

Miguel Loura Lamas

BIO SCAFFOLDS POLIMÉRICOS PARA CONSTRUÇÃO DE ESTRUTURAS CELULARES

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica,
orientada pelo Doutor Arménio Serra e o Doutor Jorge Coelho,
submetida à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Miguel Loura Lamas

Bio *scaffolds* poliméricos para construção de estruturas celulares

*Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra
para cumprimento dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica*

Orientador(es):

Professor Doutor Arménio Serra (DEQ)

Professor Doutor Jorge Coelho (DEQ)

Coimbra, 2015

Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com:

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de
Coimbra



Departamento de Engenharia Química da Faculdade de
Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.

Para o Tona, um exemplo, um amigo e companheiro, o melhor Avô...

Agradecimentos

Aos meus orientadores científicos, Doutor Arménio Serra e Doutor Jorge Coelho, pela oportunidade de poder trabalhar com excelentes pessoas e profissionais dedicados e pela disponibilidade, conselhos, apoio e orientação.

A todo o Grupo de Polímeros do DEQ, no qual me senti integrado desde o início e cuja disponibilidade para ajudar e ao mesmo tempo para ensinar foi muito importante ao longo desta jornada. Foi sem dúvida um ano de grande aprendizagem mas também de evolução como pessoa e colega, muito graças ao bom ambiente que encontrei nos laboratórios B03 e B05.

Particularmente, gostava de agradecer a disponibilidade e ajuda da Inês, da Filipa, da Cátia, da Célia, da Bruna e da Catarina. Pelas conversas e pelos conselhos, foram uma grande ajuda e permitiram que aprendesse muito. Excelentes colegas!

Ao Francisco, pelo companheirismo e amizade, pela vontade de ajudar e me fazer ver o que às vezes não era capaz de perceber tão facilmente sozinho. Mesmo sendo muito diferentes, foi um prazer conhecer-te e trabalhar contigo ao longo deste ano.

À Ana Clotilde por toda a orientação, conhecimento e disponibilidade desde o primeiro dia. Foi um prazer aprender contigo e perceber que a tua ajuda sempre foi incondicional e sincera. O resultado do meu trabalho deve-se também à ajuda que sempre estiveste disponível para dar.

Aos meus pais, por serem um exemplo para mim como pessoas e profissionais, por sempre me terem dado a oportunidade e liberdade necessária para atingir os meus objetivos e ser bem sucedido tanto a nível pessoal como académico. O vosso apoio, confiança, dedicação e compreensão foram essenciais e muito importantes ao longo deste

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

percurso. O que sou hoje é um reflexo do que vejo em vocês e sei que, ao concluir esta etapa, estão tão orgulhosos por mim como sempre me senti em relação a vocês.

À Cristina, uma segunda mãe e cujo amor, carinho e preocupação nunca passou despercebido nem foi desvalorizado. Obrigado pelo incentivo, pela força e por sempre ter acreditado no que sou capaz de fazer e atingir.

Ao meu irmão João pelo interesse e atenção, por ser o meu melhor amigo e por todos os dias, com a descontração e alegria que o caracteriza, me ensinar a desfrutar dos aspetos positivos e a enfrentar e ultrapassar os menos positivos da melhor forma. Desejo que tenhas tanto sucesso ou mais do que aquele que sempre acreditaste que posso alcançar.

Às minhas avós que, cada uma à sua maneira, sempre me mostraram o quanto este trabalho e o meu sucesso é importante para elas. À avó-Lu pela preocupação, interesse e por me lembrar que mesmo quando não é fácil, com trabalho não é impossível. À avó-Lé por, desde sempre, me ter proporcionado todas as condições para poder estudar, aprender e desenvolver este trabalho, fazendo-me sentir perto de casa, mesmo estando longe. Pela força e tranquilidade que transmites, sou grato. És uma força da natureza!

Ao meu avô Tona, que infelizmente não pode estar presente mas que sei que não teria orgulho e felicidade maior do que poder constatar o meu sucesso ao terminar esta etapa da minha vida. A vontade e principalmente o gosto por aprender e trabalhar, por fazer mais e melhor e não ficar satisfeito até que tudo esteja como penso que deve estar foram a maior herança que me deixaste. Foste e vais sempre ser o meu maior exemplo!

A todo o resto da minha família, de quem sempre senti todo o apoio e desejo de que consiga chegar longe. Por mais ou menos distantes que estejam, levo-vos sempre no coração.

À minha namorada Tatiana, que sempre me apoiou e acreditou onde posso chegar. Que sempre me incentivou a fazer o que gosto e da melhor forma que conseguir. O amor e paciência, mesmo nos momentos em que apareceram alguns obstáculos, foram

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

essenciais para que os ultrapassasse. Obrigado por me fazeres crescer e perceber o que realmente é importante e por me deixares partilhar o meu sucesso contigo.

À Nala, companheira e companhia de muitas noites a ler artigos, a pesquisar e a escrever e analisar resultados. Sempre pronta a ouvir as minhas inseguranças e conquistas. Pelos beijos e brincadeiras, pelos momentos de descontração, tão importantes como aqueles em que estive a trabalhar.

Ao meu primo, João Nuno, que mesmo não estando dentro do assunto sempre teve a paciência e capacidade de me ouvir acerca do trabalho que desenvolvi e dar a sua opinião sincera. Mas por também ser capaz de me distrair e conversar sobre tudo.

Por último mas, não menos importante, gostaria de agradecer a todos os meus amigos de Aveiro, Coimbra e não só. Sei que partilham da minha felicidade e são uma parte muito importante da minha vida.

Bio *Scaffolds* poliméricos para construção de estruturas celulares

Resumo

Este trabalho de mestrado tem como tema *Bio-scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares* e como objetivo a síntese de poli(éster amidas) (PEAs) de base α -aminoácido (AA), potencialmente aplicáveis em engenharia de tecidos (ET), e o estabelecimento das relações estrutura/propriedades. As PEAs foram preparadas por polimerização interfacial, um método de síntese simples, rápido e que ocorre à temperatura ambiente. Para além disso, permite obter polímero após poucas horas de reação (p.e., 2h).

Os monómeros utilizados na síntese foram diaminas de base AA, dicloreto de ácido derivados de oligómeros de L-ácido láctico (L-LA) ou de oligómeros ϵ -caprolactona (ϵ -CL) e o cloreto de sebacoílo. As diaminas foram preparadas a partir da reação entre os AA (glicina ou L-leucina) e dietileno glicol (DEG) na presença de ácido *p*-tolueno sulfónico (*p*-TSA). Os dicloreto de ácido foram sintetizados pela reação entre oligómeros de L-LA ou oligómeros de ϵ -CL com grupos hidroxilo terminais e o cloreto de sebacoílo.

Os AA, glicina e L-leucina, foram escolhidos por apresentarem estruturas químicas bastante distintas, passíveis de conferir diferentes propriedades às PEAs.

O trabalho consistiu na síntese de 3 tipos de PEAs de base glicina e 3 tipos de PEAs de base L-leucina: com cloreto de sebacoílo (PEA-SebCl-gly e PEA-SebCl-leu), com dicloreto de ácido de base ϵ -CL (PEA-PCL-gly e PEA-PCL-leu) e com dicloreto de ácido de base L-LA (PEA-PLA-gly e PEA-PLA-leu), com o objetivo de estabelecer as relações entre a estrutura das PEAs e as propriedades físico-químicas e de degradação.

As estruturas químicas das PEAs foram avaliadas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão (^1H RMN), tendo confirmado o sucesso da reação de síntese.

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

A análise termogravimétrica (TGA) revelou que as PEAs de base glicina são termicamente mais estáveis do que as de base L-leucina e que a incorporação de segmentos de L-LA e ϵ -CL não afeta a estabilidade térmica, sendo que as que contêm oligômeros ϵ -CL apresentam melhor estabilidade térmica do que aquelas em que foram introduzidos segmentos de L-LA.

A análise por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) mostrou que as PEAs de base glicina têm uma natureza semi-cristalina, ao passo que as de L-leucina têm uma natureza amorfa. A temperatura de transição vítrea (T_g) foi determinada por análise dinâmica termomecânica (DMTA) e verificou-se que as PEAs de base glicina têm uma T_g mais alta que as de base L-leucina. Verificou-se ainda que a introdução dos segmentos oligoméricos de L-LA e ϵ -CL levou a uma diminuição da T_g , o que poderá indicar um efeito plastificante destes materiais nas PEAs.

Os perfis de degradação hidrolítica das PEAs, em meio fisiológico simulado (pH=7.4, 37 °C), indicam que a introdução de oligômeros de base poliéster na estrutura das PEAs altera o comportamento de degradação das PEAs. A incorporação de segmentos de L-LA aumenta a percentagem de perda de massa ao longo do teste, enquanto os oligômeros de ϵ -CL introduzidos diminuem a percentagem de perda de massa das PEAs, muito provavelmente devido a um aumento da hidrofobicidade do polímero.

No que concerne à degradação enzimática, a introdução de oligômeros de base oligoéster nas PEAs diminui a sensibilidade à ação das enzimas, sendo que as PEAs sintetizadas com cloreto de sebacoílo apresentam valores significativamente superiores de perda de massa comparativamente às restantes, degradando quase ou mesmo totalmente ao fim das 144 horas de teste.

Abstract

This master's work *Polymeric Bio-scaffolds for construction of cellular structures*, aimed at the development of α -amino acid base (AA) based poly(ester amides) (PEAs) potentially usable in tissue engineering, and the establishment of structure/properties relationships. The PEAs were prepared by interfacial polymerization, a simple and fast synthetic method that is carried out at room temperature and allows the obtainment of polymers after few hours reaction (e.g., 2 hours).

The monomers used in the synthesis were AA based diamines, diacyl chlorides derived from oligomers of L-lactic acid (L-LA) or oligomers of ϵ -caprolactone (ϵ -CL), and sebacoyl chloride. The diamines were prepared from the reaction between AA (glycine or L-leucine) and diethylene glycol (DEG) in the presence of *p*-toluene sulfonic acid (*p*-TSA). The oligoester based diacyl chlorides were synthesized by the reaction of hydroxyl terminated L-LA oligomers or ϵ -CL oligomers and sebacoyl chloride.

Glycine and L-leucine were the chosen AA because they have very different chemical structures, which would impart different properties to the PEAs.

The work involved the synthesis of 3 types of glycine based PEAs and 3 types of L-leucine based PEAs: with sebacoyl chloride, with ϵ -CL based diacyl chloride and with L-LA-based diacyl chloride, in order to establish the relationships between the structure of the PEAs and the physicochemical and *in vitro* degradation properties.

The chemical structures of the PEAs were studied by Fourier transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H NMR) and the results showed that the PEAs were successfully synthesized.

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

Thermogravimetric analysis (TGA) revealed that the glycine-based PEAs are more thermally stable than the PEAs based on L-leucine. It was also found that the incorporation of L-LA and ϵ -CL segments does not affect negatively the thermal stability. The PEAs containing ϵ -CL oligomers have better thermal stability than those derived from the L-LA segments.

The results obtained from the differential scanning calorimetry (DSC) showed that the glycine-based PEAs have a semi-crystalline nature, whereas the L-leucine-based have an amorphous nature. The glass transition temperature (T_g) was determined by dynamic mechanical thermal analysis (DMTA) and it was found that the glycine based PEAs have a higher T_g than those based on L-leucine. It was also found that the introduction of oligomeric L-LA and ϵ -CL segments leads to a decrease of T_g , which may indicate a plasticizing effect of these materials on PEAs.

The hydrolytic degradation profiles of the PEAs, in a simulated physiological medium (pH=7.4, 37 °C), indicated that the introduction of oligoester-based oligomers in the structure of the PEAs alters the degradation behavior of these PEAs. The incorporation of L-LA segments increases the percentage of mass loss throughout the test, while the introduced ϵ -CL oligomers contribute to an increase of the hydrophobicity of the polymer, decreasing the percentage of mass loss of the PEAs.

Regarding the *in vitro* enzymatic degradation, the introduction of polyester-based oligomers on the PEAs diminishes the sensibility to the action of enzymes. The PEAs based only in the AA and sebacoyl chloride present high values of mass loss, degrading almost or even completely at the end of the 144 hours of test.

Lista de Siglas/ Acrónimos

AA: Aminoácido(s)

CHMLAC: Células humanas do músculo liso da artéria coronária

DEG: Dietileno glicol

DMF: N,N'-dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DSC: Análise por calorimetria diferencial de varrimento ('Differential Scanning Calorimetry' do inglês)

ET: Engenharia de Tecidos

FTIR: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

HA: Ácido hialurônico

¹H RMN: Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton

L-LA: L-ácido láctico

PCL: Poli(ε-caprolactona)

PDLA: Poli(D-ácido láctico)

PDLLA: Poli(DL-ácido láctico)

PDMS: Polidimetilsiloxano

PEAs: Poli(éster amida)s

PE: Poli(etileno)

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

PET: Poli(terafitalato de etileno)

PGA: Poli(ácido glicólico)

PLA: Poli(ácido lático)

PLLA: Poli(L-ácido lático)

PMMA: Poli(metacrilato de metilo)

PP: Poli(propileno)

PPF: Poli(propileno fumarato)

PTFE: Poli(tetrafluoretileno)

p-TSA: Ácido *p*-tolueno sulfônico

PU: Poliuretanos

ROP: Reação de abertura de anel ('Ring Opening Polymerization', do inglês)

SLF: Sistema de liberação de fármacos

TGA: Análise termogravimétrica ('Thermogravimetric Analysis', do inglês)

THF: Tetrahidrofurano

T_{cc} : Temperatura de cristalização a frio

T_g : Temperatura de transição vítrea

T_m : Temperatura de fusão

ϵ -CL: ϵ -caprolactona

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Aplicações de polímeros sintéticos não biodegradáveis.....	5
Tabela 2 - Vantagens e desvantagens dos métodos de síntese de PEAs.....	19
Tabela 3 - Nº de onda associado aos grupos característicos do PLA-OH e PCL-OH	34
Tabela 4 - Nº de onda correspondentes às ligações características das PEAs.....	36
Tabela 5 - Rendimentos obtidos para as reações de síntese das PEAs.....	40
Tabela 6 - Temperaturas caraterísticas obtidas por TGA. $T_{5\%}$: temperatura correspondente a 5% da perda de massa (TG); $T_{10\%}$: temperatura correspondente a 10% da perda de massa (TG); T_p : temperatura de pico (DTG).....	42
Tabela 7 - Temperaturas de interesse obtidas por DSC e DMTA. T_{cc} : 'cold cristalization temperature'; T_g : temperatura de transição vítrea; T_f : temperatura de fusão	43

Bio *Scaffolds* poliméricos para construção de estruturas celulares

Lista de Ilustrações e Figuras

Ilustração 1 - Diagrama explicativo da Engenharia de Tecidos.....	1
Figura 1 - Síntese de PGA	8
Figura 2 - Síntese de PLA	9
Figura 3 - Síntese de PCL	10
Figura 4 - Estrutura da unidade de repetição dos polianidridos.....	11
Figura 5 - Estrutura do poly[pyromellitylimidoalanine-co-1,6-bis(p-carboxyphenoxy)hexane]... ..	12
Figura 6 - Síntese de polifosfazenos.....	13
Figura 7 - Estrutura da unidade de repetição do PPF	14
Figura 8 - a) Síntese da diamida-diéster; b) Síntese de PEA de base AA por policondensação na massa	16
Figura 9 - a) Síntese dos ésteres ativados; b) Síntese do sal de diamina de base AA; c) Síntese da PEA de base AA por policondensação em solução ativa	17
Figura 10 - a) Síntese do sal de diamina de base AA; b) Síntese de PEAs de base AA por polimerização interfacial	19
Figura 11 - Síntese de PLA-OH.....	26
Figura 12 - Síntese de PLA-Cl.....	26
Figura 13 - Síntese de PCL-Cl	27
Figura 14 - Síntese da diamina de base AA	28
Figura 15 - Síntese de PEAs de base AA com cloreto de sebacoílo.....	28
Figura 16 - Síntese de PEA de base glicina ou l-leucina e PCL.....	29
Figura 17 - Síntese de PEA de base glicina ou l-leucina e PLA.....	29
Figura 18 - Reações de síntese dos 3 tipos de PEAs de base AA.....	30
Figura 19 - Espectro de FTIR dos oligómeros de L-LA com grupos –OH terminais e de ε-CL com grupos –OH terminais.....	34

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

Figura 20 - Espectro de ^1H RMN dos oligómeros de L-LA com grupos –OH terminais e de ϵ -CL com grupos –OH terminais	35
Figura 21 - Espectro de FTIR das PEAs de base glicina (A) e de base L-leucina (B) com cloreto de sebacoílo, com PCL e com PLA	36
Figura 22 - Espectro de ^1H RMN das PEAs de base glicina	37
Figura 23 - Espectro de ^1H RMN das PEAs de base L-leucina.....	38
Figura 24 – TG (esquerda) e DTG (direita) das PEAs de base glicina (A) e L-leucina (B)	41
Figura 25 - DSC das PEAs de base glicina (A) e L-leucina (B)	43
Figura 26 - Perfil de degradação hidrolítica das PEAs de base glicina (A) e L-leucina (B)....	45
Figura 27 - Perfil de degradação enzimática das PEAs de base glicina (A) e L-leucina (B) ..	46
Figura 28 - Espectro de ^1H RMN das diaminas de base AA, glicina (D) e L-leucina (E)	XIX
Figura 29 - TG (A) e DTG (B) do PLA-OH e PCL-OH	XXI
Figura 30 - Espectro de massa da PEA de base glicina e cloreto de sebacoílo, (M(UR)=486,44 g/mol)	XXIII
Figura 31 - Espectro de massa da PEA de base L-leucina e cloreto de sebacoílo, (M(UR)=496,65 g/mol)	XXIV
Figura 32 - Gráficos obtidos por DMTA das 6 PEAs sintetizadas	XXV

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo	V
Abstract	VII
Lista de Siglas/ Acrónimos	IX
Lista de Tabelas	XI
Lista de Ilustrações e Figuras.....	XIII
Índice	XV
1 Introdução.....	1
2 Estado da Arte.....	3
2.1 Polímeros como biomateriais para engenharia de tecidos.....	3
2.2 Polímeros sintéticos biodegradáveis	7
2.2.1 Poliésteres alifáticos.....	7
2.2.1.1 Poli(ácido glicólico) (PGA).....	7
2.2.1.2 Poli(ácido láctico) (PLA)	9
2.2.1.3 Policaprolactona (PCL)	10
2.3 Polianidridos	11
2.4 Polifosfazenos	13
2.5 Poli(propileno fumarato) (PPF).....	14
2.6 Poli(éster amida)s de base α -amino ácido.....	15
2.6.1 Poli(éster amida)s em Engenharia de Tecidos	20
3 Parte Experimental.....	25
3.1 Materiais	25

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

3.2	Procedimentos.....	25
3.2.1	Síntese dos oligómeros de L-LA com grupos hidroxilo (-OH) terminais (A) ...	25
3.2.2	Síntese de dicloretos de ácido a partir dos oligómeros de L-LA com grupos –OH terminais (B).....	26
3.2.3	Síntese de dicloretos de ácido a partir de oligómeros de ϵ -CL com grupos –OH terminais (C).....	27
3.2.4	Síntese de ésteres de bis(α -amino ácidos) a partir de glicina ou L-leucina e DEG (D e E).....	27
3.2.5	Síntese das PEAs de base α -amino ácido.....	28
3.3	Técnicas de caracterização.....	30
3.3.1	Identificação da estrutura química.....	30
3.3.2	Propriedades térmicas e mecânicas.....	31
3.3.3	Degradação hidrolítica <i>in vitro</i>	31
3.3.4	Degradação enzimática <i>in vitro</i>	32
4	Resultados e Discussão.....	33
4.1	Síntese e caracterização das PEAs.....	33
4.1.1	Identificação da estrutura química dos oligómeros de base L-LA e oligómeros de base ϵ -CL, com grupos –OH terminais.....	34
4.1.2	Identificação da estrutura química das PEAs.....	36
4.2	Propriedades térmicas das PEAs.....	41
4.3	Degradação hidrolítica e enzimática <i>in vitro</i> das PEAs sintetizadas.....	45
5	Conclusão e perspectivas futuras.....	49
6	Referências bibliográficas.....	51
7	Anexos.....	XIX
7.1	Anexo A – Espetros de ^1H RMN dos monómeros (diaminas de base AA).....	XIX

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

7.2	Anexo B – Curvas termoanalíticas dos oligómeros de L-LA e dos oligómeros de ϵ -CL com grupos –OH terminais	XXI
7.3	Anexo C – Espectros de massa das PEAs de base glicina ou L-leucina com cloreto de sebacoílo	XXIII
7.4	Anexo D – Gráficos obtidos por DMTA das 6 PEAs sintetizadas.....	XXV

Bio *Scaffolds* poliméricos para construção de estruturas celulares

1 Introdução

A engenharia de tecidos define-se como uma área interdisciplinar que aplica princípios da engenharia, química e biologia, com o objetivo de desenvolver substitutos biológicos que possam ser utilizados para restaurar, manter ou melhorar as funções dos tecidos. O aparecimento desta área surge como resposta à necessidade de uma alternativa à transplantação de órgãos, efetuada com sucesso pela primeira vez no início da década de 60 mas, cuja utilização estava em grande parte restrita devido à escassez de dadores e, em alguns casos, à rejeição imunológica.^{1, 2}

Na base do processo, células são cultivadas em *scaffolds*, em biorreatores apropriados, para formarem um tecido natural e que se assemelhe ao tecido humano. Depois de formado, o tecido é implantado nos pacientes mas, em alguns casos, o *scaffold* com ou sem células pode ser implantado diretamente *in vivo* enquanto o corpo do paciente desempenha o papel do biorreator, capaz de construir novos tecidos. Os biorreatores são sistemas dinâmicos de cultura de células que permitem grande controlo sob condições (p.e., temperatura, humidade) e por isso, podem gerar grandes volumes de células quando comparados com as técnicas convencionais de cultura estática.³

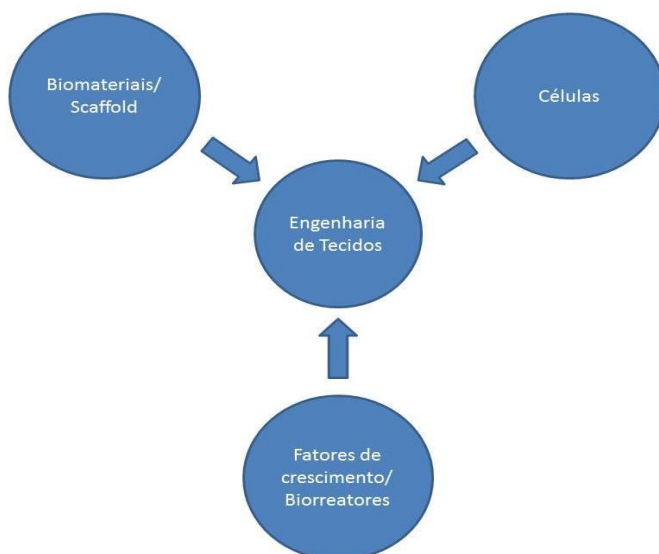


Ilustração 1 - Diagrama explicativo da Engenharia de Tecidos

Bio *Scaffolds* poliméricos para construção de estruturas celulares

Tipicamente, os *scaffolds* podem ser preparados sob a forma de malhas ou redes tridimensionais, espumas ou fibras e estas configurações promovem a distribuição uniforme das células e difusão dos nutrientes bem como o crescimento organizado das estruturas celulares. A biocompatibilidade dos *scaffolds* é determinante para evitar reações inflamatórias ou imunes e a capacidade de suportar e favorecer a deposição, proliferação e diferenciação das células que irão formar os novos tecidos também deve ser assegurada. Existem vários materiais que podem ser usados na preparação de *scaffolds* (p.e., metais, cerâmicos e polímeros) mas, os materiais poliméricos, devido à variedade e versatilidade de estruturas e propriedades, são os mais promissores e os mais utilizados^{1,2}.

Neste trabalho pretende-se sintetizar PEAs de base α -amino ácido, nomeadamente glicina e L-leucina, biodegradáveis e biocompatíveis, com bom desempenho mecânico e que permitam a preparação de *scaffolds* que promovam a formação de estruturas celulares para aplicação em ET.

2 Estado da Arte

2.1 Polímeros como biomateriais para engenharia de tecidos

Os biomateriais estão na base da ET e o seu sucesso depende das propriedades e características finais do material. Inicialmente, o único requisito essencial para classificar um material como biomaterial era este ser biocompatível, ou seja, ser capaz de coexistir com tecidos biológicos ou organismos sem provocar uma reação tóxica ou imunológica. Por este motivo, muitos materiais podiam pertencer a esta classe, tais como os metais, cerâmicos, vidros e polímeros. Estes últimos, devido à versatilidade de estruturas e propriedades que podem apresentar têm sido os mais investigados na área da ET².

Os polímeros podem ser divididos em naturais, artificiais e sintéticos, podendo estes últimos ser divididos em biodegradáveis e não-biodegradáveis.

Os polímeros naturais são utilizados como biomateriais há alguns milhares de anos e podem ser considerados os primeiros biomateriais biodegradáveis a serem usados para uso clínico. Podem ser classificados em proteínas (seda, colagénio, gelatina, elastina, queratina), polissacarídeos (celulose, amilose, dextrano, quitina e glicosaminoglicanos) ou polinucleótidos (DNA e RNA). Apesar destes polímeros poderem suportar a adesão, proliferação e diferenciação celular e de serem bioativos, existem preocupações relativas à possibilidade de ocorrerem respostas imunes ou risco de transmissão patogénica, aquando da sua utilização.

Os derivados da celulose têm sido bastante investigados para aplicações biomédicas como revestimentos em tratamento de feridas cirúrgicas e outras, queimaduras e vários problemas dermatológicos. Um dos exemplos são as fibras de derivados carboximetilados da celulose que formam um gel bastante coeso quando hidratadas e que são comercializadas com o nome de AQUACEL[®] para estes efeitos¹.

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

Outro polímero natural bastante utilizado é o ácido hialurônico (HA) e alguns dos produtos comercialmente disponíveis são: gel de HA reticulado para revestimento de feridas (HYAFF®); soluções de HA de elevado peso molecular (AMVISC® e AMVISC PLUS®), para proteção de zonas delicadas dos olhos após remoção de cataratas, transplante da córnea ou em casos de cirurgia em pacientes com glaucoma, podendo funcionar como substituto vítreo durante cirurgias à retina; formulações injetáveis de HA, desenvolvidas para aliviar a dor e melhorar a mobilidade das articulações em pacientes que sofrem de artrites nos joelhos (SYNVISC® e ORTHOVISC®); HA adicionado com fator de crescimento de fibroblastos para acelerar o processo de cura e regeneração da fratura (OSSIGEL®)^{1, 2, 4}.

O colagénio é a proteína mais abundante no corpo humano e o principal componente do tecido ósseo, pele, ligamentos, cartilagem e tendões e foi utilizado sob diferentes formas para aplicações biomédicas. O colagénio reticulado e combinado com glicosaminoglicanos (GAGs) foi aprovado pela “*Food and Drug Administration*”(FDA) dos Estados Unidos da América como substituto dérmico e comercializado com o nome de Integra®, enquanto o compósito de colagénio tipo I e hidroxiapatite ou fosfato tricálcio tem sido aplicado como substituto sintético em enxertos ósseos (Collagraft®)¹.

No entanto, os polímeros naturais podem apresentar variabilidade nas suas propriedades, o que muitas das vezes está relacionado com os processos de extração e purificação. Para além disso, tipicamente, os polímeros naturais apresentam fracas propriedades mecânicas, sendo muitas vezes necessário proceder à sua modificação, reticulação ou mistura com polímeros sintéticos⁵. Devido às desvantagens inerentes ao uso dos polímeros naturais, a investigação tem-se centrado nos polímeros sintéticos, sendo que atualmente estes são a classe de polímeros mais usados em aplicações biomédicas.

O primeiro relato da utilização dos polímeros sintéticos em aplicações biomédicas remete para a época da Segunda Guerra Mundial, onde o poli(metacrilato de metilo) (PMMA), um polímero sintético não biodegradável, foi usado como substituto artificial da córnea. Devido aos resultados promissores apresentados pelo PMMA, outros polímeros não biodegradáveis como o poli(tereftalato de etileno) (PET), o polidimetilsiloxano (PDMS), o poli(tetrafluoretileno) (PTFE),

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

o poli(etileno) (PE) e os poliuretanos (PU) foram utilizados para outras aplicações, nomeadamente como substitutos da articulação da anca e lentes intraoculares. A Tabela 1 sumaria algumas das aplicações destes polímeros¹.

Tabela 1 - Aplicações de polímeros sintéticos não biodegradáveis

Polímero	Aplicação
PET	Enxertos vasculares
PDMS	Próteses mamárias
PE	Substituição da articulação da anca
PTFE	Enxertos vasculares, próteses faciais
PU	Próteses faciais, sistemas de interface sanguínea
PMMA	Lentes intraoculares, cimentos ósseos, próteses dentárias

Apesar da utilização de polímeros sintéticos não biodegradáveis ter sido responsável por um grande avanço e desenvolvimento nos cuidados de saúde, os problemas relacionados com a biocompatibilidade de muitos destes materiais não podem ser menosprezados nem desvalorizados, representando um dos grandes problemas a ultrapassar. Por forma a dar resposta a este problema, as atenções têm-se voltado para os polímeros sintéticos biodegradáveis¹.

O primeiro relato da utilização desta classe de polímeros surge na segunda metade da década de 1960 e desde então, principalmente nos últimos vinte anos, assistiu-se a uma mudança no que diz respeito aos materiais utilizados para aplicações biomédicas, sendo os materiais poliméricos biodegradáveis preferidos relativamente aos não biodegradáveis, utilizados até então. Esta mudança justifica-se pela necessidade de eliminar alguns problemas associados à já referida biocompatibilidade a longo prazo de muitos dos biomateriais utilizados, bem como pelas questões técnicas e éticas associadas às cirurgias necessárias para posterior remoção dos mesmos^{1,6}. Assim, começaram a utilizar-se os polímeros sintéticos biodegradáveis, sendo que estes se definem como materiais que se degradam, tanto *in vitro* como *in vivo*, em produtos que são metabolitos normais do corpo humano ou em produtos que podem ser fácil e completamente eliminados do organismo, com ou sem transformações metabólicas¹.

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

A biodegradação dos polímeros pode envolver dois tipos de mecanismos de clivagem das ligações presentes nos polímeros – hidrolítica ou enzimática, sendo que ambos conduzem à erosão do material. No primeiro, a quebra das ligações dá-se por ação da água e leva à formação de oligómeros ou monómeros, sendo característica de polímeros com grupos químicos específicos na sua estrutura, como anidridos, orto éster, éster, amida ou ureia. Por outro lado, a degradação enzimática ocorre em polímeros naturais ou polímeros sintéticos preparados a partir de monómeros de origem natural (p.e., ácido glicólico, D,L-ácido láctico, aminoácidos) ou análogos destes monómeros (p.e., ácido dimetil glicólico, ϵ -caprolactona, *p*-dioxano). Os exemplos mais comuns de enzimas envolvidas no processo de biodegradação são as proteases, estereases, glicosidases e fosfatases. Outros aspetos importantes a ter em conta no processo de biodegradação são o peso molecular, a cristalinidade, a hidrofiliabilidade e o pH do meio envolvente^{7,8}.

Nos dias de hoje, o uso de polímeros biodegradáveis na área biomédica não é um assunto trivial e devem ser tomados em consideração uma série de aspetos, tais como⁶:

- Os tempos de degradação devem ser coerentes com o tempo que demora o processo de regeneração;
- As propriedades mecânicas dos polímeros utilizados devem ser apropriadas e indicadas para a aplicação pretendida e as alterações após degradação devem ser compatíveis com o processo de regeneração;
- O material não deve provocar uma reação tóxica ou inflamatória após implantação no organismo;
- Os produtos de degradação não devem ser tóxicos e o organismo deve ser capaz de os metabolizar e eliminar;
- O material deve ser facilmente esterilizável;
- O material deve ter um tempo de vida aceitável.

Bio *Scaffolds* poliméricos para construção de estruturas celulares

2.2 Polímeros sintéticos biodegradáveis

Os poliésteres alifáticos (p.e., poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL)) são dos polímeros sintéticos biodegradáveis mais usados em *scaffolds* para ET, tendo já sido aplicados em tecido ósseo, cartilagem, ao nível cardiovascular e das válvulas cardíacas bem como do intestino, regeneração nervosa, substituição e/ou regeneração da pele, substituição de ligamentos e artérias.

Além dos polímeros referidos, existem outros que também apresentam potencial para serem utilizados nesta área, nomeadamente poli(anidridos), poli(fosfazenos), poli(propileno fumarato)s e poli(éster amida)s.

2.2.1 Poliésteres alifáticos

Os poliésteres alifáticos são a classe de polímeros biodegradáveis mais investigados na área das aplicações biomédicas e podem ser sintetizados por reação de abertura de anel (ROP) ou de policondensação na massa ou em solução, dependendo do tipo de monómeros utilizados. Tipicamente degradam por um mecanismo de cisão hidrolítica das ligações éster e, no caso, do PGA e do PLA, os produtos de degradação são metabolitos naturais do corpo humano^{1,6}.

2.2.1.1 Poli(ácido glicólico) (PGA)

O PGA é um poliéster alifático que pode ser obtido pela ROP do glicolídeo ou pela policondensação (na massa ou em solução) do ácido glicólico (GA) (Figura 1).

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

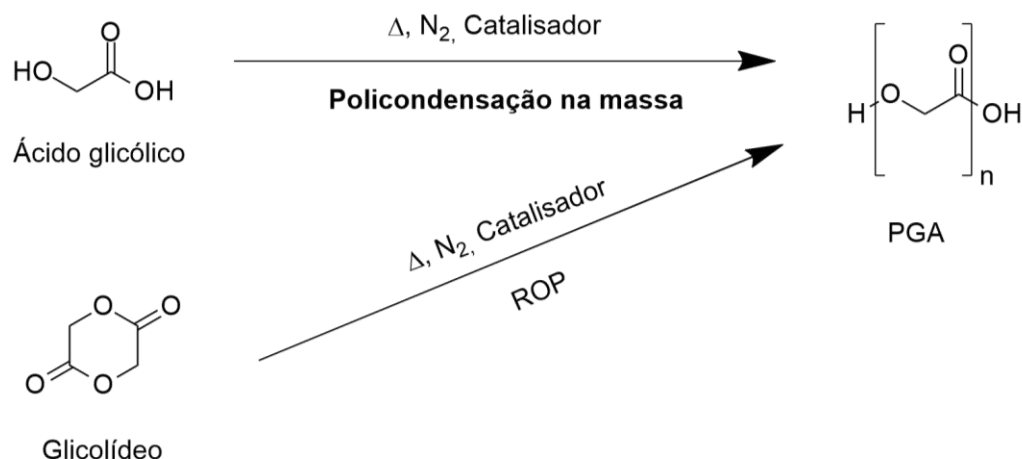


Figura 1 - Síntese de PGA

É altamente cristalino, entre 45 a 55 % de cristalinidade, apresenta um módulo de tração elevado e solubilidade bastante reduzida em solventes orgânicos. A temperatura de transição vítrea (T_g) varia entre 35 e 40 °C e a temperatura de fusão (T_m) é superior a 200 °C.

Devido à capacidade de facilmente formar fibras, este polímero foi inicialmente investigado como material para suturas reabsorvíveis, sendo o primeiro material, de nome DEXON[®], aprovado em 1969 pela FDA para este efeito. Além disso, tem sido bastante utilizado em *scaffolds* para regeneração de tecidos, devido à sua biodegradabilidade, boas propriedades mecânicas iniciais e viabilidade celular. A elevada percentagem de cristalinidade permite a este polímero exibir excelentes propriedades mecânicas, razão pela qual também foi utilizado em dispositivos internos de fixação óssea, Biofix^{®6}.

O PGA degrada, por cisão da ligação éster, em GA, que pode ser excretado na urina ou convertido em dióxido de carbono e água pelo ciclo do ácido cítrico⁶.

Apesar das vantagens enumeradas, a baixa solubilidade do PGA e o carácter ácido dos seus produtos de degradação limitam as aplicações biomédicas, pelo que têm sido desenvolvidos vários copolímeros, que contêm unidades de GA, para poder ultrapassar estas desvantagens⁶.

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

2.2.1.2 Poli(ácido láctico) (PLA)

O PLA, à semelhança do PGA, pode ser sintetizado por ROP do lactídeo ou por policondensação do ácido láctico (LA) (Figura 2). Ao contrário do glicolídeo, o lactídeo é uma molécula quiral que existe em duas formas, L-lactídeo e D-lactídeo, e por isso o PLA pode existir em quatro formas distintas: poli(L-ácido láctico) (PLLA), poli(D-ácido láctico) (PDLA), poli(DL-ácido láctico) (PDLLA) e meso-PLA. O PLLA e PDLA são polímeros semi-cristalinos, ao passo que o PDLLA e o meso-PLA têm uma natureza amorfa. Na área biomédica, apenas o PLLA e PDLLA mostraram ser promissores e apenas estes têm sido amplamente usados e investigados.

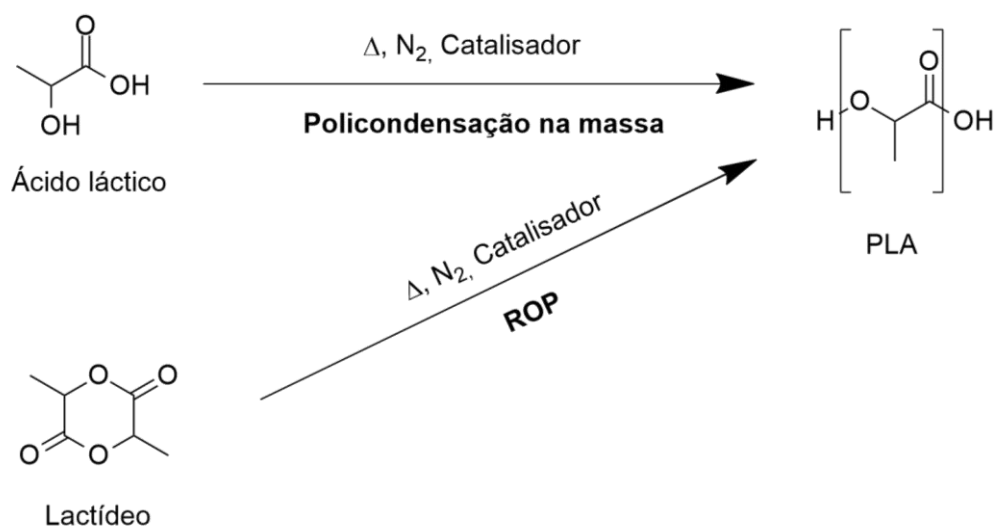


Figura 2 - Síntese de PLA

O PLLA tem uma percentagem de cristalinidade de aproximadamente 37% mas que varia com o peso molecular e os parâmetros de processamento do polímero. Tem uma T_g entre 60 e 65 °C e uma T_m de cerca de 175 °C. Apresenta boa resistência à tração, reduzido alongamento e elevado módulo de Pascal, cerca de 4,8 GPa, sendo por isso considerado uma boa solução para dispositivos de fixação ortopédica. Alguns destes produtos são Phantom Soft Thread Soft Tissue Fixation Screw[®], Phantom Suture Anchor[®] (DePuy), Full Thread Bio Interference Screw[®] (Arthrex), BioScrew[®], Bio-Anchor[®], Meniscal Stinger[®] (Linvatec) e Clearfix Meniscal Dar[®] (Innovative Devices). A sua facilidade em formar fibras, fez com que o PLLA fosse aprovado pela

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

FDA em 1971 para desenvolver melhores suturas que as DEXON[®] de base PGA e, devido à elevada força das fibras formadas, foi também utilizado em *scaffolds* para substituição de ligamentos (Dacron[®])⁶.

Ao contrário do PLLA, o PDLLA é amorfo devido à distribuição aleatória das unidades de L e D-lactídeo e por essa razão o seu módulo de Pascal é bastante inferior, cerca de 1,9 GPa. Tem uma T_g entre 55 e 60 °C e por ser menos resistente é utilizado principalmente em sistemas de libertação de fármacos (SLF) ou para fabricação de *scaffolds* para aplicações em que o desempenho mecânico não é crítico.

O PLA sofre degradação hidrolítica por cisão da ligação éster, degradando em LA, um metabolito normal no corpo humano e que é transformado em água e dióxido de carbono pelo ciclo do ácido cítrico⁶.

2.2.1.3 Policaprolactona (PCL)

A PCL é um poliéster semi cristalino, sendo obtido pela ROP a partir de um monómero relativamente barato e acessível, a ϵ -caprolactona (ϵ -CL) (Figura 3). É solúvel numa vasta gama de solvente orgânicos, tem uma T_m entre os 55 e 60 °C, T_g de - 60 °C, reduzida resistência à tração mas excelente alongação e é passível de formar misturas miscíveis com outros polímeros (p.e., PMMA e Poli(propileno) (PP)).

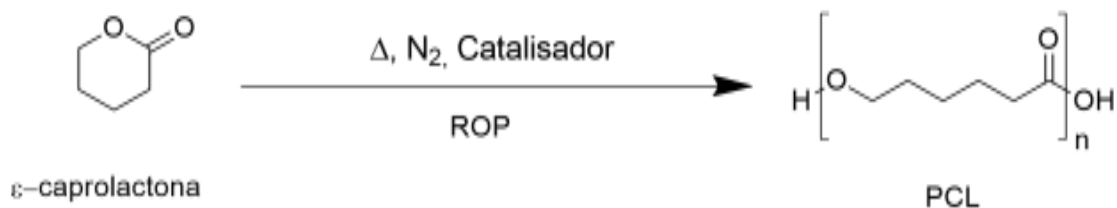


Figura 3 - Síntese de PCL

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

Degrada por um mecanismo hidrolítico, devido à presença das ligações éster e apresenta um perfil de degradação lento, entre 2 a 3 anos. Devido, não só às propriedades antes referidas, bem como à elevada permeabilidade a drogas e não citotoxicidade, foi investigada como SLF para libertação de drogas por tempo prolongado e também para vacinas⁶.

Devido às boas propriedades de biocompatibilidade que apresenta, é bastante utilizada em *scaffolds* para ET. Um dos trabalhos apresenta um *scaffold* poroso de PCL e HYAFF como substituto do menisco, tendo os resultados dos testes clínicos mostrado que a utilização deste compósito promove a regeneração do tecido na zona do menisco e a formação de cartilagem, enquanto outro utiliza compósitos de PCL com fosfato de cálcio para obter *scaffolds* com uma densa rede porosa e os resultados iniciais indicam que estes podem ter a capacidade de mineralizar e assim regenerar tecido ósseo⁶.

Outra abordagem bastante investigada é a síntese de copolímeros de ϵ -CL com outros monómeros como por exemplo o GA e LA com o objetivo de melhorar as propriedades da PCL. Estão disponíveis comercialmente como monofilamento para suturas (MONACRYL®), fibras compostas por um copolímero de ϵ -caprolactona com glicolídeo que provaram ser bastante menos rígidas quando comparadas com aquelas constituídas apenas por PGA⁶.

2.3 Polianidridos

Os polianidridos são uma classe de polímeros que degradam por um mecanismo de erosão à superfície, sendo obtidos por ROP de anidridos, por policondensação interfacial, por policondensação na massa de diácidos ou ésteres derivados de diácidos. A estrutura destes polímeros está representada na Figura 4.

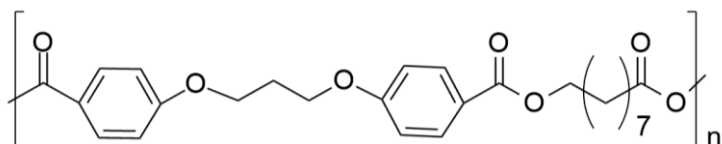


Figura 4 - Estrutura da unidade de repetição dos polianidridos

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

Devido ao seu mecanismo de degradação são especialmente usados em SLFs. Estes polímeros foram sintetizados com sucesso, pela primeira vez em 1909 por Bucher e Slade. Posteriormente, em 1932 Hill e Carothers desenvolveram copolímeros deste material com poliésteres alifáticos, sob a forma de fibras para aplicações no sector têxtil. A sua instabilidade hidrolítica e os baixos pesos moleculares obtidos impediram a sua progressão e aplicação industrial mas, em 1980 foram investigados como materiais para SLF e em 1996, este material foi aprovado pela FDA dos Estados Unidos para esta aplicação. Devido à rápida degradação e fraca performance mecânica, as aplicações biomédicas deste tipo de polímero restringem-se a SLFs^{1, 6}.

Na ET, os polianidridos foram aplicados na forma de copolímeros poli(anidrido-co-imida)s, uma vez que estes últimos apresentam propriedades mecânicas significativamente melhores do que os polianidridos, tendo a sua biocompatibilidade sido comprovada *in vivo* e *in vitro*. Laucerin *et al.* investigaram a performance mecânica e a biocompatibilidade de uma vasta gama de poli(anidrido-co-imida)s, nomeadamente o *poly[pyromellitylimidoalanine-co-1,6-bis(p-carboxyphenoxy) hexane]* (Figura 5), para aplicações de regeneração de tecido ósseo. Os resultados mostraram a capacidade de tratar a lesão, no caso ao nível da tíbia, em aproximadamente 12 dias, tendo as matrizes implantadas demonstrado boa osteocompatibilidade e desempenho mecânico, com módulos de compressão de 50-60 MPa, sugerindo que podem ser utilizadas como *scaffolds* na área ortopédica. Estes copolímeros degradam, numa primeira fase, por hidrólise da ligação anidrido, seguida por hidrólise da ligação imida^{1, 9}.

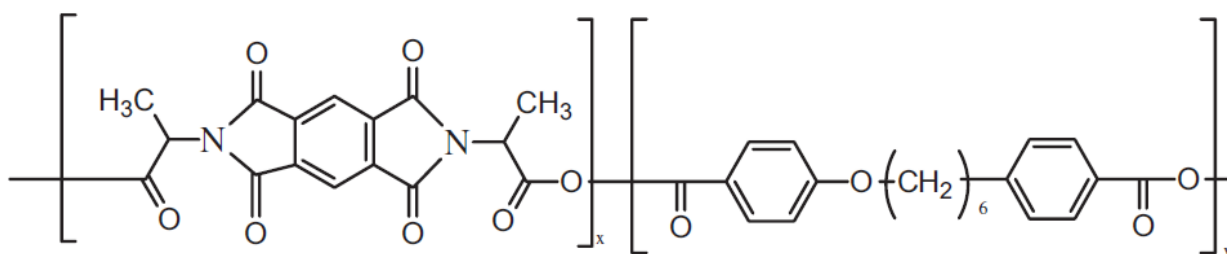


Figura 5- Estrutura do poly[pyromellitylimidoalanine-co-1,6-bis(p-carboxyphenoxy) hexane]

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

2.4 Polifosfazenos

Os polifosfazenos são polímeros que contêm uma cadeia inorgânica de átomos de fósforo alternados com átomos de azoto, com dois grupos orgânicos laterais ligados a cada átomo de fósforo e que degradam por hidrólise da cadeia, libertando unidades não tóxicas de fosfato e amónia, deixando os grupos laterais livres. No final da década de 1960, Allcock e Kugel desenvolveram os primeiros polímeros deste tipo mas apenas duas décadas mais tarde, a mesma equipa de investigadores, conseguiu sintetizar polifosfazenos biodegradáveis.

A síntese destes materiais compreende dois passos:

1) ROP do hexacloro ciclotrifosfazeno, de onde se obtém o intermediário poli(diclorofosfazeno);

2) Substituição das unidades de cloro do poli(diclorofosfazeno) por um grupo lateral orgânico (p.e., amino, alcóxi ou ariloxi) (Figura 6)⁶.

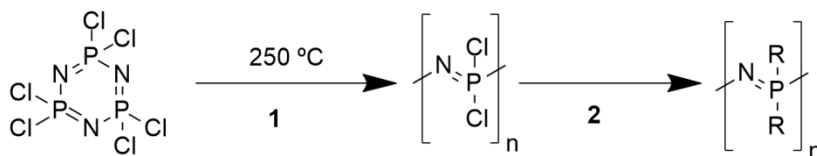


Figura 6 - Síntese de polifosfazenos

Estes polímeros têm características como a boa funcionalidade, flexibilidade e adaptabilidade para aplicações em SLF e ET, nomeadamente a nível neural e de tecido ósseo. Até ao momento já foram sintetizados mais de 500 tipos de polifosfazenos com uma vasta gama de grupos laterais^{1, 6, 9}.

2.5 Poli(propileno fumarato) (PPF)

O PPF é um poliéster insaturado que pode ser sintetizado por três vias diferentes. Um dos métodos faz reagir o dietil fumarato e o propileno glicol a 250 °C, usando o ácido *p*-tolueno sulfônico (*p*-TSA) como catalisador, mas os rendimentos atingem apenas os 35%. Noutro método, o ácido fumárico e o propileno glicol são inicialmente aquecidos a 145 °C, sendo a temperatura aumentada gradualmente até aos 180 °C, permitindo obter PPF com pesos moleculares entre os 500 e 1200 g/mol. O último método envolve a preparação dos intermediários bis-(hidroxipropil) fumarato, por reação do ácido fumárico com o propileno glicol, e o propileno bis(hidrogénio maleato), por reação do anidrido maleico com propileno glicol. Estes dois compostos reagem a 180 °C para produzir PPF com pesos moleculares entre 750 e 1500 g/mol. A estrutura deste polímero está representada na Figura 7.

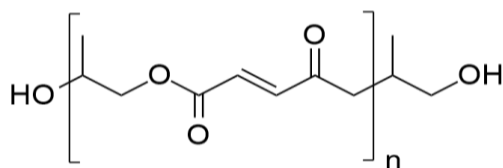


Figura 7 - Estrutura da unidade de repetição do PPF

Tipicamente, o PPF obtém-se com pesos moleculares baixos devido à ocorrência de reações secundárias, devidas em grande parte à presença das ligações duplas. Usualmente, este polímero é usado na forma reticulada, sendo as suas propriedades dependentes do tipo de reticulante usado, do peso molecular do PPF e da densidade de reticulação⁹.

Uma das utilizações do PPF é como biomaterial injetável biodegradável para aplicações ortopédicas, sendo a reticulação química vantajosa em relação a outros polímeros baseados em sistemas de fotorreticulação e cuja aplicação está limitada à zona superficial dos ossos. Habitualmente, a reticulação química ocorre com o metacrilato de metilo ou com *N*-vinil pirrolidona, usando o peróxido de benzoílo como iniciador, fazendo parte da formulação⁹.

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

Além disso, compósitos de PPF e cerâmicos como o fosfato tricálcio ou o sulfato de cálcio formam matrizes bastante resistentes com módulos entre os 2 e os 30 MPa, excelentes para aplicações ortopédicas⁹.

2.6 Poli(éster amida)s de base α -amino ácido

As PEAs são copolímeros que apresentam na sua estrutura ligações éster e ligações amida e, por essa razão, reúnem num só material as melhores propriedades dos poliésteres (p.e., biodegradabilidade) e das poliamidas (p.e., boas propriedades termomecânicas). De grande interesse são as PEAs de base α -aminoácido (AA). A presença das unidades de AA melhora as interações célula-polímero, permite a degradação também por via enzimática e a introdução de grupos pendentes reativos (-NH₂, -OH, -SH, -COOH), dependendo do AA usado. O carácter natural e não tóxico dos AA e o fato de promoverem a interação do polímero com os tecidos vizinhos após a sua implantação são outras duas importantes razões que justificam o potencial das PEAs de base AA⁸.

Relativamente aos poliésteres, as PEAs de base AA apresentam a grande vantagem de libertarem produtos ácidos e básicos aquando da degradação, evitando-se assim uma variação do pH do meio, muitas vezes responsável pela inflamação dos tecidos. Face aos poli(aminoácidos), as PEAs têm como principais vantagens o facto de serem facilmente processáveis e de terem perfis de degradação mais rápidos.

Assim, as PEAs de base AA apresentam-se como uma alternativa muito promissora e com vantagens óbvias relativamente aos poliésteres e poli(aminoácidos) em aplicações no contexto biomédico, particularmente em ET.

Tipicamente, as PEAs de base AA são sintetizadas por três métodos: policondensação na massa ou em solução e polimerização interfacial.

Na policondensação na massa, a reação dá-se entre um diol e uma diamida-diéster, previamente obtida pela condensação de um dicloreto de ácido com um éster metílico de AA. A

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

policondensação ocorre em duas etapas: a primeira, a temperaturas entre os 160 e 190 °C sob atmosfera de azoto e à pressão atmosférica, para se formar a diamida-diéster (Figura 8a); na segunda etapa, é aplicado vácuo e a temperatura é aumentada para cerca dos 200-220 °C, para favorecer o processo de condensação e aumentar o peso molecular do polímero formado (Figura 8b). Este método tem como desvantagem as elevadas temperaturas requeridas, que podem originar reações secundárias. Mas, nomeadamente no contexto industrial, tem a vantagem de não ser necessário tratamento do polímero após a reação¹⁰.

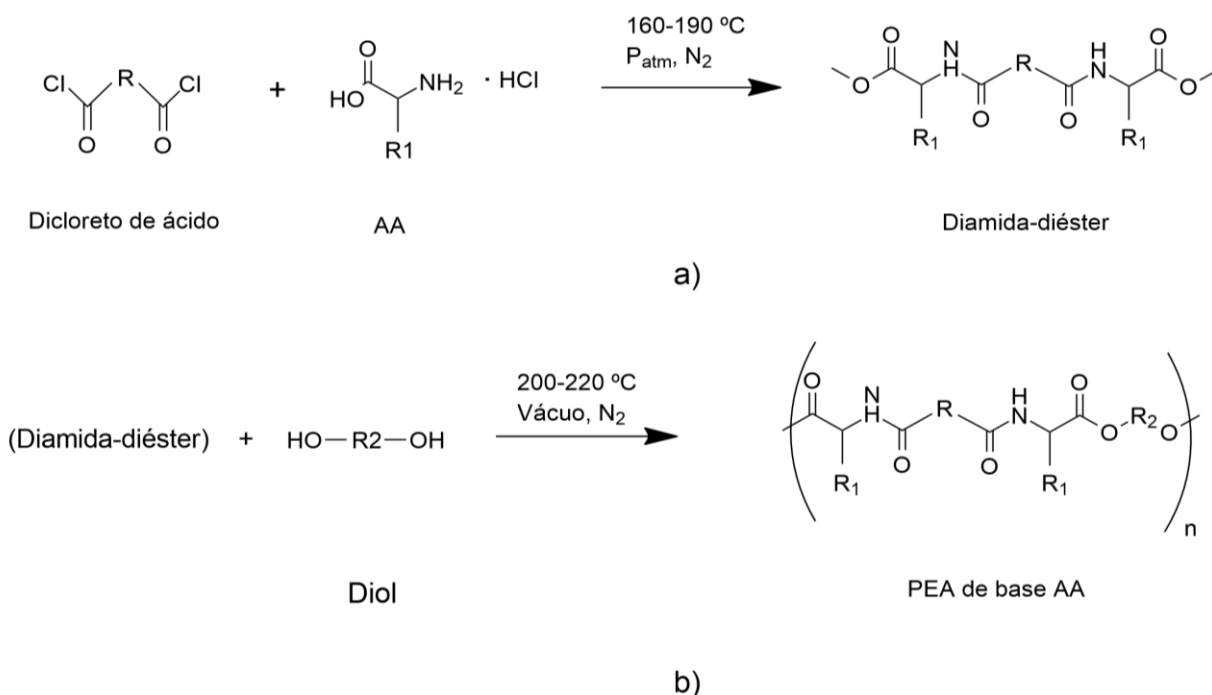


Figura 8 - a) Síntese da diamida-diéster; b) Síntese de PEA de base AA por policondensação na massa

No caso da policondensação em solução a reação ocorre entre um ácido dicarboxílico e uma diamina, por ativação dos grupos do ácido carboxílico ou utilizando agentes de condensação. É comum designar este tipo de reação como policondensação ativa em solução, devido à ativação dos grupos do ácido que consiste na reação destes grupos com os chamados grupos livres ou agentes de condensação, para formar amidas ou ésteres.

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

O método de dá-se em três etapas: na primeira são preparados ésteres ativados a partir de ácidos dicarboxílicos ou dicloreto de ácido na presença de agentes de condensação (p.e., dicicloexilcarbodiimida) ou aminas terciárias (p.e., trietilamina (Et₃N)), respetivamente (Figura 9a). Os nitrofenil ésteres são os diésteres ativados mais utilizados em policondensação em solução ativa; na segunda etapa é feita a preparação de um sal de diamina, por esterificação de Fisher entre AA e dióis, na presença de p-TSA (Figura 9b) e a terceira etapa compreende a policondensação em solução entre o nitrofenil éster obtido na primeira etapa e o sal de diamina de base AA obtido na segunda etapa, a pressão atmosférica, em solvente orgânico e na presença de uma amina terciária (Figura 9c). Os solventes orgânicos habitualmente utilizados são o clorofórmio (CHCl₃), a N,N'-dimetilformamida (DMF) e a N,N'-dimetilacetamida (DMA) e as aminas terciárias a Et₃N, a N-metilmorfolina e a N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina (TMED).

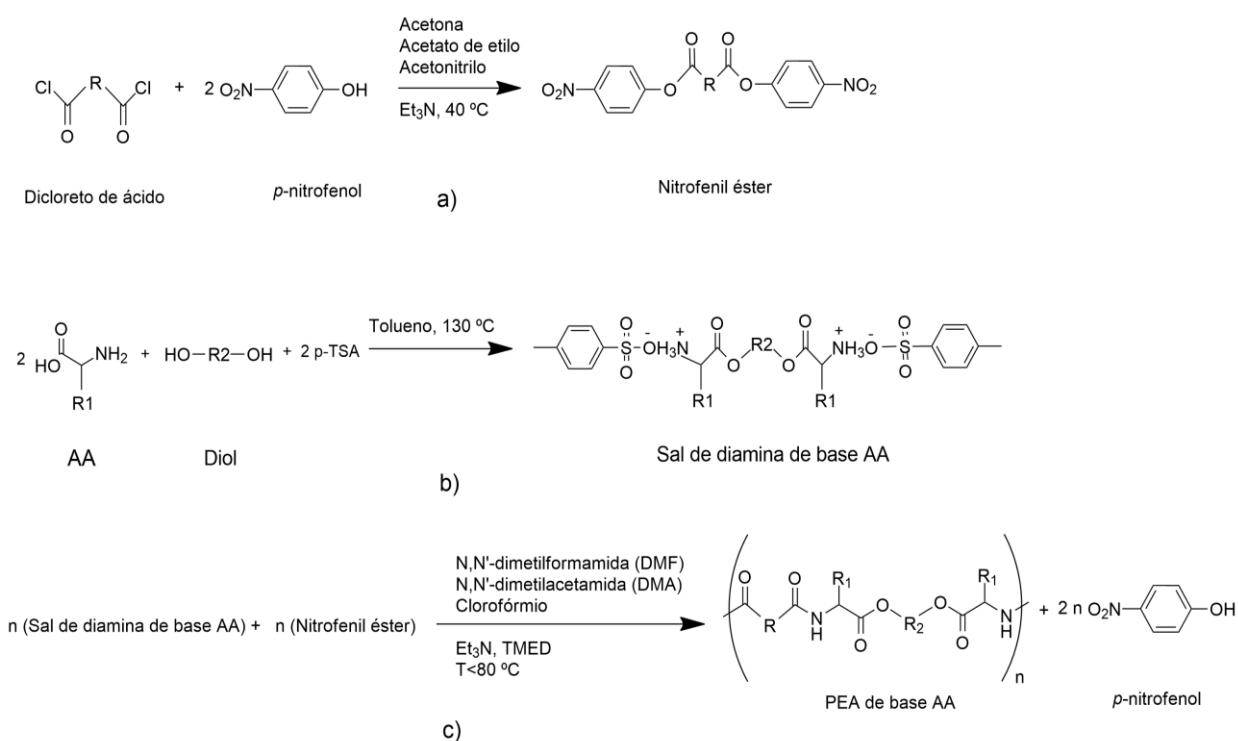


Figura 9 - a) Síntese dos ésteres ativados; b) Síntese do sal de diamina de base AA; c) Síntese da PEA de base AA por policondensação em solução ativa

Este método foi desenvolvido para dar resposta aos já referidos problemas relacionados com as elevadas temperaturas envolvidas nas reações de policondensação na massa, sendo atualmente o mais utilizado. Este tipo de reação ocorre a temperaturas inferiores a 80 °C e à

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

pressão atmosférica, sendo caracterizada por elevadas velocidades de polimerização, por minimizar as reações secundárias e pelos polímeros de elevado peso molecular obtidos. A síntese de PEAs de base AA por policondensação ativa em solução foi proposta e descrita por Katarava *et al.* durante a década de 1980 e continua a ser um dos métodos mais usados, apesar da necessidade de purificar o polímero depois de terminada a reação para remover o produto tóxico formado (*p*-nitrofenol), o que pode ser considerado como uma desvantagem¹⁰.

A polimerização interfacial é um método rápido e irreversível de policondensação que ocorre na interface entre duas fases imiscíveis, normalmente água e um solvente orgânico, cada um contendo reagentes bifuncionais. É um método baseado na reação de Schotten-Baumann, em que um dicloreto de ácido reage com compostos que contêm átomos ativos de hidrogênio (p.e., OH, NH e SH). Ocorre à temperatura ambiente e não necessita de um balanço estequiométrico entre os reagentes das duas fases. O sucesso deste tipo de polimerização depende da presença de uma base, necessária na fase aquosa para neutralizar o ácido clorídrico formado durante a reação, caso contrário a diamina será convertida num sal não reativo, comprometendo o rendimento da reação. Por outro lado, a hidrólise do dicloreto de ácido no respetivo diácido deve ser evitada, uma vez que este não reage nas condições de polimerização interfacial, pelo que irá diminuir as taxas de polimerização e limitar o peso molecular dos polímeros formados. Para evitar ou minimizar a ocorrência desta situação, podem usar-se dicloretos de ácido de cadeias alifáticas longas ou aromáticas, prevenindo assim a hidrólise devido à baixa afinidade com o meio aquoso. O solvente orgânico deve ser cuidadosamente selecionado, para que o polímero precipite apenas quando atingir um peso molecular adequado para a aplicação final.

Na Tabela 2 são apresentados os três métodos principais de síntese de PEAs e as suas vantagens e desvantagens.

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

Tabela 2 - Vantagens e desvantagens dos métodos de síntese de PEAs

Método de síntese	Vantagens	Desvantagens
Policondensação na massa	Não é necessário tratamento do polímero após a reação	Condições severas (200-220 °C) Probabilidade elevada de ocorrência de reações secundárias
Policondensação em solução ativa	Condições menos severas (80 °C) Elevadas taxas de polimerização Reações secundárias mínimas	Monómeros com elevado grau de pureza Necessário equilíbrio estequiométrico Purificação do polímero
Polimerização interfacial	Reação à temperatura ambiente Não é necessário equilíbrio estequiométrico Tempos de polimerização reduzidos	Possibilidade de hidrólise do dicloreto de ácido no respetivo diácido

Devido a estas características e à sua simplicidade, a polimerização interfacial tem despertado bastante interesse, tendo sido utilizada para sintetizar várias PEAs de base AA nos últimos anos. O procedimento pode ser dividido em duas etapas:

1. Preparação de um sal de diamina, por esterificação de Fisher entre AA e dióis, na presença de *p*-TSA (Figura 10a);
2. Reação do sal de diamina com o dicloreto de ácido, na presença de uma base (Figura 10b).

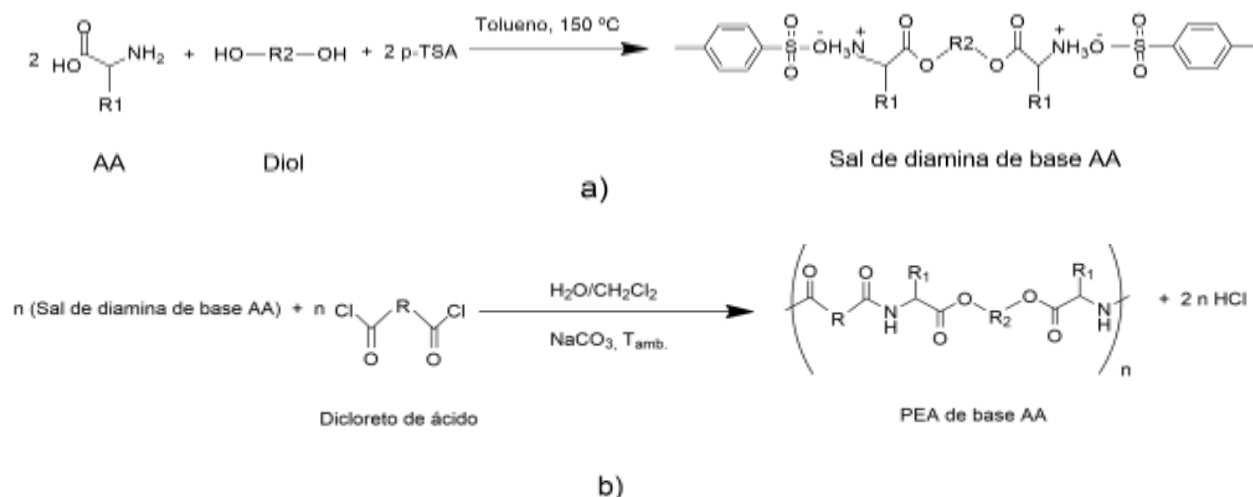


Figura 10 - a) Síntese do sal de diamina de base AA; b) Síntese de PEAs de base AA por polimerização interfacial

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

Desta forma, analisando os três métodos de síntese descritos, a polimerização interfacial tem vantagens relativamente aos métodos de síntese por policondensação. Ao contrário dos métodos de policondensação na massa e em solução, cuja reação ocorre a 200-220 °C e 80 °C, respetivamente, a polimerização interfacial ocorre à temperatura ambiente, o que diminuiu a probabilidade de ocorrência de reações secundárias. Além disso é um procedimento simples e que permite obter polímero em poucas horas de reação (p.e, 2 horas)¹¹.

2.6.1 Poli(éster amida)s em Engenharia de Tecidos

Nos últimos anos têm sido desenvolvidos muitos trabalhos para testar e provar a biocompatibilidade, biodegradabilidade e o desempenho térmico e mecânico das PEAs de base AA para que possam ser aplicadas no contexto biomédico, nomeadamente em ET.

Katsarava e Markoishvili utilizaram PEAs de base AA para construir biocompósitos destinados a aplicações biomédicas. Um dos produtos registado desde 1999 na República da Geórgia é o PhagoBioDerm[®], produzido sob a forma de filmes com propriedades elásticas que juntamente com bacteriófagos, antibióticos, analgésicos e enzimas proteolíticas constituem um sistema de proteção e ajuda na cicatrização de feridas, funcionando como pele artificial. A sua utilidade terapêutica foi demonstrada com sucesso tanto em feridas infetadas como em úlceras (de origem trófica ou diabética). Os testes clínicos foram efetuados numa amostra de 107 pacientes com úlceras mas apenas 96 terminaram o estudo. A aplicação dos filmes de PhagoBioDerm[®] contribuiu para o sucesso do tratamento total das úlceras em 67 dos 96 pacientes (70%), enquanto em 24 se observaram melhorias e redução do tamanho das feridas. Nos restantes 5 casos não foi observada qualquer melhoria, o que pode ser explicado pelo facto desses pacientes terem interrompido o tratamento ao fim de um mês¹².

Pouco tempo depois, a mesma equipa desenvolveu o produto sob a forma de *spray* que, ao ser aplicado em feridas superficiais, úlceras ou queimaduras, forma um filme fino, elástico e transparente que acelera o processo de cicatrização¹².

Em 2009, DeFife e a sua equipa desenvolveram PEAs de base AA por policondensação em solução, utilizando a L-leucina e L-lisina, a qual foi funcionalizada com álcool benzílico ou óxido

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

de 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO), 1,6-hexanodiol e dinitro-*p*-sebacinato. As PEAs sintetizadas tinham como objetivo o revestimento de “*stents*” cardiovasculares e por isso, a capacidade de promover e melhorar a compatibilidade com o sangue e os tecidos humanos foi testada *in vitro* e *in vivo*. Os resultados indicam que as PEAs de base AA apresentam excelente biocompatibilidade a longo prazo e os testes de proliferação celular provam a capacidade destes polímeros favorecerem a adesão e proliferação de células endoteliais. Com este estudo DeFife *et al.* pretenderam apresentar uma alternativa de base natural que pudesse substituir materiais como o PLGA ou o biomaterial não biodegradável, poli(metacrilato de *n*-butilo) (PBMA), no revestimento de “*stents*” vasculares^{7,13}.

Outra das áreas da ET em que as PEAs se apresentam como uma solução bastante promissora é na implantação de *bypasses* coronários. São efetuados cerca de 600 mil procedimentos deste tipo por ano na Europa e nos Estados Unidos, o que justifica o interesse e investimento no desenvolvimento deste tipo de materiais para esta aplicação. Assim, o desenvolvimento de vasos sanguíneos artificiais constituídos por PEAs que possam, depois de implantados, desempenhar o papel das artérias coronárias e desta forma substituí-las, é uma das alternativas mais interessantes aos “*stents*” que são realizados atualmente, muito rígidos e cujos riscos para o paciente e a probabilidade de rejeição são bastante superiores¹³.

Em 2010, Horwitz e a sua equipa sintetizaram várias PEAs de base fenilalanina por policondensação em solução. Os polímeros formados apresentam pesos moleculares entre os 24 000 e 167 000 g/mol e T_g entre os 11 e os 109 °C. A adesão de células endoteliais foi bem sucedida e os testes mecânicos mostraram que as PEAs apresentam módulos comparáveis e aproximados aos dos vasos sanguíneos, pelo que se apresentam como uma alternativa muito promissora aos “*stents*” realizados com PET e PTFE, cuja aplicação está limitada a vasos de diâmetro superior a 6 mm, colapsando rapidamente nos vasos de menor dimensão¹⁴.

No mesmo ano, Karimi e a sua equipa de investigadores desenvolveram PEAs de base AA, preparadas à base de L-fenilalanina, L-metionina, 1,4-butanodiol, 1,6-hexanodiol e cloreto de sebacoílo, por polimerização interfacial. Desta forma foi possível sintetizar PEAs com grupos laterais aromáticos e PEAs com cadeias laterais alifáticas, com peso molecular entre os 28 000 e

Bio *Scaffolds* poliméricos para construção de estruturas celulares

45 000 g/mol, suficientemente elevados para permitir a formação de filmes para os testes de degradação e de cultura celular com células humanas do músculo liso da artéria coronária (CHMLAC). Os resultados obtidos indicam que apesar da rápida perda de massa das PEAs na presença de enzimas, o peso molecular dos polímeros não sofre grandes alterações, o que permite que este mantenha as suas propriedades. Por outro lado, a adesão das células do tecido muscular vascular foi comprovada mas, devido ao curto período de tempo dos testes (48 horas) não foi possível avaliar a proliferação e aumento do número de células. Em todo o caso, as PEAs de base L-fenilalanina e L-metionina mostraram ter propriedades de degradação e interação celular interessantes e principalmente, pesos moleculares suficientemente elevados para que possam ser utilizadas em *scaffolds* para ET¹⁵.

Em 2011, a equipa de Knight desenvolveu um estudo comparativo entre PEAs de base L-alanina e L-fenilalanina, sintetizadas por polimerização interfacial e policondensação em solução. Foram utilizados dois dióis diferentes, 1,4-butanodiol e 1,8-octanodiol e os AA foram escolhidos por permitirem obter PEAs semi-cristalinas e que exibem um bom desempenho térmico e mecânico. Todas as PEAs, particularmente as de base L-alanina, têm uma temperatura de degradação bastante elevada (superior a 300 °C), o que facilita o seu processamento. Por outro lado, o carácter hidrofóbico da L-alanina e da L-fenilalanina e a utilização de dióis com longas cadeias alifáticas (p.e., 1,8-octanodiol) também facilita o processamento das PEAs, ao favorecer a solubilidade em solventes orgânicos (p.e., clorofórmio).

Neste estudo, os autores concluíram que a polimerização interfacial é um método que forma polímeros com peso molecular mais elevado do que por policondensação em solução. As PEAs apresentaram temperaturas de transição vítrea baixas (13 °C e 25 °C para L-alanina e L-fenilalanina, respetivamente), o que indica que têm potencial para serem utilizadas em *scaffolds* para ET vascular, onde os polímeros utilizados devem apresentar preferencialmente uma T_g inferior ou próxima à das condições fisiológicas, para que sejam capazes de deformar sob essas condições, mimetizando o melhor possível a matriz extracelular. Além disso, os testes de adesão e proliferação celular, efetuados com CHMLAC, na presença apenas das PEAs sintetizadas por polimerização interfacial devido ao peso molecular mais elevado obtido, indicam que as PEAs interagem com as células, favorecendo a adesão e inclusivamente a proliferação celular, tendo

Bio *Scaffolds* poliméricos para construção de estruturas celulares

sido observado um aumento do número de células entre o 3º e 5º dia em cultura. Desta forma, as PEAs sintetizadas apresentam características mecânicas, térmicas e de viabilidade e proliferação celular indicadas para a utilização em *scaffolds* para engenharia de tecido vascular¹⁶.

Outro trabalho, em 2012, tinha como objetivo a produção de fibras de PEA de base AA através de *electrospinning*. A PEA sintetizada por Srinath e a sua equipa é constituída por alanina, o 1-8-octanodiol e o cloreto de sebacoílo, tendo sido obtido um polímero com peso molecular de cerca de 45 000 g/mol e T_g de 13,5 °C. Para facilitar a formação de fibras por *electrospinning* foi adicionada PCL (peso molecular 80 000 g/mol), entre 18 e 30%, sendo que abaixo do valor mínimo não se verifica a formação de fibras e o valor máximo limita a influência da PCL nas fibras de PEAs. As fibras obtidas apresentam um diâmetro de 0,4 µm, adequado para *scaffolds* para ET e os testes de proliferação celular, com CHMLAC, indicam que as fibras são capazes de assegurar e promover a adesão e proliferação celular¹⁷.

Ainda em 2012, o trabalho de del Valle *et al.* tinha também como objetivo fabricar micro/nano fibras de PEAs de base AA por *electrospinning*. A PEA, constituída por alanina, 1,12-dodecanodiol e cloreto de sebacoílo, foi sintetizada por polimerização interfacial e o peso molecular do polímero obtido foi 19 000 g/mol. Foram utilizados diferentes solventes para dissolver entre 5 a 10 % de PEA e formar as fibras por *electrospinnig*, sendo que o 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (HFIP) apresentou os melhores resultados e por isso foi o solvente escolhido. Numa segunda fase do trabalho, a mesma equipa tentou incorporar agentes antimicrobianos nas fibras, nomeadamente nitrato de prata (AgNO₃) (entre 0,01 e 0,24 %) e clorohexidina (entre 0,35 e 4,25%). Os efeitos antimicrobianos das fibras foram testados pela avaliação da adesão e crescimento de bactérias como *E. coli* e *M. luteus* e os resultados mostraram que percentagens superiores a 0,05% de AgNO₃ e 1,2% de AgNO₃ de clorohexidina nas fibras inibem significativamente a atividade destes dois tipos de bactérias¹⁸.

As PEAs apresentam-se assim como uma excelente alternativa aos materiais convencionais utilizados no contexto biomédico, nomeadamente as de base natural como é o caso das de base α-aminoácido. As propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade são asseguradas e

Bio *Scaffolds* poliméricos para construção de estruturas celulares

as PEAs podem ser aplicadas sob a forma de fibras, filmes ou redes 3D em tecidos como a pele, tecido ósseo ou vascular.

Neste trabalho de dissertação de mestrado pretende-se sintetizar um conjunto de PEAs de base AA passíveis de serem aplicadas em ET e estudar a influência dos diferentes monómeros usados nas suas propriedades finais (termomecânicas e de degradação).

3 Parte Experimental

3.1 Materiais

O L-ácido láctico (80%) (L-LA), ácido sebácico (SA), di-etileno glicol (DEG) (99%), ácido *p*-toluenosulfónico monohidratado (*p*-TSA), glicina (> 99%), leucina (> 99%) cloreto de sebacoílo (92%), carbonato de sódio anidrido (Na₂CO₃), *N,N'*-dimetilformamida (DMF) (grau HPLC), clorofórmio, clorofórmio deuterado (CDCl₃, 99,8%), L-cisteína hidrocloreto, di-hidrogenofosfato de sódio (99,9%) e α -quimotripsina foram comprados à Sigma-Aldrich (St Louis, USA) e usados como recebidos. O diclorometano, tolueno, tetrahydrofurano (THF), isopropanol e acetato de etilo foram fornecidos por Fischer Chemical (United Kingdom). O dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) foi comprado à Eurisotop (França) e a acetona fornecida por José Manuel Gomes dos Santos Lda (Odivelas, Portugal). A PCL-OH (550 g/mol) foi gentilmente cedida pela Perstorp (Reino Unido), enquanto a papaína foi fornecida por Acros Organics (Bélgica). O ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) foi comprado à Panreac Quimica (Espanha) e o hidrogenofosfato di-sódio di-hidratado (99,5%) à Riedel-de Haen (Alemanha).

3.2 Procedimentos

3.2.1 Síntese dos oligómeros de L-LA com grupos hidroxilo (-OH) terminais (A)

Para sintetizar os oligómeros de L-LA com grupos -OH terminais (PLA-OH), o LA (1,33 mol) foi copolimerizado com DEG (0,217 mol). A polimerização decorreu durante 6 horas a 180 °C e à pressão atmosférica (Figura 11). Durante a reação foi mantido um fluxo contínuo de azoto. Os oligómeros foram dissolvidos em THF e precipitados em hexano. O excesso de solvente foi removido sob vácuo.

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

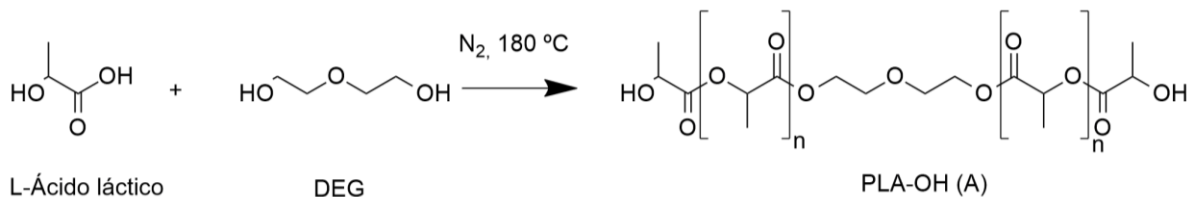


Figura 11 - Síntese de PLA-OH

3.2.2 Síntese de dicloretos de ácido a partir dos oligômeros de L-LA com grupos -OH terminais (B)

Os oligômeros de L-LA com grupos -OH terminais (PLA-OH) (6 mmol) foram dissolvidos em diclorometano (9 mL) e, com uma ampola de adição, adicionou-se gota a gota a solução de cloreto de sebacoílo (12 mmol) em diclorometano (9 mL), sob agitação a $50\text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 12). Terminada a adição, substituiu-se a ampola de adição por um condensador e uma torre de secagem. A reação decorreu durante 2 horas e a solução orgânica resultante foi usada diretamente na preparação de PEAs por polimerização interfacial.

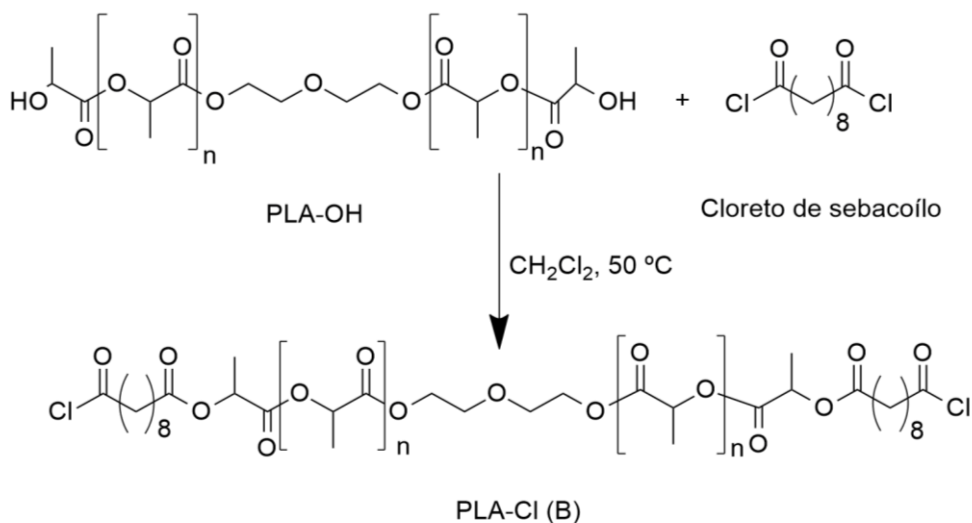


Figura 12 - Síntese de PLA-Cl

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

3.2.3 Síntese de dicloretos de ácido a partir de oligômeros de ϵ -CL com grupos -OH terminais (C)

Os oligômeros de ϵ -CL com grupos -OH terminais (PCL-OH) (6 mmol) foram dissolvidos em diclorometano (9 mL) e, com uma ampola de adição, adicionou-se gota a gota a solução de cloreto de sebacoílo (12 mmol) em diclorometano (9 mL), sob agitação a 50 °C (Figura 13). Terminada a adição, substituiu-se a ampola de adição por um condensador e uma torre de secagem. A reação decorreu durante 2 horas e a solução orgânica resultante foi usada diretamente na preparação de PEAs por polimerização interfacial.

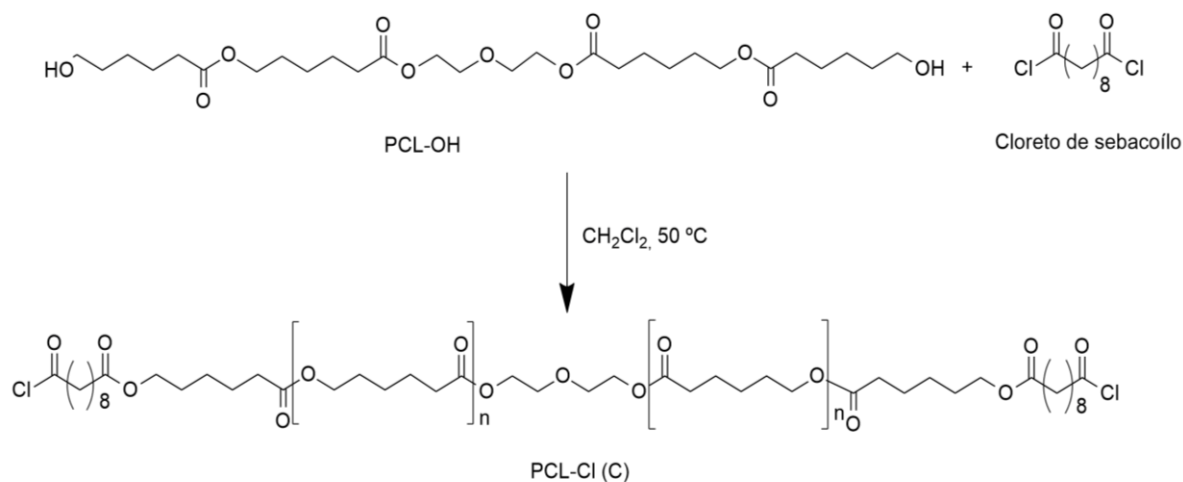


Figura 13 - Síntese de PCL-Cl

3.2.4 Síntese de ésteres de bis(α -amino ácidos) a partir de glicina ou L-leucina e DEG (D e E)

Uma suspensão de glicina ou L-leucina (55 mmol), DEG (25 mmol) e *p*-TSA (60 mmol), em tolueno, foi aquecida até 150 °C, com agitação, num balão de fundo redondo acoplado a uma Dean-Stark e um condensador com torre de secagem (Figura 14). A reação decorreu até a destilação de água cessar (cerca de 8 horas). O excesso de tolueno foi decantado e os produtos

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

foram purificados por recristalização. No caso da glicina o solvente usado foi o isopropanol, ao passo que no caso da L-leucina o solvente usado foi uma mistura de acetato de etilo/etanol.

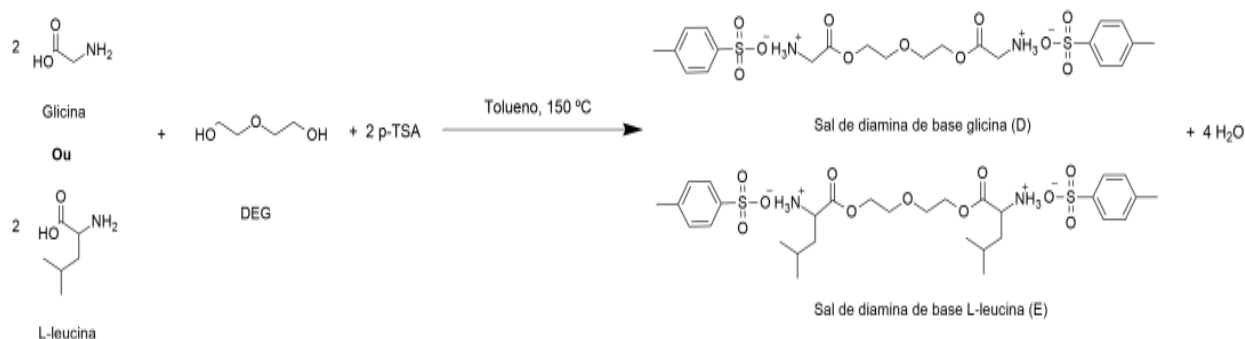


Figura 14 - Síntese da diamina de base AA

3.2.5 Síntese das PEAs de base α -amino ácido

1- Polimerização interfacial de (D) ou (E) com cloreto de sebacoílo

Uma solução de cloreto de sebacoílo (6 mmol) em diclorometano (18 mL) foi adicionada gota a gota, sob agitação mecânica, a uma solução aquosa (18 ml) de (D) ou (E) (6 mmol) e Na₂CO₃ (12 mmol), previamente preparada e colocada no reator em banho de gelo (Figura 15). Após a adição, a reação decorreu durante 2 horas à temperatura ambiente e o polímero formado foi recuperado por filtração, lavado com água destilada e seco sob vácuo, à temperatura ambiente.

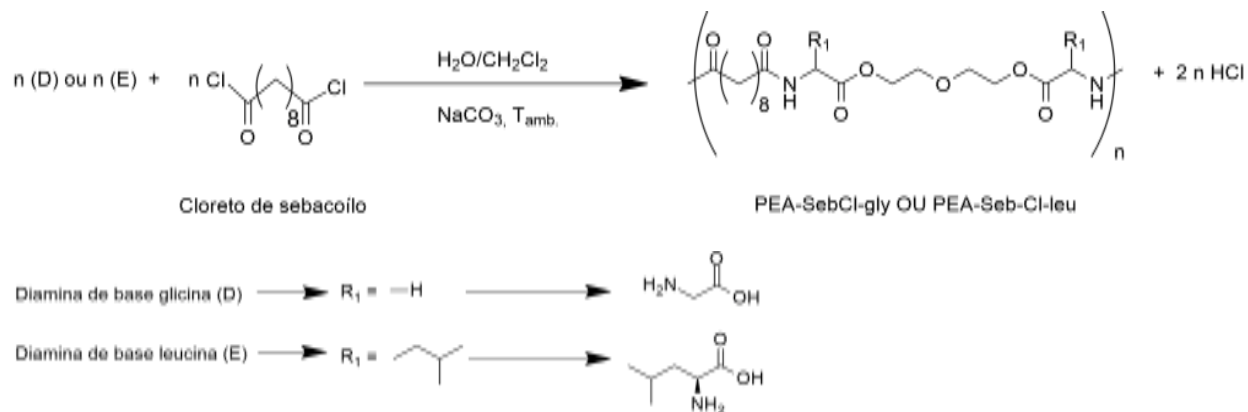


Figura 15 - Síntese de PEAs de base AA com cloreto de sebacoílo

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

2- Polimerização interfacial de (D) ou (E) com (B) ou (C)

O composto (D) ou (E) (6 mmol) foi dissolvido em água destilada (18 mL) e adicionou-se Na_2CO_3 (12 mmol). A solução resultante foi colocada num reator em banho de gelo e posteriormente, uma solução de (B) ou (C) foi adicionada gota a gota, sob agitação mecânica. A reação decorreu durante 2 horas, à temperatura ambiente (Figura 16 e Figura 17). O polímero precipitado foi recuperado por filtração, lavado com água destilada e seco sob vácuo, à temperatura ambiente.

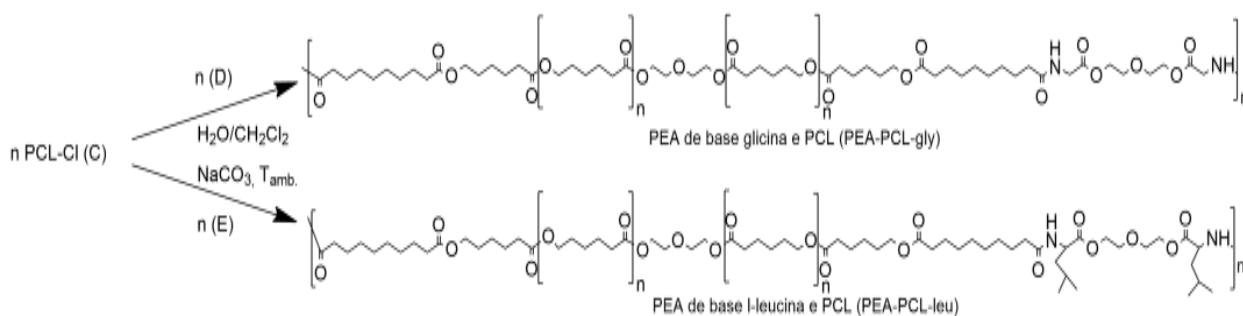


Figura 16 - Síntese de PEA de base glicina ou l-leucina e PCL

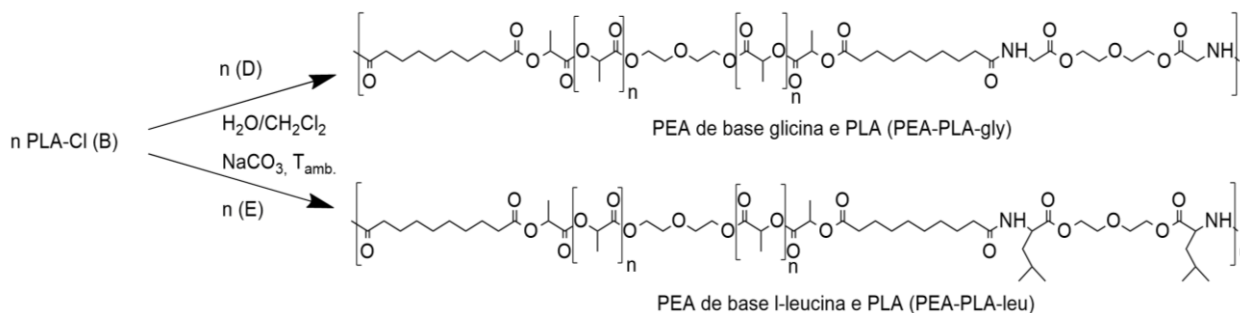


Figura 17 - Síntese de PEA de base glicina ou l-leucina e PLA

Na Figura 18 é apresentada a estratégia global do trabalho e os monómeros e reações que permitiram obter as novas PEAs de base AA.

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

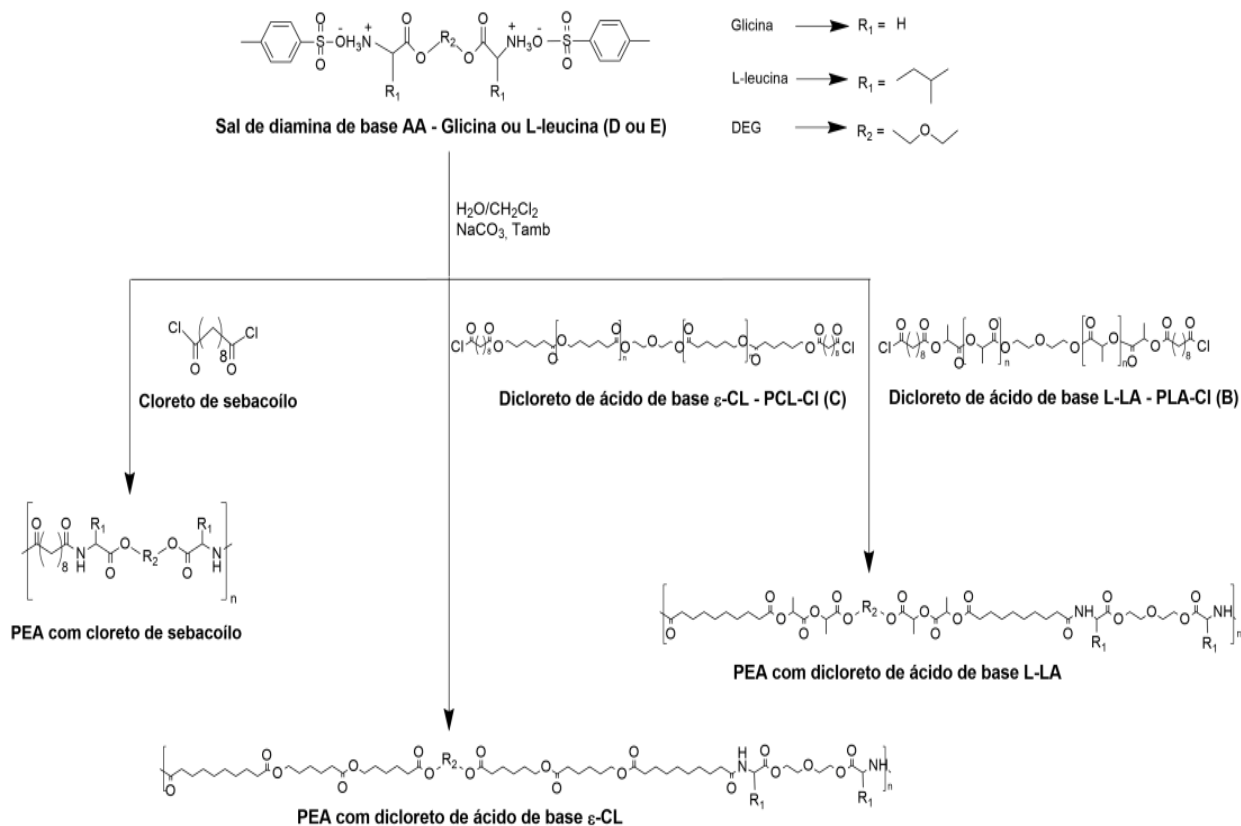


Figura 18 - Reações de síntese dos 3 tipos de PEAs de base AA

3.3 Técnicas de caracterização

3.3.1 Identificação da estrutura química

Os espectros de FTIR das diferentes amostras foram obtidos à temperatura ambiente utilizando um espectrômetro Jasco FT/IR-4200 em modo ATR. Os espectros foram obtidos numa gama espectral de 4000 a 500 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} e 64 acumulações.

Os espectros de RMN de próton dos ésteres de bis(α -aminoácido), oligômeros de L-LA, de ϵ -CL e PEAs foram obtidos num espectrômetro Bruker Avance III 400 MHz, com uma sonda de detecção tripla TIX 5mm. O DMSO- d_6 foi usado como solvente.

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

3.3.2 Propriedades térmicas e mecânicas

A estabilidade térmica das amostras foi avaliada por análise termogravimétrica (TGA) usando o equipamento *TA Instruments* Q500. A análise decorreu entre os 25 °C e os 600 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, em atmosfera inerte de azoto.

O comportamento térmico das amostras antes da degradação foi avaliado por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) usando o equipamento *TA Instruments* Q100, equipado com uma unidade de arrefecimento RSC90. As amostras foram sujeitas a um primeiro ciclo de aquecimento de 25 °C a 200 °C, a 10 °C/min, para eliminar a história térmica da amostra. De seguida, as amostras foram arrefecidas até -80 °C e aquecidas novamente até 200 °C, a 10 °C/min. A análise decorreu sob atmosfera de azoto (50 mL min⁻¹), tendo sido utilizadas massas de amostras entre 5 e 10 mg.

A análise dinâmica termomecânica (DMTA) foi realizada num equipamento Tritec2000DMA. As amostras foram colocadas em 'pockets' de aço inoxidável e analisadas no modo de *single cantilever*. Os testes foram realizados de -150 °C até 200 °C, em modo multifrequência, com uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

3.3.3 Degradação hidrolítica *in vitro*

Os testes de degradação hidrolítica *in vitro* foram realizados numa solução de tampão fosfato (PBS) (pH=7.4, 0.01 M), a 37 °C, durante 40 dias. Cerca de 20 mg de PEAs, previamente secas, foram imersas em 5 mL de PBS e incubadas a 37 °C. Em tempos predefinidos, o PBS foi removido e a amostra lavada com água destilada. De seguida, a amostra foi seca sob vácuo, até não se observar alteração na sua massa. O grau de degradação foi estimado pela percentagem de perda de massa das PEAs de acordo com a equação (1):

$$\text{Perda de massa}_{(\%)} = \frac{W_0 - W_d}{W_0} \quad (1)$$

Onde W_0 representa a massa inicial das amostras antes da imersão em PBS e W_d a massa das amostras de PEAs secas após d dias de incubação. Foram efetuadas duas medições em cada tempo predeterminado, para cada PEA.

3.3.4 Degradação enzimática *in vitro*

Os testes de degradação enzimática *in vitro*, foram realizados a 37 °C, durante 6 dias. Para as PEAs de base glicina foi preparada uma solução tampão de fosfato de sódio (pH=6, 0.1 M). Posteriormente, no dia de início dos testes, foi preparado o meio com a enzima papaína (0,5 mg/mL) em 250 mL da solução preparada anteriormente. Ao meio contendo papaína foram ainda adicionados a L-cisteína (5,6 mM) e o ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) (1,1 mM) para promover a ativação da enzima.

Para as PEAs de base leucina utilizou-se PBS (pH=7.4, 0.01 M) e a enzima α -quimotripsina (0,1 mg/mL).

Cerca de 20 mg de PEAs, previamente secas, foram imersas em 5 mL da solução e incubadas a 37 °C. Em tempos predefinidos, o meio foi removido e a amostra lavada com água destilada. O meio de todas as amostras foi mudado a cada 48 horas durante os 6 dias de teste para garantir a atividade das enzimas envolvidas na degradação das PEAs. Posteriormente, a amostra foi seca sob vácuo, até não se observar alteração na sua massa. Foram efetuadas duas medições em cada tempo predeterminado, para cada PEA. O grau de degradação foi estimado pela percentagem de perda de massa das PEAs de acordo com a equação (1).

4 Resultados e Discussão

4.1 Síntese e caracterização das PEAs

Todas as PEAs foram sintetizadas por polimerização interfacial e a escolha deste método justifica-se pelas vantagens anteriormente referidas relativamente à policondensação na massa e em solução, nomeadamente o tempo e as condições da reação. A reação ocorre à temperatura ambiente e permite obter PEAs em poucas horas de reação (p.e., 2 horas).

Foram preparadas diferentes PEAs com o intuito de estabelecer as relações entre a estrutura e as propriedades físico-químicas e de degradação. Utilizaram-se como reagentes dois α -aminoácidos, a glicina e a L-leucina, um dicloreto de ácido convencional, o cloreto de sebacoílo e dois dicloretos de ácidos derivados de oligómeros de base poliéster (oligómeros de L-LA – PLA-OH e oligómeros de ϵ -CL – PCL-OH). A glicina e a L-leucina foram os α -aminoácidos selecionados na medida em que apresentam estruturas químicas bastante distintas, o que permitirá conferir diferentes propriedades às PEAs. No caso da L-leucina, este AA apresenta um grupo pendente volumoso que pode introduzir alterações nas propriedades físicas, químicas e de degradação das PEAs. Optou-se por usar o cloreto de sebacoílo por se tratar de um dicloreto de ácido de cadeia alifática longa, o que lhe confere uma menor propensão para hidrolisar, característica muito importante para poder ser utilizado em reações de polimerização interfacial. Para além disso, um polímero que contenha este monómero na estrutura, ao degradar, irá libertar ácido sebácico que é endógeno ao corpo humano. Os oligómeros de base poliéster, necessários depois à preparação dos novos dicloretos de ácido, foram escolhidos uma vez que se sabe que as ligações éster são sensíveis à hidrólise. Acresce ainda o facto de polímeros de base L-LA e ϵ -CL serem bastante usados em aplicações biomédicas.

No anexo A é possível observar o espectro de ^1H RMN das diaminas de base glicina e L-leucina e comprovar a sua estrutura química.

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

4.1.1 Identificação da estrutura química dos oligómeros de base L-LA e oligómeros de base ϵ -CL, com grupos -OH terminais

A síntese dos oligómeros de L-LA com grupos hidroxilo terminais foi feita a partir da reação do L-LA com DEG (Figura 11). O diol reage com uma molécula de L-LA ou com uma pequena cadeia oligomérica, fazendo com que o material final apresente maioritariamente grupos -OH terminais^{19, 20}. O oligómero de ϵ -CL (550 g/mol) é um composto comercial e foi adquirido à Perstorp.

O espectro de FTIR dos oligómeros de L-LA e dos oligómeros de ϵ -CL com grupos -OH terminais (Figura 19) mostra as bandas correspondentes aos grupos hidroxilo terminais, bem como às ligações éster e éter.

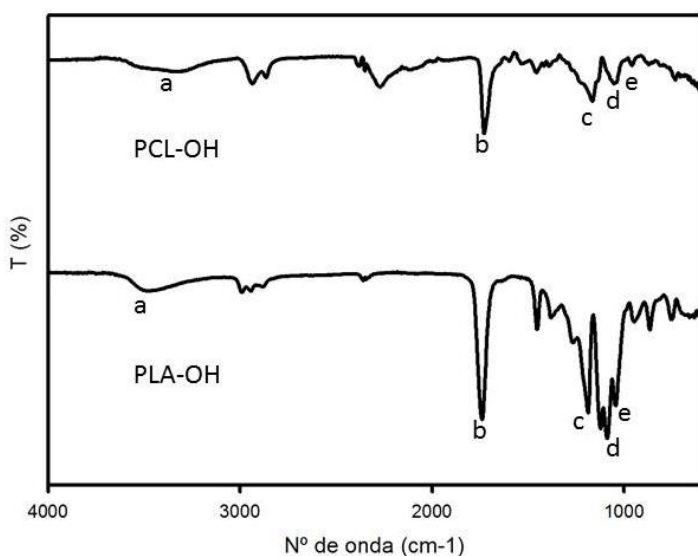


Figura 19 - Espectro de FTIR dos oligómeros de L-LA com grupos -OH terminais e de ϵ -CL com grupos -OH terminais

Na Tabela 3 são atribuídos os números de onda correspondentes às bandas observadas na Figura 19. Tabela 3 - Nº de onda associado aos grupos característicos do PLA-OH e PCL-OH

Oligoéster	Nº de onda (cm ⁻¹)				
	U _{O-H} (a)	U _{C=Oéster} (b)	U _{C-O-Cséster} (c)	U _{C-O-Caséster} (d)	U _{C-O-Caséster} (e)
PLA-OH	3473	1740	1188	1122	1084
PCL-OH	3338	1726	1168	1042	957

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

Os espectros de ^1H RMN permitiram identificar as unidades centrais e os grupos hidroxilo terminais nos oligômeros de L-LA e de ϵ -CL. (Figura 20).

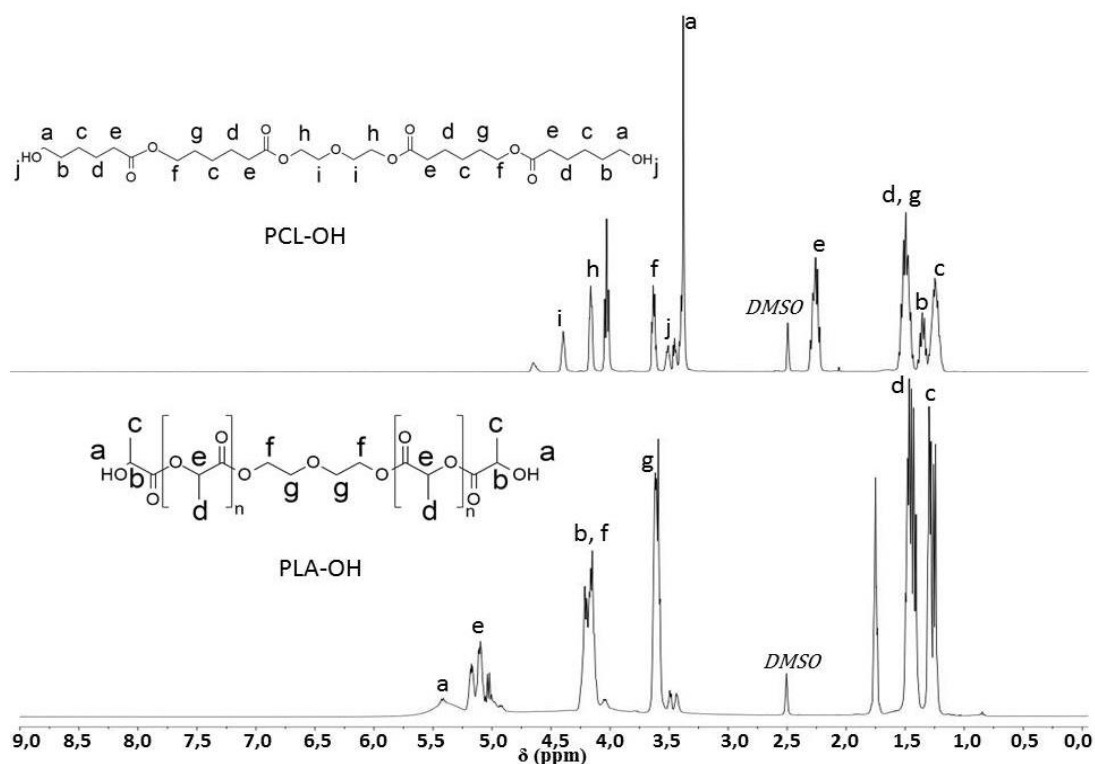


Figura 20 - Espectro de ^1H RMN dos oligômeros de L-LA com grupos $-\text{OH}$ terminais e de ϵ -CL com grupos $-\text{OH}$ terminais

Através dos espectros apresentados na Figura 20 é possível verificar que estes estão de acordo com a estrutura química esperada.

O peso molecular dos oligômeros de L-LA com grupos hidroxilo terminais (PLA-OH) foi estimado por ^1H RMN, utilizando as ressonâncias (c) e (d), em 640 g/mol.

Também foi realizada a análise térmica dos oligômeros de base L-LA e de base ϵ -CL, por TGA, estando as curvas termoanalíticas representadas no Anexo B. Verificou-se que os oligômeros de ϵ -CL são mais estáveis termicamente do que os de L-LA, com grupos hidroxilo terminais.

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

4.1.2 Identificação da estrutura química das PEAs

As PEAs foram sintetizadas por polimerização interfacial da diamina de base AA com cloreto de sebacoílo (Figura 15), com PCL-Cl (Figura 16) e com PLA-Cl (Figura 17).

No espectro de FTIR das PEAs de base glicina ou L-leucina (Figura 21) é possível identificar claramente as bandas correspondentes à ligação éster e à ligação amida, indicando que as reações foram bem sucedidas. Os respectivos números de onda são apresentados na Tabela 4.

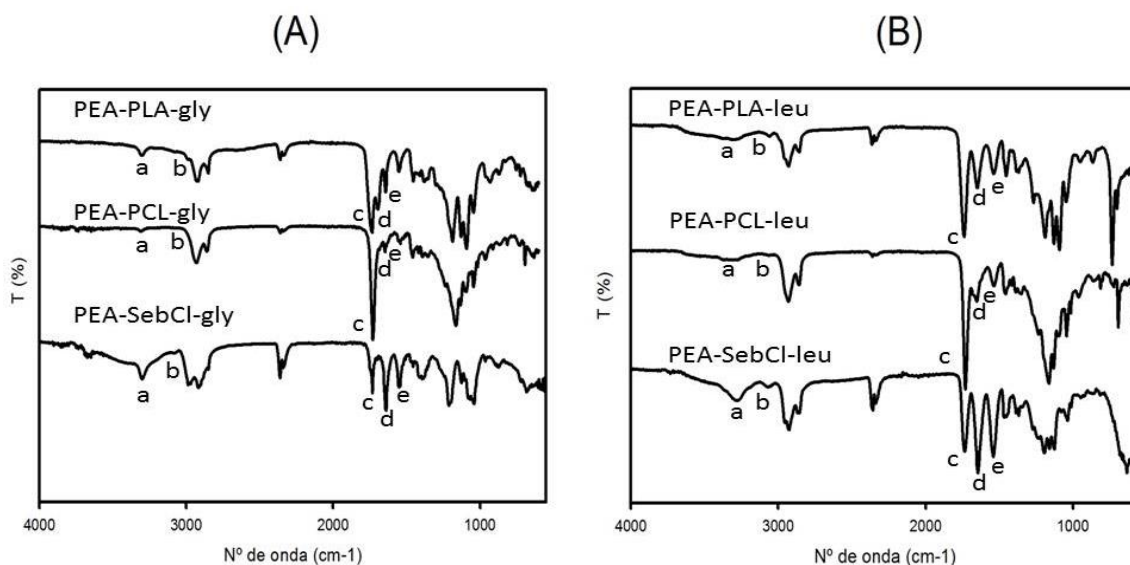


Figura 21 - Espectro de FTIR das PEAs de base glicina (A) e de base L-leucina (B) com cloreto de sebacoílo, com PCL e com PLA

Tabela 4 - Nº de onda correspondentes às ligações características das PEAs

PEA	Nº de onda (cm ⁻¹)				
	Amida A (ν_{N-H}) (a)	Amida B (b)	Éster ($\nu_{C=O}$) (c)	Amida I ($\nu_{C=O}$) (d)	Amida II (δ_{N-H} e $\nu_{C=O}$) (e)
PEA-SebCl-gly	3300	3079	1730	1640	1548
PEA-SebCl-leu	3279	3067	1735	1644	1538
PEA-PCL-gly	3309	3071	1728	1644	1545
PEA-PCL-leu	3291	3068	1729	1654	1535
PEA-PLA-gly	3301	3079	1736	1641	1551
PEA-PLA-leu	3290	3061	1738	1648	1539

Nas Figuras 22 e 23 apresentam-se os espectros de ¹H RMN das PEAs sintetizadas.

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

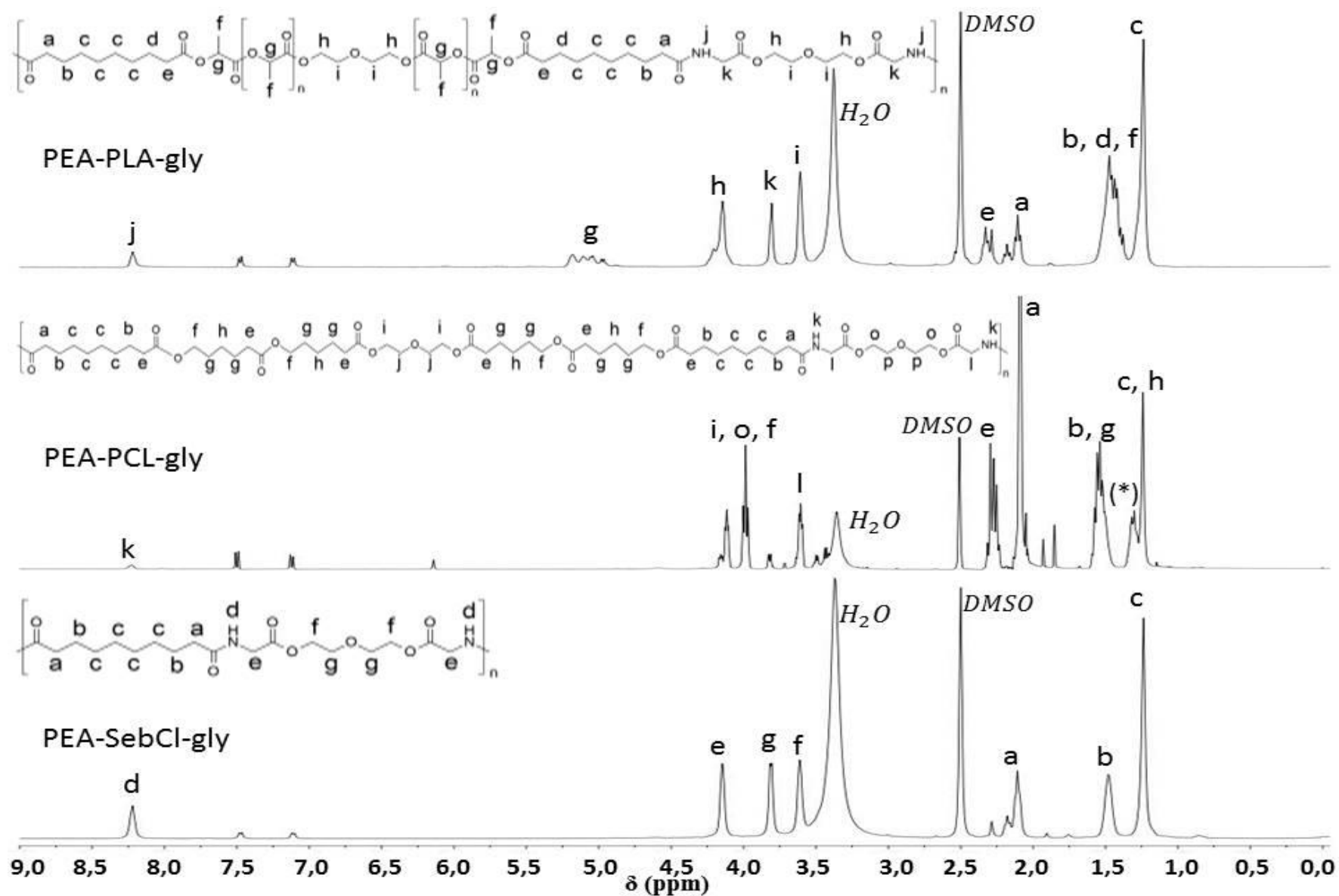


Figura 22 - Espectro de ^1H RMN das PEAs de base glicina

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

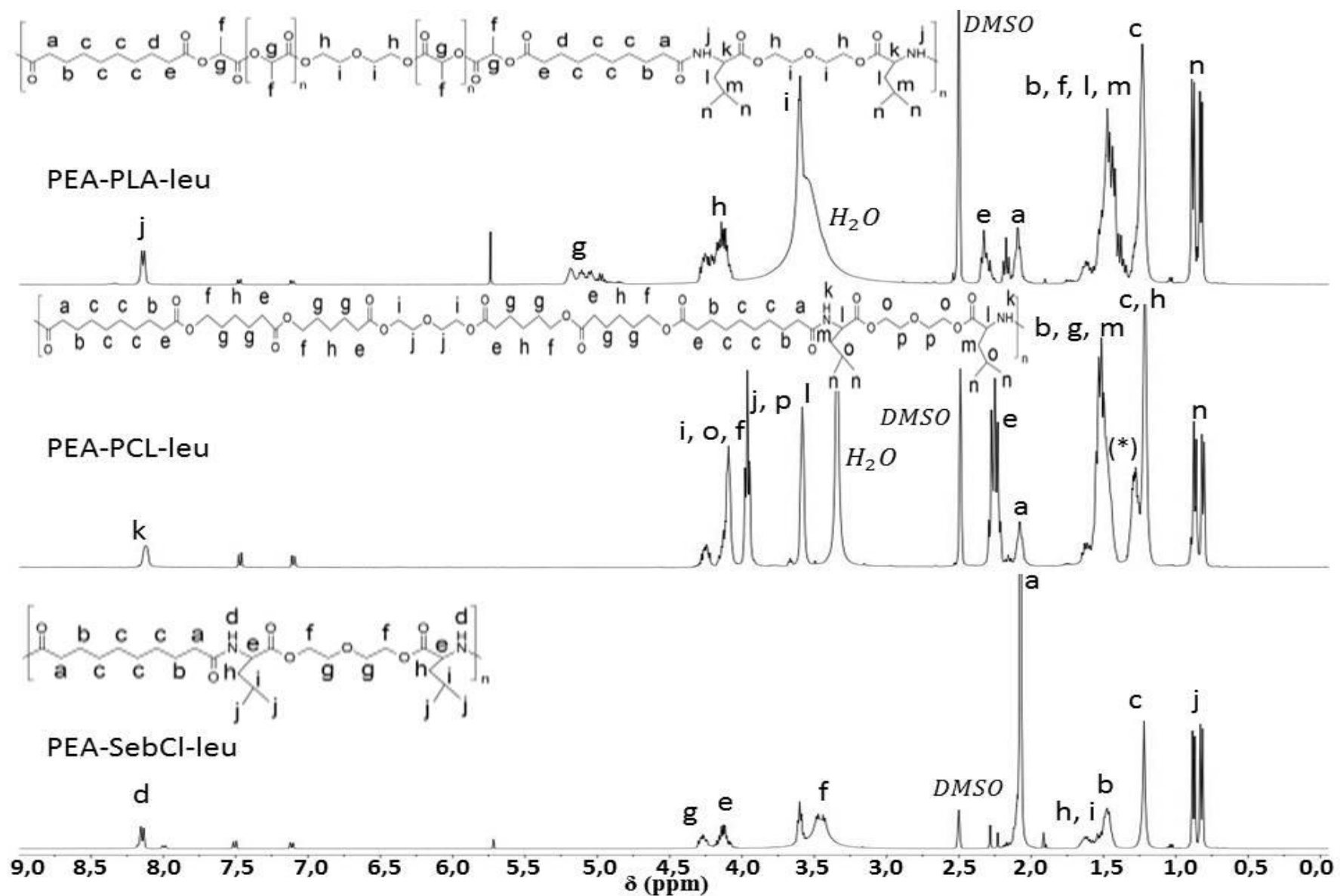


Figura 23 - Espectro de ^1H RMN das PEAs de base L-leucina

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

Em todos os espectros de ^1H RMN das PEAs apresentados na Figura 22 e na Figura 23, é visível uma ressonância entre 8,15 e 8,3 ppm correspondente ao próton da ligação amida (-NH) (**j**, **k** ou **d**).

Nos espectros da PEA-SebCl-gly e PEA-SebCl-leu é possível identificar as ressonâncias correspondentes aos prótons dos AA (**e** para a glicina e **e**, **h**, **i**, **j** para a L-leucina) usados e também as ressonâncias correspondentes aos prótons da unidade de cloreto de sebacoílo (**a**, **b**, **c**).

Nos espectros de ^1H RMN da PEA-PLA-gly (Figura 22) e PEA-PLA-leu (Figura 23), na gama dos 5,4-4,9 ppm encontra-se a ressonância correspondente aos prótons do grupo -CH das unidades oligoméricas de L-LA (**g**). A 4,3-4,2 ppm é possível identificar a ressonância dos prótons dos grupos -CH₂ do DEG que se encontram ligados à cadeia oligomérica de L-LA (**h**). Relativamente às ressonâncias dos grupos -CH₂ mais externos do cloreto de sebacoílo, verifica-se a existência de duas ressonâncias distintas, o que se justifica pelo facto de estes prótons estarem em ambientes químicos distintos. De um lado estão ligados a um grupo éster (**e**) e do outro estão ligados a um grupo amida (**a**). De notar a ausência da ressonância pertencente aos grupos -CH₃ terminais das unidades oligoméricas de L-LA (ver espectro representado na Figura 20) nos espectros das PEAs, indicando que estas unidades foram totalmente incorporadas.

No que concerne à PEA-PCL-gly e PEA-PCL-leu, é possível identificar as ressonâncias correspondentes aos grupos -CH₂ da PCL, e também aos grupos característicos dos AA usados. De salientar que, no caso destas PEAs, a ressonância dos grupos -CH₂ do cloreto de sebacoílo ligados ao grupo amida (**a**) se encontra sobreposta com a ressonância correspondente aos grupos -CH₂ das unidades oligoméricas de ϵ -CL (**f**). De notar também, a existência da ressonância (*) que pertence aos grupos -CH₂ terminais da PCL-OH (ver espectro representado na Figura 20), o que indica uma parte da PCL-OH não foi incorporada nas PEAs.

A partir do ^1H RMN foi ainda possível estimar a contribuição molar de oligómeros de L-LA e ϵ -CL na estrutura final das PEAs. Para tal, usaram-se os integrais das ressonâncias (**g**) e (**i**) para a PEA-PLA-gly e (**g**) e (**n**) para a PEA-PLA-leu, tendo sido obtidas percentagens molares de oligómeros de L-LA de cerca de 69% e 70%, respetivamente.

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

No caso das PEA-PCL-gly e PEA-PCL-leu utilizaram-se os integrais das ressonâncias (i, o, f) e (k). De salientar que no integral das ressonâncias (i, o, f) foi retirada a contribuição do sinal (o). As contribuições molares de oligómeros de ϵ -CL obtidas foram de cerca de 31% para a PEA-PCL-gly e 55% para a PEA-PCL-leu.

Relativamente às reações de síntese dos 6 tipos de PEAs de base glicina ou L-leucina, com cloreto de sebacoílo ou segmentos de oligoéster de base L-LA ou ϵ -CL, foram bem sucedidas tendo sido obtidos rendimentos entre 73 e 84 %, apresentados em mais detalhe na tabela 5.

Tabela 5 - Rendimentos obtidos para as reações de síntese das PEAs

PEAs	Rendimento (%)
PEA-SebCl-gly	84
PEA-SebCl-leu	81
PEA-PCL-gly	75
PEA-PCL-leu	73
PEA-PLA-gly	78
PEA-PLA-leu	80

Uma outra característica relevante para estes materiais é o seu peso molecular. No caso das PEAs em estudo não foi possível fazer esta determinação por cromatografia de exclusão molecular devido à insolubilidade das amostras nos solventes comumente usados para este tipo de determinação (clorofórmio, *N,N'*-dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF), dimetilsulfóxido (DMSO)). Tentou-se ainda fazer a determinação dos pesos moleculares das amostras através de espectroscopia de massa no entanto, também esta via se revelou infrutífera na medida em que nem para as PEAs mais simples (PEA-SebCl-gly e PEA-SebCl-leu) foi possível chegar a alguma conclusão. A análise foi corrida em diferentes solventes mas em nenhum dos resultados foi possível detetar o peso molecular da unidade de repetição (386,44 g/mol para a PEA-SebCl-gly e 496,65 g/mol para a PEA-SebCl-leu). Por exemplo, para a PEA-SebCl-gly havia um decréscimo de 4 unidades na unidade de repetição, ao passo que para a

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

PEA-SebCl-leu havia um decréscimo de 3 unidades na unidade de repetição (ver espectros de massa no Anexo C).

4.2 Propriedades térmicas das PEAs

A estabilidade térmica das PEAs foi avaliada por TGA, na gama de temperaturas de 25-600 °C, em atmosfera inerte de azoto. As curvas termoanalíticas são apresentadas na Figura 23.

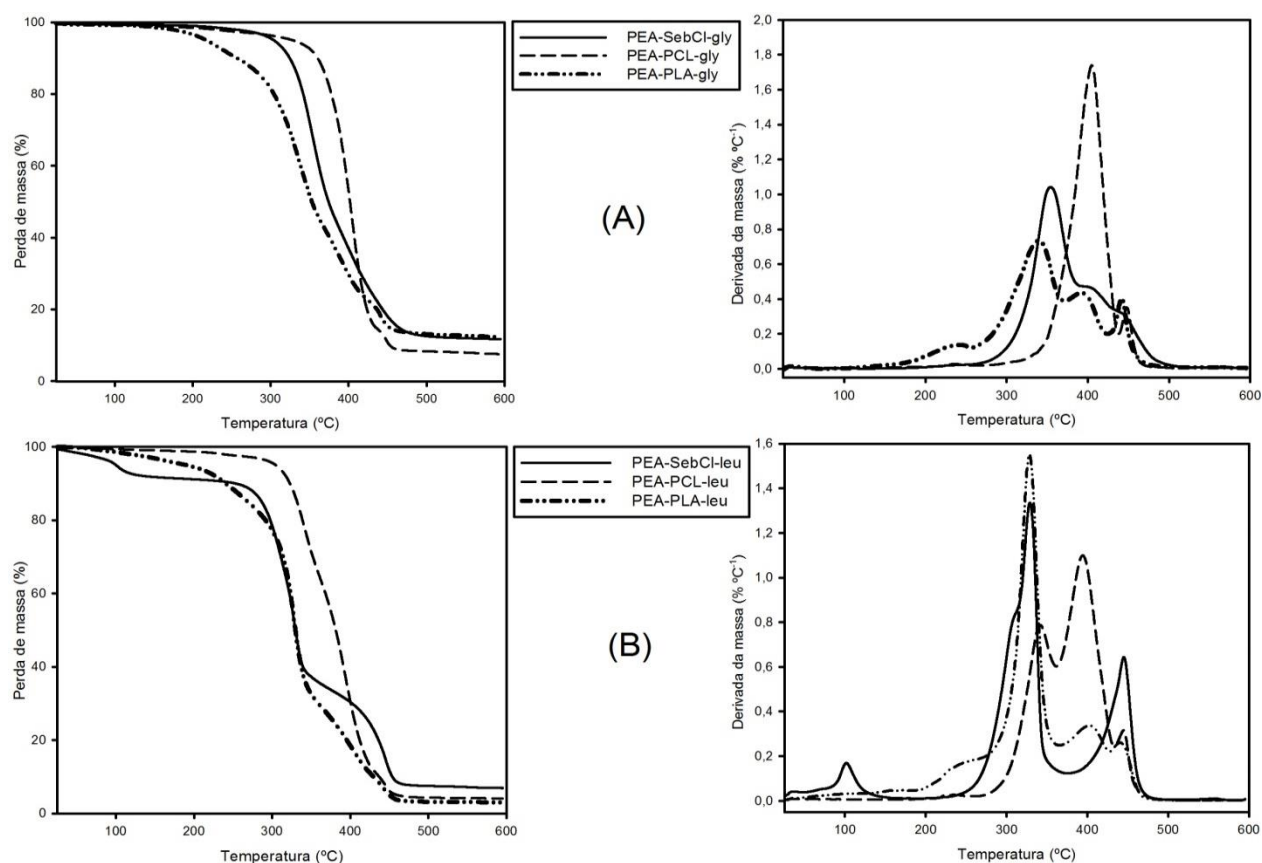


Figura 24 – TG (esquerda) e DTG (direita) das PEAs de base glicina (A) e L-leucina (B)

Dados da literatura indicam que, tipicamente, as PEAs degradam em dois estágios, sendo um correspondente à degradação das ligações éster e o outro correspondente à degradação das ligações amida^{11, 21}. Observando as curvas termoanalíticas representadas na Figura 24, é possível verificar que algumas das PEAs sintetizadas neste trabalho apresentam mais que dois estágios de perda de massa. A PEA-PLA-gly e a PEA-PLA-leu apresentam um ombro entre 200-

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

300 °C, que poderá dever-se à degradação das cadeias poliméricas com peso molecular muito baixo^{11, 21}. Na PEA-SebCl-leu é possível observar uma perda de massa perto dos 100 °C que poderá dever-se à evaporação de água residual na amostra. O facto de apenas esta PEA apresentar esta perda de massa inicial pode estar relacionado com a sua consistência pastosa, que impede a completa secagem da amostra.

Na Tabela 6 são apresentadas as temperaturas obtidas a partir das curvas termoanalíticas da Figura 24.

Tabela 6 - Temperaturas características obtidas por TGA. $T_{5\%}$: temperatura correspondente a 5% da perda de massa (TG); $T_{10\%}$: temperatura correspondente a 10% da perda de massa (TG); T_p : temperatura de pico (DTG)

PEA	$T_{5\%}/^{\circ}\text{C}$	$T_{10\%}/^{\circ}\text{C}$	$T_{p1}/^{\circ}\text{C}$	$T_{p2}/^{\circ}\text{C}$	$T_{p3}/^{\circ}\text{C}$
PEA-SebCl-gly	303,7	324,2	353,6	407,5	444,3
PEA-SebCl-leu	250,2 (*)	286,6 (*)	328,6	444,9	-----
PEA-PCL-gly	327,6	404,6	404,6	447,8	-----
PEA-PCL-leu	304,5	322,4	341,7	393,9	444,9
PEA-PLA-gly	217,3	255,4	339,4	392,7	441,5
PEA-PLA-leu	191,0	240,6	328,0	402,9	440,9

(*) Nesta PEA a perda de massa inicial é atribuída à evaporação do solvente devido à dificuldade de secar completamente a amostra pela sua consistência pastosa e, por este motivo, não é considerada para calcular as temperaturas $T_{5\%}$ e $T_{10\%}$.

Os resultados da Tabela 6 indicam que as PEAs de base glicina são termicamente mais estáveis que as PEAs de base L-leucina, uma vez que apresentam valores de $T_{5\%}$ e $T_{10\%}$ mais elevados. De salientar que, quer a introdução das cadeias oligoméricas de L-LA, quer a introdução das cadeias oligoméricas de ϵ -CL, não compromete a estabilidade térmica das PEAs. De um modo geral, as PEAs com as cadeias oligoméricas de ϵ -CL apresentam melhor estabilidade térmica do que aquelas que contêm as cadeias oligoméricas de L-LA. Este resultado pode estar relacionado com o facto de na PEA-PLA-gly e PEA-PLA-leu haver mais grupos éster, devido à contribuição de L-LA ser superior à de ϵ -CL nas PEAs, que se sabe que são menos estáveis que os grupos amida²².

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

Os eventos térmicos que ocorrem abaixo da temperatura de degradação das PEAs foram estudados por DSC e DMTA. As curvas de fluxo de calor estão representadas na Figura 25 e no Anexo D é possível observar os termogramas obtidos na análise de DMTA. Na Tabela 7 são apresentadas a temperatura de fusão (T_f) e temperatura de cristalização a frio (T_{cc}) obtidas por DSC, assim como os valores de T_g obtidos por DMTA.

A Figura 25 representa as curvas de fluxo de calor obtidas para as PEAs, sendo que a curva representada corresponde ao segundo ciclo de aquecimento.

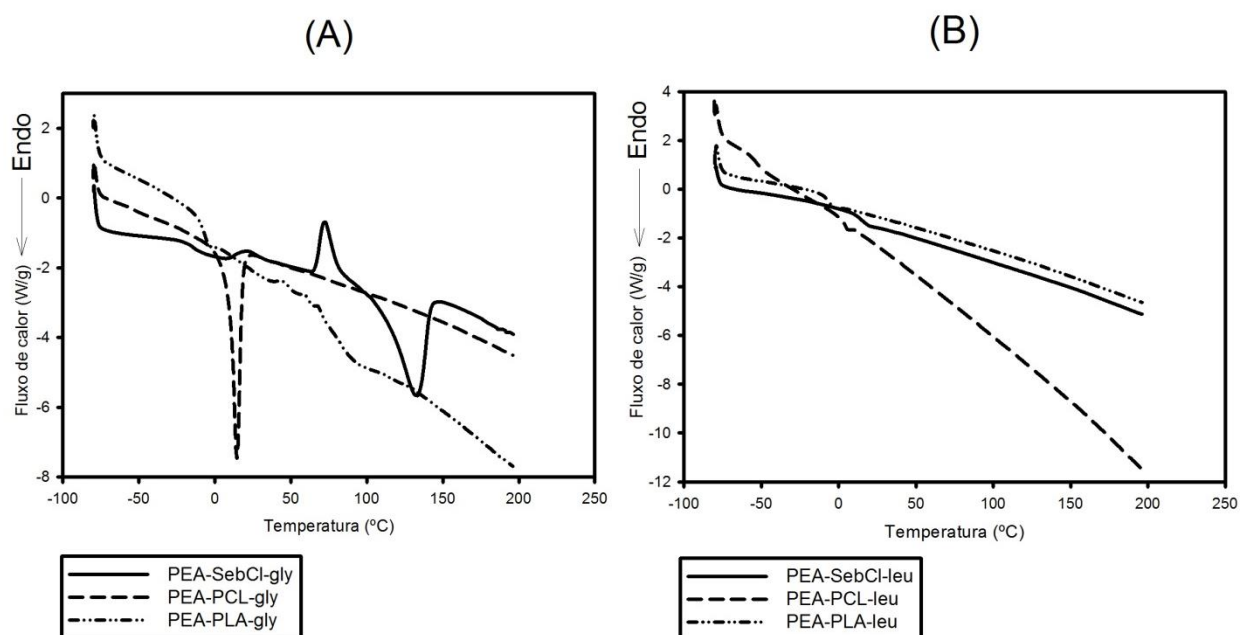


Figura 25 - DSC das PEAs de base glicina (A) e L-leucina (B)

Tabela 7 - Temperaturas de interesse obtidas por DSC e DMTA. T_{cc} : 'cold cristalization temperature'; T_g : temperatura de transição vítrea; T_f : temperatura de fusão

PEA	$T_g^{(*)}$ (°C)	T_{cc} (°C)	T_f (°C)
PEA-SebCl-gly	49,5	72,3	132,15
PEA-SebCl-leu	27,8	-----	-----
PEA-PCL-gly	-19,6	-8,1	14,6
PEA-PCL-leu	-36,3	-----	-----
PEA-PLA-gly	10,6	-----	96
PEA-PLA-leu	8,6	-----	-----

(*) T_g determinada pelo pico da Tan δ a 1Hz.

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

Através da Figura 25 é possível verificar que as PEAs de base L-Leucina têm uma natureza amorfa, uma vez que não apresentam qualquer transição na curva de fluxo de calor. Este resultado deve-se ao facto destas PEAs possuírem um grupo lateral muito volumoso, o que impede/dificulta que ocorra a cristalização do material^{15,23-25}.

Nas PEAs de base glicina é possível observar algumas transições. Na PEA-SebCl-gly observam-se duas transições, uma a cerca de 132,15 °C (Tabela 7) que corresponde à fusão e outra a cerca 72,3 °C (Tabela 7) que corresponde à designada temperatura de cristalização a frio (*'cold crystallization temperature'*). Tipicamente, esta transição aparece quando as amostras são arrefecidas a uma velocidade tal que os domínios amorfos das amostras não têm tempo suficiente para se organizarem no ciclo de arrefecimento, fazendo isso no ciclo de aquecimento subsequente²⁶. O mesmo comportamento já foi observado para outras PEAs^{27, 28}. Na PEA-PCL-gly observa-se um pico endotérmico a 14,6 °C (Tabela 7), que corresponderá à fusão. Na PEA-PLA-gly é observável uma transição endotérmica a cerca de 96 °C (Tabela 7), que pode ser atribuída à fusão. O pico apresenta-se algo largo o que sugere a coexistência de diferentes populações de cristais, que fundem a temperaturas diferentes.

Relativamente à T_g , é possível observar que as PEAs de base L-leucina (PEA-SebCl-leu, PEA-PCL-leu e PEA-PLA-leu) têm uma T_g mais baixa que as de base glicina (PEA-SebCl-gly, PEA-PCL-gly e PEA-PLA-gly). Este resultado pode ser devido ao facto do grupo lateral da L-leucina ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) ser bastante volumoso, aumentando o volume livre entre as cadeias poliméricas, o que contribui para uma redução da T_g . Verifica-se ainda que as PEAs obtidas a partir dos dicloretos de ácido derivados dos oligómeros de L-LA ou dos oligómeros ϵ -CL apresentam T_g significativamente mais baixas do que aquelas obtidas a partir do cloreto sebacoílo. Este facto sugere que as cadeias oligoméricas de L-LA ou de ϵ -CL atuam como plastificantes nas PEAs²¹. De notar ainda, o facto das PEAs que contêm os oligómeros de ϵ -CL (PEA-PCL-gly e PEA-PLC-leu) na sua estrutura terem uma T_g mais baixa do que as que contêm na sua constituição os oligómeros de L-LA (PEA-PLA-gly e PEA-PLA-leu). Tal resultado pode ser justificado pelo facto de a PCL apresentar uma T_g mais baixa que o PLA⁶.

4.3 Degradação hidrolítica e enzimática *in vitro* das PEAs sintetizadas

Na Figura 26 são apresentados os perfis de perda de massa das PEAs em condições fisiológicas simuladas (PBS pH=7.4, 37 °C).

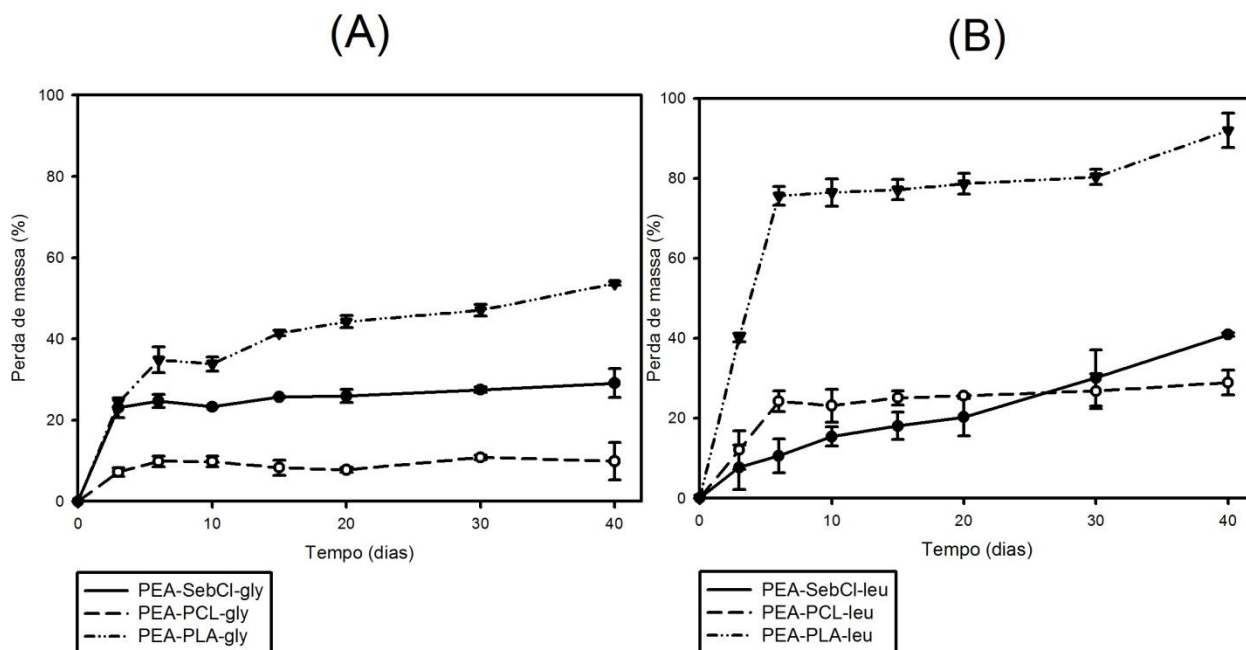


Figura 26 - Perfil de degradação hidrolítica das PEAs de base glicina (A) e L-leucina (B)

Ao observar os perfis de degradação hidrolítica das PEAs (Figura 26) verifica-se que, tanto na PEA-PLA-gly (de base glicina) como na PEA-PLA-leu (de base L-leucina), a incorporação de oligômeros de L-LA altera o comportamento de degradação da PEA, aumentando a percentagem de perda de massa para pelo menos o dobro em relação às PEAs sintetizadas apenas a partir da reação com cloreto de sebacoílo (PEA-SebCl-gly e PEA-SebCl-leu), no mesmo período de tempo (40 dias). A presença de ligações éster (do oligômero de L-LA), que são sensíveis a degradação por hidrólise, contribui significativamente para o aumento da percentagem de perda de massa observada nas PEAs sintetizadas com oligômeros de L-LA²⁷.

Por outro lado, os segmentos de PCL incorporados nas PEA-PCL-gly (de base glicina) e PEA-PCL-leu (de base L-leucina) também contribuem para a alteração do comportamento de degradação hidrolítica mas de forma contrária, registando-se uma diminuição da percentagem

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

de perda de massa no final do teste, comparativamente às PEAs sintetizadas apenas com cloreto de sebacoílo. A explicação para esta diminuição na perda de massa das PEAs pode estar no facto da incorporação de segmentos oligoméricos de ϵ -CL contribuir para um aumento da hidrofobicidade do polímero, dificultando a penetração do meio e consequentemente diminuindo as perdas de massa devido a mecanismos de degradação hidrolítica.

Na Figura 27 são apresentados os perfis de degradação das PEAs sob a ação de enzimas, tendo sido utilizada a papaína (0,5 mg/mL) para as PEAs de base glicina e a α -quimotripsina (0,1 mg/mL) para as PEAs de base L-leucina.

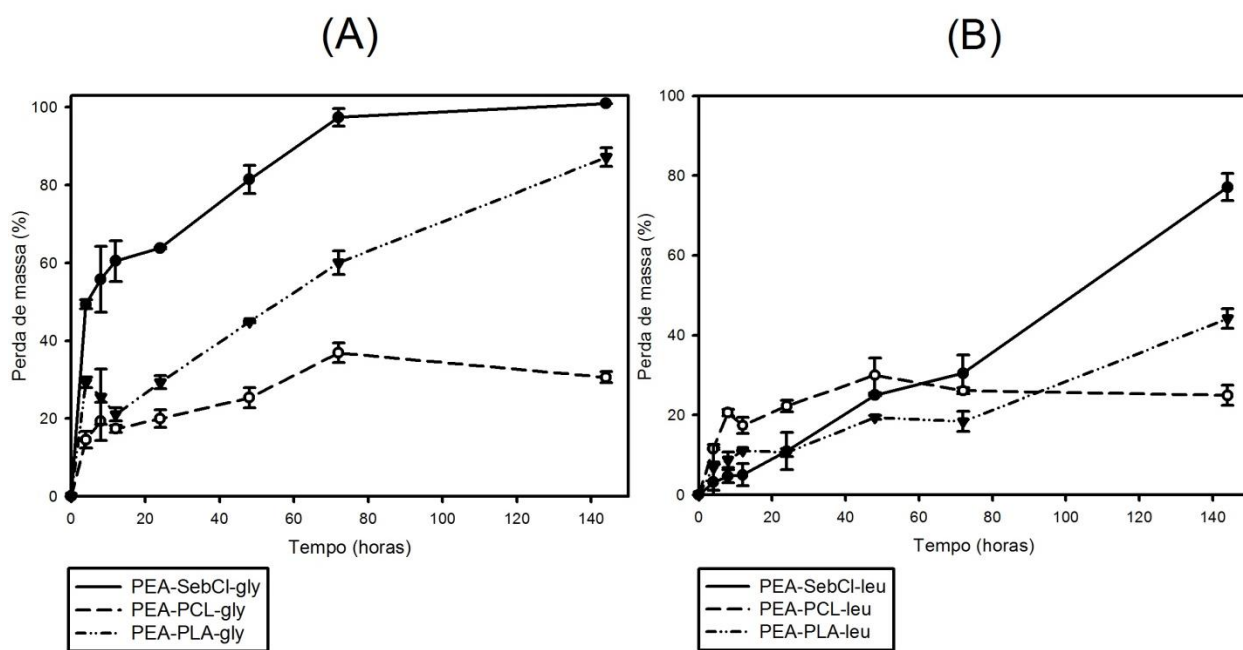


Figura 27 - Perfil de degradação enzimática das PEAs de base glicina (A) e L-leucina (B)

Relativamente aos resultados dos testes de degradação enzimática (Figura 27), é possível observar que as PEAs sintetizadas com cloreto de sebacoílo (PEA-SebCl-gly e PEA-SebCl-leu) são as que apresentam valores mais elevados de percentagem de perda de massa na presença de enzimas. As percentagens de perda de massa mais baixas verificadas para as PEAs contendo na sua estrutura oligómeros de L-LA (PEA-PLA-gly e PEA-PLA-leu) e de ϵ -CL (PEA-PCL-gly e PEA-PCL-leu) sugerem que os segmentos de base oligoéster não são sensíveis à ação das enzimas usadas,

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

traduzindo-se numa diminuição do valor da massa perdida. No que diz respeito às PEAs em que foram incorporados segmentos de base oligoéster, as que contêm segmentos de L-LA são mais sensíveis à degradação das enzimas do que as que têm oligómeros de ϵ -CL. De um modo geral, verifica-se que as PEAs de base glicina (ao fim dos 6 dias de teste) apresentam maiores valores de perda de massa do que as de base L-leucina. Este resultado pode dever-se ao facto da concentração de enzima usada para degradar as PEAs de base glicina (papaína) ser maior (0.5 mg/mL) que a usada no caso das de L-leucina (α -quimotripsina, 0.1 mg/mL).

Bio *Scaffolds* poliméricos para construção de estruturas celulares

5 Conclusão e perspetivas futuras

No decorrer deste trabalho foi possível sintetizar com sucesso um conjunto de PEAs com estruturas diferentes, tendo sido estabelecidas as relações estruturas/propriedades.

As estruturas das PEAs foram confirmadas por FTIR e ^1H RMN, tendo sido verificado por ^1H RMN que, no caso da PEA-PCL-gly e PEA-PCL-leu, houve uma parte dos oligómeros de ϵ -CL que não reagiu.

A análise de TGA revelou que as PEAs de base glicina são termicamente mais estáveis que as de base L-leucina e que a introdução dos segmentos oligoméricos de base poliéster não compromete a estabilidade térmica das amostras. As PEAs de base L-leucina demonstraram ter uma natureza amorfa, devido ao facto do grupo pendente volumoso do AA impedir que a cristalização ocorra, enquanto as amostras de base glicina têm uma natureza semi-cristalina, sendo a temperatura de fusão dependente da presença do oligómero de base poliéster e a da sua natureza.

Relativamente à T_g , verifica-se que as PEAs de base glicina têm T_g mais elevadas que as de base L-leucina, uma vez que as últimas, devido a possuírem um grupo pendente volumoso, têm um maior volume livre entre as cadeias poliméricas, aumentando a sua mobilidade. Verifica-se também que as PEAs preparadas a partir dos dicloretos de ácido derivados dos oligómeros de base ϵ -CL apresentam T_g mais baixa quando comparadas com as obtidas a partir dos oligómeros de L-LA. Este resultado é atribuído ao facto de, tipicamente, os polímeros de base ϵ -CL terem T_g mais baixa que os de base L-LA.

No que respeita à degradabilidade das amostras em meio fisiológico simulado, os resultados indicam que a introdução de oligómeros de base L-LA aumenta a degradação das PEAs em PBS (pH=7.4, 37 °C), ao passo que a incorporação de oligómeros de base ϵ -CL não se traduz num aumento da degradabilidade das amostras. Tal facto poderá dever-se ao aumento da hidrofobicidade da amostra, por introdução das cadeias oligoméricas de ϵ -CL, que diminui a

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

afinidade do meio de degradação para a amostra, traduzindo-se numa diminuição do valor da perda de massa.

A degradação em meio enzimático revelou que de facto as PEAs são sensíveis à presença de enzimas, tendo este efeito sido mais pronunciado nas PEA-SebCl-gly e PEA-SebCl-leu. Verificou-se ainda que a introdução das cadeias oligoméricas de L-LA e ϵ -CL torna as PEAs menos sensíveis à degradação enzimática.

Apesar de se terem obtido resultados interessantes ao nível das propriedades físicas, químicas e de degradação, não foi possível preparar com as PEAs sintetizadas algumas estruturas adequadas para o crescimento celular (p.e., membranas, malhas 3D). Ainda assim, estudos efetuados na última década evidenciam a capacidade destas estruturas de base PEA suportarem a adesão e proliferação de células, nomeadamente CHMLAC.

Por esse motivo, a título de trabalho futuro seria interessante explorar a aplicação da técnica de fotorreticulação para obter estruturas reticuladas de base PEA e que apresentassem propriedades mecânicas adequadas para o suporte e proliferação de células, com o objetivo de serem utilizadas em aplicações biomédicas. Para tal, podiam ser desenvolvidas PEAs com grupos terminais reativos (p.e., NH_2 ou COOH) passíveis de serem modificados com ligações duplas (p.e., com metacrilato de 2-isocianoetilo). Outra alternativa também interessante seria o desenvolvimento de PEAs a partir de AA trifuncionais (p.e., L-lisina) de modo a se obterem PEAs com grupos funcionais pendentos, que depois também pudessem ser modificados com ligações duplas.

Outra alternativa que poderia ser explorada seria a utilização destas PEAs como 'fillers' de outros polímeros comerciais (p.e., PLA, PCL, PLGA), passíveis de serem processados por extrusão ou moldagem por injeção. Desta maneira, conseguir-se-iam obter amostras que para além de serem sensíveis à degradação por via hidrolítica, seriam também degradáveis por ação de enzimas.

Após o desenvolvimento destes materiais, seria também muito importante a avaliação das suas propriedades, nomeadamente de degradação e de citotoxicidade, de modo a verificar se seriam potenciais candidatos à área biomédica.

6 Referências bibliográficas

1. L. S. Nair and C. T. Laurencin, in *Tissue Engineering I. Scaffolds systems for tissue engineering*, eds. T. Scheper, K. Lee and D. Kaplan, Springer, Heidelberg, 2006, vol. 102, pp. 47-90.
2. B. L. Guo and P. X. Ma, Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review, *Science China Chemistry*, 2014, **57**, 490-500.
3. R. E. Horch, Future perspectives in tissue engineering: 'Tissue Engineering' Review Series, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2006, **10**, 4-6.
4. B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa and D. S. Kumar, Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review, *International Journal of Polymer Science*, 2011, **2011**, 1-19.
5. A. C. Fonseca, P. Ferreira, R. A. Cordeiro, P. V. Mendonça, J. R. Góis, M. H. Gil and J. F. J. Coelho, in *New strategies to advance pre/diabetes care: Integrative approach by PPM*, ed. M. S. Mozaffari, Springer Science + Business Media Dordrecht, 2013, vol. 3, pp. 399-455.
6. L. S. Nair and C. T. Laurencin, Biodegradable polymers as biomaterials, *Progress in Polymer Science*, 2007, **32**, 762-798.
7. C. C. Chu, Novel Biodegradable Functional Amino Acid-based Poly(ester amide) Biomaterials: Design, Synthesis, Property and Biomedical Applications, *Journal of Fiber Bioengineering and Informatics*, 2012, **5**, 1-31.
8. A. Diaz, R. Katsarava and J. Puiggali, Synthesis, properties and applications of biodegradable polymers derived from diols and dicarboxylic acids: from polyesters to poly(ester amide)s, *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, **15**, 7064-7123.
9. P. A. Gunatillake and R. Adhikari, Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering, *European Cells and Materials*, 2003, **5**, 1-16.
10. R. Katsarava, V. Beridze, N. Arabuli, D. Kharadze, C. C. Chu and C. Y. Won, Amino acid-based bioanalogous polymers. Synthesis, and study of regular poly(ester amide)s based on bis(α -amino acid) α,ω -alkylene diesters, and aliphatic dicarboxylic acids, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 1999, **37**, 391-407.

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

11. A. C. Fonseca, M. H. Gil and P. N. Simões, Biodegradable poly(ester amide)s – A remarkable opportunity for the biomedical area: Review on the synthesis, characterization and applications, *Progress in Polymer Science*, 2014, **39**, 1291-1311.
12. K. Markoishvili, G. Tsitlanadze, R. Katsarava, J. Glenn and A. Sulakvelidze, A novel sustained-release matrix based on biodegradable poly (ester amide) s and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds, *International journal of dermatology*, 2002, **41**, 453-458.
13. K. M. DeFife, K. Grako, G. Cruz-Aranda, S. Price, R. Chantung, K. Macpherson, R. Khoshabeh, S. Gopalan and W. G. Turnell, Poly(ester amide) co-polymers promote blood and tissue compatibility, *J Biomater Sci Polym Ed*, 2009, **20**, 1495-1511.
14. J. A. Horwitz, K. M. Shum, J. C. Bodle, M. Deng, C.-C. Chu and C. A. Reinhart-King, Biological performance of biodegradable amino acid-based poly(ester amide)s: Endothelial cell adhesion and inflammation in vitro, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2010, **95A**, 371-380.
15. P. Karimi, A. S. Rizkalla and K. Mequanint, Versatile Biodegradable Poly(ester amide)s Derived from α -Amino Acids for Vascular Tissue Engineering, *Materials*, 2010, **3**, 2346.
16. D. K. Knight, E. R. Gillies and K. Mequanint, Strategies in Functional Poly(ester amide) Syntheses to Study Human Coronary Artery Smooth Muscle Cell Interactions, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 2475-2487.
17. D. Srinath, S. Lin, D. K. Knight, A. S. Rizkalla and K. Mequanint, Fibrous biodegradable l-alanine-based scaffolds for vascular tissue engineering, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2014, **8**, 578-588.
18. L. J. Del Valle, M. Roa, A. Díaz, M. T. Casas, J. Puiggali and A. Rodríguez-Galán, Electrospun nanofibers of a degradable poly (ester amide). Scaffolds loaded with antimicrobial agents, *Journal of Polymer Research*, 2012, **19**, 1-13.
19. K. Hiltunen, M. Härkönen, J. V. Seppälä and T. Väänänen, Synthesis and characterization of lactic acid based telechelic prepolymers, *Macromolecules*, 1996, **29**, 8677-8682.

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

20. K. Hiltunen and J. V. Seppälä, The use of different diols in the synthesis of low-molecular-weight lactic-acid-based telechelic prepolymers, *Journal of Applied Polymer Science*, 1998, **67**, 1017-1023.
21. A. C. Fonseca, A. C. Serra, J. F. J. Coelho, M. H. Gil and P. N. Simões, Novel poly(ester amide)s from glycine and L-lactic acid by an easy and cost-effective synthesis, *Polymer International*, 2013, **62**, 736-743.
22. A. Van Bennekom, P. Willemsen and R. Gaymans, Amide-modified poly (butylene terephthalate): thermal stability, *Polymer*, 1996, **37**, 5447-5459.
23. A. C. Fonseca, J. F. Coelho, J. F. Valente, T. R. Correia, I. J. Correia, M. H. Gil and P. N. Simões, Poly (ester amide) s based on (l)-lactic acid oligomers and α -amino acids: influence of the α -amino acid side chain in the poly (ester amide) s properties, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2013, **24**, 1391-1409.
24. E. Armelin, N. Paracuellos, A. Rodríguez-Galán and J. Puiggali, Study on the degradability of poly (ester amide) s derived from the α -amino acids glycine, and l-alanine containing a variable amide/ester ratio, *Polymer*, 2001, **42**, 7923-7932.
25. L. Wang, Y. Wang and D. Cao, Synthesis and characterization of novel biodegradable polyamides containing α -amino acid, *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 2009, **46**, 312-320.
26. M. I. Calafel, P. M. Remiro, M. M. Cortázar and M. E. Calahorra, Cold crystallization and multiple melting behavior of poly (l-lactide) in homogeneous and in multiphasic epoxy blends, *Colloid and Polymer Science*, 2010, **288**, 283-296.
27. A. C. Fonseca, J. F. Coelho, M. Gil and P. Simões, Poly (ester amide) s based on l-lactic acid oligomers and glycine: the role of the central unit of the l-lactic acid oligomers and their molecular weight in the poly (ester amide) s properties, *Polymer Bulletin*, 2014, **71**, 3085-3109.
28. D. Chromcová, L. Baslerová, J. Roda and J. Brožek, Polymerization of lactams. 99 Preparation of polyesteramides by the anionic copolymerization of ϵ -caprolactam and ϵ -caprolactone, *European Polymer Journal*, 2008, **44**, 1733-1742.

Bio *Scaffolds* poliméricos para construção de estruturas celulares

7 Anexos

7.1 Anexo A – Espetros de ^1H RMN dos monómeros (diaminas de base AA)

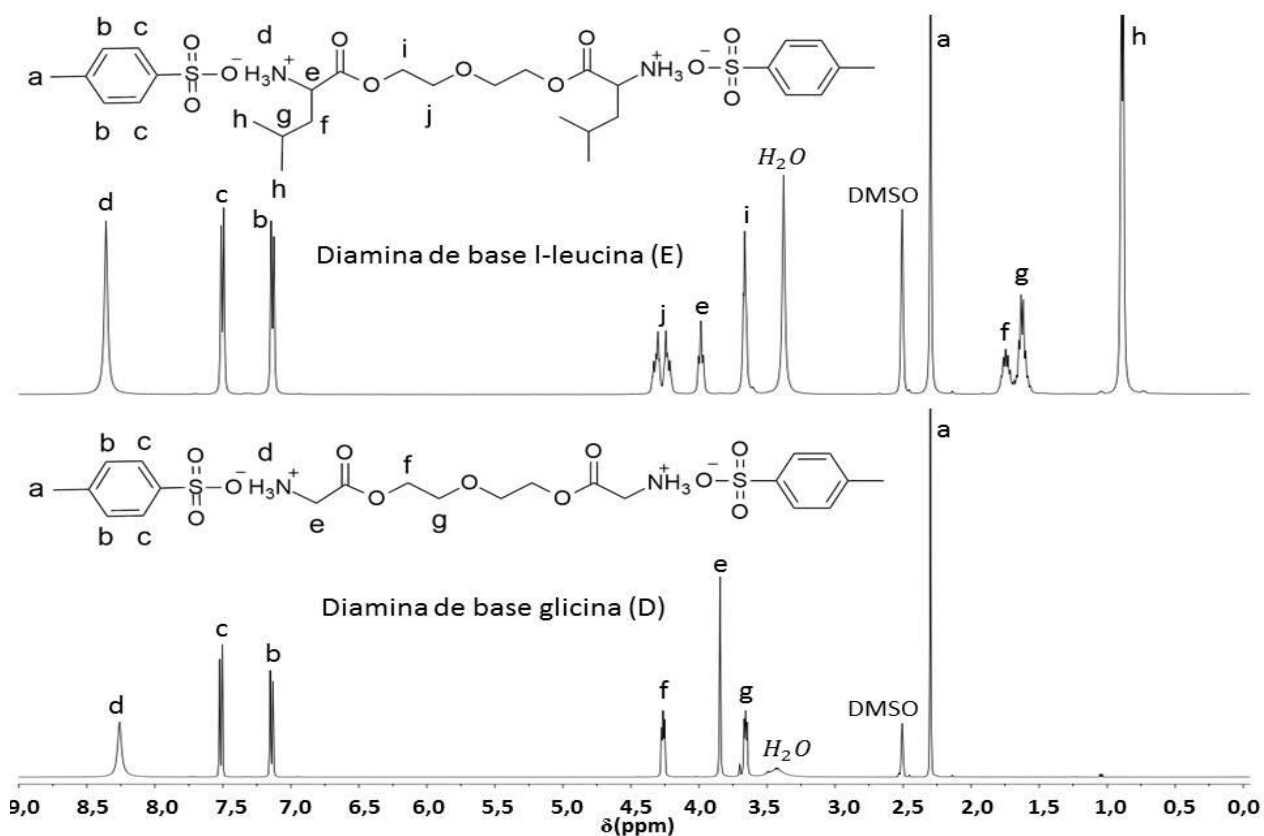


Figura 28 - Espetro de ^1H RMN das diaminas de base AA, glicina (D) e L-leucina (E)

Bio *Scaffolds* poliméricos para construção de estruturas celulares

7.2 Anexo B - Curvas termoanalíticas dos oligômeros de L-LA e dos oligômeros de ϵ -CL com grupos -OH terminais

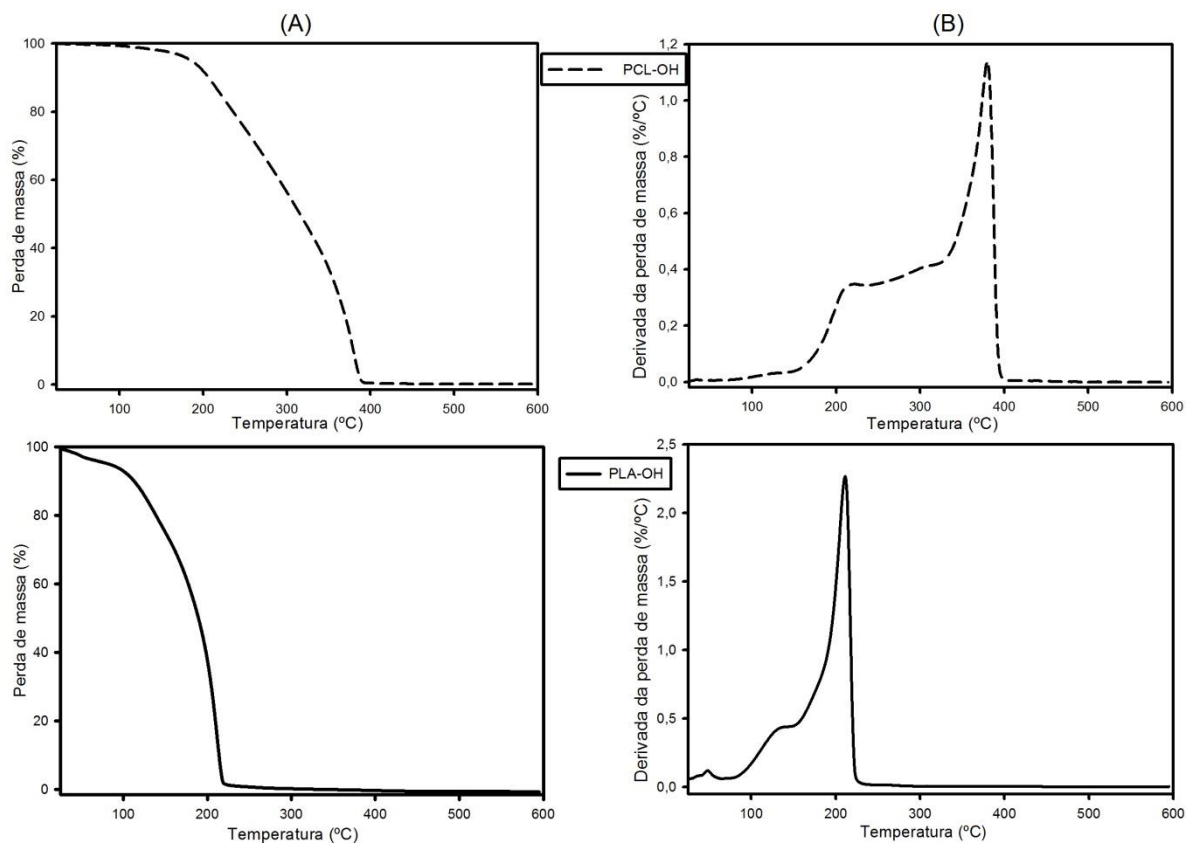


Figura 29 - TG (A) e DTG (B) do PLA-OH e PCL-OH

Bio *Scaffolds* poliméricos para construção de estruturas celulares

7.3 Anexo C - Espectros de massa das PEAs de base glicina ou L-leucina com cloreto de sebacoílo

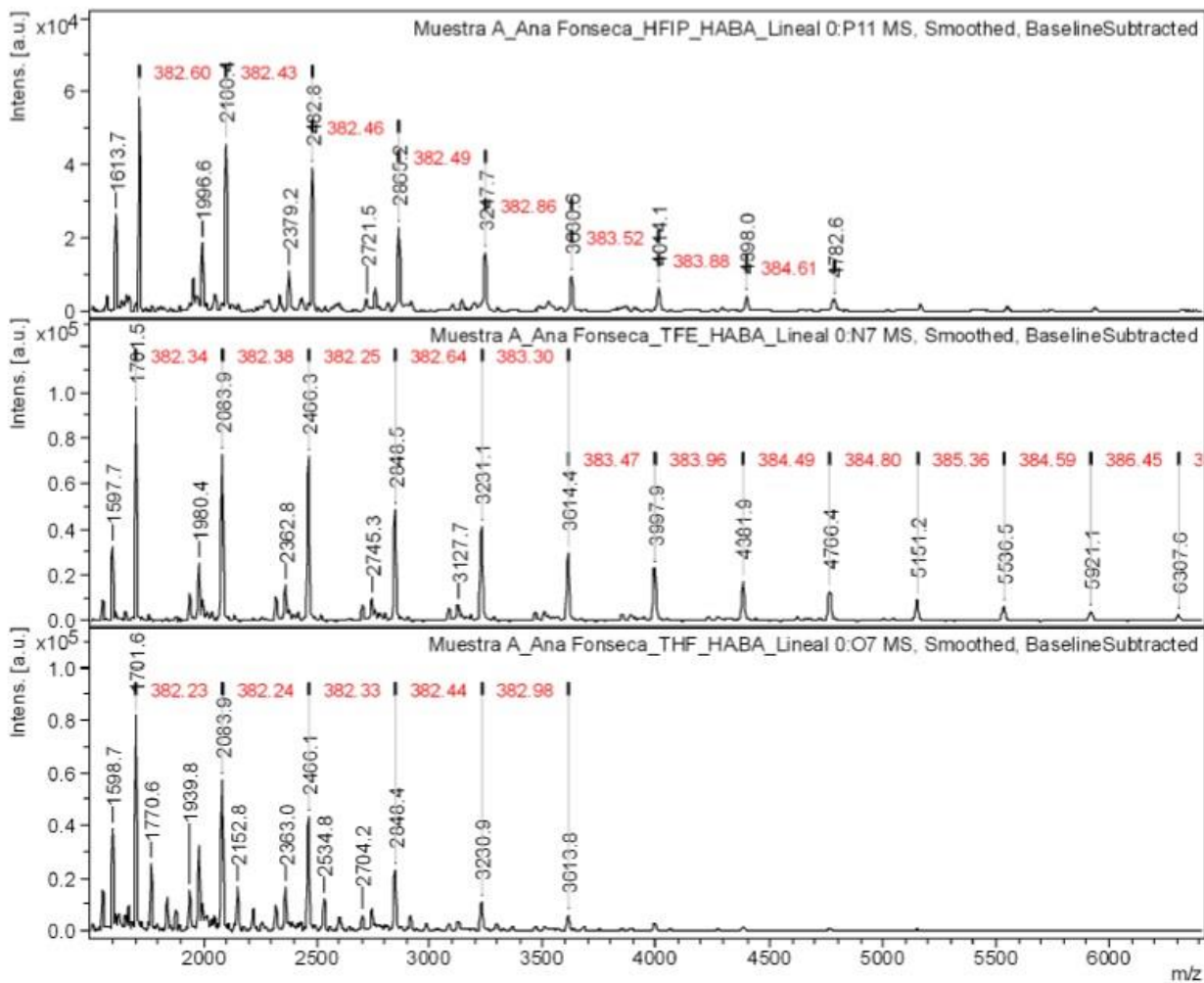


Figura 30 - Espectro de massa da PEA de base glicina e cloreto de sebacoílo, (M(UR)=486,44 g/mol)

Bio Scaffolds poliméricos para construção de estruturas celulares

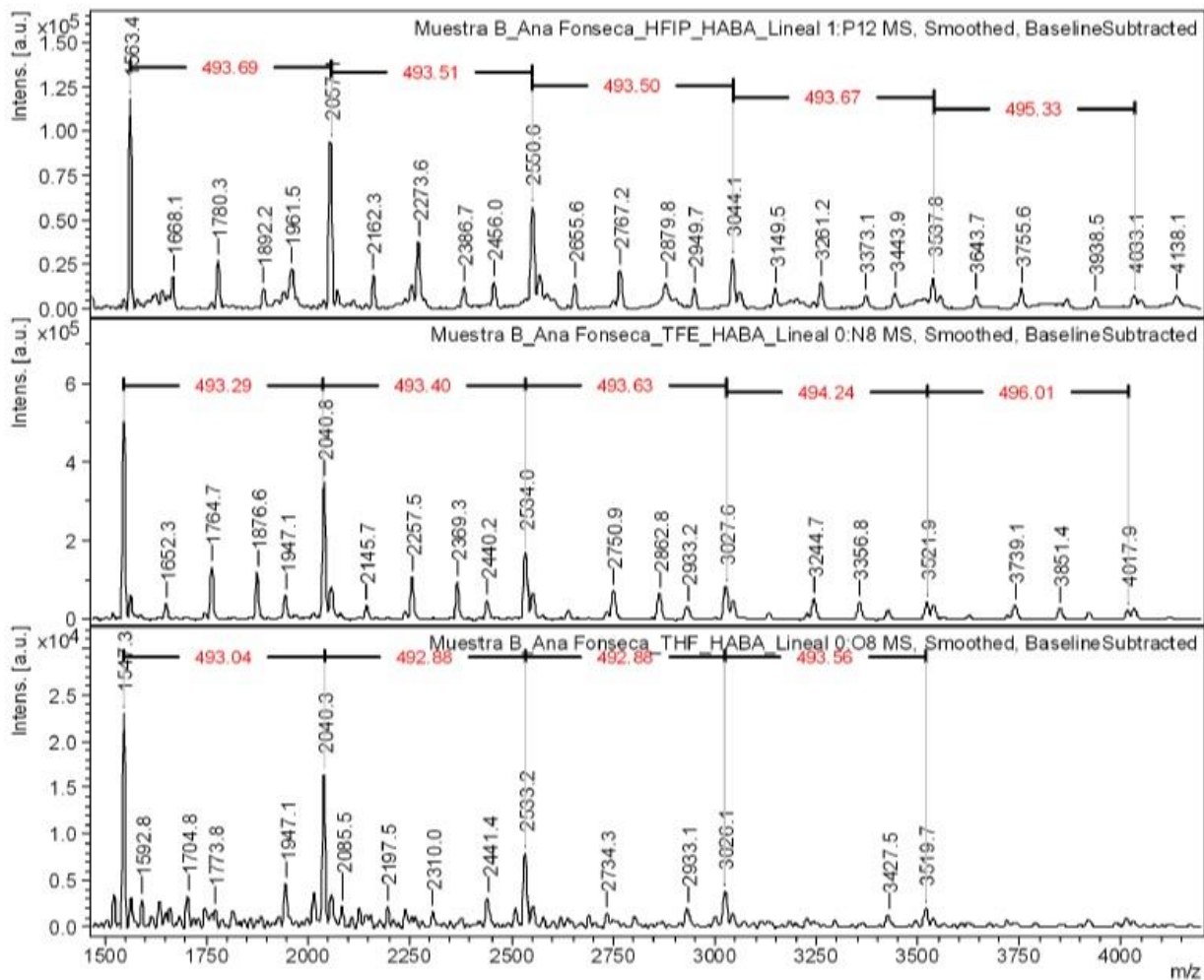


Figura 31 - Espectro de massa da PEA de base L-leucina e cloreto de sebacoilo, ($M(\text{UR})=496,65 \text{ g/mol}$)

7.4 Anexo D – Gráficos obtidos por DMTA das 6 PEAs sintetizadas

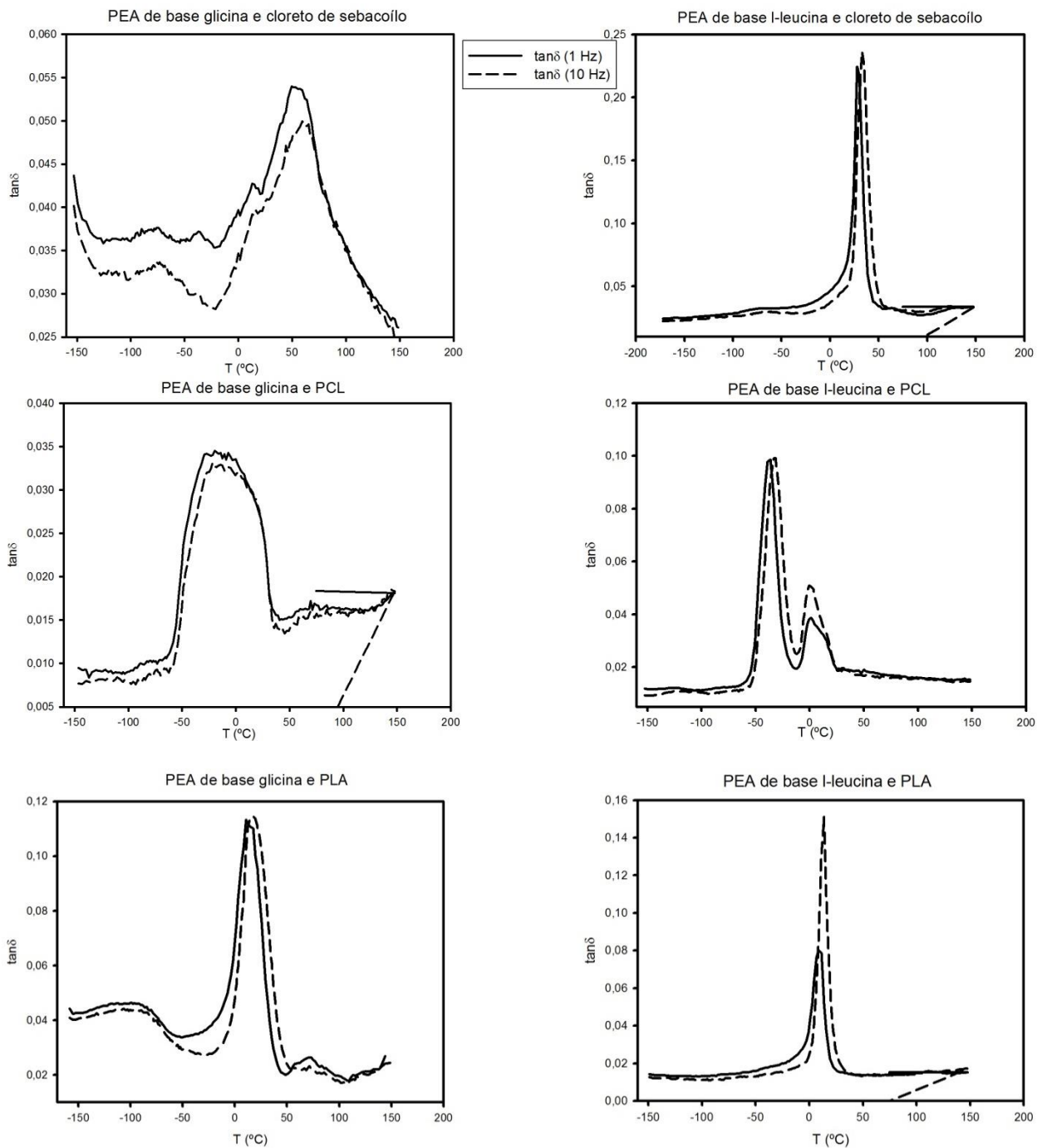


Figura 32 - Gráficos obtidos por DMTA das 6 PEAs sintetizadas