



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

VICTOR BALDIM

**BLENDAS DE POLICAPROLACTONA COM
POLIÉSTER POLINITROSADO PARA LIBERAÇÃO
LOCALIZADA DE ÓXIDO NÍTRICO**

**CAMPINAS
2016**

VICTOR BALDIM

**BLENDAS DE POLICAPROLACTONA COM
POLIÉSTER POLINITROSADO PARA LIBERAÇÃO
LOCALIZADA DE ÓXIDO NÍTRICO**

**Tese de Doutorado apresentada ao Ins-
tituto de Química da Universidade Esta-
dual de Campinas como parte dos requi-
sitos exigidos para a obtenção do título
de Doutor em Ciências**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO VICTOR BALDIM, E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCELO GANZA-
ROLI DE OLIVEIRA**

**CAMPINAS
2016**

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

B177b Baldim, Victor, 1985-
Blendas de policaprolactona com poliéster polinitrosado para liberação localizada de óxido nítrico / Victor Baldim. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Marcelo Ganzarolli de Oliveira.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Óxido nítrico. 2. S-nitrosotióis. 3. Poli (caprolactona). 4. Vasodilatação. I. Oliveira, Marcelo Ganzarolli de, 1959-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Polycaprolactone blended with polynitrosated polyester for local nitric oxide delivery

Palavras-chave em inglês:

Nitric oxide

S-nitrosothiols

Poly (caprolactone)

Vasodilation

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Marcelo Ganzarolli de Oliveira [Orientador]

Denise Freitas Siqueira Petri

Fernanda Poletto

Camila Alves de Rezende

Celso Aparecido Bertran

Data de defesa: 21-06-2016

Programa de Pós-Graduação: Química

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira (Orientador)

Profa. Dra. Denise Freitas Siqueira Petri (IQ-USP)

Profa. Dra. Fernanda Poletto (IQ-UFRGS)

Profa. Dra. Camila Alves de Rezende (IQ-UNICAMP)

Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran (IQ-UNICAMP)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do(a) aluno(a).

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pelo aluno **VICTOR BALDIM**, aprovada pela Comissão Julgadora em 21 de junho de 2016.

AGRADECIMENTOS

Aos meus dedicados pais Delcy e Julio e minha querida irmã Marjorie, por me apoiarem com amor e compreensão durante todos meus anos de UNICAMP.

Ao professor Marcelo Ganzarolli pela orientação e oportunidades que me confiou, como a participação em congressos científicos de destaque, estágio sanduíche e colaborações com outros grupos de pesquisa.

Ao técnico do laboratório Henrique Piva, excelente profissional e amigo, por resolver problemas de todas as naturezas e irradiar sua alegria de viver e bom humor diariamente no laboratório.

À equipe de segurança noturna, em especial ao Sr. Nestor e ao Sr. Cristiano, por sempre zelarem por minha integridade no laboratório.

Aos amigos pessoais e colegas de laboratório e pesquisadores do Instituto de Química da UNICAMP e da *École Normale Supérieure de Chimie de Paris*: Abdelilah Alar, Abdulghani Ismail, André Garcia, Ana Marmo, Arturo Ceballos, Beatriz Mansano, Bruno Giordano, Eva Ratajová, Fernanda Dias, Fernanda Lima, Gabriela de Souza, Gonzalo García, Henrique Pasti, Letícia Vitorazi, Lilian Padula, Mathieu Lazerges, Nathan Vetorazzi, Patricia Taladriz, Pietro Escobar, Rafael Vercelino, Raphael Marcilli, Raphael Pires, Renan Zibordi, Roberta Kamei, Samuel Souza, Sergio Januzzi, Sophie Griveau, Talita Gonçalves, Thatiane Marini, Thiago Ito e Yuri Hjelmstrom, pela lealdade, respeito, ajuda, companhia, apoio, conversas, discussões acaloradas, risadas e desabafos.

À professora Inés Joeques por seus conselhos e ensinamentos.

Aos professores supervisores do Programa de Estágio Docente (PED): Camila Rezende, Paulo Rosa e Watson Loh.

Aos professores Leandro Martinez e Isabel Felisberti, pelos excelentes cursos ministrados de termodinâmica estatística e física de polímeros que mudaram substancialmente a minha compreensão do universo da físico-química.

Ao professor Fethi Bedioui por ter me acolhido e supervisionado em seu laboratório na *École Normale Supérieure de Chimie de Paris* durante o estágio sanduíche de doutorado com profissionalidade exemplar e por sua atenção e humanidade quando precisei.

E por último, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) cujo suporte financeiro tornou viável a execução deste trabalho.

*Every portrait that is painted with feeling
is a portrait of the artist, not of the sitter.*

Oscar Wilde

RESUMO

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver um biomaterial polimérico liberador de NO e degradável em condições fisiológicas. Para isso, filmes sólidos de blendas entre policaprolactona (PCL) e um poliéster polissulfidrilado (PSPE), sintetizado a partir da reação de policondensação entre o ácido mercaptosuccínico e o tioglicerol, foram preparadas. A influência do conteúdo de PSPE nas cinéticas de cristalização e na morfologia dos esferulitos de PCL nas blendas PCL/PSPE foi investigada por microscopia óptica de polarização de acordo com o modelo de Avrami-Ahrrenius. Demonstrou-se que o PSPE não afeta os parâmetros de cela unitária da PCL e deve se situar nas regiões amorfas interfibrilares da PCL. Os filmes de PCL/PSPE foram caracterizados por DSC, utilizando-se a equação de Fox para prever o comportamento das T_g s e o modelo de Hoffman-Weeks para determinar a temperatura de fusão de equilíbrio em função da composição da blenda. Um ensaio acelerado de degradação foi utilizado para determinar os perfis de perda de massa de filmes de PCL/PSPE devido à degradação hidrolítica. Análises por EDS e DSC, mostraram que o PSPE se degrada mais rapidamente que a PCL. Os grupos sulfidrilos dos filmes de PCL/PSPE foram quantificados pelo método colorimétrico de Ellman. A superfície dos filmes de PCL/PSPE foi S-nitrosada por imersão em ácido nitroso. Os perfis de liberação de NO dos filmes de PCL/PNPE foram determinados por quimiluminescência e amperometria. Medidas de fluxo sanguíneo dérmico por fluxometria de laser Doppler, demonstraram que a aplicação tópica dos filmes de PCL/PNPE promove vasodilatação dose-dependente. O conjunto de resultados demonstra que os filmes de PCL/PNPE possuem potencial de uso como biomateriais degradáveis doadores de NO em aplicações biomédicas.

ABSTRACT

The main aim of this work was the development of a nitric oxide releasing polymeric biomaterial which is degradable in physiological medium. With this aim, solid films of blends of polycaprolactone (PCL) with a polysulfhydrylated polyester (PSPE), synthesized through the polycondensation reaction between mercaptosuccinic acid and thioglycerol, were prepared. The influence of the content of PSPE on the crystallization kinetics and spherulite morphology of PCL on the PCL/PSPE blends was investigated by polarizing optical microscopy, according to the Avrami-Ahrrenius model. It was shown that the PSPE does not affect the PCL's unitary cell parameters and must be located in the amorphous interfibrillar regions of PCL. The PCL/PSPE films were characterized by DSC using Fox equation to predict the behavior of the T_g s and the Hoffman-Weeks model to determine the equilibrium melting temperature as a function of the blend composition. An accelerated degradation assay was used to assess the mass loss profiles of PCL/PSPE films due to hydrolytic degradation. EDS and DSC analysis showed that the PSPE degrades faster than the PCL. The sulfhydryl groups of the PCL/PSPE films were quantified by the Ellman's colorimetric assay. The surface of the PCL/PSPE was S-nitrosated through the immersion in nitrous acid. The NO release profiles of the PCL/PNPE films were determined by chemiluminescence and amperometry. The films were shown to promote topical skin vasodilation in a dose dependent manner. Measurements of dermal blood flow by laser Doppler flowmetry showed that the topical application of the PCL/PNPE films promotes a dose-dependent vasodilation. Altogether, these results show that the PCL/PNPE films have potential to be used as nitric oxide-releasing biomaterials in biomedical applications.

ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|--|
| AlbSNO | S-nitrosoalbumina |
| AMS | ácido mercaptossuccínico |
| AuNP | nanopartícula de ouro |
| BH4 | tetrahidrobiopterina (BH4) |
| cysNO | S-nitrosocisteína |
| DBHD/NO | diazeniodiolato de dibutilhexildiamina |
| DEA/NO | diazeniodiolato de dietilamina |
| DETA/NO | diazeniodiolato de dietilenotriamina |
| DRX | difratometria de raios-X |
| DSC | calorimetria exploratória diferencial |
| DTNB | ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) |
| EDRF | fator relaxante derivado do endotélio |
| EDS | espectroscopia dispersiva de elétrons |
| EDTA | ácido etilenodiamintetracético |
| eNOS | óxido nítrico sintase endotelial |
| FAD | flavina adenina dinucleotídeo |
| FMN | flavina mononucleotídeo |
| GMPc | guanosina 3',5'-monofosfato cíclica |
| GPC | cromatografia de permeação em gel |
| GSH | glutathiona reduzida |
| GSNO | S-nitrosoglutathiona |
| GTP | guanosina 5'-trifosfato |
| HbSNO | S-nitrohemoglobina |
| HPLC | cromatografia líquida de alta eficiência |
| HPMC | hidroximetil propilcelulose |

| | |
|----------|--|
| iNOS | óxido nítrico sintase induzível |
| IP3R | receptor de inositol trifosfato |
| IV | infravermelho |
| MEV | microscopia eletrônica de varredura |
| NADPH | fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina |
| nNOS | óxido nítrico sintase neuronal |
| NO | óxido nítrico |
| NOA | equipamento analisador de óxido nítrico por quimiluminescência |
| NONOato | diazeniodiolato |
| NOS | óxido nítrico sintase |
| PAPA/NO | diazeniodiolato de dipropilenodiamina |
| PCL | policaprolactona |
| PCL/PNPE | blenda de policaprolactona com poliéster polinitrosado |
| PCL/PSPE | blenda de policaprolactona com poliéster polissulfidrilado |
| PEEK | poliéter(éter-cetona) |
| PEG | poli(etilenoglicol) |
| PEO | poli(etilenoglicol) |
| PET | poli(tereftalato de etileno) |
| PGA | poli(ácido glicólico) |
| PHEMA | poli(metacrilato de hidroxietila) |
| PLA | poli(ácido láctico) |
| PLGA | poli(ácido láctico - co - ácido glicólico) |
| PMMA | poli(metacrilato de metila) |
| PNPE | poliéster polinitrosado |
| POM | microscopia óptica com luz polarizada |
| PPO | poli(propilenoglicol) |
| PSNO | S-nitrosotiol macromolecular |
| PSPE | poliéster polissulfidrilado |
| PTCM | poli(carbonato de trimetileno) |
| PTFE | poli(tetrafluoroetileno) |
| pTSA | ácido p-tolueno sulfônico |
| PVA | poli(álcool vinílico) |
| PVC | policloreto de polivinila |
| RS | radical tiila |
| RSNO | S-nitrosotiol |
| sGC | forma solúvel da guanilato ciclase |
| SH | função orgânica sulfidríla |
| SNAC | S-nitrosoacetilcisteína |
| SNAP | S-nitrosoacetilpenicilina |

| | |
|----------|---|
| SNO | função orgânica S-nitrosotiol |
| SNP | nitroprussiato de sódio |
| TGA | análise termogravimétrica |
| THF | tetrahidrofurano |
| TNB | ácido 2-nitro-5-tiobenzóico |
| Tris-HCl | cloridrato de tris(hidroximetil)aminometano |
| UHMMPE | polietileno de ultra alta massa molar |
| UV-vis | ultravioleta-visível |
| VASP | fosfoproteína estimulada por vasodilatação |
| VEGF | fator de crescimento do endotélio vascular |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Introdução | 14 |
| 1.1 | Óxido nítrico | 14 |
| 1.1.1 | Química e bioquímica | 15 |
| 1.1.2 | Fisiologia | 16 |
| 1.1.3 | S-nitrosotióis | 19 |
| 1.2 | Biomateriais poliméricos liberadores de óxido nítrico | 22 |
| 1.3 | Objetivos | 25 |
| 2 | Síntese e caracterização de poliéster polissulfidrilado | 26 |
| 2.1 | Parte Experimental | 27 |
| 2.1.1 | Materiais | 27 |
| 2.1.2 | Síntese e purificação | 27 |
| 2.1.3 | Espectroscopia vibracional no infravermelho (IV) | 27 |
| 2.1.4 | Espectrometria de absorção molecular no ultravioleta-visível (UV-vis) | 27 |
| 2.1.5 | Calorimetria exploratória diferencial (DSC) | 28 |
| 2.1.6 | Cromatografia de permeação em gel (GPC) | 28 |
| 2.2 | Resultados e Discussão | 28 |
| 2.3 | Conclusão | 32 |
| 3 | Blendas de poliéster polissulfidrilado com policaprolactona | 33 |
| 3.1 | Procedimento Experimental | 34 |
| 3.1.1 | Materiais | 34 |
| 3.1.2 | Preparação de blendas | 34 |
| 3.1.3 | Análise termogravimétrica (TGA) | 34 |
| 3.1.4 | Difração de raios-X (DRX) | 34 |
| 3.1.5 | Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (EDS) | 35 |
| 3.1.6 | Calorimetria exploratória diferencial (DSC) | 35 |
| 3.1.7 | Microscopia óptica com luz polarizada (POM) | 36 |
| 3.2 | Resultados e Discussão | 36 |
| 3.2.1 | Morfologia de filmes | 36 |
| 3.2.2 | Cristalização da policaprolactona nas blendas | 38 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.2.3 | Miscibilidade da blenda | 43 |
| 3.3 | Conclusão | 47 |
| 4 | Degradação hidrolítica de filmes de PCL/PSPE | 48 |
| 4.1 | Procedimento Experimental | 49 |
| 4.1.1 | Materiais | 49 |
| 4.1.2 | Ensaio de molhabilidade | 49 |
| 4.1.3 | Ensaio de degradação hidrolítica acelerada | 49 |
| 4.1.4 | Espectroscopia dispersiva de elétrons (EDS) | 50 |
| 4.1.5 | Calorimetria de varredura diferencial (DSC) | 50 |
| 4.2 | Resultados e Discussão | 50 |
| 4.3 | Conclusão | 53 |
| 5 | Carga e perfis de liberação de óxido nítrico de filmes PCL/PNPE | 55 |
| 5.1 | Procedimento Experimental | 56 |
| 5.1.1 | Materiais | 56 |
| 5.1.2 | Síntese de S-nitrosoglutationa | 56 |
| 5.1.3 | Quantificação de sulfidrilas | 56 |
| 5.1.4 | Nitrosação de blendas | 57 |
| 5.1.5 | Quantificação de S-nitrosotióis | 57 |
| 5.1.6 | Perfil de liberação de NO por quimiluminescência | 57 |
| 5.1.7 | Perfil de liberação de NO por amperometria | 57 |
| 5.1.8 | Ensaio de vasodilatação tópica | 58 |
| 5.2 | Resultados e Discussão | 58 |
| 5.2.1 | Quantificação de sulfidrilas e S-nitrosotióis | 58 |
| 5.2.2 | Perfil de liberação de NO | 61 |
| 5.2.3 | Ensaio de vasodilatação tópica | 65 |
| 5.3 | Conclusão | 69 |
| 6 | Perspectivas | 70 |
| A | Termogramas adicionais | 72 |
| | Referências Bibliográficas | 74 |

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O óxido nítrico (NO) atua no organismo humano como molécula sinalizadora independente de receptores celulares, ou seja, como segundo mensageiro, responsável por iniciar as cascatas de transdução de sinal intracelulares que resultam em uma série de ações fisiológicas nos sistemas neural, vascular e imunitário. O sucesso do uso terapêutico de NO exógeno ou de pró-fármacos geradores de NO têm sido limitado em grande parte pela alta reatividade do radical e respectivos efeitos colaterais referentes a sua administração sistêmica. Recentemente, polímeros liberadores de NO vêm sendo desenvolvidos visando maior controle do alvo e concentração de NO *in vivo*.

Neste capítulo, a química, bioquímica e fisiologia do NO e uma classe particular de pró-fármaco conhecida como S-nitrosotióis (RSNOs) são abordados, assim como uma seção sobre biomateriais poliméricos liberadores de NO e suas aplicações médicas é apresentada. Por último, os objetivos desta tese de doutorado são elencados.

1.1 Óxido nítrico

Na década de oitenta, Ignarro, Furchgot e Murad lideraram os esforços que levaram ao descobrimento do NO como a molécula sinalizadora responsável pela relaxação do tecido vascular, molécula incógnita até então e conhecida àquele tempo por *fator relaxante derivado do endotélio* (EDRF).¹⁻⁴ A descoberta lhes rendeu o prêmio Nobel de Medicina em 1998. O radical diatômico atua no controle da pressão sanguínea,^{2,5} neurotransmissão,⁶ cicatrização,^{7,8} reação de corpo estranho,⁹ inibição de agregação plaquetária¹⁰ e na resposta imunitária,¹¹ onde o NO exerce uma poderosa ação citostática e citotóxica contra vários agentes patogênicos intracelulares como *Trypanosoma cruzi* (mal de Chagas),¹² *Plasmodium falciparum* (malária) e *Leishmania* (leishmanioses cutânea e visceral).¹³ Também atua em patologias como câncer,¹⁴ diabetes¹⁵ e

doenças neurodegenerativas.¹⁶

1.1.1 Química e bioquímica

O NO é uma molécula diatômica composta por um átomo de nitrogênio e outro de oxigênio. A presença de um elétron desemparelhado em um orbital π^* confere ao NO seu caráter radicalar, conforme se constata em seu diagrama de orbitais moleculares (Fig. 1.1).

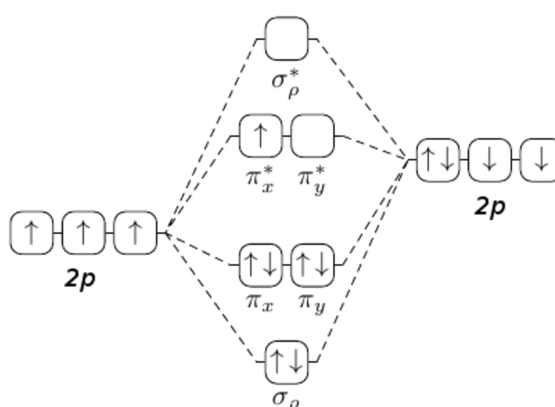
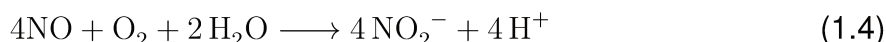


Figura 1.1: Diagrama de orbitais moleculares para o óxido nítrico no estado fundamental.

A meia vida do NO em solução aerada e fluidos biológicos é curta pois o radical reage com O_2 formando NO_2 (Eq. 1.1) que por sua vez reage com NO produzindo N_2O_3 (Eq. 1.2). Esta espécie é prontamente hidrolisada no citosol e meio extracelular levando a formação de NO_2^- (Eq. 1.3).



A cinética da reação global de auto-oxidação do NO (Eq. 1.4) é de primeira ordem na concentração de O_2 e de segunda ordem na concentração de NO (Eq. 1.5).¹⁷ Hipotetiza-se que a formação de N_2O_3 em altas concentrações, espécie esta potencial doadora do intermediário nitrosônio (NO^+) para grupos funcionais nucleofílicos presentes em biomoléculas, como aminas ou tióis, levando à formação de N-nitrosaminas e S-nitrosotióis (RSNOs), se dá no interior de bicamadas lipídicas onde o N_2O_3 não sofre hidrólise e NO e O_2 são até vinte vezes mais solúveis que no citosol.¹⁸



$$V = -\frac{1}{4} \frac{d}{dt}[\text{NO}] = -\frac{d}{dt}[\text{O}_2] = \frac{1}{4} \frac{d}{dt}[\text{NO}_2^-] = k[\text{NO}]^2[\text{O}_2] \quad (1.5)$$

Assim, a ação do NO em altas concentrações é predominantemente indireta. Porém, a autooxidação de NO em concentrações submicromolares é baixa de forma que o NO atua diretamente,^{19,20} como é o caso de sua reação com complexos entre heme e Fe^{2+} presentes em proteínas como a mioglobina, citocromo c e guanilato ciclase solúvel que resulta na formação de complexos nitrosilados paramagnéticos.²¹

A biosíntese do NO em mamíferos se dá pela oxidação da L-arginina a L-citrulina e NO (Fig. 1.2),^{22,23} catalisada por uma das três isoformas da óxido nítrico sintase (NOS), ativas quando dimerizadas: 1) neuronal (nNOS), presente em células nervosas, do músculo esquelético e coração; 2) induzível (iNOS), expressada em macrófagos e outras células do sistema imune; 3) endotelial (eNOS), presente em células dos vasos sanguíneos.^{24–26} As isoformas apresentam diferenças quanto a regulação, intensidade e duração da produção de NO mas em comum necessitam tetrahydrobiopterina (BH4), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN), fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) e heme como cofatores, além de calmodulina que atua particularmente na dimerização da nNOS e eNOS. A disponibilidade desses cofatores e do substrato L-arginina, assim como a concentração de íons Ca^{2+} , controlam a reatividade das NOS e consequentemente a produção de NO endógeno.²⁷ Além disso, a expressão de iNOS pode ser influenciada por citocinas, antígenos de origem viral ou microbiana, receptores do tipo Toll, pH e pO_2 e contatos célula-célula.²⁸

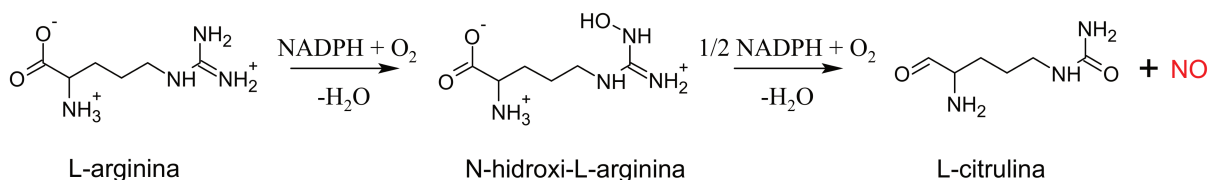


Figura 1.2: Síntese do óxido nítrico a partir da L-arginina.

1.1.2 Fisiologia

O NO atua direta ou indiretamente em uma série de processos fisiológicos e patofisiológicos.^{29,30} Dentre eles, a vasodilatação, a agregação plaquetária, a resposta imunitária e a cicatrização cutânea são apresentados nesta seção.

Vasodilatação e agregação plaquetária NO regula a homeostase vascular através do controle do fluxo e pressão sanguíneos e da agregação plaquetária. O radical atravessa as membranas celulares de células musculares lisas que envolvem o tecido endotelial levando à sua relaxação e consequente vasodilatação, e/ou as membranas de plaquetas, levando à sua ativação e formação de trombos plaquetários. Em ambos tipos celulares, o NO liga-se ao grupo heme da forma solúvel da enzima guanilato ciclase (sGC) causando sua ativação e então a sGC catalisa a reação de formação de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) a partir do trifosfato de guanosina (GTP) (Fig. 1.3).³¹

O aumento da concentração de cGMP ativa proteína cinases que fosforilam uma série de outras proteínas. Em células musculares lisas, fosforilam: o receptor de inositol trifosfato (IP3R), causando a diminuição da concentração de Ca^{2+} ; a Rho A cinase, causando a inibição de forforilação de cadeias de miosina; canais de potássio (BK), aumentando a saída de K^+ e diminuindo a entrada de Ca^{2+} ; tendo como consequência fisiológica, nos três exemplos, a relaxação muscular.^{5,31,32} Em plaquetas, fosforilam a Fosfoproteína Estimulada por Vasodilatação (VASP) e canais de cálcio, inibindo a fase de adesão e ativação plaquetária. Como consequência, a agregação plaquetária não ocorre, uma vez que a ativação é necessária para que as plaquetas se liguem com fibrinogênio, formando agregados ou trombos plaquetários.^{10,33,34}

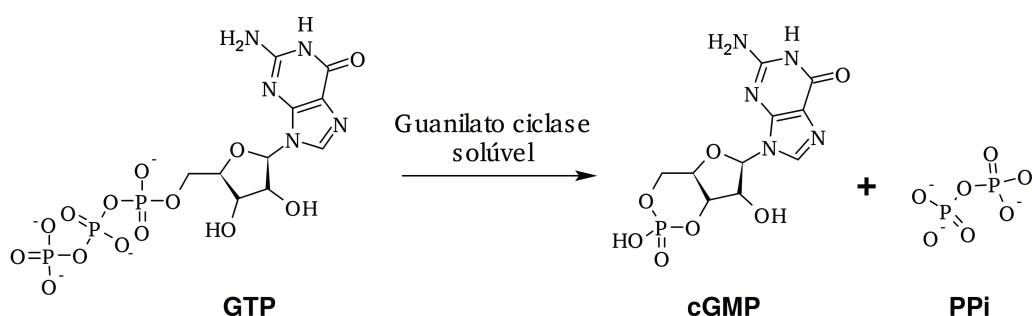


Figura 1.3: Reação de formação de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) a partir de trifosfato de guanosina (GTP) catalisada pela forma solúvel da guanilato ciclase.

Uma doença conhecida como fenômeno de Raynaud é caracterizada pela resposta vascular excessiva dos vasos dos dedos em resposta ao frio ou estresse emocional de maneira que há uma desproporção no equilíbrio entre os processos de vasodilatação/vasoconstrição privilegiando a vasoconstrição. As extremidades dos dedos tornam-se esbranquiçadas, devido a isquemia, e em seguida azuis, por causa da oxigenação deficiente, e finalmente avermelhadas quando o sangue flui de volta aos dedos. A patofisiologia desta condição é pouco entendida mas sabe-se que está relacionada à deficiência de produção de NO local e por isso estratégias que restabelecem

as concentrações locais de NO são promissores no tratamento dessa doença.^{35–38}

Resposta imunitária NO é produzido por células do sistema imune como macrófagos, células dendríticas, células NK, neutrófilos, monócitos etc., e por outras células envolvidas indiretamente com a resposta imunitária, como as endoteliais, epiteliais, fibroblastos, queratinócitos e hepatócitos. Ele atua na diferenciação, proliferação e apoptose de células imunitárias, assim como na produção de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão e quimiotaxia. O radical está envolvido no controle e patogênese de vírus, bactérias, protozoários, fungos e helmintes, crescimento de tumores, processos autoimunes e doenças crônicas degenerativas.^{28,39} Essas ações podem ser otimizadas na presença de outras moléculas como glutati-ona, cisteína, peróxido de hidrogênio ou radicais superóxidos etc.⁴⁰ Por exemplo, o NO reage prontamente com radicais superóxidos $O_2^{\bullet-}$ em vacúolos digestivos no interior de macrófagos, formando peroxinitrito ONO_2^- (Eq. 1.6), agente oxidante potente capaz de induzir morte celular e utilizado contra organismos patogênicos.⁴¹



A ação citotóxica do NO também pode se dar indiretamente. Por exemplo, sua produção pela iNOS diminui a disponibilidade de L-arginina, causando a morte ou a inibição do crescimento de microorganismos dependentes desse aminoácido para síntese de poliaminas e proliferação.²⁸

Cicatrização cutânea Macrófagos, queratinócitos, células endoteliais e fibroblastos, células diretamente envolvidas no processo de cicatrização de feridas cutâneas, produzem NO a partir da conversão catalítica de L-arginina pela eNOS e/ou iNOS. O papel do NO na regulação da cicatrização em suas diferentes fases é complexa, uma vez que NO atua na quimiotaxia e vasodilatação na fase inflamatória, na proliferação de vários tipos celulares, na angiogênese e na deposição de colágeno,^{7,42–44} como exposto mais detalhadamente abaixo:

1. Fase inflamatória - Agregados de plaquetas fecham a ferida e liberam citocinas que atraem granulócitos, macrófagos e linfócitos para o local. A expressão de iNOS e consequente produção de NO é alta e sua ação vasodilatadora e microbicida é bastante relevante na potencialização da resposta imunitária e consequente prevenção de infecção por microorganismos patogênicos.
2. Proliferação celular - Baixas concentrações de NO inibem a proliferação de fibroblastos e células musculares lisas e estimulam a proliferação de células endoteliais e queratinócitos. Por outro lado, altas concentrações de NO ou citocinas e

outras moléculas pró-inflamatórias que estimulam a expressão de iNOS, inibem o crescimento de queratinócitos.

3. Angiogênese - NO promove angiogênese durante a cicatrização ao estimular a expressão de um fator angiogênico potente conhecido como Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF).
4. Remodelamento da matriz de colágeno - NO estimula a deposição de novas fibras de colágeno e migração de queratinócitos promovendo a contração e fechamento da ferida.

A importância do NO no processo de cicatrização é evidente também no caso de úlceras crônicas diabéticas onde sua produção é deficiente.^{42,43} Em modelos animais, a suplementação da dieta com L-arginina normaliza parcialmente a produção de NO e acelera o processo de cicatrização das úlceras.⁴⁵ Em feridas saudáveis, a dieta melhora a qualidade da cicatriz e o processo de cicatrização como um todo.⁴⁶

1.1.3 S-nitrosotióis

RSNOs são moléculas orgânicas contendo um grupo funcional nitroso ligado ao enxofre de um tiol e são carreadores endógenos de NO.^{47,48} RSNOs endógenos, como S-nitrosoglutationa (GSNO), S-nitrosocisteína (cysNO), S-nitrosoalbumina (AlbSNO) e S-nitrosohemoglobina (HbSNO), e sintéticos, como S-nitrosoacetilcisteína (SNAC) e S-nitrosoacetilpenicilina (SNAP), são alguns dos RSNOs frequentemente reportados na literatura e podem induzir respostas fisiológicas semelhantes àsquelas do NO,^{49–52} pois o liberam espontaneamente pela clivagem homolítica da ligação SNO (Eq. 1.7) e pela reação dos assim formados radicais tiila com RSNOs (Eq. 1.8).⁵³ Também podem modular processos fisiológicos e bioquímicos ao transferir íons nitrosênio (NO⁺) para tióis de enzimas como a glutationa redutase, caspases, creatina cinase, glutationa-S-transferase, adenosiltransferase, gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase, álcool dehidrogenase, tirosina fosfatase protéica ou aconitase,^{54,55} reação esta conhecida por transnitrosação (Eq. 1.13).



A Figura 1.4 mostra as estruturas moleculares de alguns RSNOs de baixa massa molar com os tempos de meia vida da reação de termólise de acordo com o reportado por *Mathews & Kerr*, verificando-se diferenças de até quatro ordens de grandeza.⁵⁶

A razão para estas diferenças reside no aumento da força da ligação S-NO proporcionado por grupos que retiram elétrons do átomo de enxofre, como oxigênio de carbonilas vicinais, ou na diminuição dessa força proporcionada por grupos doadores de elétrons, como metilas ou metilenos em RSNOs secundários e terciários.

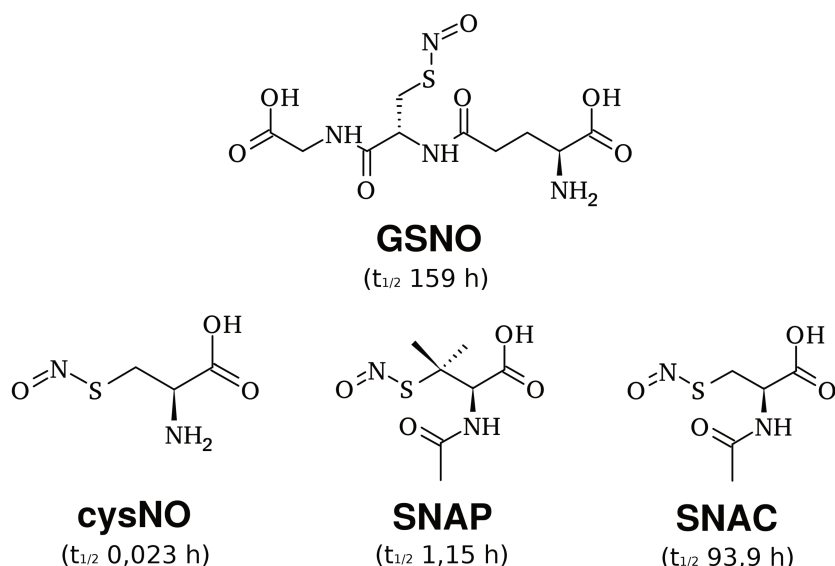
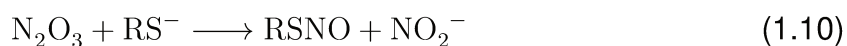
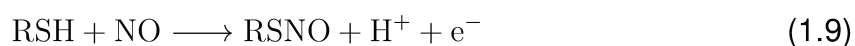
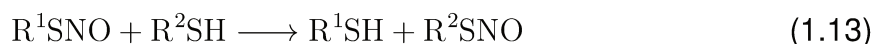


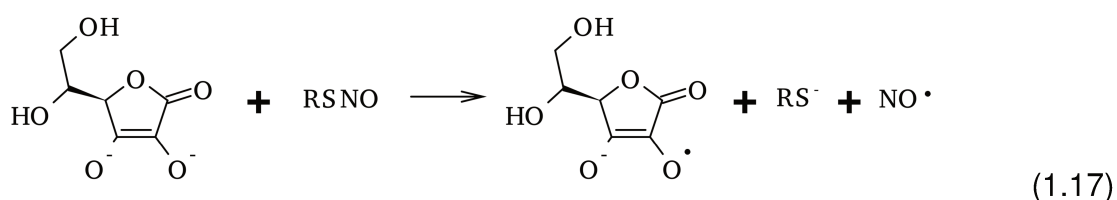
Figura 1.4: Estruturas moleculares da S-nitrosoglutationa (GSNO), S-nitroso-L-cisteína (cysNO), S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP) e S-nitroso-N-acetil-DL-cisteína (SNAC) e respectivos tempos de meia vida da reação de termólise no escuro em tampão fosfato 0,5 mM, pH 7,4, 37°C de acordo com *Mathews & Kerr*.⁵⁶

A reação direta entre NO e tióis ou tiolatos (Eq. 1.9) é demasiadamente lenta para ser considerada relevante em meio biológico e por isso acredita-se que a biosíntese de RSNOs se dá por outras rotas, como por exemplo: reação entre íons NO^+ e tiolatos mediada por agentes nitrosantes, como N_2O_3 ou peroxinitrito (ONOO^-) (Eqs. 1.10 e 1.11); reação entre NO e radicais tiila, formados a partir da oxidação de tióis por oxidantes fortes como radicais peroxila (Eq. 1.12); reações de transnitroação entre S-nitrosotióis de baixa massa molar e proteínas (Eq. 1.13).^{29,57-62}





Métodos seletivos e sensíveis para a quantificação direta e indireta de RSNOs em concentrações fisiológicas, como amperometria, quimiluminescência, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectrometria de massas etc., são amplamente descritos na literatura.^{63–72} Em particular, a detecção indireta de RSNO se vale de sua decomposição e formação de NO, que é então diretamente quantificado.⁶⁴ A decomposição seletiva de RSNOs pode ser feita por diferentes métodos, dentre eles: fotólise, após irradiação da amostra com radiação em 340 nm e/ou no intervalo 550–600 nm, respectivamente (Eq. 1.14);^{73,74} Cu(I) na presença de glutatona, cisteína ou outros redutores (Eqs. 1.15 e 1.16);⁷⁵ ascorbato (Eq. 1.17);^{76,77} nanopartículas de ouro (AuNPs) de 15 nm (Eq. 1.18).⁷⁸



Vale a pena ressaltar que existem ainda outras classes de moléculas doadoras de NO, exclusivamente sintéticas, dentre elas: diazeniodiolatos (NONOatos); complexos de nitrosilo rutênio; nitroprussiato de sódio (SNP); nitrito de sódio acidificado; nitroglicerina etc.^{79–82} Em especial, NONOatos como DEA/NO, PAPA/NO e DETA/NO liberam NO por hidrólise (Figura 1.5) e também são bastante empregados na literatura como doadores de NO para calibração de detectores de NO assim como para aplicações biológicas.⁸³ NONOatos e S-nitrosotióis macromoleculares vem sendo reportados recentemente, conforme exposto na seção 1.2.

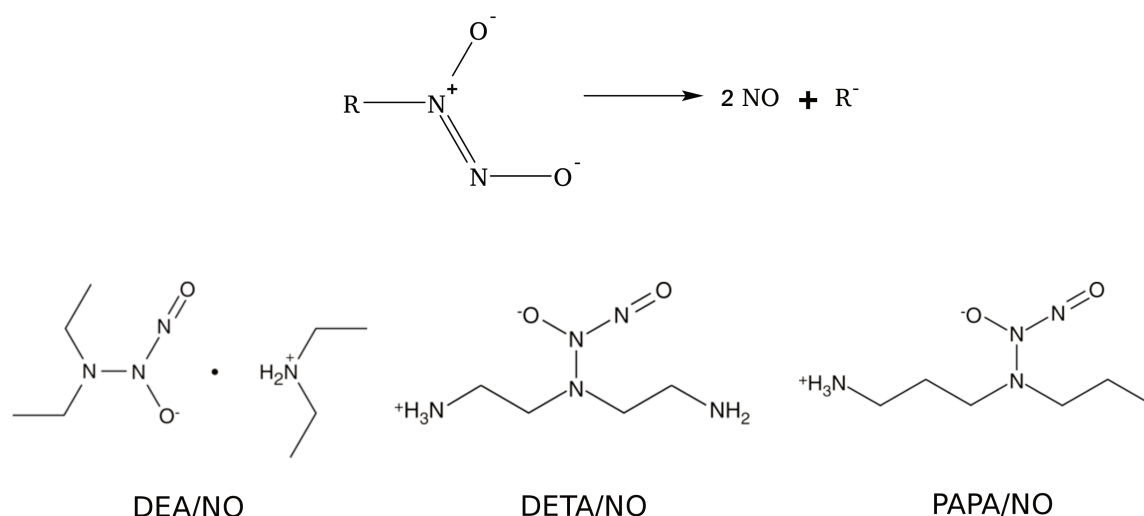


Figura 1.5: Fórmula estrutural genérica de nonoatos, respectiva reação de hidrólise e consequente produção de NO (parte superior). Fórmulas estruturais dos nonoatos DEA/NO, DETA/NO e PAPA/NO (parte inferior).

1.2 Biomateriais poliméricos liberadores de óxido nítrico

Implantes e dispositivos feitos ou revestidos com polímeros^a, capazes de reestabelecer a função de órgãos e tecidos lesados ou deteriorados, vêm sendo utilizados para melhorar a qualidade e a expectativa de vida do homem moderno. Estes materiais e respectivos resíduos inerentes à sua fabricação e esterilização, assim como seus produtos de degradação *in vivo* e metabolismo,⁸⁵ não devem ser carcinogênicos, mutagênicos, pirogênicos, tóxicos, alergênicos, incompatíveis com sangue ou causar inflamação severa, para que sejam utilizados com segurança em organismos vivos⁸⁶ e considerados, portanto, biocompatíveis. Um biomaterial polimérico é “qualquer polímero sintético ou de origem natural, ou combinação de polímeros, que pode ser usado por qualquer período de tempo, como um todo ou como parte de um sistema que trate, aumente, ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo”.⁸⁶

Em comum, biomateriais poliméricos permanecem em contato com tecidos vivos e fluidos biológicos, compostos por uma mistura de íons e proteínas, que proporciona um ambiente corrosivo e que promove degradação. Há ainda a resposta inflamatória do organismo contra o material, que inclui o sistema complemento e a resposta celular composta principalmente por neutrófilos, monócitos, macrófagos e linfócitos, que atuam ativamente em sua bioabsorção. Essa resposta depende ainda da composição e estrutura química da superfície do material polimérico e consequentemente

^aPolímeros são moléculas de cadeia longa formadas pela ligação covalente entre unidades monoméricas.⁸⁴

de seus parâmetros físico-químicos como energia superficial, hidrofobicidade, cristalinidade, grau de reticulação, além de características morfológicas, como rugosidade, porosidade e área superficial, e mecânicos, como tensão e deformação.⁸⁵

Nesta definição de biomateriais poliméricos se enquadram pinos, porcas e parafusos, próteses e dispositivos ortopédicos; gazes, colas e fios para sutura; ossos, tendões, cartilagens artificiais, articulações, pele e vasos sanguíneos artificiais; revestimentos de *stents*, catéteres, válvulas cardíacas e marcapassos; próteses para reconstrução maxilofacial, próteses para mamas e glúteos com fins estéticos, lentes de contato e intraoculares, reparos de orelha e nariz; aparelhos de diálise, bolsas de sangue para transfusão, dentre outros. Também se enquadram no biomateriais poliméricos: sistemas de entrega de fármacos e genes; tecidos e órgãos artificiais, sistemas integrados de diagnóstico e dispositivos de microeletrônica.⁸⁵⁻⁹⁰

Dentre os polímeros amplamente investigados neste contexto, pode-se citar poliésteres como poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico - co - ácido glicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL), poliamidas sintéticas como *Nylon 6* e *Nylon 66* e poliaminoácidos, poli(tereftalato de etileno) (PET) e poli(fumarato de propileno), poli(carbonato de trimetileno) (PTCM), poliuretanas, poli(orto-ésteres), poli(cianoacrilatos de alquila), polianidridos, poli(dioxanona), poli(anidrido-co-imida), polietileno de ultra alta massa molar (UHMMPE), polifosfazenos, polifosfoéteres, poli(tetrafluoroetileno) ou *Teflon* (PTFE), poli(metacrilato de metila) (PMMA), poliacetais, siliconas, poliéter(éter-cetona) (PEEK), polisulfona, poli(álcool vinílico) (PVA), poli(etilenoglicol) (PEG), poli(metacrilato de hidroxietila) (PHEMA), hidroxipropil metilcelulose (HPMC), proteínas como colágeno, elastina, albumina e fibrina, polialcanoa- tos e polissacarídeos como quitina, amido e celulose^{85,86}.

Neste contexto, alguns biomateriais poliméricos liberadores de NO foram reportados, como hidrogéis de HPMC e de Pluronic® incorporados com moléculas doadoras de NO como GSNO e SNAC, e polímeros como poliuretanas, borrachas de silicone, polipropilenoiminas, poliésteres, polialcoolvinílico, quitosana, oligo e polissacarídeos, modificados com grupos RSNO ou nonoato.⁹¹⁻⁹³ Trabalhos descrevendo doadores de NO macromoleculares hidrolisáveis são poucos, além de bastante recentes, refletindo em parte uma nova tendência e amadurecimento na pesquisa nesta área.⁹³⁻⁹⁶ Em um trabalho recente, *Yu et al.* propõe novas rotas de síntese de polímeros doadores de óxido nítrico,⁹⁷ confirmando que o desenvolvimento dessa classe de polímeros está em plena atividade.

Essa classe de biomateriais têm sido desenvolvida e investigada pelo grupo de pesquisa do prof. Marcelo Ganzarolli na forma de hidrogéis e filmes para aplicação tópica e revestimentos de catéteres e *stents* com ações vasodilatadoras, microbicidas, antitrombogênicas, cicatrizantes etc,^{50,52,98-107} conforme exposto no capítulo 5. O uso de filmes poliméricos doadores de NO para o recobrimento de dispositivos médicos

ou como dispositivos de administração tópica de NO foi relatado também por outros autores.

Yoo *et al.* desenvolveu filmes de uma blenda entre Carbopol, HPMC e PEG impregnados com GSNO para a administração de NO na mucosa vaginal de ratos com resultados positivos no tratamento da Síndrome do Desejo Hipoativo, caracterizada por diminuição da irrigação sanguínea na vagina que causa perda de desejo sexual.¹⁰⁸

Cai *et al.* utilizou filmes de PLGA impregnados com um NONOato, diazeniodiolato de dibutylhexildiamina (DBHD/NO), para recobrimento de dispositivos com ação microbicida, apresentando redução na massa de biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* de 98.4% e 99.9% *in vitro*, respectivamente.¹⁰⁹ Nablo *et al.* obteve resultados semelhantes utilizando implantes revestidos com um xerogel impregnado com NONOatos, contendo a infecção associada a implantação em ratos.¹¹⁰ Engelman *et al.* recobriu malhas de polipropileno, utilizadas no tratamento cirúrgico de hérnias abdominais, com um NONOato macromolecular e observou ação microbicida *in vitro*, mas nenhum efeito *in vivo*,¹¹¹ em contraste com os resultados apresentados por Nablo *et al.*

Dispositivos recobertos com filmes de xerogéis funcionalizados com grupos SNOs, copolímeros de sílica e poliuretano ou policloreto de polivinila (PVC) incorporados com DBHD/NO ou sílicas funcionalizadas com grupos NONOato, apresentaram melhoras na compatibilidade sanguínea atenuando agregação plaquetária em comparação com os dispositivos não recobertos.^{112–115}

Wu *et al.* cita ainda a possibilidade de recobrir dispositivos médicos com polímeros capazes de decompor RSNOs endógenos e produzir NO *in situ* continuamente e melhorar a biocompatibilidade entre o dispositivo e o sangue.¹¹⁶ Esta estratégia foi empregada por Yang *et al.* no recobrimento de *stents*, apresentando redução do fenômeno de reestenose, caracterizado pela diminuição do diâmetro interno do vaso sanguíneo no local onde o *stent* se encontra devido à formação de um tecido que recobre o dispositivo e o isola.¹¹⁷ Hetrick *et al.* relatou que a espessura do tecido fibrótico que envolve implantes devido à reação de corpo estranho pode ser diminuída ao recobrir os implantes com xerogéis liberadores de NO.⁹

Além de filmes, outros tipos de biomateriais poliméricos doadores de NO estão descritos na literatura como *tissue scaffolds*, hidrogéis, micro e nanopartículas, dendrímeros e micelas, apresentando a multitude de efeitos biológicos associados ao NO, como vasodilatação, cicatrização, prevenção da formação de trombose, ação bactericida, tratamento de reestenose, regeneração de tecidos etc.^{118–122}

A versatilidade de aplicação dos biomateriais poliméricos doadores de NO, sua diversidade, assim como quantidade e importância dos resultados biológicos já relatados mostram a importância dessa classe de materiais como objeto de investigação na atualidade.

1.3 Objetivos

O objetivo do trabalho descrito nessa Tese de Doutorado foi o desenvolvimento de um biomaterial polimérico liberador de NO e degradável em condições fisiológicas. A tese se desdobra em outros cinco capítulos: o capítulo 2, que trata da síntese e caracterização de um poliéster polissulfidrilado; o capítulo 3, que trata da preparação e caracterização de blendas de policaprolactona com poliéster polissulfidrilado; o capítulo 4, que trata sobre a degradação hidrolítica de blendas PCL/PSPE; o capítulo 5, que trata sobre a síntese de filmes nitrosados e caracterização de carga total e perfil de liberação de NO, assim como a avaliação *in vivo* da vasodilatação tópica causada pelos mesmos após aplicação sobre a pele e; o capítulo 6, onde algumas perspectivas são propostas a partir do trabalho desenvolvido nesta Tese de Doutorado.

CAPÍTULO 2

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE POLIÉSTER POLISSULFIDRILADO

S-nitrosotióis (RSNOs) endógenos como S-nitrosoglutationa (GSNO), S-nitrosocisteína (cisSNO) e S-nitrosoalbumina (AlbSNO) são conhecidos por armazenarem e transportarem óxido nítrico (NO) sob a forma da função orgânica S-nitrosotiol (SNO),¹²³ uma vez que o radical é bastante reativo e seu tempo de meia-vida em meio biológico é curto ($t_{1/2} \sim 1\text{ s}$).¹²⁴ RSNOs sintéticos de diferentes estabilidades e capacidades de armazenamento de NO são produzidos via S-nitrosação de intermediários sulfidrilaos.^{125,126} Neste contexto, a síntese de uma série de poliésteres polisulfidrilaos (PSPEs) foi descrita pelo grupo em uma patente e em artigos nos últimos dez anos.^{100,127–129} Esses polímeros foram obtidos através da reação de policondensação de ácido mercaptosuccínico com diferentes dióis, como etilenoglicol, polietilenoglicóis ou tioglicerol, levando a obtenção de PSPEs com maior ou menor abundância de grupos sulfidrilas em suas cadeias. Estes polímeros se apresentaram como líquidos incolores, transparentes e viscosos a temperatura ambiente. Filmes sólidos foram obtidos na forma de blendas com poli(metacrilato de metila) (PMMA) e foram utilizados no revestimento de *stents* metálicos e catéteres de poliuretana intravasculares. Após a imersão dos dispositivos em ácido nitroso e consequente S-nitrosação das sulfidrilas presentes no PSPE, mostraram-se capazes de liberar NO em diferentes taxas e quantidades, apresentando ação microbicida *in vitro* contra linhagens de bactérias gram-positivas e gram-negativas resistentes a múltiplos antibióticos e inibindo agregação plaquetária.^{100,127–129} Neste trabalho, um PSPE foi sintetizado para posterior preparação de filmes sólidos na forma de uma blenda com policaprolactona (PCL), visando o desenvolvimento de um biomaterial degradável e liberador de NO.

Neste capítulo, a síntese e caracterização de um PSPE, assim como sua S-nitrosação, foram apresentadas e discutidas.

2.1 Parte Experimental

2.1.1 Materiais

Ácido mercaptosuccínico (AMS), 1-tioglicerol e ácido p-tolueno sulfônico (pTSA) foram comprados da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). HCl concentrado foi comprado da TEDIA (Tedia Company, Fairfield, EUA). Ácido etilenodiamintetracético (EDTA), NaHCO_3 , tetrahidrofurano (THF) e dietiléter foram comprados da Synth (Labsynth, Diadema, Brasil). NO foi obtido da White Martins (São Paulo, Brasil). AMS foi purificado por extração com dietiléter. Todos os demais reagentes foram utilizados conforme adquiridos.

2.1.2 Síntese e purificação

PSPE foi sintetizado a partir da esterificação de quantidades equimolares de AMS (4,96 g) e 1-tioglicerol (2,75 mL) catalisada por pTSA (17,4 mg), na presença de EDTA (11,2 mg), em um balão de fundo redondo em refluxo e sob fluxo constante de N_2 . A reação se deu durante 15 h, a 120 °C sob agitação magnética. O produto foi solubilizado em acetona e purificado por precipitação em água gelada por quatro vezes, em procedimento adaptado de *Seabra et al.*¹²⁷ Em seguida, o precipitado foi isolado e liofilizado (Virtis, Gardiner, NY, EUA). Para experimentos deste capítulo, poliéster polinitrosado (PNPE) foi sintetizado através do borbulhamento de NO em solução de PSPE em acetona até o aparecimento de uma coloração vermelha intensa.

2.1.3 Espectroscopia vibracional no infravermelho (IV)

Espectros no IV de PSPE e PNPE sob a forma de filmes líquidos depositados sobre a superfície de celas de CaF_2 e AMS em pastilhas de KBr foram obtidos à temperatura ambiente em um espectrofotômetro (FTIR Bomem B100, Hartmann and Braun, EUA) no intervalo de 4000 – 1000 cm^{-1} .

2.1.4 Espectrometria de absorção molecular no ultravioleta-visível (UV-vis)

Espectros de absorção no UV-vis de PNPE sob a forma de um filme líquido depositado em cubeta desmontável de quartzo foram obtidos à temperatura ambiente em es-

pectrofotômetro UV-vis (Hewlett Packard HP-8453, EUA) no intervalo de 220 – 1100 nm.

2.1.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

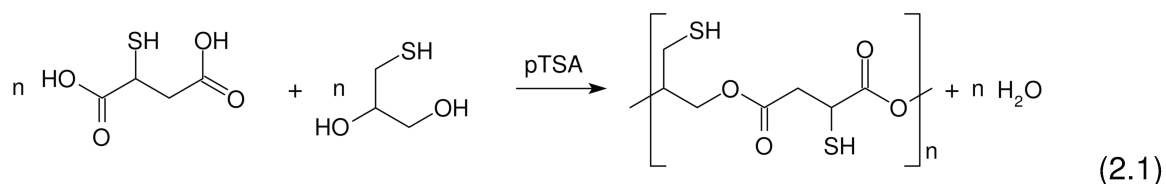
PSPE foi analisado por DSC em um calorímetro Q-100 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA) previamente calibrado com In. Uma amostra com aproximadamente 10 mg foi colocada dentro de uma panela de alumínio e sujeita ao seguinte protocolo: resfriamento a 10°C/min até -60°C sob fluxo de argônio, seguido de aquecimento a 20°C/min até 120°C. A temperatura de transição vítrea (T_g) foi determinada assinalando a temperatura em que ocorreu transição de segunda ordem em um gráfico de fluxo de calor em função da temperatura.

2.1.6 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

Um equipamento de GPC com detector por índice de refração (Viscotek VE 3580) e um sistema de colunas (1 x Viscotek TGuard 10 x 4,6 mm² e 3 x Viscotek T6000M 300 x 7,8 mm² com partículas de 10 µm) foi utilizado para obter a massa molar média (M_w) do PSPE. THF foi utilizado como eluente e a concentração das soluções poliméricas injetadas nas colunas foi de 5 mg/mL em THF. Poliestirenos com massas molares entre 1050 e 3800000 g/mol foram usados como padrão.

2.2 Resultados e Discussão

A reação de síntese do PSPE utilizado nos experimentos descritos neste trabalho consiste na policondensação de AMS e 1-tioglicerol catalisada por pTSA (Eq. 2.1), com 50% de rendimento.



A Figura 2.1 mostra em detalhes o mecanismo da reação de policondensação a partir de diácidos e dióis e catalisada por ácido, estratégia utilizada na síntese do PSPE. Um H⁺ proveniente do catalisador ácido pTSA se liga ao oxigênio de carbonila do diácido estabilizando a estrutura de ressonância em que a ligação π entre carbono e oxigênio é quebrada, resultando em carga parcial positiva no carbono da carbonila do diácido. Em seguida, o diácido ativado participa de uma reação de substituição

nucleofílica onde a carbonila ativada sofre ataque por um grupo hidroxila do diol, produzindo uma molécula de água e um éster terminado por um grupo funcional ácido carboxílico em uma extremidade e por um álcool na outra. Este éster é passível de novas e sucessivas reações com dióis e diácidos, possibilitando o crescimento da cadeia e a obtenção de poliésteres. A síntese do PSPE foi realizada a 120 °C, garantindo que a água produzida durante a esterificação fosse para a fase de vapor e subitamente arrastada por um fluxo constante de N₂. A retirada de água do meio reacional desloca o equilíbrio na direção de formação do poliéster.

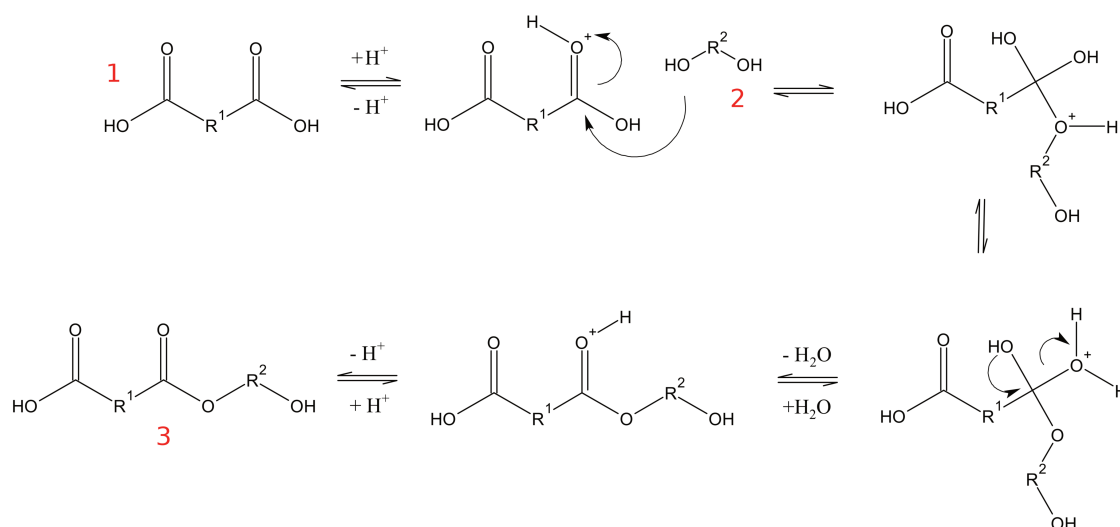


Figura 2.1: Mecanismo de esterificação a partir de um diácido (1) e um diol (2) levando à formação de um éster (3) terminado por um grupo funcional ácido carboxílico em uma de suas extremidades e por um álcool na outra.

A massa molar média (M_w)^a do PSPE determinada por GPC foi de 931 g mol⁻¹ (Fig. 2.2) o que corresponde a um oligômero com quatro unidades éster. A baixa massa molar do polímero associada com seus possíveis isômeros estruturais resultam em um líquido viscoso à temperatura ambiente e um sólido amorfo em temperaturas abaixo de 15 °C, sendo esta sua temperatura de transição vítrea (T_g), determinada por DSC. A determinação da M_w , T_g e demais caracterizações deste PSPE que constam neste trabalho não foi reportada anteriormente.

A síntese do PSPE foi verificada por espectroscopia vibracional no IV através do deslocamento da banda de absorção referente ao estiramento da ligação C-O da carbonila (Fig. 2.3), que em ácidos carboxílicos aparece em 1700 – 1725 cm⁻¹ e em ésteres aparece em 1735 – 1750 cm⁻¹. A banda de carbonila nos espectros do AMS e PSPE se deslocou de 1693 cm⁻¹ para 1732 cm⁻¹, respectivamente, confirmando a esterificação.

^a $M_w = \frac{\sum M_i^2 N_i}{\sum M_i N_i}$, onde N_i é o número de moléculas de massa molar M_i .

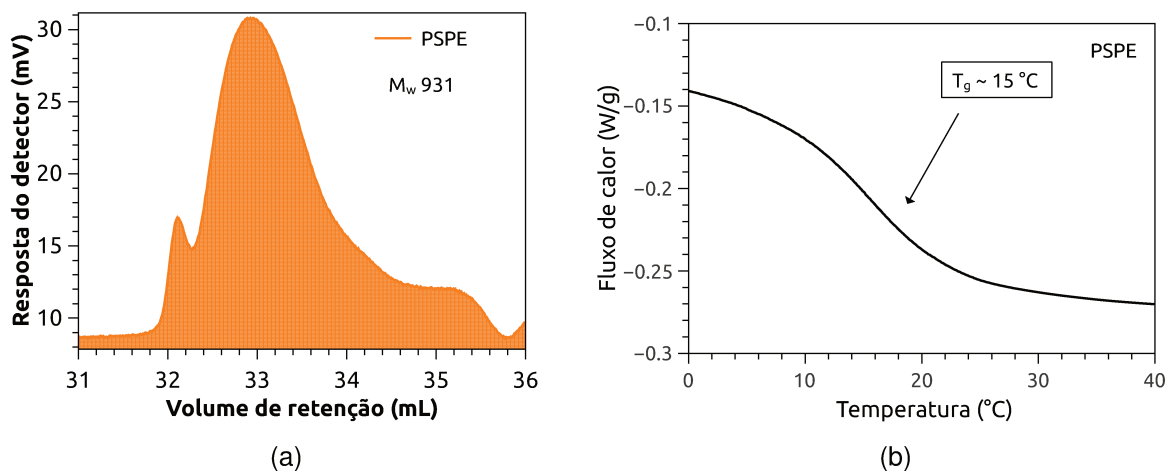


Figura 2.2: Cromatograma de permeação em gel (a) e curva de DSC (b) para o poliéster polissulfidrilado.

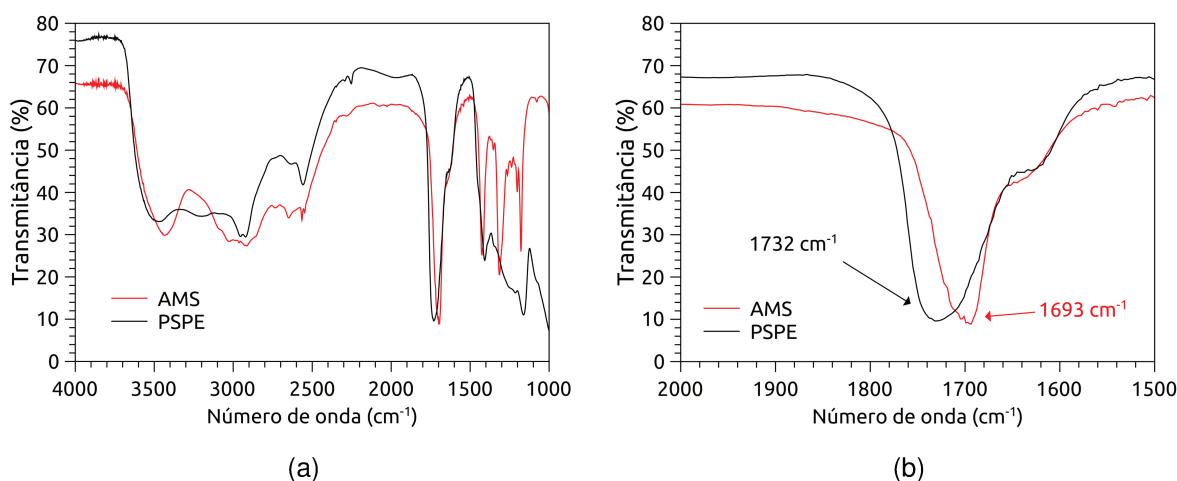
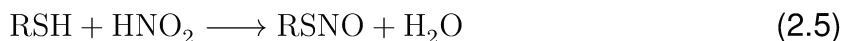


Figura 2.3: (a) Espectros no infravermelho do poliéster polissulfidrilado (PSPE) e do ácido mercaptosuccínico (AMS). (b) Aumento do espectro na região onde há o aparecimento das bandas de carbonila de éster, em 1732 cm^{-1} , presente no PSPE e de ácido, em 1693 cm^{-1} , presente no AMS.

O PSPE é o intermediário sulfidrilado utilizado na obtenção de PNPE ao decorrer deste trabalho. A sua S-nitrosação foi verificada a partir da reação com a espécie nitrosante N_2O_3 , formada a partir da reação entre NO e O_2 (Eqs. 2.2 e 2.3), preparada *in situ* em uma solução de PSPE em acetona por fluxo constante de NO gasoso. Os grupos SH do PSPE foram nitrosados pelo N_2O_3 levando à formação de solução de PNPE (Eqs. 2.4 e 2.5), de coloração avermelhada.





A síntese do PNPE foi verificada por IV pelo aparecimento da banda de absorção referente ao estiramento da ligação N-O do grupo SNO, em 1530 cm^{-1} , conforme a Figura 2.4. A banda de absorção em 1920 cm^{-1} no espectro do PNPE é causada pelo estiramento da ligação N-O de NO gasoso residual dissolvido no polímero no momento da medida.

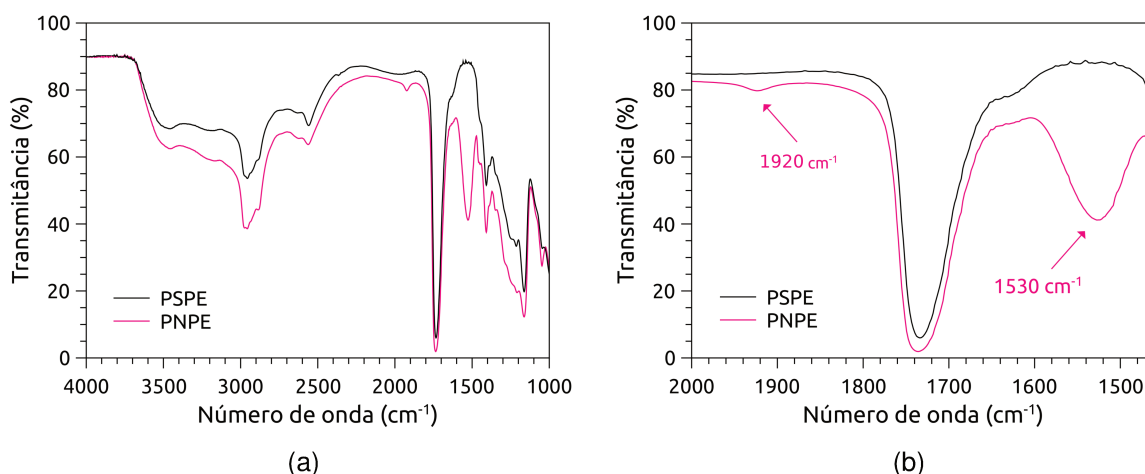


Figura 2.4: (a) Espectros no infravermelho do poliéster polissulfidrilado, PSPE e do poliéster polinitrosado, PNPE, obtidos em janela de CaF_2 . (b) Aumento do espectro na região onde há o aparecimento da banda referente ao estiramento da ligação NO, em 1530 cm^{-1} , presente no PNPE e ausente no PSPE.

RSNOs têm bandas de absorção características no UV-vis referentes às transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ (336 nm) e $n_N \rightarrow \pi^*$ (545 nm).^{98,130} O PNPE sintetizado absorve em 342 nm e em 545 nm , conforme mostra a Figura 2.5. A banda em 545 nm é a responsável pela coloração avermelhada apresentada pelo polímero.

Além dos PSPEs preparados pelo grupo, alguns outros poliésteres sulfidrilados já foram reportados como intermediários para S-nitrosação. *Damodaran et al.* reportaram uma série de cinco PLGAs modificados com as moléculas sulfidriladas: cisteína, cisteamina, penicilamina, glutathione e homocisteína, e *Coneski et al.* reportaram uma série de 26 poliésteres obtidos a partir da policondensação de ácido glutárico ou adípico com glicerol ou pentaeritritol e posteriormente modificados com cisteamina ou penicilamina. Neste contexto, os PSPEs são os que apresentam a maior quantidade

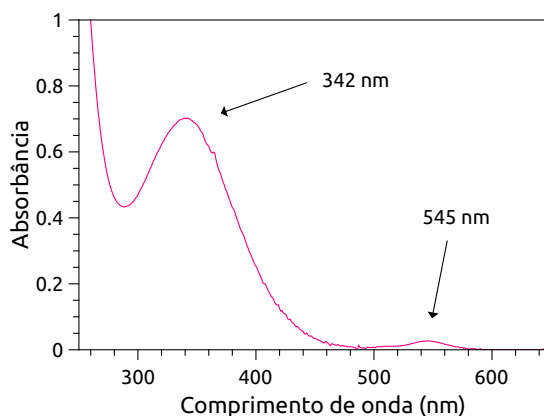


Figura 2.5: Espectro de absorção no UV-vis do poliéster polinitrosado (PNPE). As absorções em destaque são referentes às transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ (336 nm) e $n_N \rightarrow \pi^*$ (545 nm), características da função orgânica S-nitrosotiol.

de sulfidrilas na cadeia polimérica, sendo capazes *a priori* de armazenar mais NO sob a forma de SNO.

2.3 Conclusão

O PSPE foi sintetizado a partir da policondensação de 1-tioglicerol e ácido mercaptosuccínico, apresentando-se como um líquido viscoso à temperatura ambiente, e foi utilizado como precursor sulfidrilado para a produção de um RSNO macromolecular de baixa massa molar com sucesso.

CAPÍTULO 3

BLENDAS DE POLIÉSTER POLISSULFIDRILADO COM POLICAPROLACTONA

Poliésteres sulfidrilados são empregados no desenvolvimento de revestimentos, tintas, lubrificantes, embalagens e dispositivos médicos em função das propriedades microbidas e antioxidantes de seus produtos de degradação hidrolítica.¹³¹ A S-nitrosação dos grupos sulfidril (SH) permite ainda a produção de toda uma gama de materiais liberadores de NO, conforme apresentado no capítulo 2. Neste contexto, o grupo tem experiência na síntese de poliésteres polisulfidrilados, obtidos na forma de líquidos viscosos à temperatura ambiente, e preparação de suas blendas com poli(metacrilato de metila) (PMMA), utilizadas no revestimento de catéteres que apresentaram ação anti-agregação plaquetária.^{127,132}

Neste trabalho, foram preparados filmes sólidos da blenda entre PSPE e policaprolactona (PCL), um poliéster semi-cristalino empregado em diversos dispositivos médicos. A PCL tem massa molar média (M_n)^a de 3000-80000 $g\ mol^{-1}$, sofre transição vítrea em $-60^\circ C$ e fusão entre $59-64^\circ C$ e é solúvel em clorofórmio, diclorometano, benzeno, tolueno e ciclohexanona à temperatura ambiente, além de apresentar excepcional compatibilidade de blenda.¹³³⁻¹³⁵ A degradação hidrolítica da PCL em meio fisiológico é lenta¹³⁶ e este poliéster tem sido empregado, puro ou na forma de blendas ou compósitos, em dispositivos implantáveis como pinos, parafusos e fios de sutura, e nanotecnológicos como nanopartículas, nanoesferas e nanofios eluidores de moléculas com atividade biológica, além de filmes e matrizes para regeneração/crescimento de cartilagens, tendões e ossos.¹³⁷⁻¹⁴⁵

^a $M_n = \frac{\sum M_i N_i}{\sum N_i}$, onde N_i é o número de moléculas de massa molar M_i .

Neste capítulo, a caracterização da miscibilidade e a cinética de cristalização da PCL em função do teor de PSPE nas blendas PCL/PSPE foram estudadas e discutidas sob vários ângulos.

3.1 Procedimento Experimental

3.1.1 Materiais

Policaprolactona (PCL M_n 80000) foi obtida da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Tetrahidrofurano (THF) foi comprado da Synth (Labsynth, Diadema, Brasil). PSPE foi sintetizado como descrito no capítulo 2.

3.1.2 Preparação de blendas

Soluções de PCL/PSPE em THF (40 g L^{-1}) foram preparadas nas razões mássicas: 100/0, 95/5 (PCL/PSPE05), 90/10 (PCL/PSPE10), 85/15 (PCL/PSPE15), 80/20 (PCL/PSPE20), 75/25 (PCL/PSPE25), 70/30 (PCL/PSPE30), 65/35 (PCL/PSPE35), 60/40 (PCL/PSPE40), 55/45 (PCL/PSPE45) e 50/50 (PCL/PSPE50). Filmes foram preparados por *casting* em placas de *Petri* de 15 cm de diâmetro contendo 30 mL de cada solução. A evaporação se deu durante 24 h à temperatura ambiente com as placas de *Petri* cobertas com suas respectivas tampas, levando à formação de filmes com espessura próxima a 30 μm . Os filmes foram removidos das placas e estocados até análise. Somente a área central dos filmes foi utilizada, descartando uma borda de 1 cm.

3.1.3 Análise termogravimétrica (TGA)

Amostras de filmes PCL/PSPE em diferentes proporções de aproximadamente 10 mg foram submetidas a uma rampa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera de argônio e a perda de massa foi avaliada em um equipamento de análise termogravimétrica (TA Instruments, modelo 2050).

3.1.4 Difração de raios-X (DRX)

Filmes de PCL e PCL/PSPE45 foram caracterizados por DRX em um difratômetro Shimadzu XDR7000 (Shimadzu Corp., Tokyo, Japan) com radiação da linha K_α de cobre ($\lambda = 1,54\text{ \AA}$) operado a 40 kV e 30 mA com ângulo de varredura contínuo de $2,0^\circ\text{ min}^{-1}$ na faixa de $10 - 50^\circ$.

3.1.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (EDS)

Imagens de filmes de PCL/PSPE de diferentes proporções foram obtidas com um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6360 LV (Jeol Ltd., Tokyo, Japan), operando a 20 KeV. As amostras foram previamente recobertas com uma liga de Au/Pd utilizando um metalizador a alto vácuo Bal-Tec MED 020 (BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein). EDS foi utilizada para mapear átomos de enxofre na superfície de filmes de PCL/PSPE45.

3.1.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Termogramas de filmes de PCL/PSPE em diferentes proporções foram obtidos por calorimetria exploratória diferencial (DSC) com um calorímetro Q-100 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA) previamente calibrado com índio. Amostras dos filmes com aproximadamente 10 mg foram colocadas dentro de panelas de alumínio e para cada experimento, utilizou-se determinado protocolo, todos descritos abaixo. Somente as segundas curvas de aquecimentos foram utilizadas. Análise por TGA demonstrou que não há degradação dos componentes da blenda nos intervalos de temperatura dos estudos por DSC aqui relatados.

1. Temperatura de transição vítrea - amostras de PSPE, PCL/PSPE10, PCL/PSPE20, PCL/PSPE30, PCL/PSPE40 e PCL/PSPE50 foram colocadas em panelinhas de alumínio e sujeitas ao seguinte protocolo: aquecimento a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 120°C sob fluxo de argônio, seguido de resfriamento a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -60°C . A temperatura de transição vítrea para cada material foi determinadas graficando o fluxo de calor em função da temperatura.
2. Recristalização - amostras de PCL/PSPE45 foram colocadas em panelinhas de alumínio e sujeitas ao seguinte protocolo: aquecimento a $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 120°C sob fluxo de argônio. Resfriamento a $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -60°C seguido por aquecimento a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 120°C . Repetiu-se o resfriamento seguido por aquecimento nas taxas de 5, 10, 15, 20 e $25^{\circ}\text{C min}^{-1}$. As temperaturas de fusão para cada material foram determinadas graficando o fluxo de calor em função da temperatura.
3. Segunda cristalização - amostras de PCL/PSPE45 foram colocadas em panelinhas de alumínio e sujeitas ao seguinte protocolo: aquecimento a $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 120°C sob fluxo de argônio. Resfriamento a $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -60°C seguido por aquecimento a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 120°C . Repetiu-se o resfriamento seguido por aquecimento utilizando taxas de resfriamento de 5, 10, 15, 20 e $25^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

As temperaturas de fusão para cada material foram determinadas graficando o fluxo de calor em função da temperatura.

4. Hoffman-Weeks e Avrami-Arrhenius - amostras de PSPE, PCL/PSPE05, PCL/PSPE10, PCL/PSPE15, PCL/PSPE20, PCL/PSPE25, PCL/PSPE30, PCL/PSPE40 e PCL/PSPE50 foram colocadas em panelinhas de alumínio e sujeitas ao seguinte protocolo: aquecimento a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 120°C sob fluxo de argônio. Resfriamento isotérmico até completa cristalização seguido por aquecimento a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 120°C . As etapas de resfriamento seguido por aquecimento foram feitas utilizando quatro diferentes temperaturas para cristalização isotérmica, determinadas empiricamente. As isotermas de cristalização obtidas para cada material graficando fluxo de calor em função do tempo.

3.1.7 Microscopia óptica com luz polarizada (POM)

POM foi utilizada na caracterização da morfologia de esferulitos de filmes PCL/PSPE15, PCL/PSPE35 and PCL/PSPE45, utilizando um microscópio óptico (Eclipse 50i, Nikon, Tokyo, Japan) com polarizadores. Filmes foram preparados em um *spin-coater* (WS-650-MZ-23NPP, Laurell Technologies Corp., North Wales, EUA) adicionando $100\ \mu\text{L}$ de solução de PCL/PSPE em THF ($40\ \text{mg mL}^{-1}$) em lâminas de vidro. Parâmetros do *spin-coater*: (passo 1) rampa de $500\ \text{rpm}$ e aceleração de $500\ \text{rpm s}^{-1}$ durante $2,0\ \text{s}$; (passo 2) rampa de $2000\ \text{rpm}$ e aceleração de $1500\ \text{rpm s}^{-1}$ durante $1,5\ \text{s}$; (passo 3) rampa de $4000\ \text{rpm}$ e aceleração de $2000\ \text{rpm s}^{-1}$ durante $30\ \text{s}$. Os filmes foram fundidos a $120^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e recristalizados isotermicamente a 35°C .

3.2 Resultados e Discussão

3.2.1 Morfologia de filmes

Filmes da blenda PCL/PSPE foram preparados em moldes de *Nylon* por evaporação de solvente de uma solução dos polímeros em THF, conforme descrito na seção 3.1.2. Determinou-se empiricamente que no intervalo de teores de PSPE entre 0-45 % em massa filmes íntegros e flexíveis sem aparente separação de fases podem ser preparados. As Figuras 3.1 e 3.2 mostram micrografias obtidas por MEV da superfície superior e *bulk* de filmes de PCL e PCL/PSPE45. As imagens da superfície dos filmes mostram que a incorporação de PSPE na PCL aumentou a rugosidade dos mesmos. Por outro lado, a presença do PSPE não altera a morfologia do *bulk* desses filmes uma vez que ambos são densos e apresentam camadas sobrepostas, típicas de polímeros semicristalinos como a PCL.

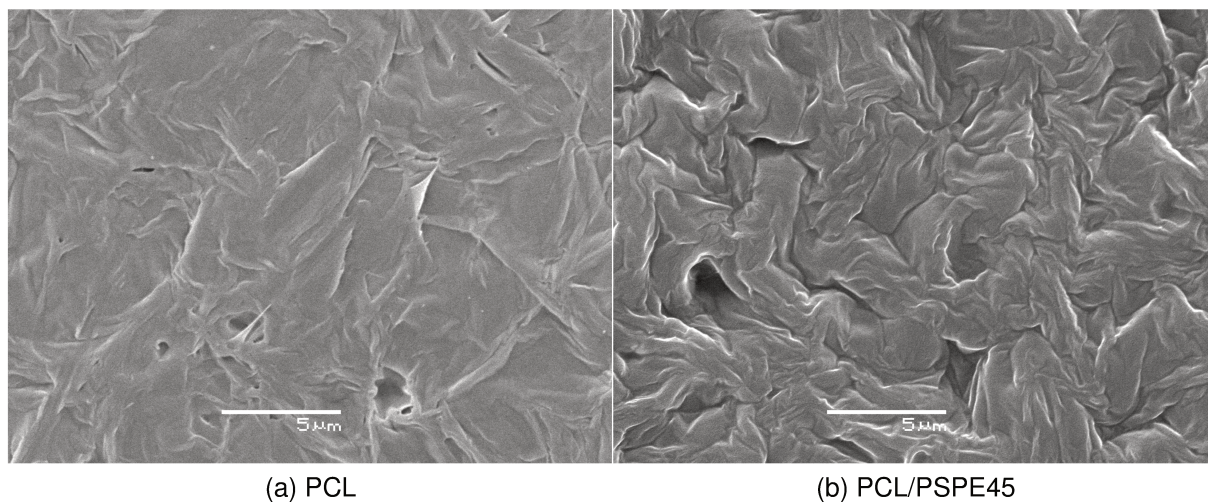


Figura 3.1: Imagens de elétrons secundários obtidas por MEV da superfície superior de filmes de PCL (a) e PCL/PSPE45 (b). Barra de escala: 5 μm .

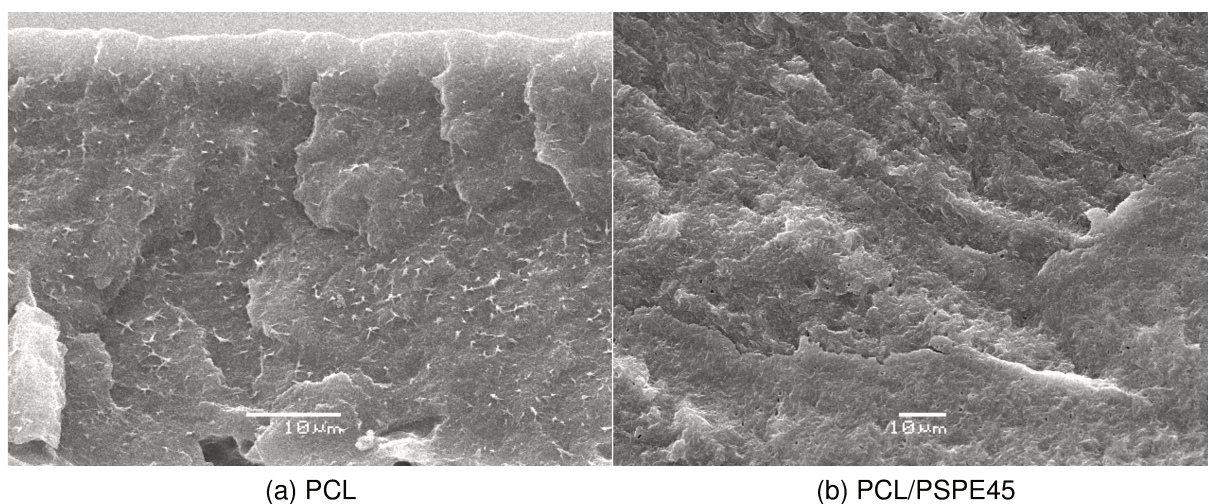


Figura 3.2: Imagens de elétrons secundários obtidas por MEV do *bulk* de filmes de PCL (a) e PCL/PSPE45 (b), acessados por fratura criogênica. Barra de escala: 10 μm .

A Figura 3.3 mostra o espectro de emissão de raios-X e o mapa de EDS para átomos de enxofre da superfície de um filme de PCL/PSPE45. O espectro identifica a presença de carbono, oxigênio e enxofre, átomos que constituem as cadeias poliméricas da PCL e do PSPE. Os átomos de enxofre são provenientes dos grupos sulfidríla do PSPE e, portanto, o mapeamento de enxofre por EDS permite avaliar sua distribuição na superfície do filme. O mapa mostra que o PSPE é distribuído uniformemente em toda a área analisada sem qualquer evidência de domínios de composição ou de separação de fases na magnificação utilizada, em concordância com a observação empírica mencionada no parágrafo anterior. Em trabalhos anteriores do grupo, blends entre PMMA e PSPE também se mostraram miscíveis no mesmo intervalo de composições.^{127,132}

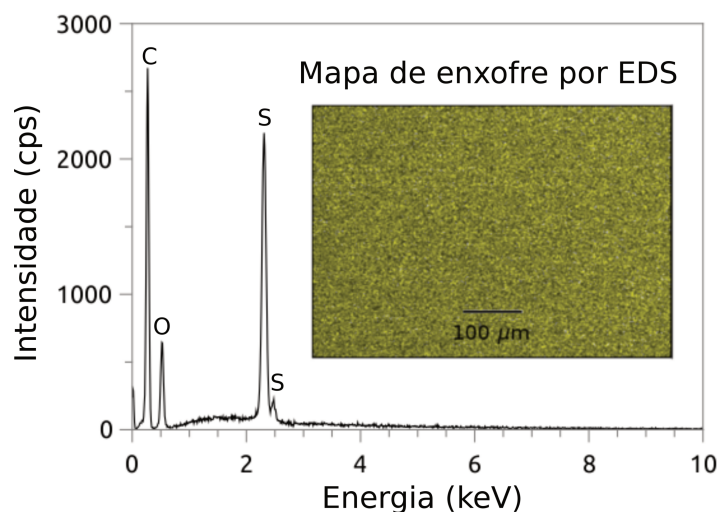


Figura 3.3: Análise elementar de um filme PCL/PSPE45 mostrando picos de EDS para o carbono, oxigênio e enxofre. *Inset*: mapa de átomos de enxofre (em amarelo) por EDS da superfície de um filme de PCL/PSPE45. Barra de escala: 100 μm .

3.2.2 Cristalização da policaprolactona nas blendas

Imagens de filmes de blendas PCL/PSPE cristalizados a 35 °C a partir do fundido^b sobre lâminas de vidro foram obtidas por microscopia óptica com luz polarizada (POM) e podem ser vistas na Figura 3.4. Os filmes das blendas são formados por esferulitos de PCL cuja quantidade diminui e cujos diâmetros aumentam com o aumento dos teores de PSPE. As imagens de POM não apresentam qualquer evidência de segregação de PSPE na fronteira dos esferulitos, em contraste com a já documentada segregação interesferulítica do componente amorfo para misturas entre PCL e poliestireno¹⁴⁶ ou polietileno clorado¹⁴⁷. Portanto, o PSPE encontra-se dentro dos esferulitos misturado com a PCL amorfa em regiões interlamelares e/ou interfibrilares, como já relatado para a segregação de Fenoxi em misturas entre PCL e Fenoxi.¹⁴⁸ Este resultado é coerente com a distribuição uniforme de PSPE nos filmes observada por EDS, conforme discutido na seção 3.2.1.

A Figura 3.5 mostra a formação de núcleos de PCL e crescimento em fundidos super-resfriados de PCL pura e da blenda PCL/PSPE45 em função do tempo. Observa-se que o processo de cristalização na blenda é mais lento. Para entender o papel do PSPE na cristalização da PCL presente nas blendas PCL/PSPE deve-se entender como o PSPE afeta os dois processos que a governam: a nucleação e o crescimento de cristalitos a partir destes núcleos.

A nucleação é governada pela termodinâmica: a energia livre de nucleação, ou

^bA temperatura de fusão da PCL nas blendas PCL/PSPE foi determinada e é apresentada na seção 3.2.3. Mostrou-se que abaixo de 45 °C os fundidos das blendas PCL/PSPE se encontram super-resfriados.

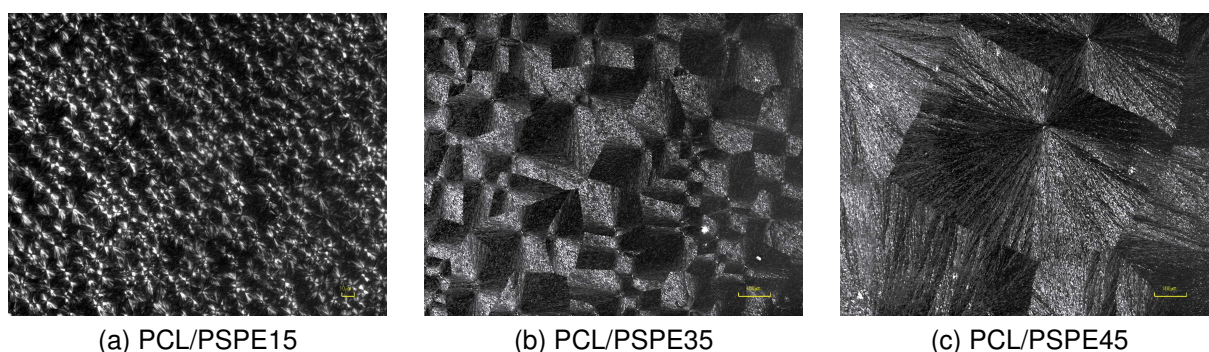


Figura 3.4: Imagens obtidas por microscopia óptica com luz polarizada mostrando a morfologia esferulítica da PCL em filmes de blendas PCL/PSPE após cristalização isotérmica a partir do fundido a 35°C em lâminas de vidro. (a) PCL/PSPE15, (b) PCL/PSPE35 e (c) PCL/PSPE45. Barras de escala: $10\ \mu\text{m}$ (a); $100\ \mu\text{m}$ (b e c).

seja, a energia livre associada ao processo de formação de núcleos a partir do fundido polimérico super-resfriado determina a espontaneidade do processo que é favorecida pela entalpia de cristalização, fenômeno exotérmico e portanto favorecido pelo abaixamento da temperatura, e desfavorecida pelo trabalho de expansão necessário para criar a superfície de um núcleo. Assim, a temperatura e a energia interfacial entre a superfície dos núcleos e o fundido determinam a taxa de nucleação.¹⁴⁹ A Figura 3.6a mostra que a taxa de nucleação a partir do fundido de PCL pura é cerca de vinte vezes maior que a partir do fundido da blenda PCL/PSPE45 em uma mesma temperatura de super-resfriamento, a temperatura ambiente. Portanto, a energia interfacial entre os núcleos de PCL e o fundido controla a taxa de nucleação neste sistema. O teor de PSPE na blenda é quem altera a natureza do fundido e portanto afeta a taxa de nucleação da PCL, e consequentemente suas cinéticas de cristalização, em cada composição.

A cristalização é governada pela cinética: a alta viscosidade do fundido dificulta a difusão das cadeias do polímero cristalizável que se alinham às recém formadas lamelas a partir do núcleo cristalino, através de movimentos de reptação, dando sequência ao crescimento do cristal. Em outras palavras, o aumento da viscosidade do fundido diminui a taxa de crescimento dos cristalitos. A viscosidade da blenda PCL/PSPE45 fundida a 80°C é dez vezes menor que a da PCL pura fundida à mesma temperatura^c e portanto a taxa de crescimento radial dos esferulitos de PCL na blenda fundida deveria ser maior que na PCL pura fundida. Observou-se de fato que a taxa de crescimento dos esferulitos na blenda fundida é quase 20% maior que na PCL pura, conforme a Figura 3.6b.

A cinética de cristalização da PCL nas blendas foi estudada também por calori-

^cAs viscosidades comparativas foram determinadas através da medida do tempo necessário para que uma esfera de aço sedimentasse numa coluna de mesma altura dos respectivos fundidos.

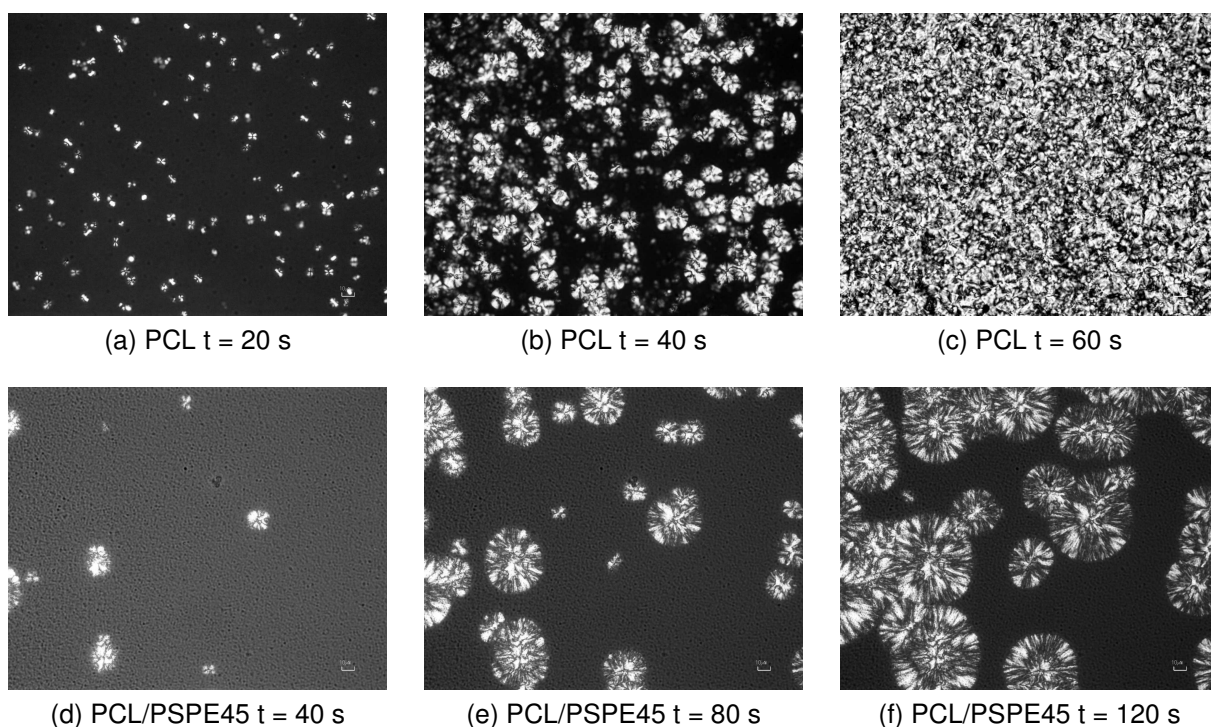


Figura 3.5: Nucleação e crescimento de esferulitos de PCL em fundidos de PCL e PCL/PSPE45 à temperatura ambiente acompanhado por microscopia óptica com luz polarizada. Barras de escala: $10\ \mu m$.

metria exploratória diferencial possibilitando um entendimento mais completo da influência do poliéster amorfo na mesma. A Figura 3.7b mostra as curvas normalizadas obtidas a partir da integração das curvas de cristalização isotérmica da blenda PCL/PSPE05 a diferentes temperaturas (Fig. 3.7a). Observa-se para esta e outras composições da blenda que o aumento da temperatura de cristalização diminui a velocidade do processo ou seja que há diminuição da taxa de nucleação e portanto da cristalização como um todo.

As curvas podem ser separadas em duas etapas distintas: na primeira, há crescimento livre dos esferulitos a partir dos núcleos; na segunda, o crescimento dos esferulitos é limitado pela presença de outros na sua vizinhança. A Figura 3.7c mostra a primeira parte das curvas ajustadas a crescimentos exponenciais de acordo com o método de Avrami, utilizando a Eq. 3.1 na sua forma linearizada, onde $Y(t)$ é a extensão do processo de cristalização, $K(T)$ é a constante de velocidade àquela temperatura e n é uma constante relacionada à natureza dimensional dos cristais formados.^{150–153} Para todas as composições, n é aproximadamente igual a 1, o que significa de acordo com Avrami que os cristais crescem radial e bidimensionalmente. É importante frisar que no método de Avrami assume-se que a composição das fases sólida e fundida é idêntica e não varia durante toda a cristalização. Essa condição pode ser satisfeita, no caso do crescimento de esferulitos de PCL a partir de fundidos das blendas

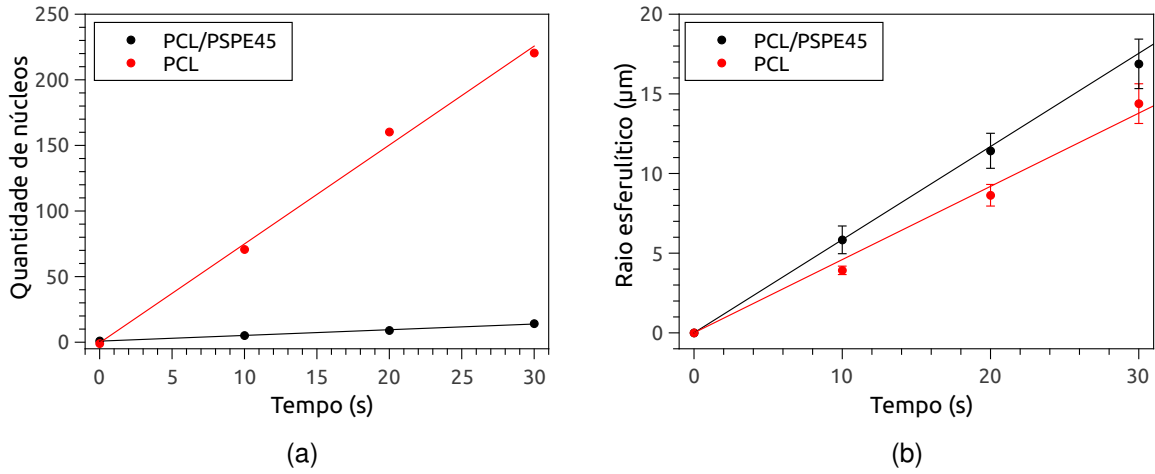


Figura 3.6: Evolução do número total de núcleos de PCL (a) e crescimento radial dos respectivos esferulitos (b), a partir de fundidos de filmes de PCL e PCL/PSPE45 à temperatura ambiente.

PCL/PSPE, se o PSPE misturar-se à fase amorfa da PCL nos esferulitos, o que reforça o modelo proposto na seção 3.2.2.

$$Y(t) = 1 - \exp(-K(T)t^n) \quad (3.1)$$

Ao isolar-se os valores de $K(T)$ é possível determinar a energia de ativação do processo (E_a) de cristalização para uma determinada composição de blenda através da equação de Arrhenius (Eq. 3.2), graficando $\ln(K)$ em função do inverso da temperatura e isolando E_a . O comportamento da constante de velocidade $K(T)$ em função da temperatura para a cristalização da blenda PCL/PSPE05 e demais composições obedecem à equação de Arrhenius, conforme se observa na Figura 3.7d.

$$\ln(K) = -\frac{E_a}{R} \frac{1}{T} + \ln(A) \quad (3.2)$$

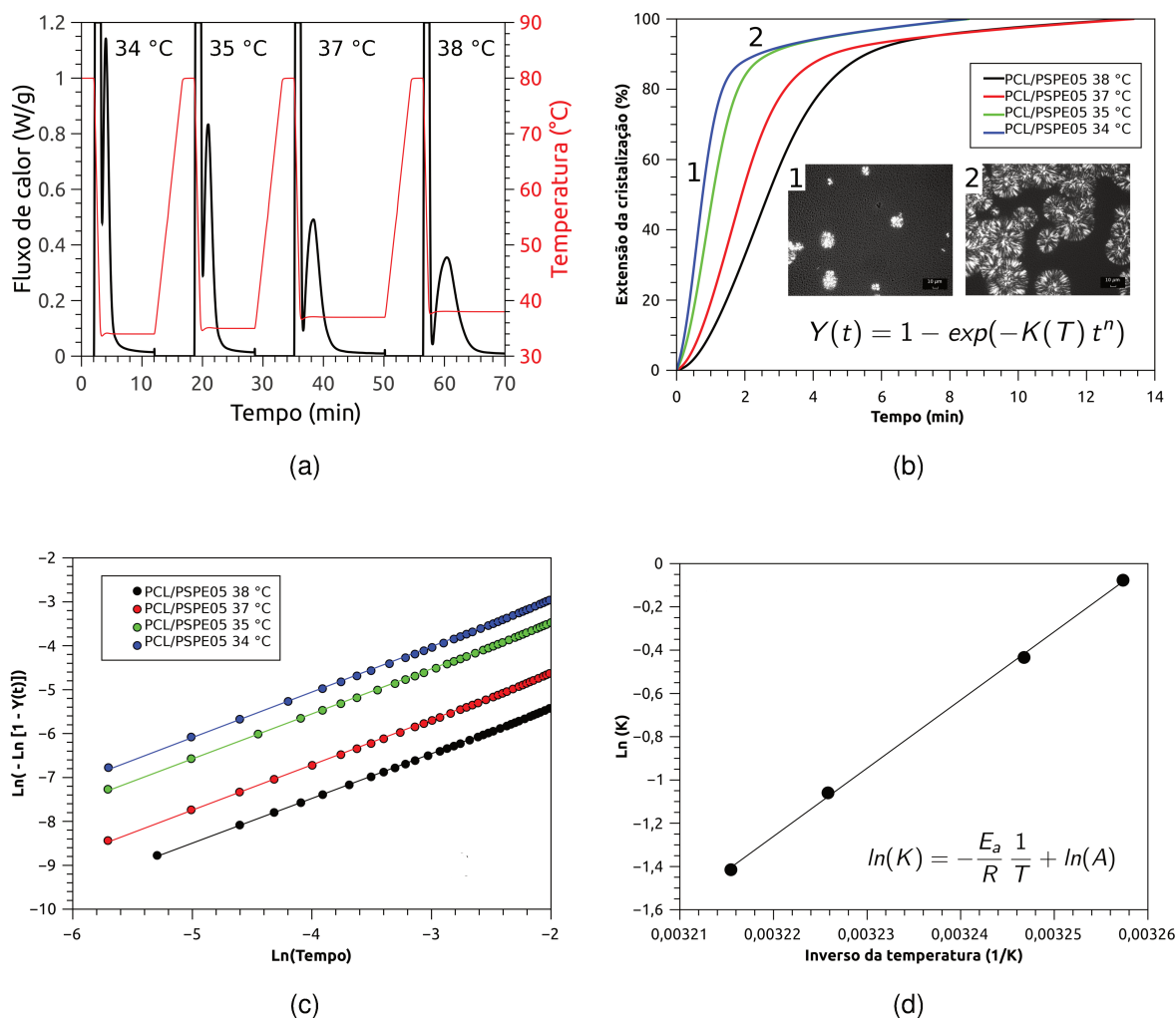


Figura 3.7: (a) Termogramas de cristalização isotérmica do PCL/PSPE05 a 34, 35, 37 e 38 °C. (b) Curvas integrais normalizadas da extensão das cristalizações isotérmicas do PCL/PSPE05 a 34 (azul), 35 (verde), 37 (vermelho) e 38 °C (preto). (c) *Plot de Avrami* e (d) *Plot de Arrhenius* para o PCL/PSPE05.

Com os valores de energia de ativação para cada composição da blenda, foi possível avaliar a variação daqueles em função da composição desta, conforme a Figura 3.8a. Observa-se que a energia de ativação não varia com a composição, seu valor estando por volta de -220 kJ/mol , evidenciando que a natureza dos cristais formados em todos os casos é a mesma. O difratograma de PCL mostra dois picos intensos referentes aos planos de índices 110 e 220^{154,155}, que também aparecem nas mesmas posições nos difratogramas do filme de PCL/PSPE45, indicando que não há influência do PSPE sobre os parâmetros cristalinos da cela unitária do PCL (Fig. 3.8b). Ambos os resultados mostram que as moléculas de PCL se empacotam em células unitárias de mesmas dimensões e retículos de Bravais, independentemente da presença do PSPE nas blends.

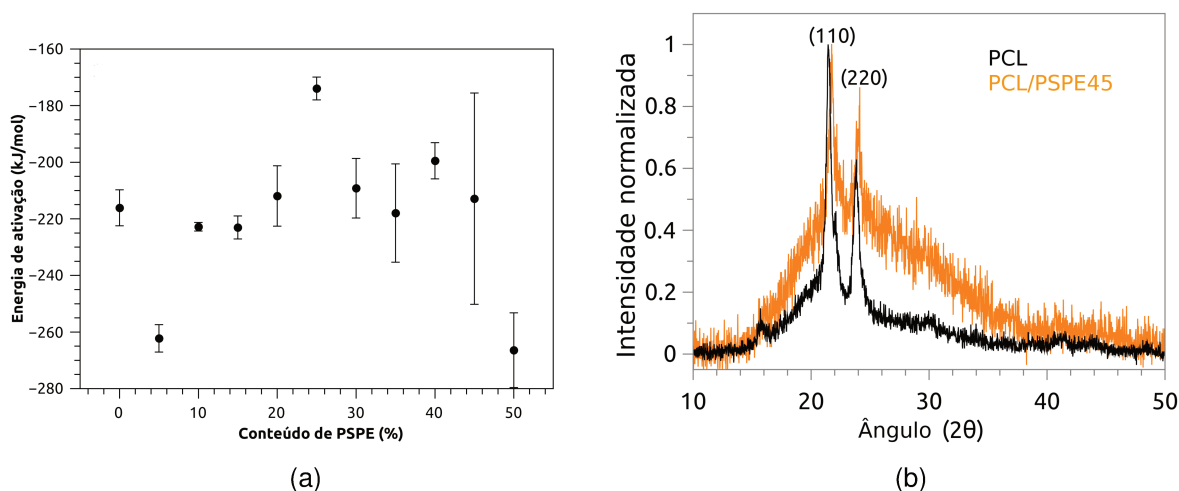


Figura 3.8: (a) Energia de ativação para o processo de cristalização das blendas PCL/PSPE em função do teor de PSPE. (b) Difratomogramas de raios-X para PCL e PCL/PSPE45.

3.2.3 Miscibilidade da blenda

Blendas miscíveis apresentam propriedades macroscópicas análogas aquelas de materiais compostos por uma única fase mesmo que microscopicamente a mistura seja composta por múltiplas fases. Blendas de polímeros semi-cristalinos com polímeros amorfos, como aquelas de PCL com PSPE, respectivamente, possuem propriedades térmicas particulares como a mudança na temperatura de transição vítrea (T_g) das blendas em comparação aos polímeros puros e o abaixamento da temperatura de fusão (T_f) da fase cristalina¹⁵⁶, cuja magnitude está relacionada com a interação entre os componentes.

A transição vítrea em polímeros dita suas propriedades viscoelásticas e reológicas afetando também a cristalização e dureza no caso de polímeros semicristalinos. Blendas heterogêneas de dois componentes apresentam duas T_g s referentes aos polímeros puros, ao passo que blendas homogêneas em todas as composições apresentam apenas uma, determinada pela proporção de seus componentes e pode ser prevista pela equação de Fox^d (Eq. 3.3), onde T_{ga} , T_{gb} e T_{gc} são as T_g s do componente A, B e da blenda, em Kelvin, e W_a é o conteúdo do polímero diluente, em porcentagem de massa. A PCL e o PSPE apresentam transições vítreas a -60 e 15°C , respectivamente e a olho nu não se observa separação de fases até a proporção PCL/PSPE45. A Figura 3.9a mostra as T_g de blendas PCL/PSPE até essa composição (termogramas no Anexo A), obedecendo razoavelmente à predição feita pela equação de Fox para esta blenda, o que indica que a mistura se comporta idealmente. Portanto, a

^dA equação de Fox prevê o comportamento da T_g em misturas entre polímero e plastificantes poliméricos de baixa massa molar e leva em conta um desvio mínimo da linearidade. O modelo é bastante confiável e é também utilizado no caso de blendas miscíveis e copolímeros aleatórios.

miscibilidade entre PCL e PSPE nas blendas é governada por interações de *Van der Waals*, importantes à curta distância. Observou-se nas composições PCL/PSPE40 e PCL/PSPE50 uma segunda T_g (Fig. 3.9b), cujo valor coincide com o da PSPE pura, indicando segregação de uma fração desse componente nestas composições.

$$\frac{1}{T_{gc}} = \frac{W_a}{T_{ga}} + \frac{(1 - W_a)}{T_{gb}} \quad (3.3)$$

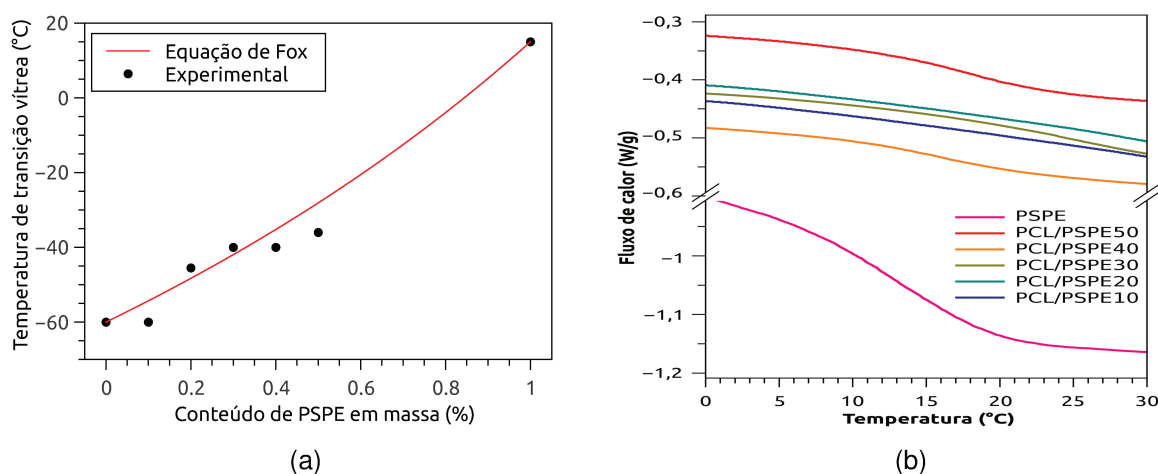


Figura 3.9: (a) Temperaturas de transição vítrea das blendas PCL/PSPE em função da composição (pontos pretos) e valores previstos pela equação de Foz (curva em vermelho). (b) Termogramas das blendas entre policaprolactona (PCL) e poliésterpolissulfidrilado (PSPE).

A Figura 3.10 mostra as segundas curvas de aquecimento de DSC para blendas PCL/PSPE no intervalo de temperatura em que a PCL funde. Observa-se que os picos de fusão da PCL são separados em dois e a separação é de maior magnitude conforme se aumenta a proporção de PSPE na blenda. Outros autores reportaram o mesmo fenômeno para outras blendas de PCL.^{147,148}

A origem desse fenômeno pode estar associada à fusão de cristalitos metaestáveis (primeiro pico) seguida por recristalização e nova fusão (segundo pico). Para verificar esta hipótese, a blenda PCL/PSPE45 foi submetida a rampas de aquecimento em diferentes taxas, entre 5 e 25 °C min⁻¹ (Fig. 3.11a). Com este procedimento, a recristalização seria dificultada conforme houvesse aumento das taxas de aquecimento havendo progressiva supressão do segundo pico de fusão. Porém, a magnitude do segundo pico diante do primeiro não foi alterada pela taxa de aquecimento, eliminando a possibilidade de recristalização. Outra possibilidade é conhecida como segunda cristalização, que consiste na cristalização de segmentos poliméricos com tamanho e mobilidade restritas e que se encontram nos espaços intra-lamelares de esferulitos, levando a formação de cristalitos com menor espessura de lamela. Para verificar esta

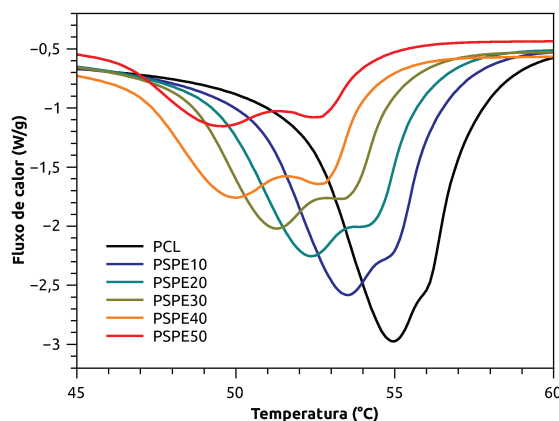


Figura 3.10: Termogramas das blendas entre policaprolactona (PCL) e poliésterpolisulfidrilado (PSPE).

possibilidade, submeteu-se o fundido da blenda PCL/PSPE45 a várias taxas de resfriamento, entre 5 e $25^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (Fig. 3.11b). Com este procedimento, a formação de lamelas/cristalitos intra-lamelares de maior espessura seria maximizada em taxas de resfriamento mais lentas, resultando no aumento da temperatura de fusão do primeiro pico. Este fenômeno foi de fato observado e portanto a hipótese de segunda cristalização explica a natureza da separação do pico de fusão.

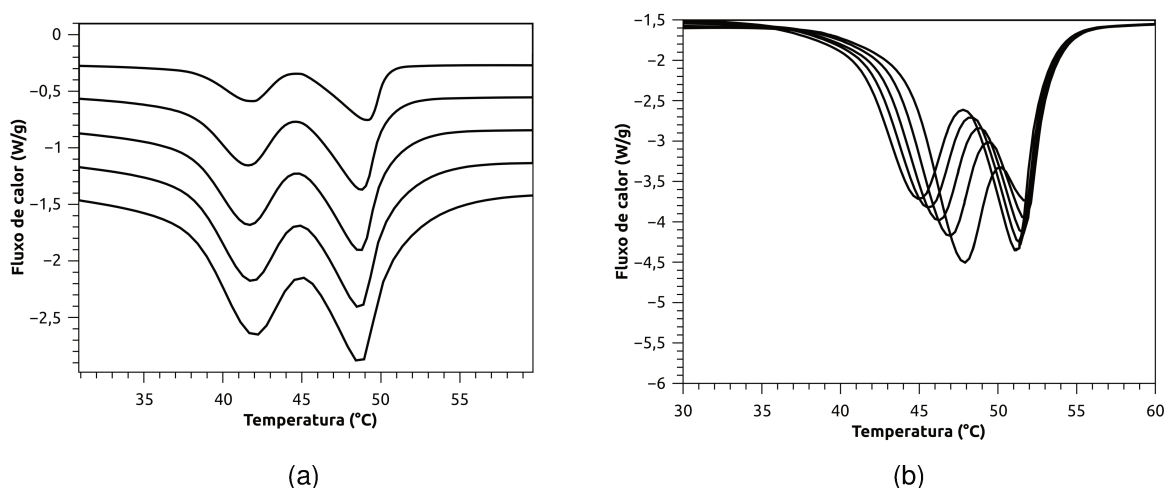


Figura 3.11: (a) Segundas curvas de aquecimento da PCL/PSPE45 em diferentes taxas. De cima para baixo: 5 , 10 , 15 , 20 e $25^{\circ}\text{C min}^{-1}$. (b) Segundas curvas de aquecimento a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ da PCL/PSPE45 após diferentes taxas de resfriamento. Da esquerda para direita: 25 , 20 , 15 , 10 , $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

Observa-se que a T_f da PCL nas blendas diminui com o aumento de seus teores de PSPE, diminuindo de 55°C a para a PCL pura até 50°C para o PCL/PSPE50. A temperatura de fusão de polímeros semicristalinos é alterada em função da espessura das lamelas de seus cristalitos¹⁵⁶, conforme Eq. 3.4, onde β é um parâmetro

proporcional à espessura, T_m^o é a temperatura de fusão de equilíbrio, T_c é a temperatura de cristalização e T_m a temperatura de fusão. Para verificar se o abaixamento de temperatura de fusão é real, construiu-se um *plot de Hoffman-Weeks*^{157,158}, conforme a Figura 3.12a, que permite extrapolar e determinar a T_m^o para cada composição da blenda, temperatura onde a espessura das lamelas de PCL é maximizada e T_c é igual à T_f .

$$T_m = \frac{T_c}{\beta} + (1 - \frac{1}{\beta}) T_m^o \quad (3.4)$$

A Fig. 3.12b mostra que há diminuição da T_m^o com o aumento do teor de PSPE na composição das blendas conforme se espera para blendas entre polímeros semi-cristalinos e amorfos. A T_m^o da composição PCL/PSPE50 não seguiu essa tendência e esse comportamento anômalo está associado à separação de fases.

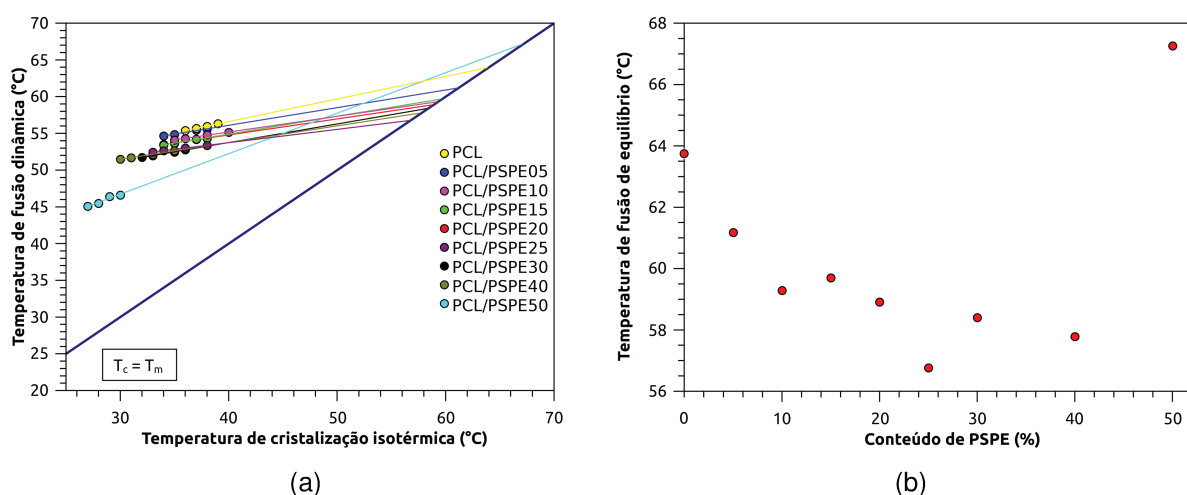


Figura 3.12: (a) Plot de Hoffman-Weeks para blendas entre poliésterpolissulfidrilado (PSPE) e policaprolactona (PCL); (b) Temperatura de fusão de equilíbrio das blendas em função do conteúdo de PSPE nas mesmas.

A temperatura máxima dos experimentos de DSC apresentados neste trabalho não ultrapassa os 120 °C o que garante a integridade das amostras analisadas, conforme verificado por análise termogravimétrica em atmosfera inerte, pelo acompanhamento da perda de massa e taxas de perda de massa de amostras de PCL e das blendas PCL/PSPE em função do aumento da temperatura (Fig.3.13). No caso da PCL, a degradação ocorre no intervalo entre 335-450 °C. Essa perda de massa também é observada na degradação térmica das blendas. Nelas, o PSPE sofre degradação entre 200-335 °C. Observou-se também que as temperaturas iniciais e finais da degradação das componentes da blenda não apresentam qualquer tendência em função de seus teores de PSPE, mostrando que a interação entre os polímeros não influencia a resistência dos materiais à degradação térmica desses materiais.

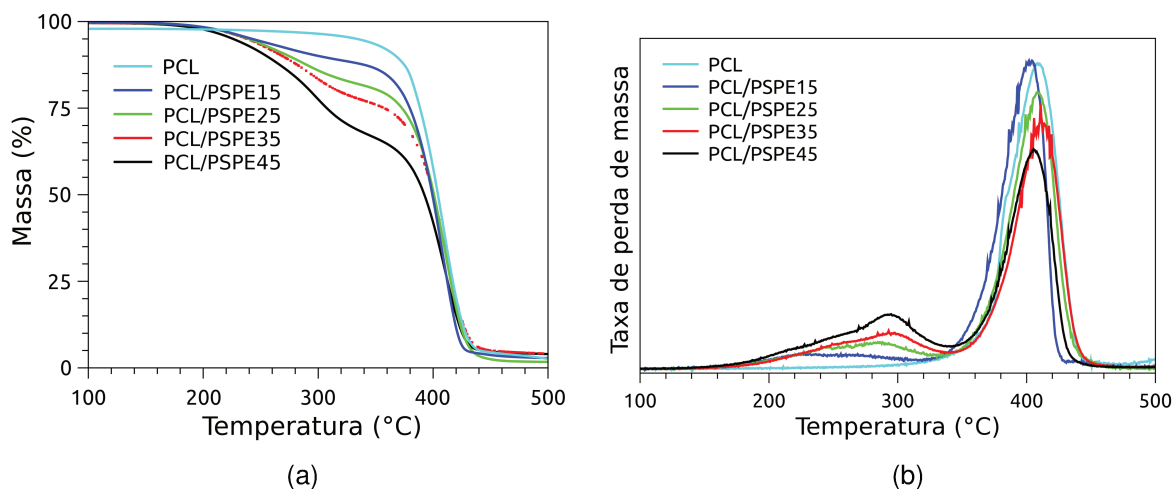


Figura 3.13: (a) Curvas de TGA para filmes de PCL/PSPE de diferentes composições em atmosfera de argônio. (b) Primeira derivada dessas curvas.

3.3 Conclusão

O conteúdo deste capítulo é uma apresentação não cronológica do conjunto de dados obtidos ao longo de todo trabalho de doutorado a respeito das caracterizações das blendas PCL/PSPE em uma abordagem que prioriza um entendimento global a cerca do material, partindo-se de uma escala macro até a microscópica. A caracterização térmica e de miscibilidade das blendas assim como a questão do lugar onde se encontra o PSPE nelas foi formulada e reformulada diversas vezes e enfrentada por diversos ângulos e por isso os resultados são numerosos e complementares. Algumas bateladas das blendas foram preparadas ao longo do trabalho de forma que as composições estudadas em cada experimento refletem as estratégias escolhidas para responder as questões em aberto que investigávamos à época.

A blenda PCL/PSPE mostrou-se miscível no intervalo de concentrações entre 0-45 % em massa de PSPE e filmes desta blenda foram utilizados como material de partida para a preparação de filmes degradáveis liberadores de NO, conforme abordado nos capítulos 4 e 5.

CAPÍTULO 4

DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA DE FILMES DE PCL/PSPE

Poli(éster-uretanos) e poliésteres alifáticos como policaprolactona (PCL), poli(ácido láctico) (PLA) e poli(ácido glicólico) (PGA), assim como seus copolímeros, como o poli(ácido láctico - co - ácido glicólico) (PLGA), têm sido amplamente empregados na construção de dispositivos médicos implantáveis e degradáveis, como pinos, parafusos e fios de sutura, dispositivos de entrega controlada de fármacos, como nano e micropartículas direcionáveis, e *tissues scaffolds* para cartilagens, ossos e outros tecidos.^{159,160}

A degradação hidrolítica de poliésteres consiste na quebra de ligações éster por moléculas de água e depende de inúmeros fatores como: composição química da cadeia polimérica, respectivos produtos de degradação e pH, hidrofobicidade, rugosidade, porosidade, cristalinidade, massa molar média e grau de reticulação.⁸⁴ Poliésteres mais hidrofílicos como o PLA degradam de forma relativamente rápida, uma vez que a entrada de água para o interior do material é mais rápida que a saída de oligômeros ácidos produtos da hidrólise que por sua vez acabam por atuar como catalisadores do processo de degradação. A consequência no caso de biomateriais implantáveis em contato com fluidos biológicos é a acidificação do microambiente da interface, promovendo morte celular. Polímeros de natureza hidrofóbica como a PCL degradam lentamente, pois a difusão de moléculas de água para o interior do material é lenta de forma que a degradação ocorre essencialmente em sua superfície em um processo conhecido como erosão.^{161,162} A degradação da PCL em meio fisiológico não causa danos a tecidos, e no contexto dos biomateriais degradáveis liberadores de NO, a sua escolha para compor uma blenda degradável junto com poliésteres polinitrosados (PNPEs) é justificada.

Neste capítulo, o efeito do teor de poliéster polisulfidrilado (PSPE) em filmes de blendas PCL/PSPE na massa perdida por degradação hidrolítica foi avaliado. Em seguida, provou-se a hipótese de que o PSPE é preferencialmente retirado da blenda como consequência da degradação.

4.1 Procedimento Experimental

4.1.1 Materiais

Bicarbonato de sódio, cloreto de benzalcônio, EDTA foram comprados da Synth (Labsynth, Diadema, Brasil).

4.1.2 Ensaio de molhabilidade

O ângulo de contato entre água (gotas de aproximadamente $10\ \mu\text{L}$) e a superfície de filmes obtidos a partir de fundidos de blendas de PCL/PSPE de diferentes proporções (0, 30 e 100 % de PSPE), foi medido em um tensiômetro óptico (Attension Theta). As medidas foram executadas em triplicata e cada uma delas consistiu em cinco fotos, obtidas em intervalos de $1\ \text{s}$. O ângulo de contato foi medido com a ajuda do software do equipamento, considerando a média entre os ângulos direito e esquerdo formados entre a superfície dos filmes e a gota depositada.

4.1.3 Ensaio de degradação hidrolítica acelerada

Filmes de PCL, PCL/PSPE15, PCL/PSPE25 e PCL/PSPE35, previamente pesados ($20\ \text{mg}$), foram colocados em tubos de ensaio contendo $5\ \text{mL}$ de solução tampão carbonato (pH 10, $50\ \text{mM}$, EDTA a $0,02\%$ w/w , cloreto de benzalcônio $0,02\%$ w/w), imerso num banho de água com agitação horizontal (JULABO GmbH, SW22, Seelbach, Alemanha) a $50\ ^\circ\text{C}$ e $20\ \text{rpm}$. Os tubos de ensaio foram agitados uma vez por dia vigorosamente durante $1\ \text{min}$. A degradação foi avaliada após 5, 10, 15 e 20 dias. Após estes tempos, as amostras foram recolhidas com uma peneira, lavadas extensivamente com água destilada, suavemente limpas com tecido macio e secas durante 5 dias num dessecador com sílica gel ativada. Depois disso, cada amostra foi pesada e armazenada para posterior caracterização por EDS e DSC. A perda de massa percentual foi calculada como: perda de massa (%) = $(\text{massa antes da degradação} - \text{massa após a degradação}) \times 100 / (\text{massa antes da degradação})$.

4.1.4 Espectroscopia dispersiva de elétrons (EDS)

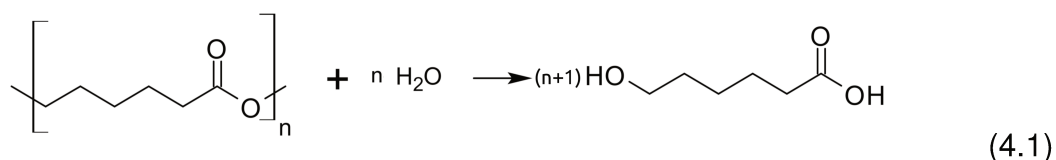
Filmes de PCL, PCL/PSPE15, PCL/PSPE25 e PCL/PSPE35 antes e após 5 dias de degradação hidrolítica, conforme descrito na seção 4.1.3, foram depositados em fitas de carbono coladas sobre bases de carbono. As amostras foram previamente recobertas com uma liga de Au/Pd utilizando um metalizador a alto vácuo Bal-Tec MED 020 (BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein) por 2 min, e examinadas em um microscópio eletrônico (Jeol JSM T-300) com magnificação de 300x dotado de um sistema de EDS para mapear para átomos de enxofre.

4.1.5 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

Filmes de PCL, PCL/PSPE15, PCL/PSPE25, e PCL/PSPE35 antes e após os 5 dias de degradação hidrolítica (seção 4.1.3) foram submetidos à DSC em um calorímetro Q-100 (TA Instruments, New Castle, DE, USA) previamente calibrado com índio. Amostras dos filmes com aproximadamente 10 mg foram colocadas dentro de painéis de alumínio e sujeitas ao seguinte protocolo: aquecimento a 10 °C/min até 120 °C sob fluxo de argônio, seguido de resfriamento a 10 °C/min até -60 °C. Os termogramas obtidos foram tratados com o software TA Universal Analysis e as entalpias de cristalização de cada material foram determinadas.

4.2 Resultados e Discussão

A degradação da PCL *in vivo* ocorre por hidrólise das funções éster que ligam suas unidades monoméricas, levando à formação de ácido caprônico (Eq. 4.1). A taxa de degradação é dependente de sua massa molar, cristalinidade e hidrofili-
dade.^{133,163–165}



A baixa hidrofili-
dade da PCL limita a hidratação de suas cadeias de forma que a difusão de moléculas de água para o *bulk* é mais lenta que a dos produtos de degradação para o meio, de forma que a erosão se limita à superfície, em contraste com outros poliésteres de uso médico como PLA e PLGA, onde a degradação se dá preferencialmente no *bulk*.¹⁶⁶ A hidrólise se dá majoritariamente nas regiões amorfas da PCL, que podem corresponder a mais de 50 % de sua massa,¹⁶⁷ onde há espaço suficiente para que moléculas de água difundam e tenham acesso ao átomos de carbono

da carbonila. Algumas estratégias são empregadas para aumentar a taxa de degradação da PCL, como sua copolimerização ou blenda com monômeros ou poliésteres mais hidrofílicos, o que aumenta sua hidratação e em alguns casos promove autocatálise.^{168,169} A blenda PCL/PSPE é mais hidrofílica do que a PCL pura, conforme mostra a Figura 4.1, onde os ângulos de contato de PSPE puro, PCL/PSPE30 e PCL pura foram obtidos (64 ± 4 , 71 ± 1 e 85 ± 1 , respectivamente). O aumento do conteúdo de PSPE implica portanto em hidratação mais eficiente dos filmes das blends o que pode favorecer a degradação hidrolítica das mesmas. No contexto dos biomateriais implantáveis, revestimentos poliméricos hidrofílicos apresentam melhores resultados de integração tecidual que aqueles hidrofóbicos¹⁷⁰ e por isso espera-se que a blenda PCL/PSPE apresente melhor integração tecidual que a PCL pura.

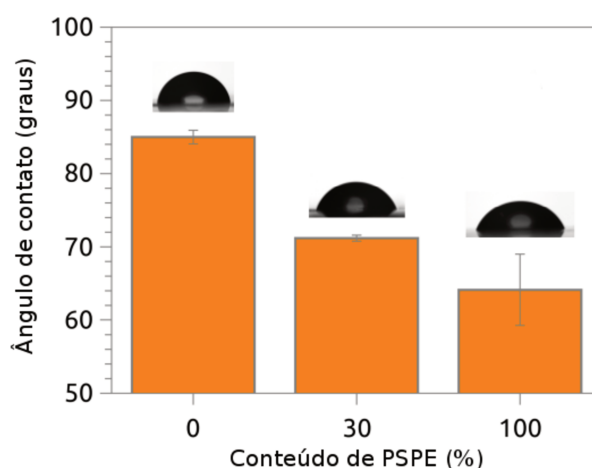


Figura 4.1: Ângulos de contato entre água e filmes de PCL, PCL/PSPE30 e PSPE.

A degradação de PCL em condições fisiológicas necessita de 2 a 4 anos para se completar.^{133–135} Por isso, ensaios acelerados de degradação hidrolítica têm sido utilizados no estudo de perfis de degradação de materiais baseados em PCL e outros poliésteres.^{168,171,172} A hidrólise em meio básico é pertinente no caso da PCL pois a OH^- é um nucleófilo mais forte que água. A reação consiste em um ataque nucleofílico dos íons OH^- ao carbono da carbonila da função éster que possui carga parcial positiva e quebra da ligação π entre carbono e oxigênio, levando a formação de um intermediário tetraédrico. O grupo alcóxido abandona a espécie intermediária resultando na quebra da ligação éster e consequente diminuição da massa molar do poliéster (Eq. 4.2).

Os filmes de PCL/PSPE foram degradados a 50 °C em tampão carbonato (pH 10) e a perda de massa acompanhada durante 20 dias, conforme mostra a Figura 4.3. Após 5 dias de degradação, as taxas de perdas de massa se aproximam de zero e as porcentagens de perda de massa atingem *plateaux* cujas alturas são diretamente correlacionadas com a quantidade inicial de PSPE nas blends. O fato de que a

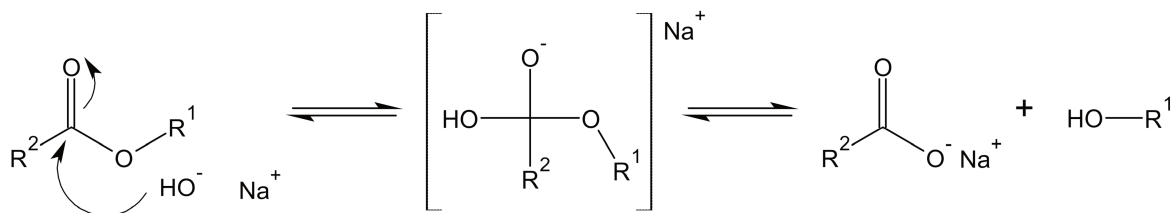


Figura 4.2: Mecanismo de hidrólise de ésteres em meio básico, passando por um intermediário tetraédrico e levando a formação de um álcool e um carboxilato de sódio.

perda de massa é proporcional ao conteúdo inicial de PSPE nos filmes de PCL/PSPE permite formular a hipótese de que o PSPE é retirado mais rapidamente da blenda, sustentada também pelo fato de que a degradação dos filmes de PCL é de apenas 2% mesmo após 20 dias. Uma explicação consistente para o observado é que poucas etapas de hidrólise são necessárias para degradar o PSPE até que se apresente na forma de oligômeros solúveis no tampão carbonato em contraste com a PCL que além de ser semicristalina e hidrofóbica possui massa molar média (M_w)^a cerca de 100 vezes maior que a do PSPE.

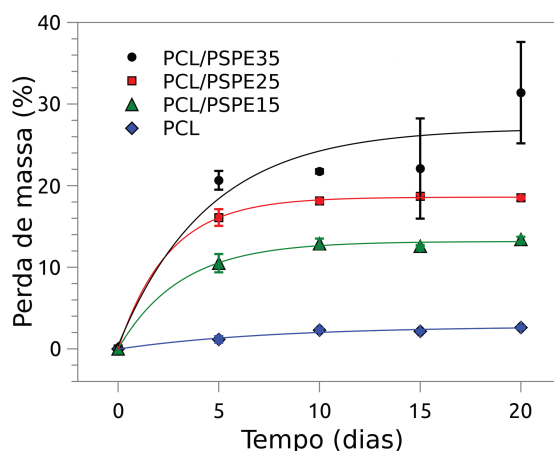


Figura 4.3: Perda de massa de filmes de PCL, PCL/PSPE15, PCL/PSPE25 e PCL/PSPE35 causada pela degradação hidrolítica em tampão carbonato pH 10 a 50 °C no intervalo de 20 dias.

A hipótese foi provada através da contagem de átomos de enxofre por EDS nos filmes de PCL/PSPE antes e depois de 5 dias de degradação hidrolítica (Fig. 4.4). Observa-se que, antes da degradação, a porcentagem de átomos de enxofre era proporcional ao teor de PSPE nos filmes mas após a degradação a porcentagem foi diminuída a valores próximos à zero em todos os filmes (0,2 a 0,3%). A mesma conclusão foi obtida por DSC ao se medir as entalpias de cristalização (ΔH_c) da PCL e filmes de PCL/PSPE antes e depois de 5 dias de degradação hidrolítica (Fig. 4.4).

^a $M_w = \frac{\sum M_i^2 N_i}{\sum M_i N_i}$, onde N_i é o número de moléculas de massa molar M_i .

Observa-se que, antes da degradação, a magnitude do ΔH_c para cada filme é proporcional ao conteúdo de PCL, uma vez que o calor liberado durante o processo de cristalização é proveniente da PCL. Porém, após 5 dias de degradação, a magnitude do ΔH_c para cada filme é a mesma que aquela da PCL pura, confirmando que após a degradação, apenas PCL permanece nos mesmos. Este resultado encontra paralelos na literatura para blendas da PCL com PLA e PLGA. *Fukushima et al.* investigaram a degradação biótica em comparação com a abiótica de blendas entre PCL (M_w 190000) e PLA (M_w 190000) e observaram que nelas a degradação do PLA é mais rápida que a da PCL.¹⁷³ Resultado semelhante foi reportado por *Cha & Pitt* sobre a degradação hidrolítica de blendas entre PCL (M_n 76000) e PLGA (M_n 10000) em pH fisiológico e mostraram que nelas o PLGA degrada-se mais rapidamente que a PCL. Além disso, mostraram por estudos em cromatografia de permeação em gel (GPC) que a hidrólise da PLGA nas blendas é mais lenta que em sua forma pura e atribuíram como causa deste fenômeno a dificuldade imposta pela matriz semicristalina da PCL à difusão de moléculas de água para o interior do material.¹⁶⁵

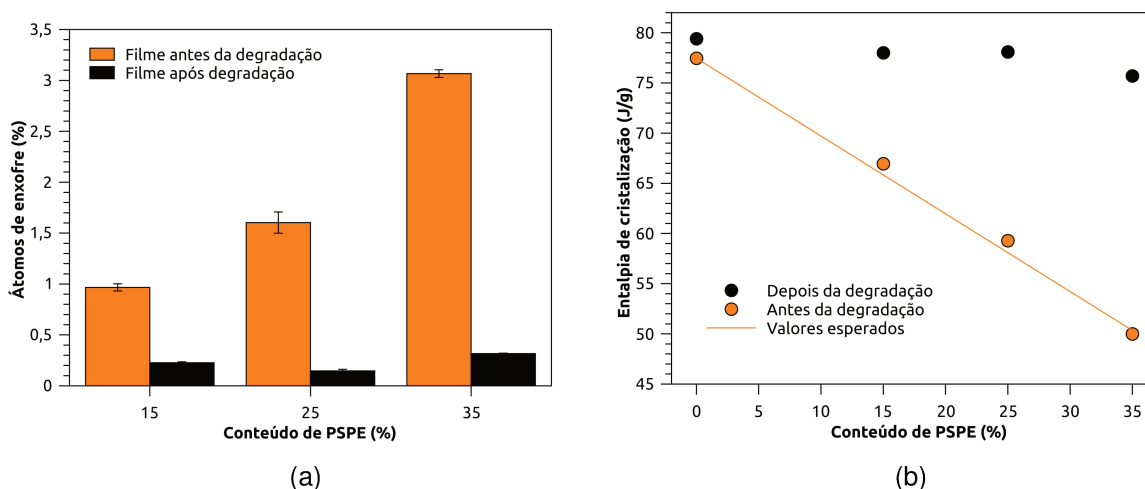


Figura 4.4: (a) Porcentagem de átomos de enxofre em filmes de PCL/PSPE15, PCL/PSPE25 e PCL/PSPE35 antes e após degradação determinada por EDS. (b) Entalpia de cristalização de filmes de PCL, PCL/PSPE15, PCL/PSPE25 e PCL/PSPE35 antes e após degradação, determinada por DSC.

4.3 Conclusão

Investigar a degradação hidrolítica das blendas de PCL com PSPE permite conceber suas potenciais aplicações de maneira mais objetiva. Os filmes da blenda PCL/PSPE degradam-se mais rapidamente que filmes de PCL pura uma vez que poucas etapas de hidrólise do PSPE são necessárias para tornar seus produtos de

degradação solúveis em água. Além disso, a blenda é mais hidrofílica que a PCL pura. Estes resultados salientam a possibilidade de modular a degradação hidrolítica e hidrofilicidade dessas blendas em função do conteúdo de PSPE nas mesmas.

CAPÍTULO 5

CARGA E PERFIS DE LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO DE FILMES PCL/PNPE

S-nitrosotióis (RSNOs) incorporados em matrizes poliméricas, assim como uma série de RSNOs macromoleculares (PSNOs), têm ganhado atenção especial por proporcionarem uma maneira controlável de armazenar e administrar óxido nítrico (NO) no âmbito dos biomateriais.^{92,174} Dentre eles, poliuretanas, polietilenoiminas lineares e dendríticas, poliésteres e quitosanas modificadas, oligo e polissacarídeos e outros já foram descritos.^{9,110,112,174–180} Neste contexto, alguns materiais foram desenvolvidos pelo grupo nas últimas duas décadas, como: S-nitroglutathione (GSNO) ou S-nitrosoacetilcisteína (SNAC) incorporados em hidrogéis de hidroxipropil metilcelulose HPMC ou do copolímero em bloco polietilenoglicol-polipropilenoglicol-polietilenoglicol (PEO-PPO-PEO), utilizados para analgesia tópica, tratamento de mucosite oral e periodontite, cicatrização de feridas isquêmicas e diabéticas; filmes de poli(álcool vinílico) física ou quimicamente reticulados, incorporados com GSNO ou funcionalizados com grupos SNO, utilizados no recobrimento de materiais de contato sanguíneo como *stents* de aço cirúrgico e catéteres de poliuretana; blendas entre poli(metacrilato de metila) (PMMA) e poliéster polinitrosado (PNPE) para vasodilatação tópica.^{50,52,100,101,103–107} As blendas PCL/PNPE estudadas neste trabalho inserem-se no contexto dos biomateriais liberadores de NO capazes de modular processos fisiológicos, como a reação de corpo estranho e ativação plaquetária, e que são passíveis de degradação em condições fisiológicas, característica particularmente interessante no campo dos dispositivos implantáveis⁹ e *tissue scaffolds* para reparação de tecidos.¹⁸¹

Neste capítulo, o efeito dos teores de PSPE em blendas PCL/PSPE na concentração superficial de grupos SNO e liberação de NO por filmes de PCL/PNPE foi avaliado.

A vasodilatação tópica e local da pele promovida por estes materiais foi investigada como possível aplicação biológica.

5.1 Procedimento Experimental

5.1.1 Materiais

Glutathione (GSH), ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) DTNB, Tris-HCl, NaNO_2 e CuCl foram comprados da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). HCl concentrado foi comprado da TEDIA (Tedia Company, Fairfield, USA). Bicarbonato de sódio e NaOH foram comprados da Synth (Labsynth, Diadema, Brasil). GSNO foi sintetizado, como descrito na seção 5.1.2.

5.1.2 Síntese de S-nitrosoglutathione

GSNO foi sintetizada a partir da S-nitrosação de GSH em solução ácida de NaNO_2 .¹⁸² GSH foi previamente dissolvida em HCl 0,5 M sob banho de gelo e protegido da luz com papel alumínio durante todo processo. Uma quantidade equimolar de NaNO_2 foi adicionado sob agitação vigorosa e a reação foi deixada prosseguir durante 1 min. A GSNO formada foi precipitada através da adição de acetona a 0 °C. Após 10 min, filtrou-se a mistura em filtro Millipore 0,45 µm acoplado a um kitassato a vácuo e o sólido separado foi liofilizado durante 24 h. GSNO seco foi transferido para tubos Eppendorf e armazenado num dessecador protegido da luz em freezer a -20 °C. A pureza da GSNO sintetizada foi verificada pelo espectro de absorção no UV-vis de solução aquosa de concentração conhecida no intervalo de 200 – 800 nm através da banda em 336 nm.

5.1.3 Quantificação de sulfidrilas

O método colorimétrico de Ellman¹⁸³ foi utilizado na determinação da concentração de sulfidrilas (SH) na superfície de filmes de PCL/PSPE15, PCL/PSPE25, PCL/PSPE35 e PCL/PSPE45. Para este propósito, as amostras de filmes (0,4 cm²) foram colocadas dentro de tubos de ensaio (5 mL) ao abrigo da luz, contendo 850 µL de água, 100 µL de Tris-HCl (1 M, pH 8) e 50 µL de DTNB 2 mM em bicarbonato de sódio 50 mM) sob agitação. Após 5 min, a absorbância a 412 nm foi medida com um espectrofotômetro de diodos (Hewlett-Packard, modelo 8453, Palo Alto, EUA) e a concentração de SHs foi calculada a partir da Lei de Lambert-Beer. Utilizou-se o coeficiente de absorção molar $\epsilon = 12252 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, obtido a partir de uma curva de calibração para o AMS. Filmes de PCL foram utilizados como controle.

5.1.4 Nitrosação de blendas

Filmes de PCL/PNPE foram preparados por imersão de filmes de PCL/PSPE15, PCL/PSPE25, PCL/PSPE35 e filmes de PCL/PSPE45 ($0,4\text{ cm}^2$) em solução acidificada de NaNO_2 (60 mM de HCl $1,0\text{ M}$) durante 20 min à temperatura ambiente, protegida da luz com folha de papel alumínio. Depois da nitrosação, os filmes foram secos com lenço de papel.

5.1.5 Quantificação de S-nitrosotióis

A concentração de SNO na superfície de filmes PCL/PNPE foi determinada em um equipamento analisador de óxido nítrico por quimiluminescência (NOA, Nitric Oxide Analyser Sievers 280, Boulder, EUA). Para este propósito, amostras de filmes foram imersas em água Milli-Q contida no interior do recipiente de vidro do NOA (Fig. 5.2) e irradiados com radiação UV ($\lambda = 333\text{ nm}$) produzida por uma lâmpada de mercúrio de 100 W (Oriol Instruments, Stratford, CT) e um prisma monocromador (Carl Zeiss M4-QIII, Oberkochen, Germany) com fenda de saída de 1 mm de largura. O NO liberado foi arrastado para o detector do NOA por um fluxo constante de N_2 . A calibração foi realizada com solução padrão de GSNO. Filmes de PCL foram utilizados como controle. O NOA foi operado no modo *low sensibility*, utilizando uma pressão de O_2 de $6,0\text{ psig}$ e de N_2 de $7,0\text{ torr}$.

5.1.6 Perfil de liberação de NO por quimiluminescência

Os perfis de liberação de NO em tempo real de amostras de filmes de PCL/PNPE15, PCL/PNPE25, PCL/PNPE35 e PCL/PNPE45 ($0,4\text{ cm}^2$) imersas em 5 mL de água destilada e desaerada foram determinados por quimiluminescência no NOA a $37\text{ }^\circ\text{C}$ ao longo de $1,5\text{ h}$ operado com uma pressão de O_2 de $6,0\text{ psig}$ e a uma pressão de N_2 de $6,0\text{ Torr}$. O equipamento foi calibrado como descrito na seção 5.1.5. O NOA foi operado no modo *low sensibility* para os filmes PCL/PNPE25, PCL/PNPE35 e PCL/PNPE45 e no modo *high sensibility* para o filme PCL/PNPE15.

5.1.7 Perfil de liberação de NO por amperometria

Cortes circulares de PCL/PNPE15, PCL/PNPE25 e PCL/PNPE35 com $0,4\text{ cm}^2$ de área são individualmente imersos em uma câmara de acrílico (NOCHM-4, World Precision Instruments, Sarasota, EUA) contendo 2 mL de água Milli-Q termostatzada a $37\text{ }^\circ\text{C}$, um eletrodo para detecção específica de NO (ISO-NOP, World Precision Instruments, Sarasota, EUA), um termopar para controle de temperatura e uma barra magnética. O sinal de corrente elétrica medido pelo eletrodo é capturado pela placa

de aquisição de dados (Apollo 4000, World Precision Instruments, Sarasota, EUA) e pode ser correlacionado com a concentração de NO na câmara. O equipamento foi calibrado através da injeção de quantidades conhecidas de uma solução padrão de GSNO na câmara contendo 2 mL de solução de CuCl 3 mM em água destilada e desaerada.

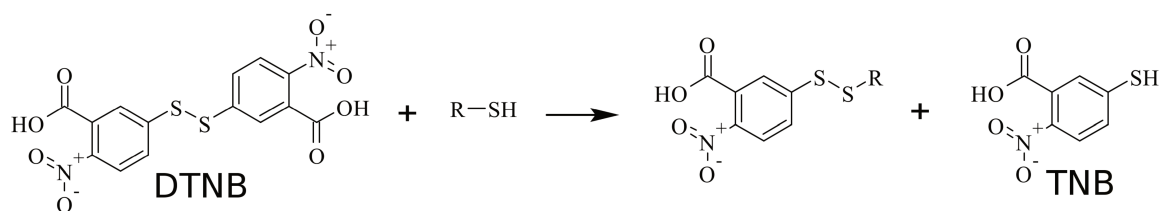
5.1.8 Ensaios de vasodilatação tópica

Corte retangulares de 1,5 cm x 1,5 cm de PCL/PNPE15 e PCL/PNPE25 foram colocados em contato com a pele úmida do antebraço de um voluntário e a vasodilatação tópica, visualmente observável, foi avaliada ao longo do tempo que se seguiu com uma sonda de fibra ótica acoplada a um equipamento de *Laser Doppler* (Transonic System BLF21 DC, Ithaca, Nova Iorque).

5.2 Resultados e Discussão

5.2.1 Quantificação de sulfidrilas e S-nitrosotióis

A concentração de grupos SH na superfície de filmes de PCL/PSPE foi determinada pelo método colorimétrico de *Ellman*.¹⁸³ O método consiste em reagir a espécie sulfidrilada com DTNB levando à formação de TNB (Eq. 5.1) em quantidade equimolar àquela de SHs. TNB ioniza-se em meio neutro ou básico para o ânion TNB^{2-} , que absorve intensamente no UV-vis. O valor de absorbância em 412 nm permite sua quantificação, e portanto a de SHs, através da lei de *Lambert-Beer*.



(5.1)

A Figura 5.1 mostra que a concentração de SHs nas blends aumenta com seus teores de PSPE, com concentrações no intervalo de 0,3–2,2 $\mu\text{mol cm}^{-2}$. Estes valores são até cinco vezes maiores que aqueles publicados anteriormente pelo grupo para filmes da blenda entre PSPE e PMMA.¹²⁷

Os filmes de PCL/PSPE foram S-nitrosados através de sua imersão em solução de ácido nitroso levando à conversão de grupos SH em SNO (Eq. 5.2) produzindo os filmes de PCL/PNPE.

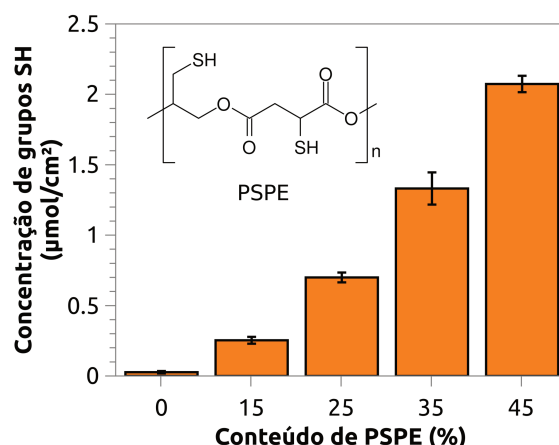
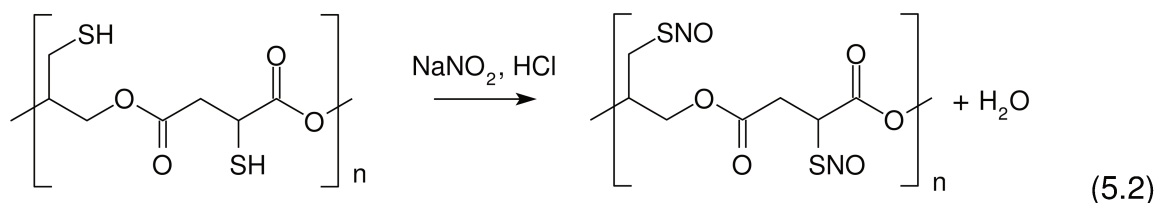


Figura 5.1: Concentração de sulfidrilas em filmes de PCL, PCL/PSPE15, PCL/PSPE25, PCL/PSPE35 e PCL/PSPE45.



A concentração de SNO na superfície dos filmes foi determinada em um equipamento analisador de NO por quimiluminescência (NOA). O RSNO é injetado em um recipiente de vidro específico que se encontra acoplado ao NOA (Fig. 5.2) preenchido geralmente por uma solução redutora que o converte em NO. Dentro do equipamento, o NO reage com O_3 e forma NO_2 no estado excitado que por sua vez decai para o estado fundamental (Eqs. 5.3 e 5.4).



Os fótons emitidos são detectados por um tubo fotomultiplicador e transformado em sinal elétrico cuja variação em tempo real é registrada em computador por *software* próprio do equipamento. O gráfico resultante da aquisição de dados em função do tempo é composto por picos cujas áreas sob as curvas são proporcionais às quantidades de RSNO reduzidas a NO. A Figura 5.2 mostra um gráfico representativo resultante da injeção de quantidades molares conhecidas de GSNO.

A técnica é amplamente descrita na literatura para a quantificação de RSNOs em

baixa concentração^a, mas também de nitrito, nitrato, e mistura destas espécies. Sua seletividade pode ser controlada utilizando diferentes redutores ou radiação ultravioleta, conforme detalhado na seção 1.1.3. Este último método se mostrou mais adequado para a decomposição das funções SNO dos filmes de PCL/PNPE em concordância com resultados recentes comparando a decomposição de PSNOs por termólise, pH e fotólise.¹⁸⁴

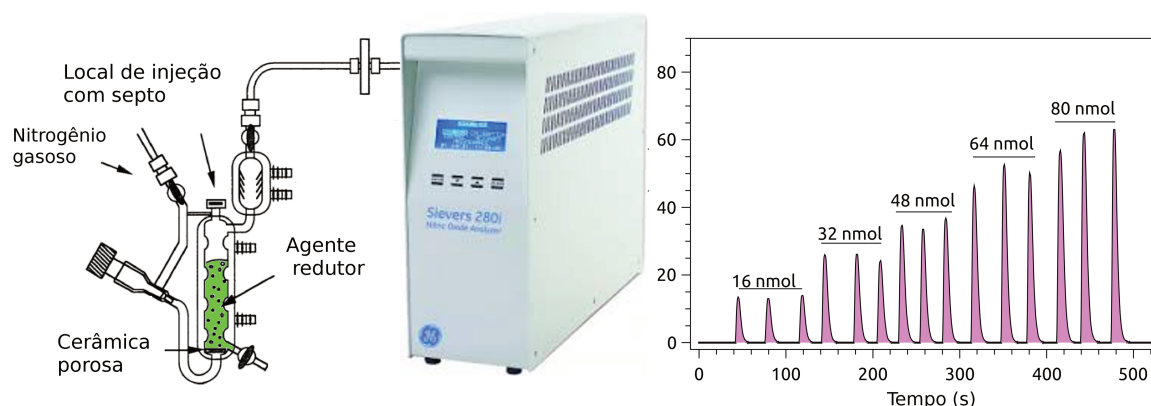


Figura 5.2: Componentes do analisador de óxido nítrico por quimiluminescência, à esquerda, e gráfico representativo obtido a partir da injeção de quantidades conhecidas de GSNO em solução de agente redutor, à direita.

A Figura 5.3 mostra que a concentração de SNO nos filmes nitrosados, no intervalo de $0,40 - 1,30 \mu\text{mol cm}^{-2}$, é proporcional aos seus respectivos teores de PSPE. A detecção de NO nos filmes de PCL puro pode ser atribuída a NO residual adsorvido pelos mesmos durante sua imersão em HNO_2 . As concentrações de SNO nos filmes PCL/PNPE correspondem a 60 – 100 % daquelas de SHs nos materiais de partida (Fig. 5.1), devido à decomposição parcial dos grupos S-nitrosotiol recém formados durante a reação de S-nitrosação, conforme observado por *Damodaran et al.* em PLGAs modificados com uma série de RSNOs.⁹³

A carga de NO armazenada nos filmes PCL/PNPE sob a forma de SNO é de magnitude semelhante àsquelas de outros materiais S-nitrosados. *Seabra et al.* descreveram uma blenda entre PNPE e PMMA com concentração de SNO de $0,04 \mu\text{mol cm}^{-2}$, apresentando ação microbica contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*,¹²⁷ enquanto *Coneski & Schoenfisch* reportaram a ação microbica contra *P. aeruginosa* por poliésteres reticulados com concentração de SNO de $0,01 - 0,81 \mu\text{mol cm}^{-2}$.⁹⁵ *Serrano et al.* mostraram que poli(di-ol citratos) liberadores de NO com concentração de SNO acima de $7,0 \mu\text{mol cm}^{-2}$ promovem a morte de células endoteliais *in vitro*, ao passo que doses menores, no intervalo de $0,4 - 0,7 \mu\text{mol cm}^{-2}$, promovem sua proliferação.¹⁸⁵ Este trabalho e outros destacam a versatilidade da ação biológica que

^aO limite de detecção do analisador de NO por quimiluminescência em amostras líquidas é de aproximadamente 1 pmol do radical.

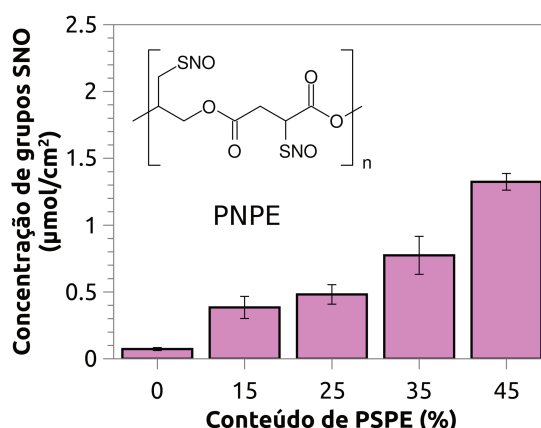


Figura 5.3: Concentração de S-nitrosotióis em filmes de PCL, PCL/PNPE15, PCL/PNPE25, PCL/PNPE35 e PCL/PNPE45

o óxido nítrico desempenha dependendo de sua concentração local em células e tecidos.^{29,30} *Hetrick et al.* reportaram xerogéis^b liberadores de NO com concentração de SNO de $1,35 \mu\text{mol cm}^{-2}$ usados para recobrir implantes e reduzir significativamente a reação de corpo estranho^c, além de promover angiogênese^d.¹⁸⁶ *Nichols et al.* reportaram uma série de poliuretanas com concentração de SNO de $2,7 - 6,1 \mu\text{mol cm}^{-2}$ que apresentaram ações biológicas similares.¹⁷⁹ Borrachas de silicone e peptídeos automontáveis com concentração de SNO de $0,6 - 4,0 \mu\text{mol cm}^{-2}$ foram capazes de evitar trombose^e.^{115,187} Estes trabalhos bastante promissores sugerem que as blendas PCL/PNPE são boas candidatas para uma vasta gama de aplicações biológicas.

5.2.2 Perfil de liberação de NO

RSNOs liberam NO espontaneamente pela clivagem homolítica da ligação SNO (Eq. 5.5) e pela reação dos assim formados radicais tiila (RSs) com RSNOs (Eq. 5.6). A Equação 5.7 mostra a reação de terminação dos RSs, que leva à formação do dímero RS-SR.

Etapa lenta



^bXerogéis são sólidos de alta porosidade e área superficial formados por redes de polímeros a partir da secagem dos respectivos géis.

^cA reação de corpo estranho é um processo inflamatório cuja função é isolar corpos estranhos, como implantes, do restante do organismo.

^dAngiogênese é o processo fisiológico pelo qual novos vasos sanguíneos funcionais são criados.

^eTrombose é a condição em que um coágulo se forma e se aloja em vasos sanguíneos, bloqueando o fluxo sanguíneo.

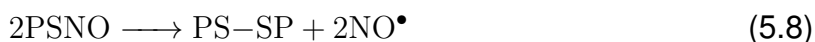
Etapa rápida



Etapa rápida



PSNOs, como o PNPE presente nas blendas PCL/PNPE, também se decompõem espontaneamente, conforme já reportado,^{92,100,103,188} formando NO e redes poliméricas reticuladas através de pontes de enxofre, representadas como PS-SP na reação global mostrada na Equação 5.8.



As curvas da Figura 5.4 representam o total de NO liberado em função do tempo por blendas PCL/PNPE de diferentes composições em água deionizada e desaerada, a 37 °C, determinado por quimiluminescência. Elas foram ajustadas a um crescimento exponencial de primeira-ordem^f, de acordo com a Equação 5.9.

$$NO_{total}(t) = SNO_o [1 - e^{-t k_{SNO}}] \quad (5.9)$$

Nesta equação, $NO_{total}(t)$ é a variável dependente, correspondente ao número de mols de NO liberado por área de filme expressa em micromoles por centímetro quadrado, t é o tempo em minutos, k_{SNO} é a constante de velocidade de primeira ordem e SNO_o é o número de mols de grupos SNO por área de filme no início do experimento expressa em micromoles por centímetro quadrado, assumindo que decomposição de RSNOs é quantitativa nas blendas PCL/PNPE se dado tempo o suficiente, ou seja, que $\lim_{t \rightarrow +\infty} NO_{total}(t) = SNO_o$. A Equação 5.9 está em coerência com a expressão de formação de NO a partir da termólise de RSNOs (Eq. 1.7), cuja cinética é de primeira ordem na concentração de RSNO, conforme a Equação 5.10 e confirmação experimental reportada por *Shishido et al.*¹⁸⁹

$$v = -\frac{d[SNO]}{dt} = \frac{d[NO]}{dt} = k_{SNO} [SNO] \quad (5.10)$$

Todas as curvas ajustadas na Figura 5.4 têm a mesma constante $k_{SNO} = 44 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, indicando que o NO é liberado pelo mesmo mecanismo térmico em todos os filmes, em concordância com o esperado uma vez que o RSNO presente nas blendas, o PNPE, é o mesmo em todas elas. Os diferentes valores de *plateau* para cada composição refletem as respectivas SNO_o de cada material, proporcionais ao

^f $y(t) = A_o [1 - e^{-t k}]$

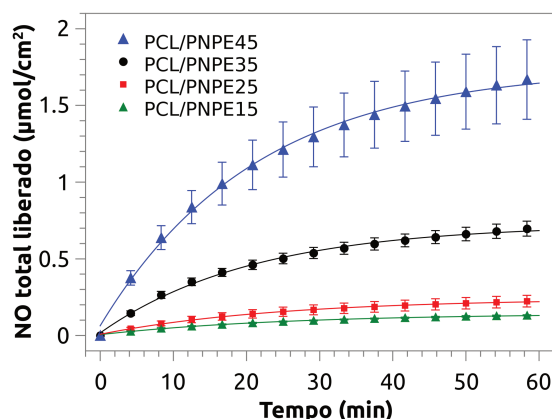


Figura 5.4: Curva de cinética de liberação de NO em água a 37 °C por filmes nitrosados de PCL/PSPE obtidas por quimiluminescência (NOA).

conteúdo de PNPE na blenda, conforme mostra a Figura 5.3. O intervalo de valores de carga de NO armazenada nos filmes de blendas PCL/PNPE na forma de SNO é de mesma magnitude que o intervalo de valores dos *plateaux* nessas curvas, que correspondem justamente à quantidade de SNO nos filmes no início de experimento. Este resultado mostra que existe coerência entre as medidas de quantificação de SNO e de cinética de liberação de NO pelos filmes de PCL/PNPE45 e PCL/PNPE35.

As curvas da Figura 5.4 mostram que é possível controlar a quantidade de NO administrado pelos filmes PCL/PNPE em função de suas composições mas também em função do tempo de aplicação, uma vez que a liberação de NO é sustentada durante pelo menos 60 *min*. Além dessas estratégias, o controle da área superficial dos filmes por aumento de rugosidade, porosidade ou tramas de fibras eletrofiadas de diferentes diâmetros, por exemplo, poderia levar a maiores magnitudes de carga de NO. Esse controle aumenta o número de possíveis aplicações biológicas para o material, uma vez que o NO pode apresentar atividades de citoprotetoras a citotóxicas em função de sua concentração local.

A liberação de NO em água pelos filmes PCL/PNPE foi estudada também em água aerada, ou seja, na presença de oxigênio, condição mais próxima àquela encontrada em fluidos biológicos, utilizando amperometria com eletrodo comercial de Pt operando a +0,7 V. Neste potencial, NO liberado pelos filmes é oxidado ao cátion nitrosônio (Eq. 5.11) na superfície do eletrodo de Pt e a magnitude da corrente elétrica resultante é proporcional à sua concentração, cuja evolução pode ser acompanhada. É importante frisar que neste valor de potencial outras espécies presentes no meio, como o NO_2^- produto da oxidação de NO por O_2 em meio aquoso (Eq. 5.12), também são oxidadas e resultam em sinal elétrico. Para evitar esse falso positivo, utilizam-se eletrodos revestidos por membranas poliméricas seletivas a NO, como o comercial ISO-NOP (Fig. 5.5) ou mesmo *homemade* revestidos com polieugenol, polifenóis, dentre outros.¹⁹⁰

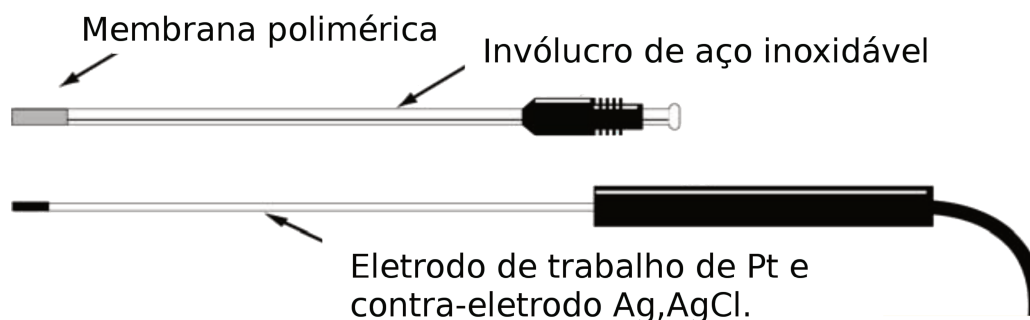
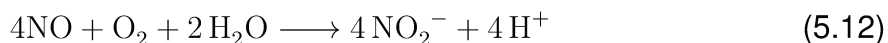


Figura 5.5: Eletrodo de Pt seletivo para NO da WPI (ISO-NOP). O eletrodo de Pt e contra eletrodo de Ag, AgCl estão montados em conjunto. O interior do invólucro de aço inoxidável é preenchido com solução de eletrólito (não especificado), onde o eletrodo é imerso quando as duas partes são acopladas. A extremidade deste invólucro é fechada com uma membrana polimérica seletiva a NO (não especificada) que permite somente a difusão do radical para o seu interior.

A Figura 5.6 mostra a evolução da concentração de NO no interior da câmara de acrílico termostatzada a 37 °C onde os filmes PCL/PNPE são imersos e o eletrodo seletivo de NO se encontra posicionado. A liberação de NO pelos filmes leva a um aumento contínuo na concentração do radical até que se atinja um máximo, seguido por sua contínua diminuição. Este perfil reflete a existência de duas reações independentes e que influenciam simultaneamente a concentração de NO no meio: 1) a termólise das funções SNO dos filmes que resulta na liberação de NO (Eq. 5.8); 2) a oxidação de NO pelo O₂ dissolvido na água (Eq. 5.12).

A Equação 5.13 expressa a taxa de liberação de NO pelos filmes em solução, desprezando o NO oxidado na superfície do eletrodo. Ela possui solução analítica por se tratar de uma equação diferencial ordinária não-linear de Ricatti^g, desde que a concentração de O₂ seja considerada constante no interior da câmara. Essa consideração é pertinente, uma vez que a concentração de O₂ é sempre muito maior que aquela de NO nos experimentos discutidos ao longo deste trabalho.

$$\frac{d[\text{NO}]}{dt} = k_{\text{SNO}}[\text{SNO}]_o e^{-k_{\text{SNO}} t} - 4k_{\text{NO}_2}[\text{NO}]^2[\text{O}_2] \quad (5.13)$$

Utilizando a condição de contorno $[\text{NO}](0) = 0$, utilizou-se a plataforma *Wolfram*^h

^g $y'(t) = 4B y(t)^2 - AC e^{-Ct}$

^h*Wolfram* (<https://www.wolframalpha.com/>) é uma plataforma *on-line* para resolução de problemas matemáticos e de outras áreas do conhecimento.

para que a Equação 5.14, que descreve a evolução da concentração de NO no interior da câmara, fosse determinada.

$$\begin{aligned}
 [\text{NO}](t) = & \\
 = & \frac{\sqrt{A}\sqrt{C}\sqrt{e^{-Ct}} \left(K_1 \left(\frac{4\sqrt{A}\sqrt{B}}{\sqrt{C}} \right) I_1 \left(\frac{4\sqrt{A}\sqrt{B}\sqrt{e^{-Ct}}}{\sqrt{C}} \right) - I_1 \left(\frac{4\sqrt{A}\sqrt{B}}{\sqrt{C}} \right) K_1 \left(\frac{4\sqrt{A}\sqrt{B}\sqrt{e^{-Ct}}}{\sqrt{C}} \right) \right)}{2\sqrt{B} \left(I_1 \left(\frac{4\sqrt{A}\sqrt{B}}{\sqrt{C}} \right) K_0 \left(\frac{4\sqrt{A}\sqrt{B}\sqrt{e^{-Ct}}}{\sqrt{C}} \right) + K_1 \left(\frac{4\sqrt{A}\sqrt{B}}{\sqrt{C}} \right) I_0 \left(\frac{4\sqrt{A}\sqrt{B}\sqrt{e^{-Ct}}}{\sqrt{C}} \right) \right)}
 \end{aligned}
 \quad (5.14)$$

Onde:

$$A = [\text{SNO}]_0$$

$$B = K_{\text{NO}_2}[\text{O}_2]$$

$$C = K_{\text{SNO}}$$

$K_n(f)$ = função modificada de Bessel de ordem n do segundo tipo aplicada em f

$I_n(f)$ = função modificada de Bessel de ordem n do primeiro tipo aplicada em f

Uma vez que a concentração de O_2 em água para dada temperatura e o valor de k_{NO_2} constam na literatura,¹⁹¹ o uso da solução analítica se apresenta como uma nova estratégia a ser explorada no futuro para a determinação de $[\text{SNO}]_0$ e k_{SNO} em materiais liberadores de NO a partir de suas curvas cinéticas.

O valor máximo de concentração de NO em solução causado por cada um dos filmes PCL/PNPE é proporcional às respectivas concentrações de SNO, em concordância com os resultados obtidos por quimiluminescência. O tempo necessário para atingir o máximo de concentração de NO é de aproximadamente 10 *min* e por isso os filmes foram aplicados por esse tempo sobre a pele nos experimentos de vasodilatação tópica, conforme exposto e discutido na seção seguinte.

5.2.3 Ensaios de vasodilatação tópica

A descoberta do papel do NO como sendo a molécula sinalizadora responsável pela relaxação de células musculares lisas, levando a vasodilatação do endotélio, rendeu o prêmio Nobel de medicina de 1998 aos pesquisadores Robert Furchgott, Louis Ignarro e Ferid Murad. O fenômeno se dá após a reação do NO com o grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel promovendo sua ativação e consequente catálise da reação de conversão de guanosina 5'-trifosfato (GTP) em guanosina 3',5'-monofosfato cíclica (GMPc). O acúmulo de GMPc no citosol leva à relaxação de células musculares lisas após uma cascata de sinalização mediada por proteína-quinases dependentes de GMPc. A consequência é uma resposta vasomotora, a já mencionada vasodilatação, que aumenta a irrigação sanguínea local.^{5,32,192} Este fenômeno pode ser causado por

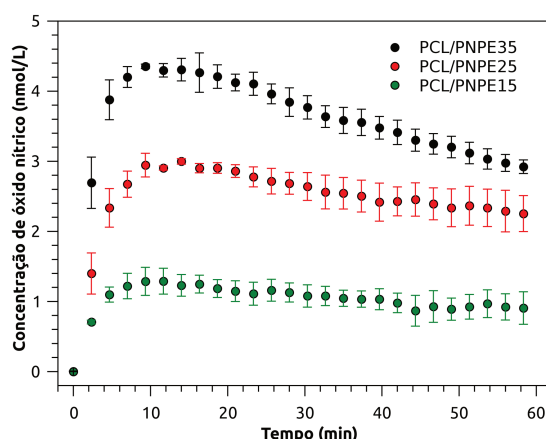


Figura 5.6: Curva de cinética de liberação de NO em água a 37 °C por filmes nitrosados de PCL/PSPE obtidas por amperometria.

NO produzido endogenamente e está geralmente associado a respostas imunológicas ou cicatrização.^{7,28}

O grupo demonstrou em trabalhos anteriores que RSNOs como GSNO ou SNAC, dissolvidos em hidrogéis de HPMC ou PEO-PPO-PEO, assim como PSNOs e suas blends, como filmes de PMMA/PNPE, aplicados sobre a pele, promovem a liberação de NO na interface dos materiais com a mesma. O radical difunde através do *stratum corneum*ⁱ, epiderme, derme e tecidos perivasculares até atingir células musculares lisas de arteríolas da microcirculação dérmica subepitelial, desencadeando a vasodilatação.^{50,100}

Nas seções 5.2.1 e 5.2.2, mostrou-se que os filmes PCL/PNPE armazenam NO através do PNPE presente nos espaços interlamelares de esferulitos de PCL e liberam NO através da termólise desse RSNO em quantidades e taxas conhecidas por promovem ações biológicas como a vasodilatação, conforme esquematizado na Figura 5.7 a. Assim, a capacidade desses filmes de causar vasodilatação tópica na pele foi investigada. Após a aplicação dos filmes sob a pele durante 10 *min* observa-se a formação de um eritema^j intenso localizado na área de aplicação (Fig. 5.7 b-d). Nota-se que o formato e tamanho do eritema coincidem com aquele do filme aplicado, mostrando que o efeito vasodilatador do NO não se espalha para o tecido adjacente. Após a remoção do filme, o eritema desaparece em menos de 10 *min* o que elimina a possibilidade de que o efeito seja devido a uma reação alérgica ao material. Filmes de PCL puro submetidos ao protocolo de nitrosação e aplicados sobre a pele não induzem a formação de eritemas, apontando mais uma vez para o NO liberado como agente causador do fenômeno.

ⁱ *Stratum corneum* é a camada externa da epiderme sendo constituída por células epiteliais mortas.

^j Eritema é uma região da pele com coloração avermelhada causada por vasodilatação capilar local.

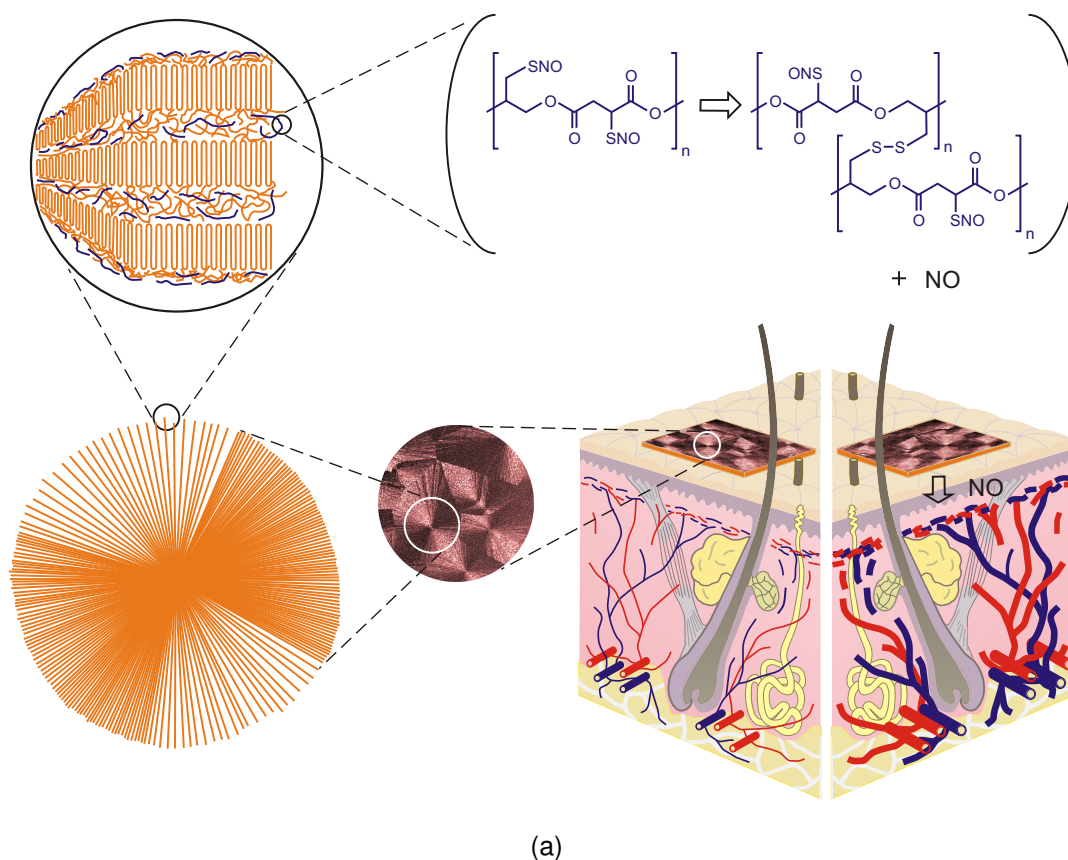
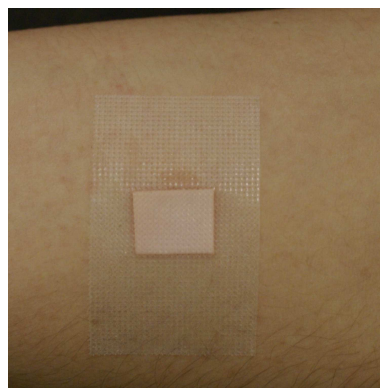
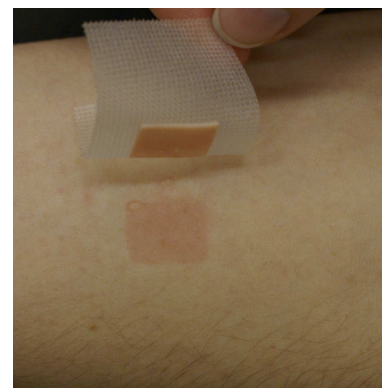
(b) $t = 0 \text{ min}$ (c) $0 \text{ min} < t < 10 \text{ min}$ (d) $t = 10 \text{ min}$

Figura 5.7: a) Esquema geral mostrando a ação vasodilatadora dos filmes de PCL/PNPE aplicados sobre a pele, sua morfologia esferulítica e mecanismo de liberação de NO via termólise do PNPE. b-d) Formação de eritema na pele do antebraço de voluntário pela aplicação de filmes PCL/PNPE25 por 10 min.

O fluxo sanguíneo em tempo real nos eritemas foi estudado por fluxometria por *Laser Doppler*. A técnica permite avaliar a perfusão sanguínea microvascular da pele e órgãos internos como rins, fígado, coração, dentre outros. A medida é feita posicionando e fixando-se a sonda do equipamento sobre o tecido a ser estudado. A sonda consiste em uma fibra ótica que emite radiação monocromática vermelha que atravessa a pele e incide sobre diversas células, conforme mostrado na Figura 5.8. Ao ser

espalhada por hemácias em movimento, sua frequência é levemente alterada, devido ao efeito *Doppler* da luz, conforme descrito em detalhes por *Fredriksson et al.*¹⁹³ A luz espalhada é captada por outra fibra ótica e processada, trazendo uma estimativa da perfusão sanguínea em valores relativos.

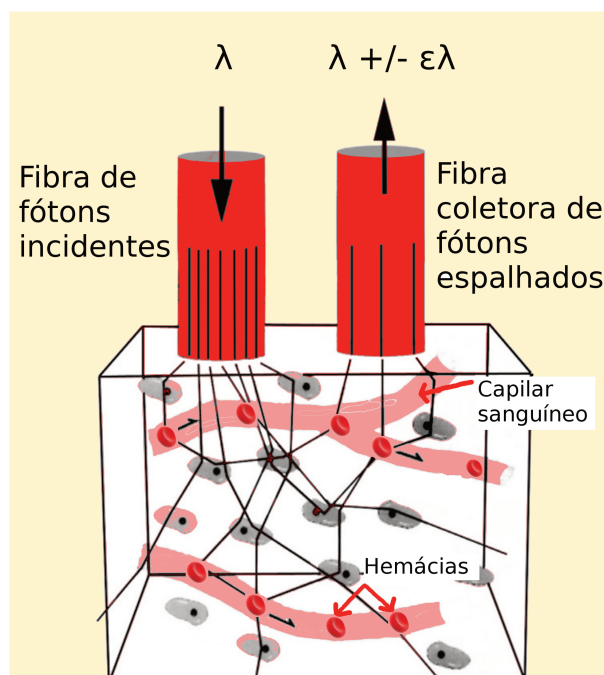


Figura 5.8: Esquema mostrando o princípio de funcionamento da técnica de fluxometria por *Laser Doppler* para a medição de fluxo sanguíneo. A caixa branca representa um corte transversal da pele contendo células estáticas e células vermelhas em movimento dentro de capilares sanguíneos. Um feixe monocromático de radiação vermelha é transmitido através da pele por uma fibra ótica e incide sobre diversas células. A radiação espalhada por hemácias sofre uma leve mudança no comprimento de onda devido ao efeito *Doppler* da luz e é captada por outra fibra ótica. A magnitude dessa mudança é processada computacionalmente em tempo real, correlacionando-se com a magnitude do fluxo sanguíneo. As medidas são sempre relativas ao fluxo sanguíneo basal do tecido estudado.

Os filmes PCL/PNPE15 e PCL/PNPE25 foram aplicados por 10 *min* na pele saudável dos antebraços de voluntários e promoveram vasodilatação tópica, aumentando o fluxo sanguíneo basal 6 ± 2 e 10 ± 2 vezes, respectivamente (Fig. 5.9). A vasodilatação decai a níveis basais após a remoção do filme que permanecia em contato com a pele. Filmes de PCL/PNPE35 e PCL/PNPE45 não levaram a fluxos de maior amplitude que aquele causado por filmes de PCL/PNPE25, indicando que a dose de NO liberada a partir dessa composição leva ao máximo de vasodilatação do tecido estudado.

Estes resultados colocam os filmes de PCL/PNPE como candidatos em potencial para o tratamento tópico de doenças microcirculatórias associadas com a produção endógena deficiente de NO, como angiopatia diabética¹⁰¹, síndrome de Reynaud³⁷ e úlceras isquêmicas¹⁰² assim como para o tratamento de doenças infecciosas que aco-

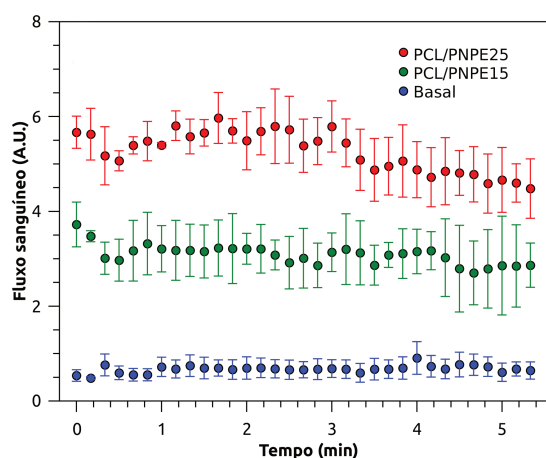


Figura 5.9: Fluxo sanguíneo no antebraço de voluntário, monitorado pela técnica de *Laser Doppler*. Em azul está representado o fluxo sanguíneo basal; em verde e vermelho, respectivamente, o promovido por filmes de PCL/PNPE15 e PCL/PNPE25, ambos aplicados durante 10 *min*.

metem a pele, como leishmaniose cutânea,⁵¹ uma vez que o NO pode desempenhar atividade microbicida.¹⁹⁴

5.3 Conclusão

A concentração de SHs em filmes de PCL/PSPE e a de SNOs em filmes de PCL/PNPE foram determinadas e mostraram-se proporcionais ao teor de PSPE nas blendas. As quantidades de NO liberadas termicamente pelos filmes PCL/PNPE em água e determinadas por quimiluminescência são consistentes com os valores provenientes da quantificação. Os perfis de liberação de NO determinados por quimiluminescência permitem também estabelecer que em 60 min a liberação de NO termina ou atinge valores abaixo do limite de detecção. Por amperometria, determinou-se que o máximo de concentração de NO liberado pelos filmes se dá em aproximadamente 10 min. Os filmes foram aplicados sobre a pele do antebraço de voluntários e promoveram vasodilatação tópica. Este conjunto de dados, somado aos apresentados no capítulos anteriores mostram de maneira conclusiva que os filmes PCL/PNPE desenvolvidos durante o doutorado e apresentados nessa Tese de Doutorado são biomateriais poliméricos degradáveis liberadores de NO e portanto promissores para aplicações biológicas relacionadas as ações deste radical diatômico.

CAPÍTULO 6

PERSPECTIVAS

Algumas perspectivas podem ser vislumbradas no âmbito de complementação e expansão dos trabalhos desenvolvidos durante o doutorado:

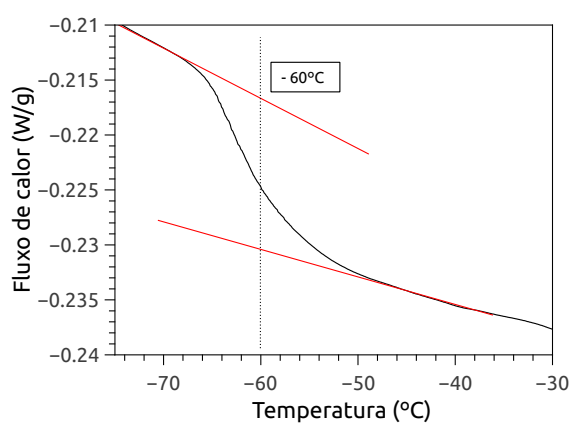
- O PSPE, precursor do PNPE descrito neste trabalho, foi sintetizado a partir da policondensação de ácido mercaptosuccínico e 1-tioglicerol. Porém, uma família de outros PSPEs com diferentes cargas de SH poderia ser preparada, utilizando em sua síntese misturas de diácidos como o ácido mercaptosuccínico, o ácido succínico e/ou o ácido dimercapto succínico, e dióis como o 1-tioglicerol, glicerol e/ou polietilenoglicóis. Essa versatilidade poderia ser utilizada, ainda, em uma avaliação sistemática da relação entre propriedades fisiológicas e terapêuticas mediadas pelo NO - que pode ser citotóxico, microbicida, vasodilatador, antitrombogênico, cicatrizante etc, dependendo de sua concentração local - e a carga total/perfis de liberação de NO de materiais S-nitrosados, uma vez que esta relação é apresentada na literatura de maneira qualitativa e pouco exploratória.
- A decomposição seletiva de RSNOs com nanopartículas de ouro foi aplicada no âmbito de sua detecção e quantificação amperométrica na literatura.⁷⁸ Porém, não existem resultados empregando essa técnica na quantificação de RSNOs por quimiluminescência nem qualquer relato do seu uso na quantificação de RSNOs macromoleculares. Portanto, este tópico poderá ser investigado posteriormente para a otimização da quantificação de RSNOs em biomateriais desenvolvidos pelo grupo.
- As blendas PCL/PSPE foram obtidas e estudadas na forma de filmes sólidos e densos. Outras formas como nanofios eletrofiados, nano e micropartículas, materiais com porosidade controlada e dispositivos implantáveis, como pinos e

fios, poderão ser investigadas como forma de controlar a carga de SNO por área de material, ampliando o espectro de suas possíveis aplicações biológicas.

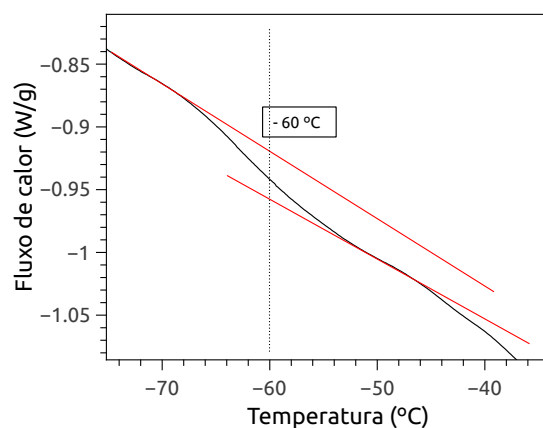
- A toxicidade das blendas PCL/PSPE e respectivos produtos de degradação *in vitro* poderia ser avaliada.

APÊNDICE A

TERMOGRAMAS ADICIONAIS

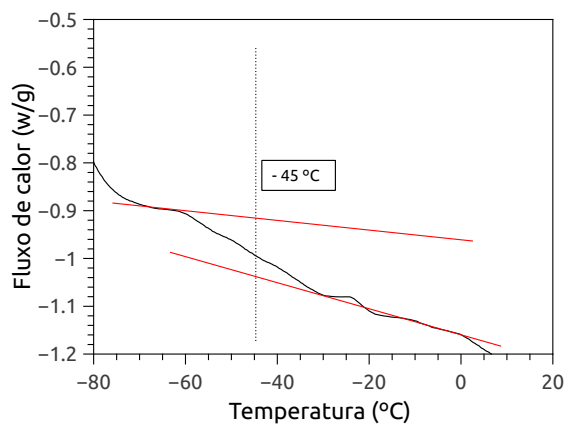


(a) PCL

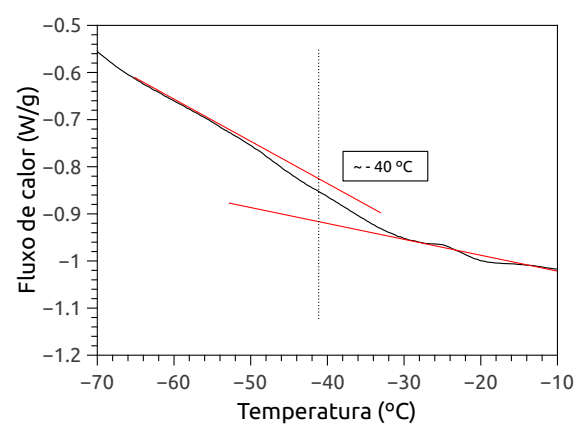


(b) PCL/PSPE10

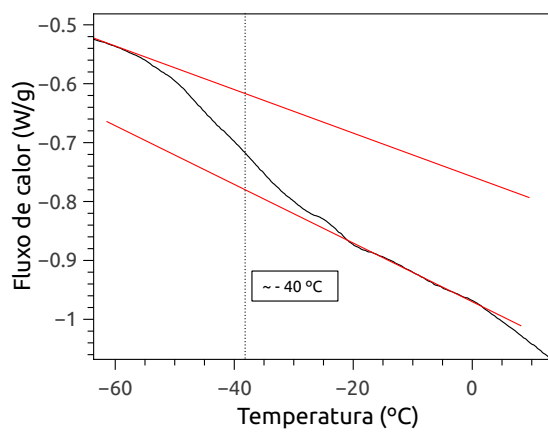
Figura A.1: Termogramas da PCL e da blenda PCL/PSPE10 na região de transição vítrea.



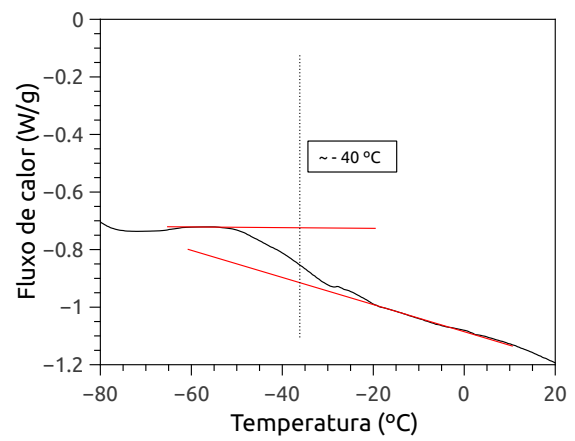
(a) PCL/PSPE20



(b) PCL/PSPE30



(c) PCL/PSPE40



(d) PCL/PSPE50

Figura A.2: Termogramas das blendas PCL/PSPE30, PCL/PSPE30, PCL/PSPE40, PCL/PSPE50 na região de transição vítrea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A. H. Chester, G. S. O'Neil, S. Tadjkarimi, R. M. J. Palmer, S. Moncada, e M. H. Yacoub, "The role of nitric oxide in mediating endothelium dependent relaxations in the human epicardial coronary artery," *International Journal of Cardiology*, vol. 29, no. 3, pp. 305–309, 1990.
- [2] L. J. Ignarro, G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns, e G. Chaudhuri, "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 84, no. 24, pp. 9265–9269, 1987.
- [3] R. F. Furchgott, "Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle.," *Circulation research*, vol. 53, no. 5, pp. 557–573, 1983.
- [4] L. J. Ignarro, "Signal transduction mechanisms involving nitric oxide," *Biochemical Pharmacology*, vol. 41, no. 4, pp. 485–490, 1991.
- [5] M. T. Gladwin, J. H. Crawford, e R. P. Patel, "The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: Role in blood flow regulation," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 36, no. 6, pp. 707–717, 2004.
- [6] J. Garthwaite, "Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission.," *The European journal of neuroscience*, vol. 27, no. 11, pp. 2783–802, 2008.
- [7] A. Schwentker e T. R. Billiar, "Nitric oxide and wound repair," *Surgical Clinics of North America*, vol. 83, no. 3, pp. 521–530, 2003.
- [8] T. P. Amadeu, A. B. Seabra, M. G. de Oliveira, e A. Monte-Alto-Costa, "S-nitrosoglutathione-containing hydrogel accelerates rat cutaneous wound repair," *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol. 21, no. 5, pp. 629–637, 2007.
- [9] E. M. Hetrick, H. L. Prichard, B. Klitzman, e M. H. Schoenfisch, "Reduced foreign body response at nitric oxide-releasing subcutaneous implants," *Biomaterials*, vol. 28, no. 31, pp. 4571–4580, 2007.
- [10] R. Bruckdorfer, "The basics about nitric oxide," *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 26, no. 1-2, pp. 3–31, 2005.
- [11] M. Aslan e B. A. Freeman, "Oxidases and oxygenases in regulation of vascular nitric oxide signaling and inflammatory responses.," *Immunologic research*, vol. 26, no. 1-3, pp. 107–118, 2002.

- [12] P. Ascenzi, A. Bocedi, e L. Gradoni, "The Anti-Parasitic Effects of Nitric Oxide," *IUBMB Life*, vol. 55, no. 10, pp. 573–578, 2004.
- [13] A. Awasthi, A. Kumar, S. N. Upadhyay, T. Yamada, e Y. Matsunaga, "Nitric oxide protects against chloroquine resistant *Plasmodium yoelii nigeriensis* parasites in vitro.," *Experimental parasitology*, vol. 105, no. 3-4, pp. 184–191, 2003.
- [14] S. Ekmekcioglu, J. A. Ellerhorst, J. B. Mumm, M. Zheng, L. Broemeling, V. G. Prieto, A. L. Stewart, A. M. Mhashilkar, S. Chada, e E. A. Grimm, "Negative association of melanoma differentiation-associated gene (mda-7) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human melanoma: MDA-7 regulates iNOS expression in melanoma cells.," *Molecular cancer therapeutics*, vol. 2, no. 1, pp. 9–17, 2003.
- [15] S. Y. Chae, M. Lee, S. W. Kim, e Y. H. Bae, "Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin," *Biomaterials*, vol. 25, no. 5, pp. 843–850, 2004.
- [16] H. J. Lüth, G. Münch, e T. Arendt, "Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation," *Brain Research*, vol. 953, no. 1-2, pp. 135–143, 2002.
- [17] S. Goldstein e G. Czapski, "Kinetics of nitric oxide autoxidation in aqueous solution in the absence and presence of various reductants. The nature of the oxidizing intermediates," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 117, no. 49, pp. 12078–12084, 1995.
- [18] R. d. L. Barreto, C. R. D. Correia, e M. N. Muscará, "Óxido nítrico: Propriedades e potenciais usos terapêuticos," *Química Nova*, vol. 28, no. 6, pp. 1046–1054, 2005.
- [19] B. C. Smith e M. a. Marletta, "Mechanisms of S-nitrosothiol formation and selectivity in nitric oxide signaling," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 16, no. 5-6, pp. 498–506, 2012.
- [20] S. Pfeiffer, A. Schrammel, K. Schmidt, e B. Mayer, "Electrochemical Determination of S-Nitrosothiols with a Clark-Type Nitric Oxide Electrode," *Analytical Biochemistry*, vol. 258, no. 1, pp. 68–73, 1998.
- [21] J. Tejero, J. Santolini, e D. J. Stuehr, "Fast ferrous heme-NO oxidation in nitric oxide synthases," *FEBS Journal*, vol. 276, no. 16, pp. 4505–4514, 2009.
- [22] L. J. Ignarro, "Biosynthesis and Metabolism of Endothelium-Derived Nitric Oxide," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 30, no. 1, pp. 535–560, 1990.
- [23] S. S. Gross e M. S. Wolin, "Nitric Oxide: Pathophysiological Mechanisms," *Annual Review of Physiology*, vol. 57, no. 1, pp. 737–769, 1995.
- [24] D. J. Stuehr, "Mammalian nitric oxide synthases," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1411, no. 2-3, pp. 217–230, 1999.
- [25] D. J. Stuehr, "STRUCTURE-FUNCTION ASPECTS IN THE NITRIC OXIDE SYNTHASES," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 37, no. 1, pp. 339–359, 1997.
- [26] S. Daff, "NO synthase: structures and mechanisms.," *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*, vol. 23, no. 1, pp. 1–11, 2010.
- [27] N. F. Cerqueira e W. B. Yoshida, "Óxido Nítrico: Revisão," *Acta Cirurgica Brasileira*, vol. 17, no. 6, pp. 417–423, 2002.

- [28] C. Bogdan, "Nitric oxide and the immune response.," *Nature immunology*, vol. 2, no. 10, pp. 907–16, 2001.
- [29] D. A. Wink e J. B. Mitchell, "Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 25, no. 4-5, pp. 434–456, 1998.
- [30] K. D. Kröncke, K. Fehsel, e V. Kolb-Bachofen, "Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection—how, why, when, and where?," *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*, vol. 1, no. 2, pp. 107–120, 1997.
- [31] H. H. Schmidt, S. M. Lohmann, e U. Walter, "The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1178, no. 2, pp. 153–75, 1993.
- [32] J. W. Denninger e M. A. Marletta, "Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1411, no. 2-3, pp. 334–350, 1999.
- [33] B. T. Mellion, L. J. Ignarro, C. B. Myers, E. H. Ohlstein, B. A. Ballot, A. L. Hyman, e P. J. Kadowitz, "Inhibition of human platelet aggregation by S-nitrosothiols. Heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase and stimulation of cyclic GMP accumulation.," *Molecular pharmacology*, vol. 23, no. 3, pp. 653–64, 1983.
- [34] W. A. Buechler, K. Ivanova, G. Wolfram, C. Drummer, J. M. Heim, e R. Gerzer, "Soluble guanylyl cyclase and platelet function.," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 714, pp. 151–7, 1994.
- [35] R. Bakst, J. F. Merola, A. G. Franks, e M. Sanchez, "Raynaud's phenomenon: Pathogenesis and management," *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 59, no. 4, pp. 633–653, 2008.
- [36] M. Gayraud, "Raynaud's phenomenon," *Joint Bone Spine*, vol. 74, no. 1, pp. 1–8, 2007.
- [37] A. L. Herrick, "Pathogenesis of Raynaud's phenomenon.," *Rheumatology (Oxford, England)*, vol. 44, no. 5, pp. 587–96, 2005.
- [38] M. Baumhäkel e M. Böhm, "Recent achievements in the management of Raynaud's phenomenon.," *Vascular health and risk management*, vol. 6, no. 1, pp. 207–14, 2010.
- [39] R. a. Floyd, "Nitric Oxide and Cancer," in *Journal of Toxicologic Pathology*, vol. 29, pp. 113–92, Elsevier, 2007.
- [40] J. MacMicking, Q. W. Xie, e C. Nathan, "Nitric oxide and macrophage function.," *Annual review of immunology*, vol. 15, no. 1, pp. 323–50, 1997.
- [41] C. Szabó, H. Ischiropoulos, e R. Radi, "Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 6, no. 8, pp. 662–680, 2007.
- [42] M. B. Witte e A. Barbul, "Role of nitric oxide in wound repair," *The American Journal of Surgery*, vol. 183, no. 4, pp. 406–412, 2002.
- [43] A. Schwentker, Y. Vodovotz, R. Weller, e T. R. Billiar, "Nitric oxide and wound repair: role of cytokines?," *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, 2002.

- [44] H. P. Shi, D. T. Efron, D. Most, e A. Barbul, "The role of iNOS in wound healing," *Surgery*, vol. 130, no. 2, pp. 225–229, 2001.
- [45] M. B. Witte, F. J. Thornton, U. Tantry, e A. Barbul, "L-arginine supplementation enhances diabetic wound healing: Involvement of the nitric oxide synthase and arginase pathways," *Metabolism: Clinical and Experimental*, vol. 51, no. 10, pp. 1269–1273, 2002.
- [46] H. P. Shi, D. T. Efron, D. Most, U. S. Tantry, e A. Barbul, "Supplemental dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible nitric oxide synthase knockout mice.," *Surgery*, vol. 128, no. 2, pp. 374–378, 2000.
- [47] N. Hogg, "The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols.," *Annual review of pharmacology and toxicology*, vol. 42, no. 1, pp. 585–600, 2002.
- [48] K. Szaciłowski e Z. Stasicka, "S-NITROSOTHIOLS: MATERIALS, REACTIVITY AND MECHANISMS," *Progress in Reaction Kinetics and Mechanism*, vol. 26, no. 1, pp. 1–58, 2001.
- [49] M. W. Radomski, D. D. Rees, A. Dutra, e S. Moncada, "S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo," *British Journal of Pharmacology*, vol. 107, no. 3, pp. 745–749, 1992.
- [50] R. Vercelino, T. M. Cunha, E. S. Ferreira, F. Q. Cunha, S. H. Ferreira, e M. G. De Oliveira, "Skin vasodilation and analgesic effect of a topical nitric oxide-releasing hydrogel," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 24, no. 9, pp. 2157–2169, 2013.
- [51] G. F. P. de Souza, J. K. U. Yokoyama-Yasunaka, A. B. Seabra, D. C. Miguel, M. G. de Oliveira, e S. R. B. Uliana, "Leishmanicidal activity of primary S-nitrosothiols against Leishmania major and Leishmania amazonensis: implications for the treatment of cutaneous leishmaniasis.," *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*, vol. 15, no. 3, pp. 209–216, 2006.
- [52] T. P. Amadeu, A. B. Seabra, M. G. de Oliveira, e A. Monte-Alto-Costa, "Nitric Oxide Donor Improves Healing if Applied on Inflammatory and Proliferative Phase," *Journal of Surgical Research*, vol. 149, no. 1, pp. 84–93, 2008.
- [53] S. P. Singh, J. S. Wishnok, M. Keshive, W. M. Deen, e S. R. Tannenbaum, "The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, pp. 14428–14433, 1996.
- [54] E. V. Faassen e A. F. Vanin, "Low-molecular-weight S -nitrosothiols," in *Radicals for Life: The Various Forms of Nitric Oxide*, ch. 9, pp. 173–199, 1st ed., 2007.
- [55] A. K. V. Iyer, Y. Rojanasakul, e N. Azad, "Nitrosothiol signaling and protein nitrosation in cell death," *Nitric Oxide*, vol. 42, pp. 9–18, 2014.
- [56] W. R. Mathews e S. W. Kerr, "Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide.," *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 267, no. 3, pp. 1529–37, 1993.
- [57] E. Nagababu e J. M. Rifkind, "Routes for Formation of S-Nitrosothiols in Blood," *Cell Biochemistry and Biophysics*, vol. 67, no. 2, pp. 385–398, 2013.
- [58] T. a. Heinrich, R. S. Da Silva, K. M. Miranda, C. H. Switzer, D. a. Wink, e J. M. Fukuto, "Biological nitric oxide signalling: Chemistry and terminology," *British Journal of Pharmacology*, vol. 169, no. 7, pp. 1417–1429, 2013.

- [59] K. A. Broniowska e N. Hogg, "The Chemical Biology of S-Nitrosothiols," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 17, no. 7, pp. 969–980, 2012.
- [60] D. L. H. Williams, "The chemistry of S-nitrosothiols," *Accounts of Chemical Research*, vol. 32, no. 10, pp. 869–876, 1999.
- [61] B. C. Smith e M. A. Marletta, "Mechanisms of S-nitrosothiol formation and selectivity in nitric oxide signaling," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 16, no. 5-6, pp. 498–506, 2012.
- [62] M. Balazy, P. M. Kaminski, K. Mao, J. Tan, e M. S. Wolin, "S-nitroglutathione, a product of the reaction between peroxynitrite and glutathione that generates nitric oxide," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 48, pp. 32009–32015, 1999.
- [63] P. H. MacArthur, S. Shiva, e M. T. Gladwin, "Measurement of circulating nitrite and S-nitrosothiols by reductive chemiluminescence.," *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, vol. 851, no. 1-2, pp. 93–105, 2007.
- [64] A. R. Diers, A. Keszler, e N. Hogg, "Detection of S-nitrosothiols," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1840, no. 2, pp. 892–900, 2014.
- [65] D. Tsikas, M. Schmidt, A. Böhmer, A. a. Zoerner, F.-M. Gutzki, e J. Jordan, "UPLC–MS/MS measurement of S-nitrosoglutathione (GSNO) in human plasma solves the S-nitrosothiol concentration enigma," *Journal of Chromatography B*, vol. 927, pp. 147–157, 2013.
- [66] T. Xu, N. Scafa, L.-P. Xu, L. Su, C. Li, S. Zhou, Y. Liu, e X. Zhang, "Electrochemical Sensors for Nitric Oxide Detection in Biological Applications," *Electroanalysis*, vol. 26, no. 3, pp. 449–468, 2014.
- [67] B. Peng e M. E. Meyerhoff, "Reexamination of the Direct Electrochemical Reduction of S-Nitrosothiols," *Electroanalysis*, vol. 25, no. 4, pp. 914–921, 2013.
- [68] N. S. Bryan e M. B. Grisham, "Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 43, no. 5, pp. 645–657, 2007.
- [69] M. W. Foster, "Methodologies for the characterization, identification and quantification of S-nitrosylated proteins," *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, vol. 1820, no. 6, pp. 675–683, 2012.
- [70] D. Giustarini, A. Milzani, I. Dalle-Donne, e R. Rossi, "Detection of S-nitrosothiols in biological fluids: A comparison among the most widely applied methodologies," *Journal of Chromatography B*, vol. 851, no. 1-2, pp. 124–139, 2007.
- [71] S. Griveau e F. Bedioui, "Electroanalytical methodologies for the detection of S-nitrosothiols in biological fluids.," *The Analyst*, vol. 138, no. 18, pp. 5173–81, 2013.
- [72] V. A. Tyurin, Y. Y. Tyurina, S.-X. Liu, H. Bayir, C. A. Hubel, e V. E. Kagan, "[30] Quantitation of S-nitrosothiols in cells and biological fluids," in *Methods in enzymology*, vol. 352, pp. 347–360, 2002.
- [73] P. D. Wood, B. Mutus, e R. W. Redmond, "The Mechanism of Photochemical Release of Nitric Oxide from S-Nitrosoglutathione," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 64, no. 3, pp. 518–524, 1996.

- [74] R. a. Hunter e M. H. Schoenfish, "S -Nitrosothiol Analysis via Photolysis and Amperometric Nitric Oxide Detection in a Microfluidic Device," *Analytical Chemistry*, vol. 87, no. 6, pp. 3171–3176, 2015.
- [75] R. J. Singh, N. Hogg, J. Joseph, e B. Kalyanaraman, "Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 31, pp. 18596–18603, 1996.
- [76] A. J. Holmes e D. L. H. Williams, "Reaction of ascorbic acid with S-nitrosothiols: clear evidence for two distinct reaction pathways," *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, no. 8, pp. 1639–1644, 2000.
- [77] J. N. Smith e T. P. Dasgupta, "Kinetics and mechanism of the decomposition of S-nitrosoglutathione by l-ascorbic acid and copper ions in aqueous solution to produce nitric oxide.," *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*, vol. 4, no. 1, pp. 57–66, 2000.
- [78] V. Baldim, A. Ismail, P. Taladriz-Blanco, S. Griveau, M. G. de Oliveira, e F. Bedioui, "Amperometric Quantification of S-Nitrosoglutathione Using Gold Nanoparticles: A Step toward Determination of S-Nitrosothiols in Plasma," *Analytical Chemistry*, vol. 88, no. 6, pp. 3115–3120, 2016.
- [79] F. d. S. Oliveira, V. Togniolo, T. T. Pupo, A. C. Tedesco, e R. S. Da Silva, "Nitrosyl ruthenium complex as nitric oxide delivery agent: Synthesis, characterization and photochemical properties," *Inorganic Chemistry Communications*, vol. 7, no. 2, pp. 160–164, 2004.
- [80] K. M. Davies, D. a. Wink, J. E. Saavedra, e L. K. Keefer, "Chemistry of the Diazeniumdiolates. 2. Kinetics and Mechanism of Dissociation to Nitric Oxide in Aqueous Solution," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 123, no. 23, pp. 5473–5481, 2001.
- [81] L. K. Keefer, J. L. Flippen-Anderson, C. George, a. P. Shanklin, T. M. Dunams, D. Christodoulou, J. E. Saavedra, E. S. Sagan, e D. S. Bohle, "Chemistry of the diazeniumdiolates. I. Structural and spectral characteristics of the [N(O)NO]- functional group.," *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*, vol. 5, no. 4, pp. 377–94, 2001.
- [82] R. Serafim, M. Primi, G. Trossini, e E. Ferreira, "Nitric Oxide: State of the Art in Drug Design," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 19, no. 3, pp. 386–405, 2012.
- [83] A. L. Fitzhugh e L. K. Keefer, "Diazeniumdiolates: Pro- and antioxidant applications of the 'NONOates'," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 28, no. 10, pp. 1463–1469, 2000.
- [84] H. B. Lee, G. Khang, e J. H. Lee, "Polymeric Biomaterials," in *Biomaterials* (J. Y. Wong e J. D. Bronzino, eds.), vol. 36, ch. 3, pp. 3–24, CRC Press, 2007.
- [85] D. Das, Z. Zhang, T. Winkler, M. Mour, C. I. Günter, M. M. Morlock, H.-G. Machens, e A. F. Schilling, "Bioresorption and Degradation of Biomaterials.," *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, vol. 126, no. Outubro 2011, pp. 317–333, 2011.
- [86] N. R. Patel e P. P. Gohil, "A Review on Biomaterials : Scope , Applications & Human Anatomy Significance," *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, vol. 2, no. 4, pp. 91–101, 2012.
- [87] C. K. S. Pillai e C. P. Sharma, "Review paper: absorbable polymeric surgical sutures: chemistry, production, properties, biodegradability, and performance.," *Journal of biomaterials applications*, vol. 25, no. 4, pp. 291–366, 2010.

- [88] L. S. Nair e C. T. Laurencin, "Biodegradable polymers as biomaterials," *Progress in Polymer Science*, vol. 32, no. 8-9, pp. 762–798, 2007.
- [89] J. S. Boateng, K. H. Matthews, H. N. E. Stevens, e G. M. Eccleston, "Wound healing dressings and drug delivery systems: a review.," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 97, no. 8, pp. 2892–2923, 2008.
- [90] J. K. Vasir e V. Labhasetwar, "Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics.," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 59, no. 8, pp. 718–28, 2007.
- [91] M. M. Reynolds, M. C. Frost, e M. E. Meyerhoff, "Nitric oxide-releasing hydrophobic polymers: preparation, characterization, and potential biomedical applications.," *Free radical biology & medicine*, vol. 37, no. 7, pp. 926–36, 2004.
- [92] M. C. Jen, M. C. Serrano, R. van Lith, e G. A. Ameer, "Polymer-Based Nitric Oxide Therapies: Recent Insights for Biomedical Applications," *Advanced Functional Materials*, vol. 22, no. 2, pp. 239–260, 2012.
- [93] V. B. Damodaran, J. M. Joslin, K. a. Wold, S. M. Lantvit, e M. M. Reynolds, "S-Nitrosated biodegradable polymers for biomedical applications: synthesis, characterization and impact of thiol structure on the physicochemical properties," *Journal of Materials Chemistry*, vol. 22, no. 13, pp. 5990–6001, 2012.
- [94] H. Zhao, M. C. Serrano, D. A. Popowich, M. R. Kibbe, e G. A. Ameer, "Biodegradable nitric oxide-releasing poly(diols citrate) elastomers," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 9999A, pp. NA–NA, 2009.
- [95] P. N. Coneski, K. S. Rao, e M. H. Schoenfisch, "Degradable nitric oxide-releasing biomaterials via post-polymerization functionalization of cross-linked polyesters.," *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 11, pp. 3208–15, 2010.
- [96] Y. Wang, M. Kibbe, e G. Ameer, "Photo-crosslinked biodegradable elastomers for controlled nitric oxide delivery," *Biomaterials science*, pp. 625–632, 2013.
- [97] S. H. Yu, J. Hu, F. Ercole, N. P. Truong, T. P. Davis, M. R. Whittaker, e J. F. Quinn, "Transformation of RAFT Polymer End Groups into Nitric Oxide Donor Moieties: En Route to Biochemically Active Nanostructures," *ACS Macro Letters*, vol. 4, no. 11, pp. 1278–1282, 2015.
- [98] S. M. Shishido, A. B. Seabra, W. Loh, e M. G. De Oliveira, "Thermal and photochemical nitric oxide release from S-nitrosothiols incorporated in Pluronic F127 gel: Potential uses for local and controlled nitric oxide release," *Biomaterials*, vol. 24, no. 20, pp. 3543–3553, 2003.
- [99] a. B. Seabra, a. Fitzpatrick, J. Paul, M. G. De Oliveira, e R. Weller, "Topically applied S-nitrosothiol-containing hydrogels as experimental and pharmacological nitric oxide donors in human skin.," *The British journal of dermatology*, vol. 151, no. 5, pp. 977–83, 2004.
- [100] A. B. Seabra, R. da Silva, e M. G. de Oliveira, "Polynitrosated polyesters: Preparation, characterization, and potential use for topical nitric oxide release," *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 5, pp. 2512–2520, 2005.

- [101] A. Seabra, E. Pankotai, M. Fehér, Á. Somlai, L. Kiss, L. Bíró, C. Szabó, M. Kollai, M. de Oliveira, e Z. Lacza, "S-nitrosoglutathione-containing hydrogel increases dermal blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats," *British Journal of Dermatology*, vol. 156, no. 5, pp. 814–818, 2007.
- [102] J. L. Georgii, T. P. Amadeu, A. B. Seabra, M. G. de Oliveira, e A. Monte-Alto-Costa, "Topical S-nitrosoglutathione-releasing hydrogel improves healing of rat ischaemic wounds.," *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, vol. 5, no. 8, pp. 612–9, 2011.
- [103] R. H. Marcilli e M. G. de Oliveira, "Nitric oxide-releasing poly(vinyl alcohol) film for increasing dermal vasodilation," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 116, pp. 643–651, 2014.
- [104] M. de Oliveira, A. Moreira, A. Seabra, M. Simões, e S. Morato, "Stents coated with no- and s-nitrosothiol-eluting hydrophilic polymeric blends," May 6 2010. US Patent App. 11/997,087.
- [105] F. De Oliveira, M. G. de Oliveira, G. De Souza, C. De Oliveira, e V. Augusto, "S-nitrosothiols containing compositions for the treatment of fatty liver diseases, obesity and other diseases associated with the metabolic syndrome and the use of such compositions," Feb. 14 2008. WO Patent App. PCT/BR2007/000,099.
- [106] O. Pacheco, R. Moreira, A. Seabra, G. Souza, e M. de Oliveira, "Process for synthesis and incorporation of nitric oxide donors in macromolecular compositions," Dec. 17 2009. US Patent App. 12/441,341.
- [107] S. Barozzi, M. de Oliveira, M. Marra, M. Simões, e M. Penha, "Stents coated with no- and s-nitrosothiol-eluting hydrophilic polymeric blends," Feb. 1 2007. WO Patent App. PCT/BR2006/000,073.
- [108] J.-W. Yoo, G. Acharya, e C. H. Lee, "In vivo evaluation of vaginal films for mucosal delivery of nitric oxide.," *Biomaterials*, vol. 30, no. 23-24, pp. 3978–85, 2009.
- [109] W. Cai, J. Wu, C. Xi, e M. E. Meyerhoff, "Diazeniumdiolate-doped poly(lactic-co-glycolic acid)-based nitric oxide releasing films as antibiofilm coatings.," *Biomaterials*, vol. 33, no. 32, pp. 7933–44, 2012.
- [110] B. J. Nablo, H. L. Prichard, R. D. Butler, B. Klitzman, e M. H. Schoenfisch, "Inhibition of implant-associated infections via nitric oxide release," *Biomaterials*, vol. 26, no. 34, pp. 6984–6990, 2005.
- [111] A. F. Engelsman, B. P. Krom, H. J. Busscher, G. M. van Dam, R. J. Ploeg, e H. C. van der Mei, "Antimicrobial effects of an NO-releasing poly(ethylene vinylacetate) coating on soft-tissue implants in vitro and in a murine model," *Acta Biomaterialia*, vol. 5, no. 6, pp. 1905–1910, 2009.
- [112] D. A. Riccio, K. P. Dobmeier, E. M. Hetrick, B. J. Privett, H. S. Paul, e M. H. Schoenfisch, "Nitric oxide-releasing S-nitrosothiol-modified xerogels," *Biomaterials*, vol. 30, no. 27, pp. 4494–4502, 2009.
- [113] B. Wu, B. Gerlitz, B. W. Grinnell, e M. E. Meyerhoff, "Polymeric coatings that mimic the endothelium: combining nitric oxide release with surface-bound active thrombomodulin and heparin.," *Biomaterials*, vol. 28, no. 28, pp. 4047–55, 2007.

- [114] T. C. Major, D. O. Brant, M. M. Reynolds, R. H. Bartlett, M. E. Meyerhoff, H. Handa, e G. M. Annich, "The attenuation of platelet and monocyte activation in a rabbit model of extracorporeal circulation by a nitric oxide releasing polymer.," *Biomaterials*, vol. 31, no. 10, pp. 2736–45, 2010.
- [115] H. Zhang, G. M. Annich, J. Miskulin, K. Osterholzer, S. I. Merz, R. H. Bartlett, e M. E. Meyerhoff, "Nitric oxide releasing silicone rubbers with improved blood compatibility: preparation, characterization, and in vivo evaluation," *Biomaterials*, vol. 23, no. 6, pp. 1485–1494, 2002.
- [116] Y. Wu e M. E. Meyerhoff, "Nitric oxide-releasing/generating polymers for the development of implantable chemical sensors with enhanced biocompatibility," *Talanta*, vol. 75, no. 3, pp. 642–650, 2008.
- [117] Z. Yang, Y. Yang, K. Xiong, X. Li, P. Qi, Q. Tu, F. Jing, Y. Weng, J. Wang, e N. Huang, "Nitric oxide producing coating mimicking endothelium function for multifunctional vascular stents," *Biomaterials*, vol. 63, pp. 80–92, 2015.
- [118] J. Kim, G. Saravanakumar, H. W. Choi, D. Park, e W. J. Kim, "A platform for nitric oxide delivery," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 2, no. 4, p. 341, 2014.
- [119] J. F. Quinn, M. R. Whittaker, e T. P. Davis, "Delivering nitric oxide with nanoparticles," *Journal of Controlled Release*, vol. 205, pp. 190–205, 2015.
- [120] A. B. Seabra, G. Z. Justo, e P. S. Haddad, "State of the art, challenges and perspectives in the design of nitric oxide-releasing polymeric nanomaterials for biomedical applications," *Biotechnology Advances*, vol. 33, no. 6, pp. 1370–1379, 2015.
- [121] J. Saraiva, S. S. Marotta-Oliveira, S. A. Cicillini, J. d. O. Eloy, e J. M. Marchetti, "Nanocarriers for Nitric Oxide Delivery," *Journal of Drug Delivery*, vol. 2011, pp. 1–16, 2011.
- [122] N. Naghavi, A. de Mel, O. S. Alavijeh, B. G. Cousins, e A. M. Seifalian, "Nitric oxide donors for cardiovascular implant applications.," *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, vol. 9, no. 1, pp. 22–35, 2013.
- [123] J. S. Stamler, "S-Nitrosothiols in the Blood: Roles, Amounts, and Methods of Analysis," *Circulation Research*, vol. 94, no. 4, pp. 414–417, 2004.
- [124] X. Liu, Q. Liu, E. Gupta, N. Zorko, E. Brownlee, e J. L. Zweier, "Quantitative measurements of NO reaction kinetics with a Clark-type electrode.," *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*, vol. 13, no. 1, pp. 68–77, 2005.
- [125] W. R. Mathews e S. W. Kerr, "Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide.," *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 267, no. 3, pp. 1529–37, 1993.
- [126] J. M. Joslin e M. M. Reynolds, "Kinetics of S -Nitrosation Processes in Aqueous Polymer Solution for Controlled Nitric Oxide Loading: Toward Tunable Biomaterials," 2012.
- [127] A. B. Seabra, D. Martins, M. M. S. G. Simões, R. da Silva, M. Brocchi, e M. G. de Oliveira, "Antibacterial nitric oxide-releasing polyester for the coating of blood-contacting artificial materials.," *Artificial organs*, vol. 34, no. 7, pp. E204–14, 2010.
- [128] A. B. Seabra, R. da Silva, G. F. de Souza, e M. G. de Oliveira, "Antithrombogenic Polynitrosated Polyester/Poly(methyl methacrylate) Blend for the Coating of Blood-Contacting Surfaces," *Artificial Organs*, vol. 32, no. 4, pp. 262–267, 2008.

- [129] A. Seabra e M. de Oliveira, "Processo de obtenção de poliésteres polinitrosados como doadores de Óxido nítrico para aplicações biomédicas," 24 24/2/2003. PI0300784-7.
- [130] M. G. de Oliveira, S. M. Shishido, A. B. Seabra, e N. H. Morgon, "Thermal Stability of Primary S -Nitrosothiols: Roles of Autocatalysis and Structural Effects on the Rate of Nitric Oxide Release," *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 106, no. 38, pp. 8963–8970, 2002.
- [131] E. Fehling, K. Bergander, E. Klein, N. Weber, e K. Vosmann, "Thiol-functionalized copolymeric polyesters by lipase-catalyzed esterification and transesterification of 1,12-dodecanedioic acid and its diethyl ester, respectively, with 1-thioglycerol," *Biotechnology Letters*, vol. 32, no. 10, pp. 1463–1471, 2010.
- [132] A. B. Seabra, R. da Silva, G. F. de Souza, e M. G. de Oliveira, "Antithrombogenic Polynitrosated Polyester/Poly(methyl methacrylate) Blend for the Coating of Blood-Contacting Surfaces," *Artificial Organs*, vol. 32, no. 4, pp. 262–267, 2008.
- [133] M. A. Woodruff e D. W. Hutmacher, "The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century," *Progress in Polymer Science*, vol. 35, no. 10, pp. 1217–1256, 2010.
- [134] I. Castilla-Cortázar, J. Más-Estellés, J. M. Meseguer-Dueñas, J. L. Escobar Ivirico, B. Marí, e A. Vidaurre, "Hydrolytic and enzymatic degradation of a poly(ϵ -caprolactone) network," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 97, no. 8, pp. 1241–1248, 2012.
- [135] L. A. Bosworth e S. Downes, "Physicochemical characterisation of degrading polycaprolactone scaffolds," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 95, no. 12, pp. 2269–2276, 2010.
- [136] H. Sun, L. Mei, C. Song, X. Cui, e P. Wang, "The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant," *Biomaterials*, vol. 27, no. 9, pp. 1735–1740, 2006.
- [137] S. C. Neves, L. S. Moreira Teixeira, L. Moroni, R. L. Reis, C. A. Van Blitterswijk, N. M. Alves, M. Karperien, e J. F. Mano, "Chitosan/Polycaprolactone blend scaffolds for cartilage repair," *Biomaterials*, vol. 32, no. 4, pp. 1068–1079, 2011.
- [138] D. Puppi, F. Chiellini, A. Piras, e E. Chiellini, "Polymeric materials for bone and cartilage repair," *Progress in Polymer Science*, vol. 35, no. 4, pp. 403–440, 2010.
- [139] T. K. Dash e V. B. Konkimalla, "Polycaprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review," *Journal of Controlled Release*, vol. 158, no. 1, pp. 15–33, 2012.
- [140] D. Chen, J. Bei, e S. Wang, "Polycaprolactone microparticles and their biodegradation," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 67, no. 3, pp. 455–459, 2000.
- [141] V. Sinha, K. Bansal, R. Kaushik, R. Kumria, e A. Trehan, "Polycaprolactone microspheres and nanospheres: an overview," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 278, no. 1, pp. 1–23, 2004.
- [142] H. Doyle, S. Lohfeld, e P. McHugh, "Evaluating the effect of increasing ceramic content on the mechanical properties, material microstructure and degradation of selective laser sintered polycaprolactone/ β -tricalcium phosphate materials," *Medical Engineering & Physics*, vol. 37, no. 8, pp. 767–776, 2015.

- [143] B. W. Tillman, S. K. Yazdani, S. J. Lee, R. L. Geary, A. Atala, e J. J. Yoo, "The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction," *Biomaterials*, vol. 30, no. 4, pp. 583–588, 2009.
- [144] J. M. Williams, A. Adewunmi, R. M. Schek, C. L. Flanagan, P. H. Krebsbach, S. E. Feinberg, S. J. Hollister, e S. Das, "Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering," *Biomaterials*, vol. 26, no. 23, pp. 4817–4827, 2005.
- [145] V. Guarino, F. Causa, P. Taddei, M. di Foggia, G. Ciapetti, D. Martini, C. Fagnano, N. Baldini, e L. Ambrosio, "Polylactic acid fibre-reinforced polycaprolactone scaffolds for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 29, no. 27, pp. 3662–3670, 2008.
- [146] Y. Li, M. Stein, e B. J. Jungnickel, "Competition between crystallization and phase separation in polymer blends I. Diffusion controlled supermolecular structures and phase morphologies in poly(ϵ -caprolactone)/polystyrene blends," *Colloid & Polymer Science*, vol. 269, no. 8, pp. 772–780, 1991.
- [147] G. Defieuw, G. Groeninckx, e H. Reynaers, "Miscibility and morphology of binary polymer blends of polycaprolactone with solution-chlorinated polyethylenes," *Polymer*, vol. 30, no. 4, pp. 595–603, 1989.
- [148] G. Defieuw, G. Groeninckx, e H. Reynaers, "Miscibility, crystallization and melting behaviour, and semicrystalline morphology of binary blends of polycaprolactone with poly(hydroxy ether of bisphenol A)," *Polymer*, vol. 30, no. 12, pp. 2164–2169, 1989.
- [149] M. Muthukumar, "Nucleation in Polymer Crystallization," in *Advances in Chemical Physics*, vol. 128, pp. 1–63, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2004.
- [150] J. Yang, B. J. McCoy, e G. Madras, "Distribution kinetics of polymer crystallization and the Avrami equation," *Journal of Chemical Physics*, vol. 122, no. 6, p. 064901, 2005.
- [151] M. Avrami, "Kinetics of Phase Change. I General Theory," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 7, no. 12, pp. 1103–1112, 1939.
- [152] M. Avrami, "Kinetics of Phase Change. II - Transformation-Time Relations for Random Distribution of Nuclei," *Journal of Chemical Physics*, vol. 8, no. 2, pp. 212–224, 1940.
- [153] M. Avrami, "Granulation, Phase Change, and Microstructure Kinetics of Phase Change. III," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 9, no. 2, p. 177, 1941.
- [154] H. Hu e D. L. Dorset, "Crystal structure of poly(ϵ -caprolactone)," *Macromolecules*, vol. 23, no. 21, pp. 4604–4607, 1990.
- [155] H. Bittiger, R. H. Marchessault, e W. D. Niegisch, "Crystal structure of poly- ϵ -caprolactone," *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, vol. 26, no. 12, pp. 1923–1927, 1970.
- [156] J. D. Hoffman e J. J. Weeks, "Melting process and the equilibrium melting temperature of polychlorotrifluoroethylene," *Journal of Research of the National Bureau of Standards Section A: Physics and Chemistry*, vol. 66A, no. 1, pp. 13–28, 1962.
- [157] T. Nishi e T. T. Wang, "Melting Point Depression and Kinetic Effects of Cooling on Crystallization in Poly(vinylidene fluoride)-Poly(methyl methacrylate) Mixtures," *Macromolecules*, vol. 8, no. 6, pp. 909–915, 1975.

- [158] H. Marand, J. Xu, e S. Srinivas, "Determination of the equilibrium melting temperature of polymer crystals: linear and nonlinear Hoffman-Weeks extrapolations," *Macromolecules*, vol. 31, no. 23, pp. 8219–8229, 1998.
- [159] A. J. Coury, "Chemical and biochemical degradation of polymers," in *BIOMATERIALS SCIENCE An Introduction to Materials in Medicine 2nd Edition* (B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Shoen, e J. E. Lemons, eds.), ch. 6.2, pp. 411–430, Academic Press, 2^a ed., 2004.
- [160] M. Vert, "Aliphatic polyesters: great degradable polymers that cannot do everything.," *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 2, pp. 538–46, 2005.
- [161] C. X. F. Lam e S. H. Teoh, "Comparison of the degradation of polycaprolactone and polycaprolactone – (β -tricalcium phosphate) scaffolds in alkaline medium," *Polymer international*, vol. 728, no. October 2006, pp. 718–728, 2007.
- [162] F. von Burkersroda, L. Schedl, e A. Göpferich, "Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion.," *Biomaterials*, vol. 23, no. 21, pp. 4221–31, 2002.
- [163] A. Kumari, S. K. Yadav, e S. C. Yadav, "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems.," *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, vol. 75, no. 1, pp. 1–18, 2010.
- [164] C. G. Pitt, M. M. Gratzl, G. L. Kimmel, J. Surles, e A. Schindler, "Aliphatic polyesters II. The degradation of poly (DL-lactide), poly (epsilon-caprolactone), and their copolymers in vivo.," *Biomaterials*, vol. 2, no. 4, pp. 215–220, 1981.
- [165] Y. Cha e C. G. Pitt, "The biodegradability of polyester blends," *Biomaterials*, vol. 11, no. 2, pp. 108–112, 1990.
- [166] a. Göpferich, "Mechanisms of polymer degradation and erosion," *Biomaterials*, vol. 17, no. 2, pp. 103–114, 1996.
- [167] M. J. Jenkins e K. L. Harrison, "The effect of molecular weight on the crystallization kinetics of polycaprolactone," *Polymers for Advanced Technologies*, vol. 17, no. 6, pp. 474–478, 2006.
- [168] S. M. Li, X. H. Chen, R. a. Gross, e S. P. McCarthy, "Hydrolytic degradation of PCL/PEO copolymers in alkaline media," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 11, no. 4, pp. 227–233, 2000.
- [169] K. Fukushima, J. L. Feijoo, e M.-C. Yang, "Abiotic degradation of poly(dl-lactide), poly(caprolactone) and their blends," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 97, no. 11, pp. 2347–2355, 2012.
- [170] J. Kohn, W. J. Welsh, e D. Knight, "A new approach to the rationale discovery of polymeric biomaterials," *Biomaterials*, vol. 28, no. 29, pp. 4171–4177, 2007.
- [171] C. X. F. Lam, M. M. Savalani, S.-H. Teoh, e D. W. Huttmacher, "Dynamics of in vitro polymer degradation of polycaprolactone-based scaffolds: accelerated versus simulated physiological conditions," *Biomedical Materials*, vol. 3, no. 3, p. 034108, 2008.
- [172] D. Cam, S. H. Hyon, e Y. Ikada, "Degradation of high molecular weight poly(L-lactide) in alkaline medium.," *Biomaterials*, vol. 16, no. 11, pp. 833–843, 1995.

- [173] K. Fukushima, J. L. Feijoo, e M.-C. Yang, "Comparison of abiotic and biotic degradation of PDLLA, PCL and partially miscible PDLLA/PCL blend," *European Polymer Journal*, vol. 49, no. 3, pp. 706–717, 2013.
- [174] M. C. Frost, M. M. Reynolds, e M. E. Meyerhoff, "Polymers incorporating nitric oxide releasing/generating substances for improved biocompatibility of blood-contacting medical devices," *Biomaterials*, vol. 26, no. 14, pp. 1685–1693, 2005.
- [175] P. N. Coneski e M. H. Schoenfisch, "Synthesis of nitric oxide-releasing polyurethanes with S-nitrosothiol-containing hard and soft segments," *Polymer Chemistry*, vol. 2, no. 4, p. 906, 2011.
- [176] T. C. Major, D. O. Brant, C. P. Burney, K. A. Amoako, G. M. Annich, M. E. Meyerhoff, H. Handa, e R. H. Bartlett, "The hemocompatibility of a nitric oxide generating polymer that catalyzes S-nitrosothiol decomposition in an extracorporeal circulation model," *Biomaterials*, vol. 32, no. 26, pp. 5957–69, 2011.
- [177] P. S. Fleser, V. K. Nuthakki, L. E. Malinzak, R. E. Callahan, M. L. Seymour, M. M. Reynolds, S. I. Merz, M. E. Meyerhoff, P. J. Bendick, G. B. Zelenock, e C. J. Shanley, "Nitric oxide-releasing biopolymers inhibit thrombus formation in a sheep model of arteriovenous bridge grafts," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 40, no. 4, pp. 803–811, 2004.
- [178] B. Sun, D. L. Slomberg, S. L. Chudasama, Y. Lu, e M. H. Schoenfisch, "Nitric oxide-releasing dendrimers as antibacterial agents," *Biomacromolecules*, vol. 13, no. 10, pp. 3343–3354, 2012.
- [179] S. P. Nichols, A. Koh, N. L. Brown, M. B. Rose, B. Sun, D. L. Slomberg, D. a. Riccio, B. Klitzman, e M. H. Schoenfisch, "The effect of nitric oxide surface flux on the foreign body response to subcutaneous implants," *Biomaterials*, vol. 33, no. 27, pp. 6305–12, 2012.
- [180] K. A. Mowery, M. H. Schoenfisch, J. E. Saavedra, L. K. Keefer, e M. E. Meyerhoff, "Preparation and characterization of hydrophobic polymeric films that are thromboresistant via nitric oxide release," *Biomaterials*, vol. 21, no. 1, pp. 9–21, 2000.
- [181] H.-W. Jun, L. J. Taite, e J. L. West, "Nitric Oxide-Producing Polyurethanes," *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 2, pp. 838–844, 2005.
- [182] A. Prudente, C. L. Z. Riccetto, M. M. D. S. G. Simões, B. M. Pires, e M. G. de Oliveira, "Impregnation of implantable polypropylene mesh with S-nitrosoglutathione-loaded poly(vinyl alcohol)," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 108, pp. 178–184, 2013.
- [183] G. L. Ellman, "Tissue sulfhydryl groups," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 82, no. 1, pp. 70–77, 1959.
- [184] J. M. Joslin, B. H. Neufeld, e M. M. Reynolds, "Correlating S-nitrosothiol decomposition and NO release for modified poly(lactic-co-glycolic acid) polymer films," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 79, pp. 42039–42043, 2014.
- [185] M. C. Serrano, A. K. Vavra, M. Jen, M. E. Hogg, J. Murar, J. Martinez, L. K. Keefer, G. a. Ameer, e M. R. Kibbe, "Poly(diols-co-citrate)s as novel elastomeric perivascular wraps for the reduction of neointimal hyperplasia," *Macromolecular bioscience*, vol. 11, no. 5, pp. 700–9, 2011.

- [186] E. M. Hetrick, H. L. Prichard, B. Klitzman, e M. H. Schoenfisch, "Reduced foreign body response at nitric oxide-releasing subcutaneous implants.," *Biomaterials*, vol. 28, no. 31, pp. 4571–80, 2007.
- [187] M. Kushwaha, J. M. Anderson, C. A. Bosworth, A. Andukuri, W. P. Minor, J. R. Lancaster, P. G. Anderson, B. C. Brott, e H.-W. Jun, "A nitric oxide releasing, self assembled peptide amphiphile matrix that mimics native endothelium for coating implantable cardiovascular devices.," *Biomaterials*, vol. 31, no. 7, pp. 1502–8, 2010.
- [188] K. a. Wold, V. B. Damodaran, L. a. Suazo, R. a. Bowen, e M. M. Reynolds, "Fabrication of biodegradable polymeric nanofibers with covalently attached NO donors.," *ACS applied materials & interfaces*, vol. 4, no. 6, pp. 3022–30, 2012.
- [189] S. M. Shishido, A. B. Seabra, W. Loh, e M. G. de Oliveira, "Thermal and photochemical nitric oxide release from S-nitrosothiols incorporated in Pluronic F127 gel: potential uses for local and controlled nitric oxide release," *Biomaterials*, vol. 24, no. 20, pp. 3543–3553, 2003.
- [190] F. Bedioui e S. Griveau, "Electrochemical Detection of Nitric Oxide: Assessement of Twenty Years of Strategies," *Electroanalysis*, vol. 25, no. 3, pp. 587–600, 2013.
- [191] D. R. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 84th Edition, 2003-2004*, vol. 53. 2003.
- [192] R. F. Furchgott, "Endothelium-Derived Relaxing Factor: Discovery, Early Studies, and Identfication as Nitric Oxide (Nobel Lecture)," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 38, no. 13/14, pp. 1870–1880, 1999.
- [193] I. Fredriksson, C. Fors, e J. Johansson, "Laser Doppler Flowmetry - a Theoretical Framework," *Department of Biomedical Engineering, Linköeping University*, pp. 1–22, 2007.
- [194] D. O. Schairer, J. S. Chouake, J. D. Nosanchuk, e A. J. Friedman, "The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents," *Virulence*, vol. 3, no. 3, pp. 271–279, 2012.