recent Developments in Ring-opening Polymerization of Lactones for Biomedical Applications. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 6, p. 1466–1486, 2003.

ALEXANDER, H. ; MCCARTY, W. M.; BARTLETT, E. A. Toxicity of Perchloroethylene, Trichloroethylene, 1,1,1-Trichloroethane, and Methylene Chloride to Fathead Minnows. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 20, n. 3, p. 344–352, 1978.

ALEXANDRINO, E. M.; RITZ, S.; MARSICO, F.; BAIER, G.; MAILÄNDER, V.; LANDFESTER, K.; WURM, F. R. Paclitaxel-loaded polyphosphate nanoparticles: a potential strategy for bone cancer treatment. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 10, p. 1298, 2014.

ASTM. ASTM D6002-96(2002)e1 Standard Guide for Assessing the Compostability of Environmentally Degradable Plastics (Withdrawn 2011). v. 96, n. 1, 2011.

ATES, Z.; THORNTON, P. D.; HEISE, A. Side-chain functionalisation of unsaturated polyesters from ring-opening polymerisation of macrolactones by thiol-ene click chemistry. **Polymer Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 309–312, 2011.

BAUDIS, S.; BEHL, M.; LENDLEIN, A. Smart Polymers for Biomedical Applications. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 215, n. 24, p. 2399–2402, 2014.

BAUER, K. N.; TEE, H. T.; VELENCOSO, M. M.; WURM, F. R. Main-chain poly(phosphoester)s: History, syntheses, degradation, bio- and flame-retardant applications. **Progress in Polymer Science**, v. 73, p. 61–122, 2017.

BENDER, J. P.; FEITEIN, M.; FRANCESCHI, E.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V. Phase behaviour of binary systems of lactones in carbon dioxide. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 42, n. 1, p. 48–53, 2010.

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

BISHT, K. S.; HENDERSON, L. A.; GROSS, R. A.; KAPLAN, D. L.; SWIFT, G.; PSEUDOMONAS, P. Enzyme-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of ω -Pentadecalactone. **Macromolecules**, v. 30, p. 2705–2711, 1997.

BOUYAHYI, M.; PEPELS, M. P. F.; HEISE, A.; DUCHATEAU, R. ω -Pentadecalactone Polymerization and ω -Pentadecalactone/ ϵ -Caprolactone Copolymerization Reactions Using Organic Catalysts. **Macromolecules**, v. 45, n. 8, p. 3356–3366, 2012.

BRAGHIROLI, D. I.; STEFFENS, D.; PRANKE, P. Electrospinning for regenerative medicine: A review of the main topics. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 6, p. 743–753, 2014.

CAI, J.; LIU, C.; CAI, M.; ZHU, J.; ZUO, F.; HSIAO, B. S.; GROSS, R. a. Effects of molecular weight on poly(ω -pentadecalactone) mechanical and thermal properties. **Polymer**, v. 51, n. 5, p. 1088–1099, 2010.

CANELAS, D. a; DESIMONE, J. M. Polymerizations in Liquid and Supercritical Carbon Dioxide. **Polymer**, v. 133, n. 2, p. 103–140, 1997.

CAROTHERS, W.; DOROUGH, G. .; VAN NATTA, F. J. Studies of Polymerization and ring formation. X. The reversible polymerization of six-membered cyclic esters. **Journal of the American Chemical Society**, v. 54, p. 761–772, 1932.

CECCORULLI, G.; SCANDOLA, M.; KUMAR, A.; KALRA, B.; GROSS, R. a. Cocrystallization of random copolymers of omega-pentadecalactone and epsilon-caprolactone synthesized by lipase catalysis. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 902–907, 2005.

CHAN, W. D.; PERINPANAYAGAM, H.; GOLDBERG, H. A.; HUNTER, G. K.; JEFFREY DIXON, S.; SANTOS, G. C.; RIZKALLA, A. S. Tissue engineering scaffolds for the regeneration of craniofacial bone.

Journal of the Canadian Dental Association, v. 75, n. 5, p. 373–377, 2009.

CHEN, S.; BODA, S. K.; BATRA, S. K.; LI, X.; XIE, J. Emerging Roles of Electrospun Nanofibers in Cancer Research. **Advanced Helathcare Materials**, v. 1701024, n. 1, p. 1–20, 2017.

CHEN, Y.; MAK, A. F. T.; LI, J.; WANG, M.; SHUM, A. W. T. Formation of apatite on poly(a-hydroxy acid) in an accelerated biomimetic process. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 73, n. 1, p. 68–76, 2005.

CHEN, Y.; WANG, L.; YU, H.; ZHAO, Y.; SUN, R.; JING, G.; HUANG, J.; KHALID, H.; ABBASI, N. M.; AKRAM, M. Synthesis and application of polyethylene-based functionalized hyperbranched polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 45, p. 23–43, 2015.

CHIARADIA, V.; SOARES, N. S.; VALERIO, A.; DE OLIVEIRA, D.; ARAUJO, P. H. H.; SAYER, C. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B on Magnetic Poly(Urea-Urethane) Nanoparticles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, n. 3, p. 558–575, 2016.

COLAK, B.; DA SILVA, J. C. S.; SOARES, T. A.; GAUTROT, J. E. Impact of the Molecular Environment on Thiol-Ene Coupling for Biofunctionalization and Conjugation. **Bioconjugate Chemistry**, v. 27, n. 9, p. 2111–2123, 2016.

COMIM, S. R. R.; MADELLA, K.; OLIVEIRA, J. V.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction from dried banana peel (*Musa* spp., genomic group AAB): Extraction yield, mathematical modeling, economical analysis and phase equilibria. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, n. 1, p. 30–37, 2010.

COMIM ROSSO, S. R.; BIANCHIN, E.; DE OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; FERREIRA, S. R. S. Enzymatic synthesis of poly(ϵ -caprolactone) in supercritical carbon dioxide medium by means of a variable-volume view reactor. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 79, p. 133–141, 2013.

COOPER, A. I. Polymer synthesis and processing using supercritical carbon dioxide. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 10, p. 207–234, 2000.

CÓRDOVA, A.; IVERSEN, T.; HULT, K. Lipase-Catalyzed Synthesis of Methyl 6-*O*-Poly(ϵ -caprolactone)glycopyranosides. **Macromolecules**, v. 31, n. 4, p. 1040–1045, 1998.

COSTA-PINTO, A. R.; REIS, R. L.; NEVES, N. M. Scaffolds Based Bone Tissue Engineering: The Role of Chitosan. **Tissue Engineering Part**

B: Reviews, v. 17, n. 5, p. 331–347, 2011.

COULEMBIER, O.; DUBOIS, P. Polyesters from large lactones. **Handbook of Ring-Opening Polymerization**, p. 227–254, 2009.

DAL MAGRO, C.; AGUIAR, G. P. S.; VENERAL, J. G.; DOS SANTOS, A. E.; DE CHAVES, L. M. P. C.; OLIVEIRA, J. V.; LANZA, M. Co-precipitation of trans-resveratrol in PHBV using Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids technique. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 127, n. 3, p. 182–190, 2017.

DAS, S.; KAR, M.; GUPTA, S. Sen. Synthesis of end-functionalized phosphate and phosphonate-polypeptides by ring-opening polymerization of their corresponding N-carboxyanhydride. **Polym. Chem.**, v. 4, n. 15, p. 4087–4091, 2013.

DE GEUS, M. **Enzymatic catalysis in the synthesis of new polymer architectures and materials matthijs de geus**. 2007. Eindhoven University of Technology, 2007.

DE GEUS, M.; VAN DER MEULEN, I.; GODERIS, B.; VAN HECKE, K.; DORSCHU, M.; VAN DER WERFF, H.; KONING, C. E.; HEISE, A. Performance polymers from renewable monomers: high molecular weight poly(pentadecalactone) for fiber applications. **Polymer Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 525, 2010.

DE OLIVEIRA, F. C. S.; OLVERA, D.; SAWKINS, M. J.; CRYAN, S.-A.; KIMMINS, S. D.; DA SILVA, T. E.; KELLY, D. J.; DUFFY, G. P.; KEARNEY, C.; HEISE, A. Direct UV-Triggered Thiol–ene Cross-Linking of Electrospun Polyester Fibers from Unsaturated Poly(macrolactone)s and Their Drug Loading by Solvent Swelling. **Biomacromolecules**, p. acs.biomac.7b01335, 2017.

DELEU D, H. Y. Cerebellar dysfunction in chronic toluene abuse: beneficial response to amantadine hydrochloride. **Journal of Clinical Toxicology**, v. 31, n. 1, p. 37–41, 2000.

DHANDAYUTHAPANI, B.; YOSHIDA, Y.; MAEKAWA, T.; KUMAR, D. S. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. **International Journal of Polymer Science**, v. 2011, n. ii, p. 1–19, 2011.

DING, L.; LU, R.; AN, J.; ZHENG, X.; QIU, J. Cyclic polyphosphoesters synthesized by acyclic diene metathesis polymerization and ring closing metathesis. **Reactive and Functional Polymers**, v. 73, n. 9, p. 1242–1248, 2013.

DUBOIS, P.; COULEMBIER, O.; RAQUEZ, J.-M. **Handbook of ring-opening polymerization**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009.

DUQUE SÁNCHEZ, L.; BRACK, N.; POSTMA, A.; PIGRAM, P. J.; MEAGHER, L. Surface modification of electrospun fibres for biomedical applications: A focus on radical polymerization methods. **Biomaterials**, v. 106, p. 24–45, 2016.

EATEMADI, A.; DARAEI, H.; ZARGHAMI, N.; MELAT YAR, H.; AKBARZADEH, A. Nanofiber: Synthesis and biomedical applications. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 44, n. October, p. 111–121, 2016.

EFTHIMIADOU, E. K.; TZIVELEKA, L. A.; BILALIS, P.; KORDAS, G. Novel PLA modification of organic microcontainers based on ring opening polymerization: Synthesis, characterization, biocompatibility and drug loading/release properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 428, n. 1–2, p. 134–142, 2012.

ELOMAA, L.; TEIXEIRA, S.; HAKALA, R.; KORHONEN, H.; GRIJPMAN, D. W.; SEPPÄLÄ, J. V. Preparation of poly(ϵ -caprolactone)-based tissue engineering scaffolds by stereolithography. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 11, p. 3850–3856, 2011.

ELSAWY, M. A.; KIM, K. H.; PARK, J. W.; DEEP, A. Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, n. May, p. 1346–1352, 2017.

FAIRBANKS, B. D.; LOVE, D. M.; BOWMAN, C. N. Efficient Polymer-Polymer Conjugation via Thiol-ene Click Reaction. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 218, n. 18, p. 1–11, 2017.

FERNÁNDEZ, J.; ETXEBERRIA, A.; VARGA, A. L.; SARASUA, J. R. Synthesis and characterization of ω -pentadecalactone-co- ϵ -decalactone copolymers: Evaluation of thermal, mechanical and biodegradation properties. **Polymer (United Kingdom)**, v. 81, p. 12–22, 2015.

FOCARETE, M. L.; SCANDOLA, M.; KUMAR, A.; GROSS, R. a. Physical Characterization of Poly (ω -pentadecalactone) Synthesized by Lipase-Catalyzed Ring-Opening Polymerization. **J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.**, v. 39, p. 1721–1729, 2001.

GARLOTTA, D. A Literature Review of Poly(Lactic Acid). **Journal of Polymers and the Environment**, v. 9, n. 2, p. 63–84, 2001.

GHALIA, M. A.; DAHMAN, Y. Biodegradable poly(lactic acid)-

based scaffolds: synthesis and biomedical applications. **Journal of Polymer Research**, v. 24, n. 5, 2017.

GOETHALS, E. J. Telechelic Polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 17, p. 471–514, 1988.

GREINER, A.; WENDORFF, J. H. Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 46, n. 30, p. 5670–5703, 2007.

GRISOLIA, S. Enzyme Nomenclature. **Science**, v. 150, p. 719–721, 1965.

GUALANDI, C.; WHITE, L. J.; CHEN, L.; GROSS, R. A.; SHAKESHEFF, K. M.; HOWDLE, S. M.; SCANDOLA, M. Scaffold for tissue engineering fabricated by non-isothermal supercritical carbon dioxide foaming of a highly crystalline polyester. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 1, p. 130–136, 2010.

GUPTA, P.; ELKINS, C.; LONG, T. E.; WILKES, G. L. Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): Exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. **Polymer**, v. 46, n. 13, p. 4799–4810, 2005.

GUZMÁN-LAGUNES, F.; LÓPEZ-LUNA, A.; GIMENO, M.; BÁRZANA, E. Enzymatic synthesis of poly-L-lactide in supercritical R134a. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 72, p. 186–190, 2012.

HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, I. K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. **Arabian Journal of Chemistry**, v. in press, 2015.

HEDFORS, C.; HULT, K.; MARTINELLE, M. Lipase chemoselectivity towards alcohol and thiol acyl acceptors in a transacylation reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1–2, p. 120–123, 2010.

HU, X.; LIU, S.; ZHOU, G.; HUANG, Y.; XIE, Z.; JING, X. Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. **Journal of Controlled Release**, v. 185, n. 1, p. 12–21, 2014.

HUAN, S.; LIU, G.; HAN, G.; CHENG, W.; FU, Z.; WU, Q.; WANG, Q. Effect of experimental parameters on morphological, mechanical and hydrophobic properties of electrospun polystyrene fibers. **Materials**, v. 8, n. 5, 2015.

IDRIS, A.; BUKHARI, A. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 550–563, 2012.

IMMICH, A. P. S.; ARIAS, M. L.; CARRERAS, N.; BOEMO, R. L.; TORNERO, J. A. Drug delivery systems using sandwich configurations of electrospun poly(lactic acid) nanofiber membranes and ibuprofen. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 7, p. 4002–4008, 2013.

IMMICH, A. P. S.; TORNERO, J. A.; CASAS, F. C.; ARIAS, M. J. L. Electrospun PLLA Membranes for Caffeine Delivery: Diffusional Approach. **J. Biomedical Science and Engineering**, v. 10, n. 12, p. 563–574, 2017.

JANIK, H.; MARZEC, M. A review: Fabrication of porous polyurethane scaffolds. **Materials Science and Engineering C**, v. 48, p. 586–591, 2015.

JASINSKA-W; ALC, L.; HANSEN, R.; DUDENKO, D. D.; ROZANSKI, A.; BOUYAHYI, M.; WAGNER, M.; DUCHATEAU, R. Topological behavior mimicking ethylene–hexene copolymers using branched lactones and macrolactones. **Polym. Chem.**, v. 5, p. 3306–3310, 2014.

JEROME, R.; HENRIOULLE-GRANVILLE, M.; BOUTEVIN, B.; ROBIN, J. J. Telechelic polymers: Synthesis, characterization and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 16, p. 837–906, 1991.

JHON, M. S.; ANDRADE, J. D. Water and hydrogels. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 7, n. 6, p. 509–522, 1973.

JIANG, Z. Lipase-Catalyzed Copolymerization of Dialkyl Carbonate with 1,4-Butanediol and ω -Pentadecalactone: Synthesis of Poly-. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 1912–1919, 2011.

JIANG, Z.; AZIM, H.; GROSS, R. A.; FOCARETE, M. L.; SCANDOLA, M. Lipase-catalyzed copolymerization of ω -pentadecalactone with p-dioxanone and characterization of copolymer thermal and crystalline properties. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 7, p. 2262–2269, 2007.

JOHNSON, P. M.; KUNDU, S.; BEERS, K. L. Modeling enzymatic kinetic pathways for ring-opening lactone polymerization. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 9, p. 3337–3343, 2011.

JR., H. F. S.; CARPENTER, C. P.; WEIL, C. S.; POZZANI, U. C.; STRIEGEL, J. A.; NYCUM, J. S. Range-Finding Toxicity Data: List VII. **American Industrial Hygiene Association Journal**, v. 30, n. 5, p. 470–476,

1969.

KALRA, B.; KUMAR, A.; GROSS, R. a.; BAIARDO, M.; SCANDOLA, M. Chemoenzymatic Synthesis of New Brush Copolymers Comprising Poly(ω -pentadecalactone) with Unusual Thermal and Crystalline Properties. **Macromolecules**, v. 37, n. 4, p. 1243–1250, 2004.

KEUN KWON, I.; KIDOAKI, S.; MATSUDA, T. Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: Structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3929–3939, 2005.

KHIGIENA, Z. Hygiene and Sanitation. **Hygiene and Sanitation**, v. 29, n. 5, p. 39, 1986.

KIRAN, E. Supercritical fluids and polymers – The year in review – 2014. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 110, p. 126–153, 2016.

KISHI, R.; HARABUCHI, I.; KATAKURA, Y.; IKEDA, T.; MIYAKE, H. Neurobehavioral Effects of Chronic Occupational Exposure to Organic Solvents Among Japanese Industrial Painters. **Environmental research**, v. 62, n. 2, p. 303–313, 1993.

KNANI, D.; GUTMAN, A. L.; KOHN, D. H. Enzymatic polyesterification in organic media. Enzyme-catalyzed synthesis of linear polyesters. I. Condensation polymerization of linear hydroxyesters. II. Ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 31, n. 5, p. 1221–1232, 1993.

KOBAYASHI, S. Lipase-catalyzed polyester synthesis--a green polymer chemistry. **Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences**, v. 86, n. 4, p. 338–365, 2010.

KOBAYASHI, S.; KOBAYASHI, S.; UYAMA, H.; UYAMA, H.; KIMURA, S.; KIMURA, S. Enzymatic Polymerization. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 12, p. 3793–3818, 2001.

KOBAYASHI, S.; MAKINO, A. Enzymatic polymer synthesis: an opportunity for green polymer chemistry. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 11, p. 5288–5353, 2009.

KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 40, n. 11, p. 2004–2021, 2001.

KOO, S. P. S.; STAMENOVIC, M. M.; PRASATH, R. A.; INGLIS, A. J.; PREZ, F. E. DU; BARNER-KOWOLLIK, C.; CAMP, W. VAN; JUNKERS, T. Limitations of radical thiol-ene reactions for polymer-

polymer conjugation. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, v. 48, p. 1699–1713, 2010.

KORZHIKOV, V. A.; GUSEVSKAYA, K. V.; LITVINCHUK, E. N.; VLAKH, E. G.; TENNIKOVA, T. B. Enzyme-Mediated Ring-Opening Polymerization of Pentadecalactone to Obtain Biodegradable Polymer for Fabrication of Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **International Journal of Polymer Science**, v. 2013, p. 1–10, 2013.

KOSEVA, N.; BOGOMILOVA, A.; ATKOVA, K.; TROEV, K. New functional polyphosphoesters: Design and characterization. **Reactive and Functional Polymers**, v. 68, n. 5, p. 954–966, 2008.

KRAICHEVA, I.; VODENICHAROVA, E.; SHENKOV, S.; TASHEV, E.; TOSHEVA, T.; TSACHEVA, I.; KRIL, A.; TOPASHKANICHEVA, M.; GEORGIEVA, A.; ILIEV, I.; VLADOV, I.; GERASIMOVA, T.; TROEV, K. Synthesis, characterization, antitumor activity and safety testing of novel polyphosphoesters bearing anthracene-derived aminophosphonate units. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 2, p. 874–882, 2014.

KUHN, G. D. O.; COGHETTO, C.; TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Effect of compressed fluids treatment on the activity of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 immobilized in montmorillonite. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 2286–2290, 2011.

KUMAR, A.; GARG, K.; GROSS, R. A. Copolymerizations of ω -Pentadecalactone and Trimethylene Carbonate by Chemical and Lipase Catalysis. **Macromolecules**, v. 34, p. 3527–3533, 2001.

KUMAR, A.; GROSS, R. A. *Candida antarctica* lipase B-catalyzed transesterification: New synthetic routes to copolyesters. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 48, p. 11767–11770, 2000.

KUMAR, A.; KALRA, B.; DEKHTERMAN, A.; GROSS, R. A. Efficient ROP and copolymerization of ϵ -CL and ω -pentadecalactone catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B. **Macromolecules**, v. 33, p. 6303–6309, 2000.

LABET, M.; THIELEMANS, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 12, p. 3484–3504, 2009.

LEBEDEV, B.; YEVSTROPOV, A. Thermodynamic properties of polylactones. **Makromol. Chem.**, v. 1253, p. 1235–1253, 1984.

LEE, C. S.; RU, M. T.; HAAKE, M.; DORDICK, J. S.; REIMER, J. A.; CLARK, D. S. Multinuclear NMR study of enzyme hydration in an

organic solvent. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 6, p. 686–693, 1998.

LEE, K. H.; KIM, H. Y.; LA, Y. M.; LEE, D. R.; SUNG, N. H. Influence of a mixing solvent with tetrahydrofuran and N,N-dimethylformamide on electrospun poly(vinyl chloride) nonwoven mats. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, v. 40, n. 19, p. 2259–2268, 2002.

LETIZIA FOCARETE, M.; GUALANDI, C.; SCANDOLA, M.; GOVONI, M.; GIORDANO, E.; FORONI, L.; VALENTE, S.; PASQUINELLI, G.; GAO, W.; GROSS, R. A. Electrospun Scaffolds of a Polyhydroxyalkanoate Consisting of ω -Hydroxypentadecanoate Repeat Units: Fabrication and In Vitro Biocompatibility Studies. **Journal of Biomaterials Science Polymer Edition**, v. 21, n. 21, p. 1283–1296, 2010.

LI, Q.; WANG, J.; SHAHANI, S.; SUN, D. D. N.; SHARMA, B.; ELISSEFF, J. H.; LEONG, K. W. Biodegradable and photocrosslinkable polyphosphoester hydrogel. **Biomaterials**, v. 27, n. 7, p. 1027–1034, 2006.

LIANG, D.; HSIAO, B. S.; CHU, B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 14, p. 1392–1412, 2007.

LIAO, C. J.; CHEN, C. F.; CHEN, J. H.; CHIANG, S. F.; LIN, Y. J.; CHANG, K. Y. Fabrication of porous biodegradable polymer scaffolds using a solvent merging/particulate leaching method. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 59, n. 4, p. 676–681, 2002.

LIU, J.; JIANG, Z.; ZHANG, S.; LIU, C.; GROSS, R. A.; KYRIAKIDES, T. R.; SALTZMAN, W. M. Biodegradation, biocompatibility, and drug delivery in poly(ω -pentadecalactone-co-p-dioxanone) copolyesters. **Biomaterials**, v. 32, n. 27, p. 6646–6654, 2011.

LIU, J.; JIANG, Z.; ZHANG, S.; SALTZMAN, W. M. Poly(ω -pentadecalactone-co-butylene-co-succinate) nanoparticles as biodegradable carriers for camptothecin delivery. **Biomaterials**, v. 30, n. 29, p. 5707–5719, 2009.

LOEKER, F. C.; DUXBURY, C. J.; KUMAR, R.; GAO, W.; GROSS, R. A.; HOWDLE, S. M. Enzyme-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone in Supercritical Carbon Dioxide. **Macromolecules**, v. 37, p. 2450–2453, 2004.

MAHAPATRO, A.; NEGRÓN, T. D. M. Biodegradable Poly-pentadecalactone (PDL) Synthesis via Synergistic Lipase and Microwave Catalysis. **Am. J. Biomed. Eng.**, v. 3, n. 1, p. 9–13, 2013.

MÅLBERG, S.; FINNE-WISTRAND, A.; ALBERTSSON, A. C. The environmental influence in enzymatic polymerization of aliphatic polyesters in bulk and aqueous mini-emulsion. **Polymer**, v. 51, n. 23, p. 5318–5322, 2010.

MALZAHN, K.; MARSICO, F.; KOYNOV, K.; LANDFESTER, K.; WEISS, C. K.; WURM, F. R. Selective interfacial olefin cross metathesis for the preparation of hollow nanocapsules. **ACS Macro Letters**, v. 3, n. 1, p. 40–43, 2014.

MANERA, A. P.; KUHN, G.; POLLONI, A.; MARANGONI, M.; ZABOT, G.; KALIL, S. J.; OLIVEIRA, D. de; TREICHEL, H.; VLADIMIR OLIVEIRA, J.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F. Effect of compressed fluids treatment on the activity, stability and enzymatic reaction performance of beta-galactosidase. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1235–1240, 2011.

MARIN, E.; BRICENO, M. I.; CABALLERO-GEORGE, C. Critical evaluation of biodegradable polymers used in nanodrugs. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 3071–3091, 2013.

MARSICO, F.; WAGNER, M.; LANDFESTER, K.; WURM, F. R. Unsaturated poly(phosphoester)s via ring-opening metathesis polymerization. **Polymer Chemistry**, v. 45, p. 8511–8518, 2012.

MATSUMOTO, M.; ODACHI, D.; KONDO, K. Kinetics of ring-opening polymerization of lactones by lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 1, p. 73–76, 1999.

MAZZOCCHETTI, L.; SCANDOLA, M.; JIANG, Z. Enzymatic Synthesis and Structural and Thermal Properties of Poly(ω -pentadecalactone-*co*-butylene-*co*-succinate). **Macromolecules**, v. 42, n. 20, p. 7811–7819, 2009.

MCGINTY, D.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on ω -pentadecalactone. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. SUPPL. 2, p. S193–S201, 2011a.

MCGINTY, D.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on ω -pentadecalactone. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 2, p. S193–S201, 2011b.

MCKEE, M. G.; WILKES, G. L.; COLBY, R. H.; LONG, T. E. Correlations of Solution Rheology with Electrospun Fiber Formation of Linear and Branched Polyesters. **Macromolecules**, v. 37, n. 5, p. 1760–1767, 2004.

MEI, Y.; KUMAR, A.; GROSS, R. Kinetics and Mechanism of

Candida antarctica Lipase B Catalyzed Solution Polymerization of ϵ -Caprolactone. **Macromolecules**, v. 36, n. 15, p. 5530–5536, 2003.

MEULEN, I. Van Der; HUIJSER, S.; GUBBELS, E.; KONING, C. E.; HEISE, A.; DUCHATEAU, R. Size does not matter: a highly efficient catalyst for the ring-opening polymerization of macrolactones lacking string strain. **Proceedings of American Chemical Society**, p. 27–31, 2011.

MIDDLETON, J. C.; TIPTON, A. J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2335–2346, 2000.

MILETIĆ, N.; NASTASOVIĆ, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 126–135, 2012.

MISHIMA, K.; MATSUYAMA, K.; BABA, M.; HIRABARU, T.; YAMAUCHI, S.; TOMOKAGE, H.; TAKAHASHI, K.; YAMASAKI, N. Solubilities of undecanolide and pentadecanolactone in supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 46, n. 1, p. 69–72, 2001.

MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; HINRICHSSEN, G. Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: An overview. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 276–277, p. 1–24, 2000.

MORENO, M. S. M. da S. **Engenharia de tecidos na substituição de tecido ósseo**. 2014. Universidade Fernando Pessoa, 2014.

MORI, H.; MASUDA, S.; ENDO, T. Ring-opening RAFT polymerization based on aromatization as driving force: Synthesis of well-defined polymers containing anthracene units in the main chain. **Macromolecules**, v. 39, n. 18, p. 5976–5978, 2006.

MOTOKUCHO, S.; SUDO, A.; ENDO, T. Living Cationic Ring-Opening Polymerization of Five-Membered Cyclic Dithiocarbonate Controlled by Neighboring Group Participation of Carbamate Group. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, v. 45, p. 4459–4464, 2007.

NAMEKAWA, S.; UYAMA, H.; KOBAYASHI, S. Lipase-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of Lactones in Water. **Polymer Journal**, v. 30, n. 3, p. 269–271, 1998.

NUYKEN, O.; PASK, S. D. Ring-opening polymerization-An introductory review. **Polymers**, v. 5, n. 2, p. 361–403, 2013.

OHKAWA, K.; HAYASHI, S.; KAMEYAMA, N.; YAMAMOTO,

H.; YAMAGUCHI, M.; KIMOTO, S.; KURATA, S.; SHINJI, H. Synthesis of collagen-like sequential polypeptides containing O-phospho-L-hydroxyproline and preparation of electrospun composite fibers for possible dental application. **Macromolecular Bioscience**, v. 9, n. 1, p. 79–92, 2009.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A. C.; RUBIRA, A. F.; KUNITA, M. H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 3, p. 373–382, 2006.

OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. Kinetics of the Enzymatic Alcoholysis of Palm Kernel Oil in Supercritical CO₂. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 39, n. 12, p. 4450–4454, 2000.

OLIVEIRA, L.; CONCEIÇÃO, O.; MACHADO, A.; ROSA, F. Revisão: Biomateriais com aplicação na regeneração óssea—método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, p. 37–44, 2010.

PANLAWAN, P.; LUANGTHONKAM, P.; WIEMANN, L. O.; SIEBER, V.; MARIE, E.; DURAND, A.; INPRAKHON, P. Lipase-catalyzed interfacial polymerization of ω -pentadecalactone in aqueous biphasic medium: A mechanistic study. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 88, p. 69–76, 2013.

PASCUAL, A.; LEIZA, J. R.; MECERREYES, D. Acid catalyzed polymerization of macrolactones in bulk and aqueous miniemulsion: Ring opening vs. condensation. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 6, p. 1601–1609, 2013.

PELIPENKO, J.; KOCBEK, P.; KRISTL, J. Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 484, n. 1–2, p. 57–74, 2015.

PFLUGHAUPT, R. L.; HOPKINS, S. A.; WRIGHT, P. M.; DOVE, A. P. Synthesis of poly(ω -pentadecalactone)-*b*-poly(acrylate) diblock copolymers via a combination of enzymatic ring-opening and RAFT polymerization techniques. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 3326–3335, 2016.

PINTO, L. F.; DA SILVA, D. I. S.; ROSA DA SILVA, F.; RAMOS, L. P.; NDIAYE, P. M.; CORAZZA, M. L. Phase equilibrium data and thermodynamic modeling of the system (CO₂+biodiesel+methanol) at high pressures. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 44, n. 1, p. 57–65, 2012.

RAJZER, I.; MENASZEK, E.; CASTANO, O. Electrospun polymer

scaffolds modified with drugs for tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 77, p. 493–499, 2017.

RAQUEZ, J.-M.; COULEMBIER, O.; BUBOIS, P. Ring-Opening Polymerization of Cyclic Esters: Industrial Synthesis, Properties, Applications, and Perspectives. In: MATYJASZEWSKI, K.; MÖLLE, M. (Ed.). **Polymer Science: A Comprehensive Reference**. Amsterdam: Elsevier B.V., 2012. 4p. 761–775.

RAQUEZ, J. M.; HABIBI, Y.; MURARIU, M.; DUBOIS, P. Polylactide (PLA)-based nanocomposites. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 10–11, p. 1504–1542, 2013.

REBELATTO, E. A.; BENDER, J. P.; CORAZZA, M. L.; FERREIRA, S. R. S.; VLADIMIR OLIVEIRA, J.; LANZA, M. High-pressure phase equilibrium data for the (carbon dioxide+l-lactide+ethanol) system. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 86, p. 37–42, 2015.

REVERCHON, E.; ADAMI, R. Nanomaterials and supercritical fluids. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 37, n. 1, p. 1–22, 2006.

ROPER, T. M.; GUYMON, C. A.; JÖNSSON, E. S.; HOYLE, C. E. Influence of the alkene structure on the mechanism and kinetics of thiol-alkene photopolymerizations with real-time infrared spectroscopy. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 42, n. 24, p. 6283–6298, 2004.

ROSSO, S. R.; FRANCESCHI, E.; BORGES, G. R.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V.; FERREIRA, S. R. S. Phase equilibrium measurements of ternary systems formed by linoleic and linolenic acids in carbon dioxide/ethanol mixtures. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 41, n. 11, p. 1254–1258, 2009.

ROSSO COMIM, S. R.; FRANCESCHI, E.; BORGES, G. R.; CORAZZA, M. L.; VLADIMIR OLIVEIRA, J.; FERREIRA, S. R. S. Phase equilibrium measurements and modelling of ternary system (carbon dioxide + ethanol + palmitic acid). **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 42, n. 3, p. 348–354, 2010.

ROSSO COMIM, S. R.; VENERAL, J. G.; DE OLIVEIRA, D.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V. Enzymatic synthesis of poly(ϵ -caprolactone) in liquified petroleum gas and carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 96, p. 334–348, 2015.

SANTOS, R. D.; ROSSO COMIM, S. R.; OLIVEIRA, D. de; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M.; FERREIRA, S. R. S.; VLADIMIR OLIVEIRA, J. Lipase-catalyzed synthesis of poly(ϵ -caprolactone) in

supercritical carbon dioxide. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 280–283, 2012.

SARAZIN, Y.; CARPENTIER, J. F. Discrete Cationic Complexes for Ring-Opening Polymerization Catalysis of Cyclic Esters and Epoxides. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 9, p. 3564–3614, 2015.

SCHINDELIN, J.; ARGANDA-CARRERAS, I.; FRISE, E.; KAYNIG, V.; LONGAIR, M.; PIETZSCH, T.; PREIBISCH, S.; RUEDEN, C.; SAALFELD, S.; SCHMID, B.; TINEVEZ, J. Y.; WHITE, D. J.; HARTENSTEIN, V.; ELICEIRI, K.; TOMANCAK, P.; CARDONA, A. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676–682, 2012.

SEYEDNEJAD, H.; GHASSEMI, A. H.; VAN NOSTRUM, C. F.; VERMONDEN, T.; HENNINK, W. E. Functional aliphatic polyesters for biomedical and pharmaceutical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 152, n. 1, p. 168–176, 2011.

SIMPSON, N.; TAKWA, M.; HULT, K. Thiol-Functionalized Poly(ω -pentadecalactone) Telechelics for Semicrystalline Polymer Networks. **Macromolecular Symposia**, v. 41, n. Figure 1, p. 3613–3619, 2008.

SÖDERGÅRD, A.; STOLT, M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 27, n. 6, p. 1123–1163, 2002.

SUN, B.; LONG, Y. Z.; ZHANG, H. D.; LI, M. M.; DUVAIL, J. L.; JIANG, X. Y.; YIN, H. L. Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 5, p. 862–890, 2014.

TADEN, A.; ANTONIETTI, M.; LANDFESTER, K. Enzymatic polymerization towards biodegradable polyester nanoparticles. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 24, n. 8, p. 512–516, 2003.

TAKWA, M. **Enzymatic synthesis of functional polyesters**. 2008. Royal Institute of Technology (KTH), AlbaNova University Center, Stockholm - Sweden, 2008.

TAKWA, M.; SIMPSON, N.; MCILMSITRÖM, E.; HULT, K.; MARTINELLE, M. One-pot difunctionalization of poly(ω -pentadecalactone) with thiol-thiol or thiol-acrylate groups, catalyzed by candida antarctica lipase Ba. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 27, n. 22, p. 1932–1936, 2006.

TAKWA, M.; XIAO, Y.; SIMPSON, N.; MALMSTRÖM, E.; HULT, K.; KONING, C. E.; HEISE, A.; MARTINELLE, M. Lipase catalyzed HEMA initiated ring-opening polymerization: In situ formation of mixed polyester methacrylates by transesterification. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 2, p. 704–710, 2008.

TAYLOR, G. Electrically Driven Jets. **Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 313, n. 1515, p. 453–475, 1969.

TEATOR, A. J.; LASTOVICKOVA, D. N.; BIELAWSKI, C. W. Switchable Polymerization Catalysts. **Chemical Reviews**, v. 116, p. 1969–1992, 2016.

THENMOZHI, S.; DHARMARAJ, N.; KADIRVELU, K.; KIM, H. Y. Electrospun nanofibers: New generation materials for advanced applications. **Materials Science and Engineering: B**, v. 217, p. 36–48, 2017.

THURECHT, K. J.; HEISE, A.; DEGEUS, M.; VILLARROYA, S.; ZHOU, J.; WYATT, M. F.; HOWDLE, S. M. Kinetics of enzymatic ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone in supercritical carbon dioxide. **Macromolecules**, v. 39, n. 23, p. 7967–7972, 2006.

TIAN, H.; TANG, Z.; ZHUANG, X.; CHEN, X.; JING, X. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 2, p. 237–280, 2012.

TOMASKO, D. L.; LI, H. B.; LIU, D. H.; HAN, X. M.; WINGERT, M. J.; LEE, L. J.; KOELLING, K. W. A review of CO(2) applications in the processing of polymers. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 42, n. 25, p. 6431–6456, 2003.

ULERY, B. D.; NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biomedical applications of biodegradable polymers. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, v. 49, n. 12, p. 832–864, 2011.

UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, T. a. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure (London, England : 1993)**, v. 2, n. 4, p. 293–308, 1994a.

UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, T. a. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure (London, England : 1993)**, v. 2, n. 4, p. 293–308, 1994b.

UYAMA, H.; TAKEYA, K.; KOBAYASHI, S. Synthesis of Polyesters by Enzymatic Ring-Opening Copolymerization Using Lipase Catalyst. **Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences**, v. 69, n. 8, p. 203–207, 1993.

VAN DER MEE, L.; HELMICH, F.; DE BRUIJN, R.; VEKEMANS, J. a. J. M.; PALMANS, A. R. a.; MEIJER, E. W. Investigation of Lipase-Catalyzed Ring-Opening Polymerizations of Lactones with Various Ring Sizes: Kinetic Evaluation. **Macromolecules**, v. 39, n. 15, p. 5021–5027, 2006.

VAN DER MEULEN, I.; DE GEUS, M.; ANTHEUNIS, H.; DEUMENS, R.; JOOSTEN, E. a J.; KONING, C. E.; HEISE, A. Polymers from functional macrolactones as potential biomaterials: Enzymatic ring opening polymerization, biodegradation, and biocompatibility. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 12, p. 3404–3410, 2008.

VENERAL, J. G. **Produção enzimática de poli (ϵ -caprolactona) em reator de leito empacotado utilizando fluido pressurizado**. 2014. Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

VERT, M. Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: Beliefs and facts. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 2, p. 437–446, 2009.

WANG, K.; JIA, Y. G.; ZHU, X. X. Two-Way Reversible Shape Memory Polymers Made of Cross-Linked Cocrystallizable Random Copolymers with Tunable Actuation Temperatures. **Macromolecules**, v. 50, n. 21, p. 8570–8579, 2017.

WANG, Y. C.; YUAN, Y. Y.; DU, J. Z.; YANG, X. Z.; WANG, J. Recent progress in polyphosphoesters: From controlled synthesis to biomedical applications. **Macromolecular Bioscience**, v. 9, n. 12, p. 1154–1164, 2009.

WATSON, B.; KASPER, F. K.; MIKOS, A. Phosphorous-Containing Polymers for Regenerative Medicine. **Biomedical Materials**, v. 9, n. 2, p. 265–275, 2014.

WEBB, K.; HLADY, V.; TRESKO, P. A. Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization. **Journal of Biomedical Materials Research part B - Applied Biomaterials**, v. 41, n. 3, p. 422–430, 1998.

WILBON, P. A.; CHU, F.; TANG, C. Progress in Renewable Polymers from Natural terpenes, terpenoids and Rosin. **Macromolecular**

Rapid Communications, v. 13, n. 1, p. 8–37, 2013.

WILSON, J. A.; HOPKINS, S. A.; WRIGHT, P. M.; DOVE, A. P. Synthesis and Postpolymerization Modification of One-Pot Pentadecalactone Block-like Copolymers. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 10, p. 3191–3200, 2015a.

WILSON, J. A.; HOPKINS, S. A.; WRIGHT, P. M.; DOVE, A. P. Synthesis and Postpolymerization Modification of One-Pot Pentadecalactone Block-like Copolymers. **Biomacromolecules**, v. SUPPL. 16, n. 10, p. 3191–3200, 2015b.

WILSON, J. A.; HOPKINS, S. A.; WRIGHT, P. M.; DOVE, A. P. Synthesis of ω -Pentadecalactone Copolymers with Independently Tunable Thermal and Degradation Behavior. **Macromolecules**, v. 48, n. 4, p. 950–958, 2015c.

WIN-SHWE, T. T.; FUJIMAKI, H. Neurotoxicity of toluene. **Toxicology Letters**, v. 198, n. 2, p. 93–99, 2010.

XIE, J.; WILLERTH, S. M.; LI, X.; MACEWAN, M. R.; RADER, A.; SAKIYAMA-ELBERT, S. E.; XIA, Y. The differentiation of embryonic stem cells seeded on electrospun nanofibers into neural lineages. **Biomaterials**, v. 30, n. 3, p. 354–362, 2009.

XU, C.; CHEN, C.; WU, D. The starch nanocrystal filled biodegradable poly(ϵ -caprolactone) composite membrane with highly improved properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 182, p. 115–122, 2018.

YANG, X.; CUI, C.; TONG, Z.; SABANAYAGAM, C. R.; JIA, X. Poly(ϵ -caprolactone)-based copolymers bearing pendant cyclic ketals and reactive acrylates for the fabrication of photocrosslinked elastomers. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 9, p. 8232–8244, 2013.

YANG, X. Z.; SUN, T. M.; DOU, S.; WU, J.; WANG, Y. C.; WANG, J. Block copolymer of polyphosphoester and poly(L-lactic acid) modified surface for enhancing osteoblast adhesion, proliferation, and function. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 8, p. 2213–2220, 2009.

YANG, Y.; YU, Y.; ZHANG, Y.; LIU, C.; SHI, W.; LI, Q. Lipase/esterase-catalyzed ring-opening polymerization: A green polyester synthesis technique. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 1900–1908, 2011.

YEO, S.-D.; KIRAN, E. Formation of polymer particles with supercritical fluids: A review. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, n. 3, p. 287–308, 2005.

YU, Y.; SANG, L.; WEI, Z.; LENG, X.; LI, Y. Unique isodimorphism

and isomorphism behaviors of even-odd poly(hexamethylene dicarboxylate) aliphatic copolyesters. **Polymer (United Kingdom)**, v. 115, p. 106–117, 2017.

ZHANG, J.; SHI, H.; WU, D.; XING, Z.; ZHANG, A.; YANG, Y.; LI, Q. Recent developments in lipase-catalyzed synthesis of polymeric materials. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 797–806, 2014.

ZHANG, Y.; WANG, Z.; ZHOU, W.; MIN, G.; LANG, M. Cationic poly(ϵ -caprolactone) surface functionalized mesoporous silica nanoparticles and their application in drug delivery. **Applied Surface Science**, v. 276, p. 769–775, 2013.

ZHAO, Z.; WANG, J.; MAO, H.-Q.; LEONG, K. W. Polyphosphoesters in drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 4, p. 483–499, 2003a.

ZHAO, Z.; WANG, J.; MAO, H.; LEONG, K. W. Polyphosphoesters in drug and gene delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 55, p. 483–499, 2003b.