Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

***APLICAÇÃO DO POLI(ϵ -CAPROLACTONA) COM
ESTRUTURA ESTRELADA PARA OBTENÇÃO DE MICROESFERAS
BIORREABSORVÍVEIS***

Tatiana Franco da Cunha

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de Mestre
em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear
– Aplicações.**

Orientadora: Dra. Olga Zazuco Higa

São Paulo

2012

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos e cunhada, que ao meu lado tem demonstrado fé e força ao superar o maior desafio imposto pelo destino, sem perder a alegria de viver.

Meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente a Deus, pela saúde e sabedoria fornecidas durante toda a execução deste trabalho.

Especialmente à Dr.^a Olga Zazuco Higa e ao prof. Dr. Álvaro Antonio Alencar de Queiroz, por terem sido a orientadora e o conselheiro científico deste projeto e por terem despertado a pesquisadora adormecida em mim.

Ao IPEN por ter me recebido como aluna para conduzir meu trabalho de mestrado.

À Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI) pelos laboratórios e equipamentos fornecidos para a síntese e a caracterização do polímero utilizado neste projeto.

Ao Laboratório Biosíntesis do Brasil LTDA, por me apoiar financeiramente durante os anos de desenvolvimento desta pesquisa.

À FAPESP e ao CNPQ pelas bolsas de treinamento técnico, fornecidas pelo programa PIPE e RHAE.

À Dr.^a Fabiana Medeiros por ter me contratado como colaboradora em sua empresa e juntas termos trabalhado à favor da inovação tecnológica brasileira.

À Dr.^a Andréa Cecília Dorion Rodas pelos ensinamentos em cultura celular.

Aos meus queridos colegas de trabalho Monica Haimoff, Ana Paula Manetta e Fernando Baratella, pelos exemplos de fé, coragem e determinação, durante nossa jornada de trabalho.

Aos meus colegas de pesquisa do Centro de Biotecnologia (CB), pela troca de experiências e conhecimento.

Aos meus amigos de fé que pelas palavras de incentivo e conforto me ajudaram a prosseguir até a finalização deste trabalho.

Ao Alexandre Ventieri pela troca de conhecimento em vários momentos durante esses dois anos de trabalho.

À Andressa Scabin, Bruna Arenque e Marco Rego, pelos momentos filosóficos e de descontração durante os anos deste mestrado.

E a Tina pela companhia durante todo o tempo de digitação desse trabalho.

Ter problemas na vida é inevitável, ser vencido por eles é opcional.

(Arnaldo Jabor)

*Posso não ter ido aonde queria ir, mas creio que estou exatamente onde eu
deveria estar.*

(Douglas Adams)

APLICAÇÃO DO POLI(EPILON-CAPROLACTONA) COM ESTRUTURA ESTRELADA PARA OBTENÇÃO DE MICROESFERAS BIORREABSORVÍVEIS

TATIANA FRANCO DA CUNHA

RESUMO

O poli(ϵ -caprolactona) (PCL) é um polímero biocompatível e biodegradável, aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) para ser usado como biomaterial. Diversos estudos utilizando sua forma linear ou ramificada têm demonstrado resultados promissores para seu uso no desenvolvimento de dispositivos médicos e em aplicações na área farmacêutica. O objetivo deste trabalho foi utilizar o PCL com estrutura estrelada (PCLE) para obter microesferas biorreabsorvíveis. Primeiramente realizou-se a avaliação das propriedades físico-químicas do PCLE por meio da cromatografia de permeação em gel (GPC), ressonância magnética de prótons (^1H -RMN) e carbono (^{13}C -RMN), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectrometria por infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). A avaliação toxicológica do PCLE foi obtida por meio do ensaio de citotoxicidade utilizando células CHO-K1 e o corante vital 5-(3-carboximethoxifenil)-2-(4,5-dimetiltiazolil)-3-(4-sulfofenil) tetrazolium e do acoplador de elétrons fenazine metilssulfato (MTS/PMS). O ensaio de biodegradação foi conduzido em pH 7,4 na presença de lipase a 37 °C. Após essas análises o PCLE foi utilizado para preparação de esferas por meio de emulsão complexa A/O/A. O PCLE foi caracterizado como um polímero de baixa massa molar, com dispersão de tamanho unimodal e cerca de 68,8 % de suas moléculas apresentaram estrutura estrelada com três braços. Em relação às propriedades térmicas o PCLE apresentou temperatura de fusão de 57,3 °C e temperatura de transição vítrea de -54,3 °C. A avaliação da citotoxicidade mostrou que o extrato de PCLE é compatível com o metabolismo celular. As microesferas obtidas a partir do PCLE, por emulsão A/O/A apresentaram polidispersão de tamanho.

APLICACION OF STAR-SHAPED POLY(EPILON-CAPROLACTONE) TO PREPARE BIOREABSORBABLE MICROSPHERES

TATIANA FRANCO DA CUNHA

ABSTRACT

The poly(ϵ -caprolactone) (PCL) is a biocompatible and biodegradable polymer which has been approved by Food and Drug Administration (FDA). Many studies that are using its linear or branched form have showed promising results for medical devices and controlled drug delivery applications. The aim of this research was the use of star-shaped PCL (PCLE) to prepare bioreabsorbable microspheres. At first, the physical-chemical properties were characterized by Gel Permeation Chromatography (GPC), Protons Resonance Magnetic Nuclear (^1H -RMN), Carbon Resonance Magnetic Nuclear (^{13}C -RMN), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FT-IR). The toxicological property was investigated by colorimetric assay using CHO-K1 cells and the vital dye (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) (MTS) and the electron acceptor phenazine methosulfate (PMS). The biodegradation behavior was evaluated in the presence of lipase at 37 °C and pH 7.4. The microspheres were prepared by complex emulsion W/O/W. The PCLE was characterized as low molecular weight polymer with monomodal distribution and about 68,8 % of the molecules were three-arm branched. The melting and glass transition temperatures were 57.3 °C and -54.3 °C, respectively. The cytotoxicity evaluation showed that PCLE extract was cell compatible. The obtained microspheres showed diameter polydispersity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. Objetivos.....	12
2.1. Objetivos específicos.....	12
3. Revisão da literatura.....	13
3.1. Uso do poli(ϵ -caprolactona) nas áreas médica e farmacêutica	13
3.2. Técnicas de preparo de micro e nano esferas e mecanismos de liberação....	15
3.3. Mecanismos de degradação do poli(ϵ -caprolactona)	18
3.4. Influência da estrutura estrelada do poli(ϵ -caprolactona) sobre suas propriedades.....	21
4. Metodologia.....	23
4.1. Caracterização do PCL com topologia estrelada	23
4.1.1. Cromatografia de permeação em gel (GPC)	23
4.1.2. Ressonância magnética nuclear de próton e carbono.....	24
4.1.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	25
4.1.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	25
4.2. Influência da radiação gama sobre as propriedades físico-químicas do PCLE	25
4.3. Avaliação da Citotoxicidade in vitro do PCLE	26
4.4. Obtenção das microesferas	27
4.5. Biodegradação das microesferas	28
5. Resultados e Discussão.....	29
5.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PCLE.....	29
5.1.1. Determinação do massa média e da massa molar média	29
5.1.2. Determinação da estrutura estrelada do PCLE	30
5.1.3. Determinação das propriedades térmicas	35
5.1.4. Determinação da microestrutura do PCLE.....	38
5.2. Influência da radiação gama sobre as propriedades físico-químicas do PCLE	40

5.2.1. Determinação da estrutura do PCLE após a irradiação.....	40
5.2.2. Determinação das propriedades térmicas após a irradiação	41
5.3. Avaliação da citotoxicidade	43
5.4. Obtenção das microesferas	53
5.5. Biodegradação das microesferas	60
6. Conclusões.....	63
7. Perspectivas futuras	64
8. Apendice 1 - Trabalho completo.....	65
9. Referências Bibliográficas.....	81

1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade o ser humano utiliza materiais disponíveis na natureza para a criação de artefatos que possam substituir tecidos ou órgãos lesados. Durante muito tempo a seleção desses materiais foi conduzida por tentativa e erro, sem avaliação prévia da compatibilidade entre os materiais e os tecidos biológicos. Com o avanço das pesquisas, surgiu a necessidade de padronizar nomenclaturas e elaborar normas para regulamentar o uso e desenvolvimento de materiais específicos para a área médica. Dessa forma, em meados da década de oitenta a conferência da “European Society for Biomaterials”, criou o termo biomaterial para ser aplicado a qualquer substância, metálica, cerâmica, polimérica ou compósito, natural ou sintética utilizada em contato direto com os tecidos do corpo humano, com o intuito de auxiliar ou substituir suas funções. Um biomaterial deve apresentar propriedades mecânicas e físico-químicas adequadas ao seu uso e devem ser biocompatíveis. Como são utilizados em condições estéreis devem ser passíveis a processos de esterilização e sua síntese deve ser viável para produção em larga escala (Ratner et al, 2004).

As propriedades mecânicas de um biomaterial devem ser projetadas de acordo com sua função. No caso de dispositivos utilizados para reparação ou substituição óssea, recomenda-se que estes suportem grandes variações de compressão e tração, visto que durante atividades diárias os ossos são expostos a uma pressão de 4 MPa, e que tendões e ligamentos sofrem variação de tração de 40 a 80 MPa. Também é importante observar a compatibilidade entre o módulo elástico do material utilizado e o tecido ósseo, pois diferenças de elasticidade podem causar fraturas tanto no dispositivo, quanto no osso.

A modificação das propriedades mecânicas dos biomateriais pode ser controlada principalmente por meio de sua região interna (*bulk*) que influencia na sua porosidade, permeabilidade, biodegradabilidade, resistência, densidade e elasticidade (Ramakrishna et al., 2001).

As propriedades físico-químicas determinam o tipo de interação entre os materiais e o meio fisiológico e consequentemente influenciam sobre a adsorção de proteínas e, adesão celular. Essas propriedades podem ser controladas modificando-se a superfície do material por meio da distribuição dos grupos funcionais ou da modificação da estrutura macromolecular (Courtney et al, 1994; Ríhová, 1996).

Além da seleção das propriedades mecânicas e físico-químicas para garantir a qualidade do material, também se deve investigar a biocompatibilidade dos biomateriais, ou seja, avaliar as possíveis respostas adversas que podem surgir no organismo após a sua aplicação para garantir a segurança dos usuários. Com o intuito de suprir essa necessidade, a comissão da *International Organization for Standardization* (ISO) desenvolveu o conjunto de normas técnicas “ISO 10993 – *Biological Evaluation of Medical Devices*” para preceituar ensaios capazes de avaliar a toxicidade celular, tecidual, sanguínea e imunológica do biomaterial e sua interação com esses sistemas.

Um biomaterial também deve suportar os processos de esterilização sem sofrer alterações em suas propriedades físico-químicas e mecânicas. A esterilização é um processo onde se procura eliminar todas as formas de microorganismos presentes para se obter um nível aceitável de segurança durante o uso de determinados materiais em pacientes. Os processos de esterilização podem ser de natureza física, química ou físico-química e acontecem por meio do vapor, do calor, da radiação ou de uma combinação desses métodos (Rutala, 1996; Athanasiou et al, 1996). Para escolher o melhor método de esterilização de um determinado material torna-se necessário conduzir análises que demonstrem a sua resistência diante desse método.

Os polímeros compõem a maior classe dos biomateriais. São vantajosos, pois podem ser sintetizados para mimetizarem os tecidos do organismo por meio das modificações em sua composição e arquitetura molecular. As pesquisas envolvendo seu uso na área médica iniciaram-se, em sua maioria, na década de 40, e após esse período os materiais poliméricos passaram a ocupar cada vez mais espaço dentro do desenvolvimento de dispositivos médicos e produtos farmacêuticos, sendo sintetizados ou modificados para serem utilizados como biomateriais. Inicialmente foram utilizados para fabricação de fios de sutura e aos poucos foram sendo adaptados para uso em liberação controlada de fármacos, implantes (ortopédicos, dérmicos e cardiovasculares) e suportes para engenharia de tecidos e para sistemas dinâmicos de cultura de células (Angelova & Hunkeler, 1999).

Podem ser classificados de acordo com sua origem (naturais ou sintéticos), natureza química (poliésteres, poliamidas, polianidros, etc.), composição dos monômeros (homopolímero, copolímero ou blendas), estabilidade molecular (degradável ou não-degradável), solubilidade em água (hidrofílico ou hidrofóbico) e

arquitetura molecular (linear, ramificada, estrelada, grafitizada, dendrímica). Todas essas características irão influenciar no desempenho dos dispositivos poliméricos.

Os polímeros naturais são produzidos por organismos por meio de processos biológicos complexos para a síntese de proteínas, moléculas para reserva energética e controle genético, dessa forma, sua síntese não oferece o controle requerido para garantir reprodutibilidade e rendimento, sendo essas suas principais desvantagens. Podem ser utilizados para a produção de hidrogéis biodegradáveis para liberação controlada de fármacos ou encapsulamento de células para engenharia de tecidos.

Os polímeros sintéticos são produzidos a partir da ligação sequencial de monômeros e podem ter suas características (taxa de degradação e solubilidade) ajustadas por meio da síntese de copolímeros, blends ou modificação da arquitetura molecular.

Uma das modificações da arquitetura molecular é a síntese de polímeros com ramificações em sua estrutura. Os polímeros estrelados são macromoléculas com estrutura tridimensional onde cadeias lineares poliméricas (ramificações) são ligadas a um núcleo multifuncional comum. Esses polímeros são considerados os tipos mais simples de polímeros ramificados possuindo propriedades intermediárias entre os polímeros lineares e os dendrímeros. Sua síntese simplificada confere a eles vantagem sobre os dendrímeros, enquanto que sua baixa viscosidade e baixo volume hidrodinâmico conferem vantagens sobre os polímeros lineares (Inoue, 2000).

A síntese de polímeros estrelados pode ser classificada como *arm-first*, iniciada a partir das ramificações, utilizando um agente com terminações multifuncionais, ou por reações cruzadas de polímeros lineares preparados por polimerização controlada da cadeia. Também pode ser *core-first*, onde cadeias poliméricas são propagadas utilizando um iniciador multifuncional. Geralmente este método é o mais utilizado, pois oferece um maior controle da síntese e o número de ramificações é determinado pelo número de grupos funcionais presentes no iniciador (Qiu & Bae, 2005).

Dentro da área farmacêutica os polímeros estrelados são utilizados para produção de dispositivos de liberação controlada de fármacos, pois formam micelas mais estáveis em meio aquoso do que as micelas lineares formadas por moléculas anfifílicas. Como apresentam menor volume hidrodinâmico podem ser utilizados para tratamento de tumores por meio da internalização das micelas e posterior liberação da

droga no interior do tumor sem que ocorra o acúmulo do polímero no tecido renal (Qiu & Bae, 2005).

2. OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi utilizar o PCLE para obter microesferas biorreabsorvíveis que poderão ser aplicadas no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos.

2.1. Objetivos específicos

- Realizar a caracterização físico-química do PCL estrelado por meio da determinação dos valores médios e da distribuição das massas molares médias, da determinação da estrutura estrelada e da determinação das propriedades térmicas.

- Verificar a influência da radiação gama sobre as propriedades físico-químicas do polímero estrelado, utilizada para esterilizar o material.

- Avaliar a biocompatibilidade do polímero estrelado, por meio do ensaio *in vitro* de citotoxicidade.

- Preparar microesferas por meio de emulsão complexa do tipo A/O/A.

- Avaliar a biodegradação *in vitro* das microesferas de PCL e PCLE.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Uso do poli(ϵ -caprolactona) nas áreas médica e farmacêutica

O poli(ϵ -caprolactona) (PCL) é um polímero aprovado pela Food, Drug Administration (FDA) para ser usado como biomaterial. É um polímero semicristalino com propriedades térmicas compatíveis com a temperatura corpórea, com excelente biocompatibilidade e resistência elástica. Todas essas características permitem que ele seja amplamente utilizado como biomaterial em diversas áreas da medicina, ortopedia e ortodontia.

Na engenharia de tecidos o PCL, seus copolímeros e compósitos foram investigados para a produção de suportes (*scaffolds*) para reconstituição dérmica (Chong et al, 2007), óssea (Shor et al, 2007), cardiovascular (Vaz et al, 2005) e de tecido cartilaginoso (Martin et al, 2007). Nesses suportes o PCL tem papel na regulação da taxa de biodegradação e no aumento da elasticidade (Kim et al, 2005). No processamento de suportes baseados em compósitos cerâmicos o PCL é utilizado como matriz maleável em técnicas de síntese que utilizam fusão dos materiais para a produção de membranas, como por exemplo, modelagem por fusão e deposição (Chim et al, 2006), eletrofiação (Li et al, 2006), extrusão por deposição e prototipagem rápida (Wiria et al, 2006, Shalumon et al, 2010, Pant et, 2011, Du et al, 2012, Theiler et al, 2011).

Os suportes biodegradáveis tridimensionais de copolímeros de PCL também podem ser utilizados para estudar a função do substrato sobre o comportamento de adesão, crescimento e diferenciação de células tronco, tanto em substrato estático quanto em substrato dinâmico. A produção de matriz extracelular de células tronco pluripotentes humanas foi maior no suporte biodegradável o qual favoreceu o processo de diferenciação celular, identificada pela redução da expressão de genes marcadores neurológicos, indicando que o substrato polimérico pode influenciar na diferenciação e crescimento dessas células (Yim et al, 2006). Com base nessa evidência, pesquisas para o desenvolvimento de materiais que modificam sua superfície ao serem submetidos a diferentes condições de cultivo começaram a ser conduzidas. Um suporte dinâmico

sintetizado a partir de PCLE com memória de forma foi utilizado para investigar se alterações na superfície do substrato de cultura poderiam ocasionar diferenças na morfologia de células tronco mesenquimais humanas. Após o cultivo das células sobre o suporte dinâmico, verificou-se que com a presença de canais formados sobre sua superfície, as células modificaram sua morfologia de estreladas para alongadas (**FIG. 1**). Esse copolímero com memória de forma foi considerado promissor para o desenvolvimento de suportes dinâmicos (Yim et al, 2006; Le et al, 2011).

Figura 1 – Células GFP-hMSCs foram cultivadas em suportes de PCLE dinâmicos e estáticos a 28 °C por um dia e após esse período foram expostas a 40 °C por uma hora. Na sequência foram deixadas para atingir o equilíbrio por 12 h. As imagens de fluorescência das células GFP-hMSCs cultivadas em superfícies planas e estáticas mostraram que as células apresentaram formato estrelar antes (a) e depois do tratamento. As imagens das células cultivadas em superfície estática com canais mostraram que as células estavam alinhadas antes (c) e depois (d) do tratamento. Células cultivadas sobre a superfície de suporte dinâmico com canais apresentaram alinhamento (e), entretanto, após o aquecimento a superfície se tornou plana e as células alteraram sua morfologia para estrelada, respondendo à transformação da superfície (f) (Le et al, 2011).

O PCLE com memória de forma também foi utilizado para a síntese de stents cardiovasculares. Nesse estudo o PCLE foi escolhido por sua característica elástica e térmica, pois favorece a mudança de forma na temperatura mais próxima da do corpo humano. Ao comparar o PCLE com o poli (ϵ -caprolactona) linear (PCL) para a produção do mesmo stent, verificou-se que o stent produzido com PCL demorou quase o dobro do tempo para recuperar 92 % da forma. Indicando que a utilização do PCLE é mais vantajosa para o desenvolvimento de polímeros com memória de forma (Xue et al, 2010).

Na área farmacêutica os polímeros a base de PCL foram utilizados para a produção de micro e nano esferas, implantes e stents como dispositivos de liberação controlada, onde participam na redução da toxicidade dos fármacos, no aumento da solubilidade de drogas hidrofóbicas e no seu direcionamento passivo ou ativo aos tecidos alvos. A alta permeabilidade do PCL a diversas drogas e moléculas permite que elas sejam liberadas da matriz por difusão. Como seus produtos de degradação não alteram o pH do meio, isso possibilita a incorporação de proteínas e anticorpos para a produção de vacinas, sem que as moléculas percam sua atividade. Em alguns casos a incorporação da droga em nanoesferas de PCL aumentou a eficiência da droga quando comparada à sua forma comercial livre (Pitt et al, 1979; Cao & Shoichet, 1999; Cauthier et al, 2003; Chandy et al, 2002; Espuelas et al, 1997; Vandermeulen et al, 2006; Forrest et al, 2007; Peng et al, 2008; Cheng et al, 2009, Wang et al, 2011).

3.2. Técnicas de preparo de micro e nano esferas e mecanismos de liberação

Microesferas são partículas esféricas que possuem diâmetro entre 2 a 50 μm e podem ter uma droga encapsulada ou ligada em sua matriz. Nanoesferas são partículas com diâmetro menor que 1 μm e podem conter uma droga adsorvida em sua superfície, dispersa internamente em sua matriz sólida (nanoesferas) ou encapsulada em sua cavidade (nanocápsulas) (Vauthier & Bouchemal, 2008).

As micro e nano esferas de PCL podem ser preparadas por técnicas mais simples por meio de emulsificação de soluções ou por técnicas mais complexas como a diálise. Os parâmetros de cada técnica precisam ser controlados para se obter esferas estáveis, com carga elétrica e solubilidade adequadas e com a menor dispersão de diâmetro. Esses fatores são importantes, pois irão determinar o direcionamento da droga no organismo, o tipo de interação celular e a sua taxa de liberação (Dash & Konkimalla, 2012).

As técnicas de emulsão envolvem o uso de um surfactante como estabilizador das esferas e solventes para a dissolução do polímero e da droga. Pode ser utilizada para preparar nanoesferas ou microesferas. Na emulsão simples, a droga e o polímero são dissolvidos em solvente orgânico e a solução resultante é despejada sobre o surfactante aquoso, sob forte agitação constante para a formação de emulsão água/óleo (A/O). Na

emulsão complexa, a droga é dissolvida em meio aquoso e despejada sobre a solução de polímero dissolvido sob agitação. A emulsão resultante dessa etapa é então despejada sobre a solução aquosa do surfactante também sob agitação, gerando emulsão, água/óleo/água (A/O/A). Em ambas as soluções a agitação permanece constante até a evaporação total do solvente. As esferas produzidas por essas técnicas podem apresentar diâmetro nanométrico em torno de 100 – 300 nm ou micrométrico em torno de 3 – 300 µm com morfologia esférica e superfície lisas. A capacidade de incorporação varia de 2 a 96 %. O tamanho pode ser controlado pela agitação, concentração do solvente e do surfactante. As emulsões A/O são adequadas apenas para a incorporação de drogas lipofílicas, enquanto que as emulsões A/O/A são adequadas para incorporação de drogas lipofílicas ou hidrofílicas. A desvantagem desse método é o resíduo de solvente que pode permanecer após o processamento das esferas (Sinha et al, 2005; Vauthier & Bouchemal, 2008, Dash & Konkimalla, 2012).

Na técnica de *spray drying* a solução do polímero e da droga é dispersa sobre a parede de um frasco utilizando o *spray-drier*. Os parâmetros podem ser controlados por meio do fluxo do *spray*. As esferas têm diâmetro menor (cerca de 3-30 µm) e a capacidade de incorporação é aproximadamente 47 %. Essa técnica é normalmente utilizada para preparação de microesferas (Sinha et al, 2005; Dash & Konkimalla, 2012).

A diálise é utilizada para a preparação de nanosferas. O polímero é dissolvido em solvente orgânico e a droga é adicionada nessa solução sob agitação. Após a evaporação total do solvente o material resultante é transferido para a membrana de celulose para o processo de diálise. As micelas são recolhidas, sonicadas e centrifugadas para remoção das partículas agregadas e a droga não incorporada. O diâmetro médio dessas esferas fica em torno de 300 nm e a capacidade de incorporação varia de 8 a 39%. Os parâmetros de controle são o método de preparação e as condições de processamento (Sinha et al, 2005; Dash & Konkimalla, 2012).

Na técnica de calor de fusão (*hot melt*) a droga é dispersa sobre o polímero fundido misturado ao surfactante. A mistura fica sob agitação constante e vai resfriando lentamente até a obtenção das partículas que são em seguida centrifugadas. Essa técnica é empregada na preparação de micro e nano esferas com variação de diâmetros entre

100 nm – 4000 nm. A capacidade de encapsulamento da droga fica em torno de 46 – 78 % (Sinha et al, 2005; Dash & Konkimalla, 2012).

Outras técnicas de preparação de micro e nano esferas utilizadas são: dispersão em solvente e disposição interfacial, dispersão eficiente de solução, polimerização *in situ* e liofilização (Sinha et al, 2005; Vauthier & Bouchemal, 2008; Dash & Konkimalla, 2012).

A liberação da droga pode ocorrer pela erosão da matriz devido o processo de biodegradação, porem como o PCL degrada lentamente é mais comum ocorrer a liberação da droga através de sua matriz polimérica por difusão. Geralmente a cinética de liberação é formada pelo pico inicial (*burst*) devido a presença da droga na superfície do dispositivo. Em seguida a liberação prossegue a uma taxa constante por um determinado período, que irá variar de acordo com a massa molecular do polímero ou com a capacidade de incorporação das esferas, que pode ser controlada pelo método de preparação e pela concentração do polímero, do solvente e do surfactante (Dash & Konkimalla, 2012; Sinha et al, 2005).

Ao entrar em contato com o meio fisiológico as micro e nano esferas devem ser, preferencialmente, direcionadas a tecidos-alvos e devem se manter estáveis, para evitar a liberação excessiva da droga antes de atingir seu local de atuação. A interação dos dispositivos poliméricos com as células e proteínas teciduais irá depender de sua carga superficial, do seu diâmetro e de sua massa molecular. Esferas com cargas catiônicas e menor diâmetro apresentam maior tendência de interagir com as células e serem internalizadas, já esferas com maior diâmetro e cargas aniônicas tem a tendência de serem fagocitadas por macrófagos ou eliminadas da corrente sanguínea pelo sistema fagocítico mononuclear. (Qiu & Bae, 2006; Kumari et al, 2010, Vauthier & Bouchemal, 2008).

Modificações superficiais por copolimerização (recobrando as esferas com PEG) e por funcionalização com marcadores celulares (por exemplo glutatona, ácido fólico) e aplicação de esferas sensíveis a alterações microambientais (temperatura, pH, potencial redox) são técnicas comumente empregadas para aumentar a eficiência de direcionamento e liberação da droga no tecido-alvo (Ganta et al, 2008).

3.3. Mecanismos de degradação do poli(ϵ -caprolactona)

Entre os biomateriais poliméricos podem-se destacar os polímeros biorreabsorvíveis passíveis de hidrólise autocatalítica onde suas ligações ésteres são clivadas gerando moléculas menores capazes de dissolver em meio aquoso e em contato com enzimas presente nos tecidos ou células fagocitárias, a hidrólise pode ser acelerada. Os produtos de degradação gerados por essas reações devem ser absorvidos e eliminados do organismo. Os polímeros biorreabsorvíveis sintéticos mais comuns são o poli(ácido glicólico) (PGA), o poli(ácido láctico) (PLA) e seus derivados, o PCL, e o poli(óxido de etileno) (PEO) (Barbanti et al, 2005).

O processo de biodegradação do PCL foi inicialmente avaliado para o desenvolvimento de embalagens plásticas biodegradáveis e alguns anos mais tarde, começou a ser estudado para o desenvolvimento de implantes biorreabsorvíveis para liberação controlada de fármacos (Woodruff & Hutmacher, 2010).

Nos estudos *in vitro* a avaliação da degradação do PCL geralmente é conduzida em um sistema dinâmico ou estático, utilizando soluções de tampão fosfato salino (PBS), com pH variando entre 7,0-7,6, em diversas temperaturas, na ausência ou na presença de enzimas isoladas de microorganismos ou de tecidos de mamíferos. O pó ou *pellets* de PCL, com diferentes massas molares, são dissolvidos em solventes apropriados ou fundidos, para a produção de filmes, que são submersos nas soluções de teste por períodos que variam de horas a meses. Em seguida as amostras são analisadas por meio da avaliação da massa molar ponderal e numérica, da massa do filme, da morfologia, da resistência, da cristalinidade e das propriedades térmicas. Em alguns casos a avaliação da degradação foi realizada pela quantificação da degradação por meio da dosagem de carbono orgânico total solúvel presente na solução de degradação.

Apesar das variações encontradas nos diversos estudos, alguns mecanismos gerais foram descritos. Em pesquisas onde os filmes de PCL foram imersos em PBS sem a presença de enzimas verificou-se que a taxa de degradação foi menor do que nas amostras expostas em soluções enzimáticas. Os filmes apresentaram ligeira queda nos valores das massas moleculares, mas não houve perda de massa dos filmes, nem alteração morfológica das superfícies. Na presença de lipases extraídas de microorganismos e esterase hepática de mamífero a hidrólise da cadeia do PCL produziu oligômeros solúveis, causou perda da resistência, e de massa e alterou a

morfologia superficial de amostras de PCL resultando na sua degradação completa em apenas 96 h (Tokiwa & Suzuki, 1977; Mochizuki et al, 1995; Gan et al, 1996; Darwis et al, 1998; Hakkarainen & Albertson, 2002; Pulkkinen et al, 2007 e 2009).

Por mais que a presença de lipases acelere o processo de degradação *in vitro*, sua influência no processo de degradação de dispositivos médicos a base de PCL é menor, uma vez que fisiologicamente a concentração das lipases é mais baixa do que a utilizada nos estudos *in vitro* e varia entre os tecidos. A presença de água também é proporcionalmente menor nos locais de implante e isso reduz a atividade da enzima sobre a superfície polímero. Além disso, estudos *in vitro* conduzidos com enzimas extraídas de mamífero mostram que a taxa de degradação do PCL não é modificada ou modifica pouco, indicando a menor atividade dessas enzimas sobre a hidrólise do polímero (Gan et al, 1996; Lim et al, 2005; Pulkkinen et al, 2007, 2009).

A evidência da menor participação de enzimas na degradação *in vivo* é confirmada pelos estudos conduzidos em animais, onde a degradação do PCL ocorreu lentamente e em duas etapas. A primeira com duração em torno de seis meses, está relacionada com a hidrólise espontânea das ligações ésteres catalisada pelos grupos carboxílicos terminais da cadeia polimérica. Nessa etapa a massa molecular do polímero vai reduzindo, mas não ocorre perda de massa do implante, uma vez que a hidrólise ocorre em toda a extensão da cadeia polimérica gerando fragmentos ainda insolúveis em meio aquoso. A segunda etapa, com duração de cerca de três meses, inicia quando a massa molecular do polímero reduz para aproximadamente 10000 g/mol. Nessa etapa iniciam-se a perda de massa do implante, pela produção de oligômeros menores solúveis em meio aquoso, e o processo de erosão, que fragiliza o implante e causa a perda da resistência mecânica e sua fragmentação (Pitt et al, 1981; Sun et al, 2006).

Após a fragmentação do implante a degradação e biorreabsorção do PCL prosseguem por meio da fagocitose dos fragmentos principalmente pelos macrófagos e células polimorfonucleares. Uma vez dentro dos fagossomos as partículas podem ser hidrolisadas pelas enzimas ali presentes (Woodward et al, 1985) ou pela presença de espécies reativas do oxigênio resultantes das reações inflamatórias no local do implante (Ali et al, 1993). A excreção final do PCL ocorre principalmente pela urina e fezes sem o acúmulo nos principais órgãos do corpo (Sun et al, 2006).

A taxa de degradação e erosão do PCL pode ser modulada alterando suas propriedades físico-químicas ou a arquitetura de sua cadeia polimérica, sendo a síntese de copolímeros uma das estratégias mais utilizadas. Em ensaios *in vitro* e *in vivo* verificou-se que a copolimerização gera materiais mais suscetíveis à perda de massa e massa molar conforme o tamanho e composição da cadeia polimérica. Copolímeros com cadeias de PCL mais longas tendem a ter a taxa de degradação e erosão menor do que os copolímeros com cadeias de PCL menores. As diferenças observadas são atribuídas à redução da cristalinidade e da hidrofobicidade do PCL quando está copolimerizado com PLA, PLLA, PGA, poli(ρ -dioxanona) (PPDO) ou amido de milho (Pitt et al, 1981; Fukusaki et al, 1990; Shen et al, 2007; Kulkarni et al, 2008; Duarte et al, 2010).

Amostras de PCL preparadas a partir de filmes com cadeias organizadas apresentam menor taxa de degradação e erosão. Quanto maior o grau de organização das cadeias, maior a cristalinidade da amostra e menor a taxa de degradação. Esse efeito também foi detectado em copolímeros estrelados de PCL-PGA, no entanto, devido a presença de ramificações na cadeia, os filmes de copolímero estrelado com cadeias organizadas perderam mais massa do que os filmes de copolímero linear com cadeias organizadas (Mochizuki et al, 1995; Jang et al, 1997, Cho et al, 2003).

O tamanho dos esferulitos de PCL presentes em uma amostra também pode modificar a taxa de degradação e o mecanismo de degradação. Filmes com esferulitos menores e homogêneos apresentam degradação em camadas com menor taxa do que filmes com esferulitos maiores e heterogêneos, que apresentam degradação difusa e com formação de poros. (Hou et al, 2007).

A alteração da arquitetura e da composição da cadeia polimérica, por meio de reações cruzadas (*crosslinking*), inserções de ramificações ou inserção de moléculas também alteram a taxa de degradação do PCL.

Filmes preparados a partir de PCL grafitizado (*crosslinked*) por meio da irradiação do polímero por raios gama tiveram sua taxa de degradação enzimática reduzida em comparação ao PCL não irradiado. Quanto maior o grau de reações cruzadas menor a taxa de degradação. A diferença encontrada foi atribuída à formação da arquitetura tridimensional da cadeia polimérica nos filmes irradiados (Darwis et al, 1998).

A inserção de ramificações por meio da síntese de moléculas estreladas também modifica o comportamento de erosão do PCL. Filmes produzidos por copolímeros estrelados composto por PCL-PGA, ou PCL-PLA tiveram sua perda de massa aumentada em relação a perda de massa dos filmes de copolímero linear. A diferença foi atribuída a diferença de cristalinidade devido a modificação molecular do copolímero (Cho et al, 2003; Liu et al, 2009).

A ligação da cadeia polimérica do PCL à moléculas de 2,2'-bis(2-oxazolina) (PCL-O) acelerou a degradação e a erosão enzimática *in vitro*, em fluido intestinal simulado e em implantes subcutâneos *in vivo*, dos filmes de PCL-O. Nesse caso a taxa de degradação e erosão foram controladas alterando o tamanho dos blocos de PCL presentes no polímero. Quanto maior o bloco, menor a taxa de degradação e erosão dos filmes (Pulkkinen et al, 2007 e 2009).

A temperatura também pode influenciar na taxa de degradação e erosão do PCL nos ensaios *in vitro*. Entretanto, considerando o uso do PCL como dispositivo médico, a influência dessa variável tem menor impacto sobre o comportamento de degradação e erosão do polímero, pois as modificações encontradas nessa propriedade ocorreram em temperaturas próximas ao seu ponto de fusão (55 °C), temperatura muito acima da temperatura corpórea (Darwis et al, 1998).

3.4. Influência da estrutura estrelada do poli(ϵ -caprolactona) sobre suas propriedades

O avanço na área da química supramolecular permitiu o desenvolvimento de novas cadeias poliméricas com estruturas complexas formadas por ramificações. Essas macromoléculas são classificadas de acordo com sua conformação em polímeros estrelados (*star-shaped polymers*), quando ramificações partem de um núcleo central; polímeros altamente ramificados, quando longas ramificações partem de uma cadeia polimérica linear; e dendrímeros, quando possuem ramificações que surgem a cada unidade monomérica e favorecem a ligação de outras moléculas ou cadeias, formando uma macromolécula com gerações definidas (Qiu & Bae, 2006).

A aplicação das macromoléculas tem contribuído para avanços tecnológicos nas ciências básicas, na engenharia e na área da saúde, onde são utilizadas para o desenvolvimento de dispositivos para liberação controlada de fármacos, transfecção gênica, produção de vacinas e suportes em engenharia de tecidos (Frechet, 2003).

A presença de ramificações modifica as propriedades térmicas do PCL. O PCL possui valores de temperatura transição vítrea (T_g) em torno de $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura de fusão (T_m) entre 59 e $64\text{ }^{\circ}\text{C}$ e entalpia de fusão (ΔH_m) de $139,6\text{ J/g}$, dependendo da natureza de sua matriz cristalina. Já o PCLE pode apresentar valores de T_m entre $37,9$ e $51,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e ΔH_m entre $72,2$ a $76,6$ dependendo do número de ramificações de da massa molecular do polímero (ramificações maiores podem se ordenar mais facilmente, causando aumento nos valores de T_m e ΔH_m) (Sinha et al, 2005; Choi et al, 2005, Wang et al, 2006).

Em pesquisas realizadas comparando PCL e PCLE sintetizados a partir de alcoóis ou núcleos dendríticos verificou-se que a unidade cristalina dos polímeros ramificados permaneceu a mesma dos polímeros lineares. A formação e o crescimento dos esferulitos foram controlados pelo número de ramificação e pela massa molecular do PCL, sendo que para os esferulitos do PCLE com 4 e 6 ramificações, sua morfologia apresentou falhas que puderam ser corrigidas aumentando a massa molecular dos polímeros. A cristalinidade do PCLE diminuiu, sugerindo que cadeias curtas próximas aos núcleos dendríticos não sofreram cristalização. Em amostras de PCLE com o mesmo número de ramificações a cristalinidade aumentou com o aumento de sua massa molecular. A presença de ramificações também reduz a viscosidade e o volume ocupado pela molécula polimérica gerando moléculas mais compactas do que as lineares com mesma massa molecular (Nuñez et al, 2004, Wang et al, 2006; Choi et al, 2005; Lang et al, 2002).

Essas modificações no volume hidrodinâmico e nas propriedades térmicas permitem que o uso do PCLE aumente o sucesso de síntese de nanofibras por eletrofiação, reduzindo as falhas inerentes do processo e na fabricação de micelas anfifílicas, reduzindo a concentração crítica micelar (Lele & Leroux, 2006; Puppi et al, 2010; Suriano et al, 2010).

4. METODOLOGIA

O polímero estrelado utilizado nesse projeto foi sintetizado nos laboratórios da Universidade Federal de Itajubá sob orientação do prof. Dr. Álvaro Antonio Alencar de Queiroz. O PCLE com três braços foi obtido por polimerização por abertura do anel lactônico (ROP), utilizando o glicerol como iniciador e o 2-etilhexanoato de estanho (SnOct_2) como catalisador da reação (**FIG. 2**).

Figura 2 – Esquema da síntese do PCLE.

4.1. Caracterização do PCL com topologia estrelada

4.1.1. Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A análise por GPC do PCLE permitiu determinar os valores médios da massa molar média numérica (M_n), da massa molar média ponderal (M_w) e o índice de polidispersividade (IP). A M_n é baseada no número de moléculas (n_i) da espécie i e da sua massa molar (M_i).

A M_w baseia-se na fração em massa (w_i) das moléculas de uma determinada massa molar.

Os testes foram realizados no Cromatógrafo Waters 244, equipado com detector de índice de refração. Na análise de GPC, o solvente tetrahidrofurano (THF) foi utilizado como eluente. O volume de injeção da amostra foi de 50 μL e velocidade de

fluxo 1 mL/min. Foram utilizadas colunas Waters Ultrastyrigel 103 Å (200 – 3000) – Waters Ultrastyrigel HR-1 100 Å (10 – 5000) colocadas em série. A curva de calibração foi determinada com padrões de poliestireno de massas molares 785, 1950, 5000 e 9075 g/mol. A M_n e a M_w foram calculadas por:

$$M_n = \frac{\sum h_i}{\sum \frac{h_i}{s(M_p/s)_i^t}} \quad M_w = \frac{E \sum h_i s(M_p/s)_i^t}{\sum h_i}$$

O termo $(M_p/s)_i$ representa a massa molecular do polímero padrão utilizado para a construção da curva de calibração. A altura do pico no cromatograma do polímero fracionado e o volume de eluição são representados por h_i e i , respectivamente. Os termos s e t são constantes experimentais, características do equipamento utilizado. O IP é definido como:

$$IP = \frac{M_w}{M_n}$$

4.1.2. Ressonância magnética nuclear de próton e carbono

A ressonância magnética nuclear de próton (^1H -RMN) e carbono (^{13}C -RMN) permitiu identificar a topologia estrelada do PCLE e foi efetuada em um espectrômetro Bruker AM-500 da Faculdade de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Nacional de Buenos Aires. Uma alíquota da amostra do PCLE foi dissolvida em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e os grupos hidroxilas terminais foram esterificados com anidrido tricloroacético.

4.1.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise de DSC do PCLE permitiu determinar as temperaturas de transição vítrea (T_g) e de fusão (T_m), o calor ou entalpia de fusão (ΔH_m), a temperatura de cristalização (T_c) e a entalpia de cristalização (ΔH_c). A amostra foi analisada sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min), com velocidade de aquecimento de 10 °C/min em um equipamento Perkin Elmer DSC 60, previamente calibrado com padrões de índio com cadinho de alumínio e tampa não hermética. O intervalo de temperaturas explorado foi de -120 °C a 80 °C. A amostra foi aquecida de -120 °C até 80 °C e em seguida resfriada rapidamente até -120 °C. Atingido o equilíbrio térmico, a amostra foi submetida a novo aquecimento nas mesmas condições e novamente resfriada a -120 °C. A T_m e a ΔH_m foram determinadas no primeiro ciclo de aquecimento. A T_g foi determinada somente no segundo aquecimento onde sua visualização foi mais clara. A temperatura de cristalização T_c e a ΔH_c foram obtidas durante o resfriamento.

4.1.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Neste trabalho, a análise por FT-IR permitiu a análise da presença de grupos funcionais característicos do polímero PCLE. As análises dos filmes de PCLE realizaram-se no equipamento Perkin Elmer Spectrum One (FT-IR) do laboratório de biomateriais da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI). A faixa de análise foi de 4000 a 400 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e intervalo de 2 cm^{-1} .

4.2. Influência da radiação gama sobre as propriedades físico-químicas do PCLE

O PCLE foi irradiado a dose de 12, 25 e 100 kGy em irradiador de ^{60}Co para verificar a influência dos raios gama sobre as propriedades físico-químicas do PCLE para avaliar a possibilidade de utilizar a radiação como técnica de esterilização das microesferas.

Após a irradiação, as amostras do polímero foram caracterizadas por FT-IR e DSC, seguindo os mesmos procedimentos e condições da caracterização físico-química.

4.3. Avaliação da Citotoxicidade *in vitro* do PCLE

Para avaliação da citotoxicidade preparou-se um extrato de PCLE em meio RPMI 1640 (Gibco[®]) sem soro, na concentração de 200 mg/mL, seguindo a orientação normativa da ISO 10.993-12 (ISO 10993-12). O extrato foi incubado por 48 h à 37 °C e em seguida filtrado utilizando filtro de seringa com poros de 0,45 µm (Corning[®]) para retirada de material particulado. A solução resultante foi então submetida à diluição seriada 1:2 até a concentração de 6,25 mg/mL.

Alíquotas de 50 µL de cada extrato foram pipetadas em quadruplicata para uma placa de 96 poços e em seguida adicionaram-se sobre as amostras, 50 µL de suspensão celular contendo 3×10^3 células da linhagem permanente de células de ovário de hamster chinês (CHO-K1).

As placas foram incubadas por 72 h em estufa com atmosfera com 5 % de CO₂ a 37 °C e ao final desse período adicionaram-se 20 µL de solução 20:1 do corante supra vital 5-(3-carboximethoxifenil)-2-(4,5-dimetiltiazolil)-3-(4-sulfofenil)tetrazolium e do acoplador de elétrons fenazine metossulfato (MTS/PMS) (Promega[®]) e incubaram-se as placas por mais 2 h (Barltrop et al, 1991). As células viáveis do ensaio possuem a capacidade de reduzir o sal tetrazólico em formazam, resultando em um composto de cor púrpura que pode ser lido em leitor de placas espectrofotométrico. O resultado do ensaio citotoxicidade foi obtido pela leitura em espectrofotômetro (Molecular Device[®]) no comprimento de onda de 490 nm. O cálculo da viabilidade celular (% Viab) é realizado pela equação:

$$\% \text{ Viab} = (\text{mDO}_e / \text{mDO}_c) \times 100$$

Onde mDO_e é a média das leituras de densidades óticas obtidas para cada concentração do extrato e mDO_c é a média das leituras de densidades óticas obtidas para

o controle (células cultivadas sem amostra). A curva dose-resposta foi construída em função da concentração do extrato e dos valores de viabilidade celular encontrados.

4.4. Obtenção das microesferas

As microesferas foram obtidas por meio de emulsão simples A/O/A, utilizando como agente estabilizador da emulsão uma composição de azeite de oliva com dioctil sulfosuccinato de sódio (DMSS) ou com Renex 60[®].

O PCLE foi dissolvido em diclorometano (Merk) (1:13 m/v) sob agitação magnética até completa dissolução do pó. Em seguida, a solução foi levada ao sonicador por 20 minutos a temperatura ambiente.

O agente estabilizador foi preparado a partir de 25 mL de óleo de oliva comercial com 0,3% de DMSS (emulsão 1) ou 25 mL de óleo de oliva comercial com 0,3% Renex 60[®] (emulsão 2). A solução foi homogeneizada por 20 minutos em agitador (IKA[®]) a temperatura ambiente.

A emulsão foi preparada adicionando a solução de PCLE dissolvido sobre o agente estabilizador sob agitação. A agitação foi mantida a 1500 ou 2000 rpm por 3 ou 10 min (**FIG. 3**) e em seguida foi reduzida a 900 rpm por um período de 4 h até a evaporação completa do solvente.

As microesferas foram recuperadas por centrifugação por 15 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante resultante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em hexano (Merk[®]) para remoção do óleo de oliva. A solução foi centrifugada (centrífuga Celm[®]) novamente para a separação das microesferas. Esse procedimento de lavagem foi repetido por três vezes até que o sobrenadante saísse límpido.

As esferas foram recolhidas armazenadas em dessecador a vácuo até serem fotografadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) nos aumentos de 500 x e 2500 x. A citotoxicidade das esferas foi avaliada conforme metodologia descrita no item 4.3 deste trabalho.

Figura 3 - Esquema de preparação das emulsões para obtenção das microesferas de PCLE.

4.5. Biodegradação das microesferas

As microesferas de PCL e PCLE preparadas por emulsão complexa A/O/A e evaporação do solvente foram colocadas em solução de PBS contendo 0,6 mg/mL de lipase (E.C.3.1.3) e colesterol esterase (E.C.3.1.1.1). A biodegradação foi avaliada por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) utilizando o equipamento Malvern Zetasizer

3.000 para detectar alterações em seu raio hidrodinâmico (R_h). O ensaio foi conduzido por 40 h a 37° C.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PCLE

5.1.1. Determinação do massa média e da massa molar média

Entre os métodos modernos para a caracterização de polímeros, a cromatografia de permeação em Gel (GPC) ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade para determinar as massas molares médias e a distribuição de massas molares. Várias propriedades dos polímeros que são importantes em termos de sua processabilidade e aplicações estão diretamente relacionadas com as massas moleculares específicas. Isto ocorre porque as propriedades mecânicas, químicas e de biorreabsorção são afetadas pela massa molecular do polímero.

Na **FIG. 4** está representado o gráfico da análise de GPC do PCLE. De acordo com os valores de M_n e de M_w , concluí-se que o PCLE apresenta uma faixa de distribuição unimodal, ou seja, um pico de distribuição de massas moleculares, com IP igual a 1,53. A massa M_n calculada foi de 5.430 g/mol e a M_w foi de 8.280 g/mol; levando-se em consideração a curva de calibração. A massa molar para as sínteses de PCLE foi da ordem de 10^3 g/mol, o que o caracteriza como um polímero de baixa massa molecular. Os valores de M_n , M_w e IP encontrado para o PCLE estão semelhantes aos valores relatados na literatura (Lang et al, 2002).

A massa molecular tem influência sobre a permeabilidade do polímero e sobre a taxa de biorreabsorção do PCL. Em estudos conduzidos *in vivo* verificou-se que quando a massa molecular do PCL reduziu para valores em torno de 10.000 g/mol, sua taxa de biorreabsorção aumentou e o implante terminou de ser reabsorvido em aproximadamente três meses, tempo equivalente a 1/3 do tempo total da degradação do implante (Pitt et al, 1979; Woodward et al, 1985, Sun et al, 2006). Dessa forma, o valor de massa molecular do PCLE, encontrado neste trabalho, pode reduzir a taxa de biorreabsorção de implantes e dispositivos para liberação controlada de fármacos.

Figura 4 – Análise de GPC do polímero PCLE.

Para um material ser utilizado na síntese de micro e nano esferas na área farmacêutica, é necessário que ele seja totalmente eliminado do organismo pelas vias metabólicas normais. A massa molecular é um dos fatores limitantes para eliminação renal de grandes moléculas poliméricas resultando em acúmulo de material no tecido. Valores acima de 45 KDa (45.000 g/mol) são incompatíveis com a capacidade de absorção dos glomérulos. A Mw do PCLE ficou abaixo do limite máximo permitido para eliminação renal (Qiu & Bae, 2006; Vauthier & Bouchemal, 2008).

5.1.2. Determinação da estrutura estrelada do PCLE

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C para o poliéster esterificado com anidrido trifluoroacético e seus sinais correspondentes estão representados nas **FIG. 5 e 6** respectivamente. Na **FIG. 5** observam-se os sinais de ^1H -RMN e as atribuições dos hidrogênios da ligação do glicerol aos monômeros do PCL. O pico a representa um

triplete referente à ligação da hidroxila do grupo metino do glicerol ao grupo éster do monômero ϵ -CL. O sinal b representa um duplo dubleto referente à ligação da hidroxila dos grupos metilenos do glicerol ao grupo éster do monômero ϵ -CL, confirmando assim a estrutura com topologia estrela do polímero obtido. O sinal c' é um triplete correspondente aos hidrogênios dos grupos metilenos vizinhos às hidroxilas esterificadas com anidrido trifluoroacético. O sinal c é um triplete referente aos hidrogênios dos grupos metilenos adjacentes aos oxigênios do grupo éster. Os picos e e f são equivalentes e estão sobrepostos, são quartetos e representam os hidrogênios dos grupos metilenos vizinhos aos hidrogênios de dois grupos metilenos. O pico d é um triplete e representa os hidrogênios do grupo metileno vizinhos aos hidrogênios de outro grupo metileno. O sinal dos hidrogênios g é de um grupo metileno vizinho aos hidrogênios de dois grupos metilenos sendo um quarteto.

Figura 5 – Espectro de ^1H -RMN (A) e detalhamento dos sinais a e b (B) de PCLE.

O espectro de ^{13}C -RMN do PCLE e as atribuições dos carbonos da cadeia polimérica estão representados na **FIG. 6**. O sinal h em 175 ppm corresponde a carbonila do grupo éster do monômero ϵ -CL. Os picos a e b correspondem aos carbonos do glicerol que fazem a ligação com o grupo éster do monômero. O pico c corresponde ao carbono do grupo metileno que se liga ao oxigênio na cadeia do monômero. O pico d representa o carbono do grupo metileno do monômero que está ligado ao oxigênio do grupo éster. Os picos e, f, g são carbonos dos grupos metilenos da cadeia do monômero.

Figura 6 – Espectro de ^{13}C -RMN do PCLE

Os sinais de ^1H -RMN dos hidrogênios Ha e Hb são fortemente afetados pelo peso molecular médio numérico (M_n), isto é, pela relação entre ϵ -CL:glicerol. A partir dos sinais de Ha foi possível calcular o grau de substituição do glicerol. O resultado obtido indica que 68,80% do glicerol encontram-se trissubstituído, 31,20% dissustituído, enquanto não existem espécies monossustituídas (**Tabela 1**). A funcionalidade efetiva (f) do glicerol foi de 2,7 (**Tabela 2**).

Tabela 1 – Dados utilizados para o cálculo do grau de substituição do glicerol a partir da massa molecular média

Pico	Localização (ppm)	Valor da integração	Porcentagem de substituição
1	5,32 a 5,16	2258086	68,80
2	5,14 a 5,02	1023912	31,20
3	4,96 a 4,86	0	0

Para obter as porcentagens de glicerol tri, di e monossustituído dividem-se o valor da integração de cada pico pela soma das integrações dos três picos:

$$\text{Glicerol trissustituído (\%)} = \frac{1}{1+2+3} \times 100 = \frac{2258086}{3281998} \times 100 = 68,80\%$$

$$\text{Glicerol 1,3 dissustituído (\%)} = \frac{2}{1+2+3} \times 100 = \frac{1023912}{3281998} \times 100 = 31,20\%$$

$$\text{Glicerol monossustituído (\%)} = \frac{3}{1+2+3} \times 100 = \frac{0}{3281998} \times 100 = 0\%$$

Na **Tabela 2** são mostradas as condições de reação, relação molar, solvente utilizado, rendimento, funcionalidade teórica e efetiva, comprimento médio da cadeia de PCLE. A funcionalidade efetiva do iniciador da reação e o comprimento médio da cadeia de PCLE foram determinados por ^1H -RMN.

Tabela 2 – Condições de reação para obtenção do PCLE.

Funcionalidade teórica (número de grupos hidroxila do glicerol)	3
Relação molar (ϵ -CL:OH)	8:1
Rendimento da reação	90,84%
Funcionalidade efetiva (determinada por ^1H -RMN)	2,7
Comprimento médio dos braços do PCLE (determinado por ^1H -RMN, comparando as interações 4,1 e 3,6 ppm)	13,1

Por meio das caracterizações por ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, pode-se afirmar que a síntese do PCLE atingiu o objetivo de obtenção de um o polímero com estrutura do tipo estrela, em um processo controlado.

A estrutura do PCLE contendo 3 braços deduzida dos espectros está apresentada na **FIG. 7**. Os grupos metilenos do caprolactona adjacentes à hidroxila esterificada com anidrido trifluoroacético foram chamados de c'. Os grupos metilenos adjacentes ao grupo éster do monômero foram designados pela letra c. Os grupos metilenos do glicerol correspondem à letra b e o grupo metino do glicerol corresponde à letra a.

Figura 7 – Estrutura do PCLE montada de acordo com os resultados obtidas da análise de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN.

5.1.3. Determinação das propriedades térmicas

Considerando o projeto de sistemas transportadores de substâncias bioativas, a farmacotécnica exige que muitos processos de produção como a granulação via extrusão por fusão a quente (onde o polímero é fundido e funciona como um ligante e/ou agente retardador da liberação do fármaco) seja aplicado. Nesse sentido, os polímeros que serão selecionados devem possibilitar o processo em temperaturas relativamente baixas em virtude da sensibilidade térmica de muitos fármacos. Isso significa que o polímero utilizado deve apresentar uma baixa temperatura de transição vítrea (Cheng et al, 2009; Puppi et al, 2010).

A Tg é um importante efeito térmico que pode ser utilizado para a caracterização de polímeros amorfos ou semicristalinos e é a propriedade do material onde se pode obter a temperatura da passagem do estado vítreo para um estado “maleável” ou “borrachoso”, sem ocorrência de uma mudança estrutural. A parte amorfa do material (parte onde as cadeias moleculares estão desordenadas) é a responsável pela caracterização da temperatura de transição vítrea. Abaixo da Tg, o material não tem energia interna suficiente para permitir deslocamento de uma cadeia com relação à outra por mudanças conformacionais. Portanto, quanto mais cristalino for o polímero, menor será a representatividade da Tg. Na temperatura de transição vítrea, em um resfriamento, o polímero passa de um líquido super-resfriado ou um estado “borrachoso” para um estado sólido. A Tg também ocorre no sentido inverso, no aquecimento. No estado líquido, as moléculas podem se mover umas em relação às outras, ocorrendo então os chamados rearranjos cooperativos.

A transição vítrea se reflete macroscopicamente através de mudanças em vários tipos propriedades, como por exemplo, capacidade calorífica, coeficiente de expansividade térmica, resposta a forças de compressão ou expansão entre outras. Neste caso, métodos termoanalíticos como a calorimetria exploratória diferencial (DSC) fornece informações sobre efeitos térmicos que são caracterizados por uma mudança no calor específico (ou entálpico) em função da temperatura tais como o comportamento de fusão, cristalização, transições sólido-sólido e conseqüentemente a temperatura de transição vítrea.

Nas **FIG. 8** e **9** estão mostradas as curvas de DSC para o polímero PCLE sintetizado neste trabalho. Na **FIG. 8** observam-se os valores da ΔH_m e da T_m obtidas no primeiro ciclo de aquecimento. A temperatura e a entalpia de fusão obtidas, ($T_m = 57,3\text{ }^\circ\text{C}$ e $\Delta H_m = 100,8\text{ }^\circ\text{C}$) foram ligeiramente mais altas do que para outros PCLE descritos na literatura e mais baixas do que os valores descritos para o PCL. A presença de ramificações reduz o valor das T_m e da ΔH_m quando comparadas com os valores para o PCL. A quantidade de ramificações e o tamanho das ramificações também alteram esses valores, sendo que quanto mais ramificações menor será a T_m e a ΔH_m e quanto maior o tamanho das ramificações maior será a T_m e a ΔH_m . Esses valores também têm relação com a cristalinidade do polímero, quanto mais altos mais cristalino será o polímero. Considerando o valor de $\Delta H_m^\circ = 146,0\text{ J/g}$ para um PCL 100% cristalino o valor de cristalinidade (χ_c) do PCLE é de 69% e pode ser calculado pela expressão:

$$\chi_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^\circ} \times 100$$

Dessa forma, o PCLE pode ser considerado um polímero semicristalino (Chielline & Solaro, 1996; Nuñez et al, 2004; Choi et al, 2005; Lang et al, 2002).

Figura 8 – Curva DSC do PCLE ilustrando a temperatura de fusão cristalina.

O valor da temperatura de transição vítrea para o PCLE está ilustrado na **FIG. 9**. A baixa temperatura de transição vítrea observada ($T_g = -64,3^\circ\text{C}$) indica que o PCLE é um polímero muito maleável à temperatura ambiente e fisiológica (37°C). Devido às suas características maleáveis o PCLE é um polímero que deverá possuir uma elevada permeabilidade a moléculas de baixa massa molecular na temperatura corpórea sendo adequado para o projeto de dispositivos de liberação controlada de fármacos.

Figura 9 – Curva DSC do PCLE ilustrando a temperatura de transição vítrea (T_g).

Na liberação controlada de fármacos em polímeros hidrofílicos a T_g tem participação na taxa de difusão uma vez que está baseada na transição do estado vítreo (estado configuracional altamente emaranhado) para o estado maleável, associada a um processo de inchamento (ou intumescimento) resultante da penetração de água na matriz polimérica. Entretanto, a T_g desses polímeros é influenciada por vários fatores, dos quais se destaca a presença de líquidos plastificantes. As moléculas de tais líquidos são, normalmente, de dimensões reduzidas e ficam retidas entre as cadeias poliméricas, afastando-as uma das outras, o que reduz as forças de atração intermoleculares polímero – polímero, aumentando a mobilidade das cadeias o que modifica a taxa de difusão ao entrar em contato com o fluido corpóreo. Isso não irá ocorrer com o PCLE, pois o polímero não intumescer em água devido a sua hidrofobicidade, mas sua taxa de permeabilidade será influenciada pela cristalinidade (Pitt et al, 1979).

5.1.4. Determinação da microestrutura do PCLE

Uma técnica muito importante no estudo de sistemas moleculares complexos; a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier representa atualmente uma ferramenta importante para a caracterização de polímeros. Embora não seja uma técnica de caracterização estrutural absoluta, a utilização da técnica FT-IR fornece informações sobre três importantes características estruturais: a composição química, a estrutura configuracional e conformacional, e as forças interatômicas associadas às ligações de valência ou interações intermoleculares.

A espectroscopia do infravermelho permitiu uma análise imediata da microestrutura do PCLE considerando-se seus grupos funcionais, permitindo ao mesmo tempo; observar a partir de sua análise, além da pureza do produto obtido; a existência de reações secundárias. Na **FIG. 10** é possível observar os espectros de infravermelho obtidos para o polímero PCLE no equipamento Perkin-Elmer Spectrum One. Observam-se os sinais típicos de um poliéster. O intenso pico observado em 1720 cm^{-1} corresponde ao sinal de deformação axial da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) do grupo éster. O sinal observado em 3500 cm^{-1} corresponde às vibrações de deformação axial dos grupos hidroxilas (OH) devido à polimerização com glicerol. Os sinais em 2945 cm^{-1} e 2952 cm^{-1} correspondem às deformações axiais assimétricas de $\text{C}-\text{H}$ e CH_2 . O sinal

detectado em 2864 cm^{-1} corresponde às deformações axiais simétricas de C—H e CH_2 . O sinal em 1471 cm^{-1} corresponde às deformações angulares simétricas no plano. Em 1245 cm^{-1} observa-se as vibrações de deformação axial de C—O do éster, que são, na verdade, duas vibrações assimétricas acopladas: C—C(=O)—O e O—C—C. Na **Tabela 3** estão mostrados o número de onda de cada pico e seu significado.

Figura 10 – Espectro do filme PCLE obtido no espectrômetro Perkin-Elmer Spectrum One.

Tabela 3 - Principais bandas de absorção observadas no espectro FTIR do PCLE.

Vibração	Número de onda (cm^{-1})
ν OH	3500
ν_{as} CH_2	2945,19
ν_{s} CH_2	2864,94
ν C=O	1720
ν_{cr} C-O	1293,16
ν_{s} COC	1171,86
ν_{am} C-C	1108,03

5.2. Influência da radiação gama sobre as propriedades físico-químicas do PCLE

5.2.1. Determinação da estrutura do PCLE após a irradiação

Quando poliésteres alifáticos são irradiados por raios gama sua estrutura química sofre alterações devido reações de ligações cruzadas ou quebras de cadeia que geram moléculas de tamanhos menores. Entretanto, a irradiação do PCLE na dose de 100 kGy não modificou sua estrutura química. Na **FIG. 11** observam-se os espectros vibracionais do PCLE não irradiado e do PCLE irradiado. Ambas as amostras de PCLE, não irradiada e irradiada, apresentam bandas características do poliéster alifático, tais como as vibrações do estiramento das unidades repetitivas a 1243 cm^{-1} , e uma intensa banda de absorção a 1720 cm^{-1} atribuídas às ligações éster, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{CH}_2-$, características da estrutura do PCLE.

Figura 11 – Análise FT-IR do PCLE não irradiado (PCLE) em comparação com o PCLE irradiado a 100 kGy (PCLE 100 KGy), indicando que a radiação gama a 100 KGy não modificou a estrutura química do polímero.

5.2.2. Determinação das propriedades térmicas após a irradiação

As curvas típicas obtidas por calorimetria exploratória diferencial (DSC) para os polímeros PCLE não irradiado e PCLE irradiado a 100 kGy são mostradas na **FIG. 12**. A análise térmica de DSC demonstrou que a amostra de PCLE não irradiado e PCLE irradiado a 100 kGy apresentou pequena diferença nos valores de T_m e ΔH_m . O PCLE não irradiado apresentou $T_m = 57,8\text{ }^\circ\text{C}$ e o PCL irradiado apresentou $T_m = 53,04\text{ }^\circ\text{C}$. As entalpias de fusão para o PCLE não irradiado e PCLE irradiado foram respectivamente 106,8 J/g e 69,36 J/g.

A redução no valor de entalpia de fusão do PCLE irradiado indica aumento da instabilidade das ligações químicas, uma vez que menos energia foi necessária para romper as interações no estado sólido; e indica redução da cristalinidade do PCLE pelo aumento da fase amorfa do polímero. O grau de cristalinidade em ambas as amostras de PCLE foi calculado por:

$$\chi_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^o} \times 100$$

Onde ΔH_m é a entalpia de fusão do PCLE (irradiado ou não irradiado) e ΔH_m^o a entalpia de fusão do polímero PCL 100% cristalino ($\Delta H_m \text{ PCL} = 146,0\text{ J/g}$) (Chiellini & Solaro, 1996; Vogelsanger et al, 2003).

A cristalinidade calculada para os polímeros PCLE não irradiado e PCLE irradiado foram iguais a 73% e 47,5%, respectivamente. Observa-se que, no caso do PCLE irradiado, as formas de degradação provenientes do processamento desse material pela radiação ionizante (raios gama) podem ser capazes de alterar sua cristalinidade o que leva à diminuição da fração cristalina, aumentando, por consequência, a fração amorfa (Buchala, et al, 1996; Calvet et al, 2008). Essas mudanças estruturais podem trazer uma diminuição nas resistências mecânica e térmica e a ataques do fluido fisiológico (biodegradabilidade). Ao mesmo tempo, a baixa cristalinidade do PCL

irradiado pode gerar uma capacidade maior de permeação da água na fração amorfa, facilitando com isso a hidrólise do material (Pitt et al, 1981; Mochizuki et al, 1995).

Analisando-se ainda as curvas de DSC na **FIG. 12**, verifica-se a existência de apenas um pico de fusão o que sugere uma boa homogeneidade quanto à distribuição de cadeias poliméricas relativamente à massa molar média. O pico largo observado na fusão do PCLE irradiado parece indicar a presença de cadeias poliméricas menores do que a massa molar média.

Figura 12 - Curva DSC do PCLE irradiado a 100 kGy (—) e PCLE não irradiado (—).

Apesar da alta dose de radiação ter influenciado as propriedades térmicas do PCLE, a dose utilizada para esterilização de biomateriais e dispositivos médicos pode variar de 11 a 25 KGy (Odellius et al, 2008; Nguyen, et al, 2011). Dessa forma, novos ensaios foram conduzidos com doses de 12 e 25 KGy.

Na dose de 12 KGy a T_m e a cristalinidade do PCLE foram respectivamente de 61,9 °C e 82,93% (**FIG. 13A**) e na dose de 25 KGy foram de 61,8 °C e 80,44% (**FIG. 13B**).

Figura 13 - Curvas de DSC do PCLE irradiado a 12 KGy (A) e a 25 KGy (B).

A radiação gera radicais livres responsáveis por reações cruzadas ou quebras de cadeias. Porém, em caso de polímeros que apresentam alta cristalinidade essas alterações ocorrem com menor intensidade uma vez que na região cristalina, as cadeias apresentam maior organização permitindo que os radicais livres formados se recombinem e assim ocorra redução na frequência de quebras de cadeia (Odelius et al, 2008).

O PCLE sintetizado neste trabalho foi caracterizado como sendo semicristalino e dessa forma em doses de radiação menores (12 e 25 KGy) não sofreu alterações significativas em suas propriedades térmicas. Apenas na dose de 100 KGy a energia depositada foi suficiente para alterar a sua cristalinidade. De acordo com estes resultados pode-se concluir que a radiação gama em doses entre 12 e 25 KGy podem ser utilizadas para esterilização do PCLE.

5.3. Avaliação da citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade utilizando o método colorimétrico possibilita verificar a presença de substâncias nocivas à fisiologia celular por meio da obtenção da curva dose resposta de viabilidade celular.

No ensaio inicial do material, o extrato de PCLE na concentração de 100 mg/mL apresentou citotoxicidade pois, apenas 30 % das células permaneceram viáveis. Na **FIG. 14** está representado o gráfico da curva dose resposta obtida neste ensaio do PCLE com os controles positivo - solução de fenol 0,3 % - e controle negativo - extrato de PCL comercial (Sigma[®]).

Como PCL é um polímero biocompatível e já é utilizado como biomaterial (Dash & Konkimal, 2012; Woodruff & Hutmacher, 2010), a citotoxicidade do PCLE não era esperada. Revendo o processo de síntese do PCLE sabe-se que resíduos do catalisador e dos solventes utilizados podem ser tóxicos a fisiologia celular. Dessa forma, para excluir a influência de resíduos provenientes de sua síntese e para garantir a pureza do PCLE, realizou-se a lavagem da amostra do polímero em solução de PBS pH 7,4 em ultra-som por quatro horas com troca de solução a cada uma hora. Foi feita também uma lavagem em Soxhlet por oito horas. O ensaio de citotoxicidade foi repetido, porém a viabilidade celular permaneceu ainda em torno de 30 %, indicando que a citotoxicidade do material não advinha do processo de síntese.

Como o princípio do método de coloração do MTS/PMS ocorre pela redução do sal tetrazólico por meio dos citocromos gerado na cadeia respiratória de células viáveis gerando como produto o formazan (Barltrop & Owen, 1991), a diminuição na produção de formazan significa morte celular pela indução de apoptose, ou queda no metabolismo celular com redução da taxa de respiração celular ou ainda queda na proliferação celular.

Figura 14 – Viabilidade celular após 72 h de incubação com diferentes concentrações dos extratos em meio RPMI (Gibco®). PCL Sigma®: controle negativo. Fenol 0,3 %: controle positivo.

Assim para investigar o motivo na queda da viabilidade celular causada pelo PCLE, as células nos poços das placas de cultura, foram observadas em microscópio invertido, após 72 h de incubação com o extrato. Nas placas do controle positivo, verificou-se a redução da população de células aderidas com morfologia normal e aumento do número de células circulares, indicando seu descolamento da superfície da placa por morte celular (**FIG. 15 (A)**). Na placa com diferentes concentrações do extrato de PCLE as células apresentaram o mesmo comportamento, sendo que na maior concentração do extrato de PCLE ainda foi possível visualizar células aderidas com morfologia normal (**FIG. 15 (B)**).

A

B

Figura 15 – (A) Imagem das células CHO-K1 expostas à solução de fenol 0,3 %, mostrando células circulares descoladas das placas. (B) Imagem das células CHO-K1 expostas ao extrato de PCLE na concentração de 100 mg/mL, mostrando algumas células aderidas com morfologia normal. Aumento 100x.

Ao se comparar as células presentes nos poços controle (meio de cultura sem amostra) com as células expostas à maior concentração do extrato de PCLE, pôde-se observar que a diferença entre eles está associada à redução do número de células aderidas e não necessariamente ao aumento de células circulares (células inviáveis), uma vez que estas também estavam presentes nos poços controle (**FIG. 16 (A e B)**).

As células CHO-K1 são classificadas como células *epithelial-like* e para sua proliferação necessitam de contato célula-célula. Após sua adesão sobre superfícies, iniciam a secreção da matriz extracelular e ampliam o citoplasma até entrarem em contato com o citoplasma de células adjacentes. Nesse momento, param seu crescimento e iniciam sua multiplicação (French, 2005).

Como PCLE é um polímero hidrofóbico, sua hidrofobicidade impede a adesão de proteínas formadoras da matriz extracelular sobre sua superfície. Dessa forma, para ser utilizado como suporte para engenharia de tecido, necessita de tratamento superficial (Le et al, 2011).

Assim, como neste trabalho o ensaio de citotoxicidade foi conduzido adicionando as células CHO-K1 sobre os extratos de PCLE, concluiu-se que a baixa viabilidade celular poderia ter sido resultado da baixa adesão de células sobre a superfície da placa, pois observou-se que nos poços do extrato de PCLE, algumas células permaneceram isoladas com citoplasma extenso indicando que pela falta de contato com outras células continuaram aumentando seu tamanho e não puderam se dividir, e as células que conseguiram contato com outras, formaram colônias dispersas (**FIG. 14 (B)**).

A

B

Figura 16 – (A) Imagem das células CHO-K1 expostas em meio de cultura sem amostra (poço controle), mostrando células aderidas e algumas células circulares. (B) Células expostas ao extrato de PCLE na concentração de 100 mg/mL, mostrando menor número de células aderidas e algumas células circulares. Aumento 100x.

Para excluir a influência do PCLE sobre a não adesão celular nas placas de cultura, conduziu-se um novo ensaio de citotoxicidade onde uma das placas foi pré-incubada com as células por 48 h, (protocolo sugerido pela ISO 10993-5 3ª edição) e a outra placa foi incubada conforme o protocolo descrito na metodologia deste trabalho (adição das células sobre o extrato). O tempo de incubação na presença do extrato foi de 72 h, para as duas placas.

O resultado da avaliação da citotoxicidade obtido no ensaio com pré-incubação foi ausência de citotoxicidade (100 % de viabilidade celular) em todas as concentrações estudadas, enquanto que, no ensaio sem pré-incubação foi o mesmo obtido anteriormente (cerca de 30 % de viabilidade celular na maior concentração do extrato) (**FIG. 17**).

Figura 17 – Influência da pré-incubação das células CHO-K1 sobre sua viabilidade após a exposição às diferentes concentrações do extrato de PCLE, mostrando a não citotoxicidade do polímero.

As células também foram observadas em microscópio invertido para verificar alteração na morfologia celular. Na **FIG. 18 (A)** está apresentada a imagem das células dos poços controle após 48 h de pré-incubação antes da troca do meio de cultivo e na **FIG. 18 (B)** está apresentada a imagem das células após 72 h de exposição ao meio de cultura sem amostra (controle 100 % de viabilidade celular). Na **FIG. 19 (A)** observa-se a imagem das células após 48 h de pré-incubação, antes da troca do meio de cultivo pelo extrato do PCLE. Na **FIG. 19 (B)** observa-se a imagem das células pré-incubadas, após a exposição ao extrato de PCLE na concentração de 100 mg/mL, por 72 h. Nota-se que as células não apresentaram morfologia diferente das células cultivadas apenas com meio de cultura.

Diante desse resultado pode-se dizer que o extrato de PCLE diminuiu a viabilidade celular, pois interferiu no processo de adesão. Como o propósito de uso do PCLE nesse projeto envolve a obtenção de microesferas para incorporação de fármacos, o resultado obtido no ensaio com pré-incubação mostra que o polímero sintetizado não interfere, significativamente, no metabolismo celular. Caso a baixa viabilidade celular tenha sido causada pela hidrofobicidade do polímero, isso poderá resultar na captação das microesferas pelo sistema reticuloendotelial ou pelos macrófagos (Sahay et al, 2010; Qiu & Bae, 2006). (Layer by Layer).

A

B

Figura 18 – (A) Imagem das células CHO-K1 no poço controle após 48 h de pré-incubação. (B) Imagem das células pré-incubadas após 72 h de exposição ao meio de cultura sem amostra (poço controle). Aumento 100x.

A

B

Figura 19 – (A) Imagem das células após 48 h de pré-incubação, antes da adição do extrato de PCLE 100 mg/mL. (B) Imagem das células pré-incubadas após 72 h de exposição ao extrato de PCLE. Aumento 100x.

5.4. Obtenção das microesferas

A morfologia e o diâmetro aproximado das partículas preparadas por meio de emulsão complexa utilizando óleo de oliva e dioctil sulfosuccinato de sódio (emulsão 1) ou óleo de oliva e Renex 60[®] (emulsão 2) como estabilizadores, foram obtidos pelas micrografias de MEV.

As partículas formadas pela emulsão 1, na primeira condição de três minutos de agitação a 1500 rpm, apresentaram morfologia esférica com diâmetro variáveis entre 1,9 e 18 µm e superfície ligeiramente rugosa, formando veios superficiais. Nem todas as partículas assumiram o formato esférico regular. Na região interna dessas partículas, verificou-se que as esferas apresentaram cavidades laminares no mesmo sentido dos veios. Foi possível observar algumas esferas deformadas, provavelmente, devido à agitação durante o período de evaporação do solvente. Na **FIG. 20 (A e B)** pode-se observar as micrografias das microesferas obtidas na primeira condição.

Pelo valor do diâmetro encontrado, as esferas obtidas por essa emulsão podem ser caracterizadas como microesferas (Sinha et al, 2005; Vauthier & Bouchemal, 2009; Dash & Konkimalla, 2012).

As partículas obtidas pela emulsão 2 apresentaram formato esférico mais irregular com maior quantidade de cavidades e poros na superfície. A presença de esferas irregulares foi mais evidente nesta emulsão. O diâmetro das microesferas variou entre 2,85 a 47,4 µm. Na **FIG. 21 (A e B)** estão ilustradas as micrografias das microesferas obtidas a partir da emulsão 2 com três minutos de agitação a 1500 rpm.

Para testar outra condição para obtenção de microesferas mais homogêneas e com diâmetro mais reduzido, optou-se por aumentar o tempo da agitação inicial para 10 min. Preparou-se outra emulsão com a mesma formulação da emulsão 1 e verteu-se a solução de PCLE sobre os estabilizadores sob agitação a 1500 rpm, por 10 min e em seguida reduziu-se a agitação a 900 rpm para permitir a evaporação do solvente. A morfologia e o diâmetro das esferas não apresentaram alterações significativas em relação ao tempo de agitação anterior. No entanto, houve um aumento de esferas irregulares (**FIG. 22**).

Figura 20 – Micrografias das esferas obtidas pela emulsão 1 com três minutos de agitação. Aumento de 500x (A). Aumento de 2500x (B).

Figura 21 – Micrografias das esferas obtidas pela emulsão 2 com três minutos de agitação. Aumento de 500x (A). Aumento de 5000x (B).

Figura 22 – Micrografias das esferas obtidas pela emulsão 1 com dez minutos de agitação. Aumento de 2500x (A). Aumento de 5000x (B).

Outra variável que foi alterada para obter esferas menores foi a velocidade de agitação. Preparou-se uma nova emulsão baseada na composição da emulsão 1 submetida a agitação inicial a 2000 rpm por 10 min. Após a evaporação do solvente a solução foi centrifugada como descrito anteriormente. Para recuperar todo o conteúdo formado, lavou-se o béquer com hexano e a solução resultante da lavagem foi centrifugada a parte.

As esferas obtidas por esse método continuaram apresentando diâmetros variáveis na ordem de micrômetros. Porém, a superfície das microesferas apresentou cavidades mais pronunciadas e houve um aumento na quantidade de material particulado sem conformação definida (**FIG. 23 e 24**).

Sabe-se que a formação de micro e nano esferas por emulsão pode ser controlada pela concentração do polímero, pela concentração dos estabilizadores, pela velocidade de agitação e pelo tipo de agitador utilizado (Vauthier & Bouchemal, 2009).

Assim, utilizou-se o dioctil sulfosuccinato como estabilizador nas condições de agitação utilizadas no trabalho, o que propiciou a formação de microesferas mais regulares e sólidas do que as formadas pelo outro estabilizador, o Renex 60[®]. Como se pode observar na **FIG. 23** a presença de cavidades internas formadas nas microesferas pode ser uma propriedade interessante para aumentar a capacidade de encapsulamento de fármacos e os poros superficiais podem aumentar sua taxa de liberação.

A alteração nos parâmetros de velocidade e tempo de agitação inicial não auxiliaram para a formação de microesferas mono dispersas com menores diâmetros.

Figura 23 – Micrografias das microesferas obtidas sob agitação de 2000 rpm por 10 min. Aumento 2500x (A). Aumento 5000x (B).

Figura 24 – Micrografias das microesferas obtidas do resíduo recuperado após lavagem do béquer com hexano. Aumento 2500x (A). Aumento 5000x (B).

Entre as duas formulações de emulsões e condições estudadas neste trabalho, a emulsão 1 (contendo óleo de oliva 0,3 % DMSS) sob agitação de 1500 rpm por 3 min, foi a que apresentou o melhor resultado na obtenção das microesferas.

Com o propósito de obter microesferas mais regulares outros estudos deverão ser conduzidos com a emulsão 1, tais como o aumento da concentração do estabilizador seguido do aumento da velocidade de agitação.

A citotoxicidade das esferas obtidas da emulsão 1 sob agitação de 1500 rpm por 3 min foi avaliada. As esferas produzidas por esse método não apresentaram citotoxicidade. Na **FIG. 25** é possível observar o gráfico da curva dose resposta do extrato obtido das esferas de PCLE em comparação aos extratos obtidos do PCLE, do PCL comercial (PCLS) e do látex natural, controle positivo (CP) do ensaio.

Figura 25 - Gráfico da curva dose resposta dos extratos das amostras de esferas de PCLE (EPCLE), de PCL comercial Sigma[®] (PCLS), de PCL estrelado (PCLE) e de látex natural como controle positivo (CP - LATEX NATURAL)

5.5. Biodegradação das microesferas

Ao se utilizar um polímero biorreabsorvível para o desenvolvimento de dispositivos médicos ou de sistemas de liberação controlada de fármacos, propriedades como solubilidade em água, cristalinidade, modelagem e forma do dispositivo devem ser estudadas para se obter a cinética de degradação do polímero.

Neste trabalho a biodegradação das microesfera de PCL e PCLE foi avaliada pela alteração do seu raio hidrodinâmico (R_h) que está diretamente relacionado com a alteração na massa molecular do PCL e do PCLE durante o processo de degradação.

As microesferas de PCLE apresentaram maior susceptibilidade à ação enzimática do que as microesferas de PCL, uma vez que elas sofreram redução de 80,5 % em seu R_h após 24 h de incubação. Já as microesferas do PCL sofreram uma redução de 72,9 % em seu R_h no mesmo período de incubação. Essa diferença encontrada pode ser explicada pela menor massa molecular do PCLE (Sun et al, 2006). Outro fator que pode ter colaborado para a maior redução do R_h das microesferas do PCLE foi a conformação estrelada de suas moléculas, uma vez que os polímeros de arquitetura estrelada apresentam maior perda de massa durante o processo de biodegradação (Cho et al, 2003; Liu et al, 2009).

Na **FIG. 26** está representado o gráfico da dependência do R_h das microesferas em relação ao tempo de biodegradação a 37 °C. A redução da taxa de biodegradação após 24 h pode ser resultante da redução da atividade enzimática.

Figura 26 – Dependência do raio hidrodinâmico em relação ao tempo de biodegradação enzimática das microesferas de PCL (A) e do PCLE (B) em solução de PBS pH 7,4 contendo lipase e colesterol esterase.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados experimentais obtidos, pode-se concluir que:

- Neste trabalho foi possível obter PCLE com massa molar e características térmicas compatíveis com as propriedades requeridas pela área farmacêutica.
- A cristalinidade encontrada para o PCLE foi considerada superior a cristalinidade do PCL, caracterizando esse polímero como semicristalino.
- A esterilização do PCLE utilizando raios gama pode ser utilizada nas doses de 12 ou 25 kGy, uma vez que estas não alteraram as propriedades térmicas do polímero de forma significativa. Já a dose de 100 kGy altera a cristalinidade do PCLE e somente poderá ser utilizada se a alteração dessa propriedade não interferir na aplicação do dispositivo final produzido a partir desse polímero.
- A avaliação da citotoxicidade do extrato de PCLE mostrou que esse polímero pode influenciar na adesão celular, mas não é tóxico ao metabolismo das células e não altera sua morfologia.
- Ensaios *in vitro* indicaram que o PCLE é biodegradável nas condições de temperatura e pH equivalentes aos fisiológicos.
- As microesferas preparadas por emulsão A/O/A apresentaram diâmetros variáveis e polidispersão de tamanho nas condições testadas. De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho o DMSS foi considerado um emulsificante mais eficiente do que o Renex 60[®].
- Foi possível observar que as microesferas preparadas neste trabalho não apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas.
- O PCLE caracterizado neste trabalho apresentou propriedades físico-químicas e biológicas compatíveis com os requisitos de biomateriais.
- Este trabalho foi publicado nos anais do VII Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (**Apêndice 1**).

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Com base nas conclusões apresentadas nesse trabalho é possível sugerir novas pesquisas com a utilização do PCLE.

A estrutura estrelada do PCLE pode favorecer a funcionalização da molécula com marcadores biológicos visando seu direcionamento a tecidos alvos e dessa forma aumentar a eficiência e a segurança de fármacos.

Tendo em vista que muitos antitumorais são lipossolúveis e possuem efeitos colaterais, a incorporação dessas drogas em micro e nano esferas poliméricas apresenta uma alternativa para aumentar a eficiência e reduzir danos aos tecidos normais. Assim, futuramente, pode-se incorporar nas esferas de PCLE, um agente antitumoral como o paclitaxel ou a doxirrubicina e, posteriormente, estudar sua liberação, ação sobre os tecidos normais e tumorais.

Para aperfeiçoar o processo de obtenção das esferas biodegradáveis o PCLE pode ser acoplado, por exemplo, ao PEG, um polímero biodegradável hidrofílico que tem apresentado excelentes resultados na obtenção de nanoesferas poliméricas.

Apesar de a nanotecnologia ser atualmente estudada como solução dentro da área médica e farmacêutica, pouco se sabe sobre os mecanismos de interação entre as nanopartículas e os receptores celulares. Consequentemente, outro campo de pesquisa que pode ser explorado é a investigação das interações das micro e nano esferas de PCLE nos mecanismos de fagocitose e endocitose celular, bem como sua ligação a receptores de membranas.

8. APENDICE 1 - TRABALHO COMPLETO

POLI(EPSILON-CAPROLACTONA) ESTRELADA: PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, CITOTOCICIDADE E COMPORTAMENTO DE BIODEGRADAÇÃO

Tatiana F. Cunha¹, Álvaro A. A. Queiroz², Olga Z. Higa¹

¹Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, São Paulo, SP, Brasil.

²Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), Itajubá, MG, Brasil.

E-mail: tatianafc@usp.br

Resumo: O poli(ϵ -caprolactona) é um polímero biocompatível e biodegradável, aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) para ser utilizado como biomaterial. Pesquisas conduzidas utilizando sua forma linear (PCLL) ou estrelada (PCLE) estão demonstrando resultados promissores para sua utilização como dispositivos médicos ou sistemas para liberação controlada de fármacos. O objetivo deste trabalho é avaliar as propriedades físico-químicas a citotoxicidade e a biodegradação do PCLE sintetizado em parceria com a Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI). A síntese do PCLE com três braços foi conduzida por polimerização por abertura do anel lactônico (ROP), utilizando como iniciador o glicerol e como catalisador da reação o 2-etilhexanoato de estanho (SnOct)₂. A determinação das propriedades físico-químicas do PCLE foi realizada por meio da cromatografia de permeação em gel (GPC), calorimetria exploratória diferencial e espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). A avaliação toxicológica foi obtida por meio do ensaio de citotoxicidade, utilizando células CHO-K1 e o corante vital 5-(3-carboximethoxifenil)-2-(4,5-dimetiltiazolil)-3-(4-sulfofenil) tetrazolium e o acoplador de elétrons fenazine metossulfato (MTS/PMS). O ensaio de biodegradação foi conduzido na presença de lipase a 37 °C e avaliado por espalhamento de luz dinâmico (DLS). O PCLE é biodegradável e apresentou faixa de distribuição molecular unimodal com índice de polidispersão igual a 1,53. A massa molecular média numérica foi de 5430 g/mol e a massa molecular média ponderal foi de 8280 g/mol. O PCLE apresentou temperatura de fusão de 57,3 °C e temperatura de transição vítrea de -64,3 °C. A análise de FTIR confirmou a estrutura típica do poliéster. A avaliação de citotoxicidade demonstrou que os extratos de PCLE são compatíveis com as células. Com base nos resultados obtidos

neste trabalho é possível concluir que o PCLE possui propriedades físico-químicas e biológicas adequadas ao seu uso como biomaterial.

Palavras chave: *Poli(ϵ -caprolactona) estrelado, síntese, propriedades físico-químicas, Citotoxicidade, Biodegradação.*

1. INTRODUÇÃO

Os polímeros compõem a maior classe dos biomateriais e apresentam vantagens devido sua capacidade de serem sintetizados para apresentarem propriedades mecânicas, físico-químicas e morfológicas que mimetizam as propriedades do organismo. Inicialmente foram utilizados para fabricação de fios de sutura e aos poucos foram sendo adaptados para uso em liberação controlada de fármacos, implantes (ortopédicos, dérmicos e cardiovasculares), suportes para engenharia de tecidos e para sistemas dinâmicos de cultura de células [Angelova & Hunkeler, 1999].

Uma das modificações que conferem aos polímeros diferentes propriedades físico-químicas é a presença de ramificações em sua estrutura molecular. Estas podem ser ligadas quimicamente em um núcleo central para originar moléculas estreladas [Qiu & Bae, 2006]. Os polímeros obtidos por essa técnica são denominados polímeros estrelados. Possuem estrutura tridimensional e propriedades físico-químicas intermediárias entre os polímeros lineares e os dendrímeros. Sua síntese simplificada confere a eles vantagem sobre os dendrímeros, enquanto que sua baixa viscosidade e baixo volume hidrodinâmico conferem vantagens sobre os polímeros lineares [Inoue, 2000].

A síntese de polímeros estrelados pode ser classificada como *arm-first*, iniciada a partir das ramificações, utilizando um agente com terminações multifuncionais, ou por reações cruzadas de polímeros lineares preparados por polimerização controlada da cadeia. Também pode ser *core-first*, onde cadeias poliméricas são propagadas utilizando um iniciador multifuncional. Geralmente este método é o mais utilizado, pois oferece um maior controle da síntese e o número de ramificações é determinado pelo número de grupos funcionais presentes no iniciador [Qiu & Bae, 2005].

O poli(ϵ -caprolactona) (PCL) é um polímero biocompatível e biodegradável, aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para ser utilizado como biomaterial. Diversos estudos utilizando sua forma linear (PCLL) ou estrelada (PCLE) têm demonstrado resultados promissores para seu uso como matéria prima no desenvolvimento de dispositivos médicos e em aplicações na área farmacêutica [Woodruff & Hutmacher, 2010].

O objetivo deste trabalho é caracterizar as propriedades físico-químicas, a citotoxicidade e a biodegradação do PCLE sintetizado em parceria com a Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI) sob supervisão do prof. dr. Álvaro A. A. Queiroz, para utilizá-lo como matéria prima na construção de suportes para engenharia de tecidos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O PCLE com três braço foi obtido por polimerização por abertura do anel lactônico (ROP), utilizando o glicerol como iniciador e o 2-etilhexanoato de estanho (SnOct)₂ como catalisador da reação. A relação entre o monômero de ϵ -CL e os grupos hidroxilas do glicerol foi de 8:1

2.1 Caracterização estrutural do PCLE

A caracterização estrutural do PCLE foi realizada por meio de cromatografia de permeação em gel (GPC) e por espectrometria de infra-vermelho com transformada de Fourier (FTIR).

A determinação da massa molecular média numérica (M_n), da massa molecular média ponderal (M_w) e do índice de polidispersividade (IP) do PCLE foi realizada por GPC. A condução da análise ocorreu em um Cromatógrafo Waters 244, equipado com detector de índice de refração. O solvente tetrahidrofurano (THF) foi utilizado como eluente. O volume de injeção da amostra foi de 50 μL e velocidade de fluxo 1 mL/min.

Foram utilizadas colunas Waters Ultrastyrigel 103 Å (200 – 3000) – Waters Ultrastyrigel HR-1 100 Å (10 – 5000) colocadas em série. A curva de calibração foi determinada com padrões de poliestireno de massas molares 785, 1950, 5000 e 9075 g/mol. A M_n , a M_w e o IP foram calculadas de acordo com a Eq. (1), Eq. (2) e Eq. (3) respectivamente.

$$M_n = \frac{\sum h_i}{\sum \frac{h_i}{s(Mp/s)_i^t}} \quad (1)$$

$$M_w = \frac{E \sum h_i s(Mp/s)_i^t}{\sum h_i} \quad (2)$$

O termo $(M.p/s)_i$ representa a massa molecular do polímero padrão utilizado para a construção da curva de calibração. A altura do pico no cromatograma do polímero fracionado e o volume de eluição são representados por h_i e i , respectivamente. Os termos s e t são constantes experimentais, características do equipamento utilizado.

$$IP = \frac{M_w}{M_n} \quad (3)$$

A microestrutura do PCLE foi avaliada por FTIR para identificar a presença de grupos funcionais característicos do polímero. As análises realizaram-se no equipamento Perkin Elmer Spectrum One (FTIR) do laboratório de biomateriais da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI). A faixa de análise foi de 4000 a 400 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e intervalo de 2 cm^{-1} .

2.2 Propriedades térmicas do PCLE

A análise de DSC do PCLE foi utilizada para determinar as temperaturas de transição vítrea (T_g) e de fusão (T_m) e a entalpia de fusão (ΔH_m) do polímero. A amostra foi analisada sob atmosfera de nitrogênio ($50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), com velocidade de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ em um equipamento Perkin Elmer DSC 60, previamente calibrado com padrões de índio com cadinho de alumínio e tampa não hermética. O intervalo de temperaturas explorado foi de $-120 \text{ }^\circ\text{C}$ a $80 \text{ }^\circ\text{C}$. A amostra foi aquecida de $-120 \text{ }^\circ\text{C}$ até $80 \text{ }^\circ\text{C}$ e em seguida resfriada rapidamente até $-120 \text{ }^\circ\text{C}$. Atingido o equilíbrio térmico, a amostra foi submetida a novo aquecimento nas mesmas condições e novamente resfriada a $-120 \text{ }^\circ\text{C}$. A T_m e a ΔH_m foram determinadas no primeiro ciclo de aquecimento. A T_g foi determinada somente no segundo aquecimento onde sua visualização foi mais clara.

Com os valores obtidos para a ΔH_m foi possível calcular a cristalinidade do polímero estrelado comparando esse valor com o de $\Delta H_m^\circ = 146,0 \text{ J/g}$ para um PCLL 100 % cristalino por meio da Eq. 4.

$$\chi_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^\circ} \times 100 \quad (4)$$

2.3 Citotoxicidade

Para avaliação da citotoxicidade preparou-se um extrato contendo PCLE em meio RPMI 1640 (Gibco[®]), na concentração de 200 mg/mL , seguindo a orientação normativa da ISO 10.993-12 [ISO 10993-12]. O extrato foi incubado por 48 h à $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e em seguida filtrado utilizando filtro de seringa com poros de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Corning[®]). A solução resultante foi então submetida à diluição seriada 1:2 até a concentração de $6,25 \text{ mg/mL}$.

Alíquotas de 50 µL de cada extrato foram transferidos para uma placa de 96 poços contendo células da linhagem permanente de células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), previamente incubadas por 48 h.

As placas foram incubadas por mais 72 h em estufa com 5 % de CO₂ a 37 °C e ao final desse período adicionaram-se 20 µL de solução 20:1 do corante supra vital 5-(3-carboximethoxifenil)-2-(4,5-dimetiltiazolil)-3-(4-sulfofenil)tetrazolium e do acoplador de elétrons fenazine metossulfato (MTS/PMS) (Promega®) [Barltrop et al, 1991]. As placas foram incubadas novamente por 2 h. O resultado do ensaio citotoxicidade foi obtido pela leitura em espectrofotômetro (Molecular Device®) no comprimento de onda de 490 nm. O cálculo da viabilidade celular (%Viab) foi realizado pela Eq. (5).

$$\%Viab = \frac{mDOe}{mDOc} \times 100 \quad (5)$$

Onde mDOe é a média das leituras de densidades óticas obtidas para cada concentração do extrato e mDOc é a média das leituras de densidades óticas obtidas para o controle (células cultivadas sem amostra). A curva dose-resposta foi construída em função da concentração do extrato e dos valores de viabilidade celular encontrados.

2.4 Avaliação da Biodegradação do PCLE

A biodegradação do PCLE foi avaliada em comparação com a biodegradação do PCLL, por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), relacionando a redução do raio hidrodinâmico (Rh) das partículas com o tempo de biodegradação. As partículas foram preparadas por precipitação ultrassônica assistida em solução tampão de fosfato salino (PBS) (pH 7,4) e dodecil sulfato de sódio (SDS) como estabilizador. Os polímeros dissolvidos em clorofórmio foram adicionados a solução por gotejamento.

Após a precipitação das partículas o clorofórmio foi retirado da solução por evaporação à vácuo e as enzimas lipase (E.C.3.1.3) e colesterol esterase (E.C.3.1.1.1) foram adicionadas na concentração de 0,6 mg/mL. O ensaio de biodegradação foi conduzido por 40 h a 37,0 °C. O Rh das partículas de PCLL e de PCLE foi avaliado em um equipamento Malvern Zetasizer 3000.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O esquema da síntese do PCLE está ilustrado na “Fig. 1”. O rendimento da síntese foi de 90,84% para a proporção de 8:1 entre o monômero ϵ -CL e os grupos hidroxilas do glicerol.

Figura 1 – Esquema da síntese do PCLE, utilizando o glicerol como iniciador multifuncional.

A utilização da molécula de glicerol como iniciador da polimerização permite controlar a quantidade de braços do polímero estrelado e também auxilia no controle da massa molecular do PCLE por meio da relação ϵ -CL:OH [Lang et al, 2002].

3.1. Caracterização estrutural do PCLE

Para determinar a M_n e a M_w do PCLE utilizou-se a técnica de GPC. Com base na curva de calibração os valores encontrados para a M_n e para a M_w foram de 5430 g/mol e de 8280 g/mol respectivamente. Na “Fig. 2” pode-se observar que o PCLE apresentou uma faixa de distribuição de massas unimodal. O IP calculado foi de 1,53. De acordo com esses resultados foi possível caracterizar o PCLE como um polímero de baixa massa molecular.

Figura 2 – Análise de GPC do polímero PCLE

A massa molecular de um polímero influencia sobre sua taxa de biorreabsorção e posterior eliminação do organismo. Em estudos conduzidos *in vivo* verificou-se que quando a massa molecular do PCLL reduziu para valores em torno de 10000 g/mol, sua taxa de biorreabsorção aumentou e a reabsorção do implante finalizou em aproximadamente três meses, tempo equivalente a 1/3 do tempo total da degradação do implante [Pitt et al, 1979, Sun et al, 2006]. Além de aumentar a taxa de biorreabsorção do polímero, moléculas com baixa massa molecular podem ser eliminadas via tecido

renal, uma vez que os glomérulos só podem absorver moléculas de até 45 KDa (45000 g/mol) [Qiu & Bae, 2006; Vauthier & Bouchemal, 2008].

Para finalizar a caracterização estrutural, a microestrutura do PCLE foi analisada por FTIR para identificar seus grupos funcionais e observar a pureza do produto obtido. A “Figura 3” ilustra os espectros de infravermelho obtidos para o polímero PCLE. Observam-se os sinais típicos de um poliéster. O intenso pico observado em 1720 cm^{-1} corresponde ao sinal de deformação axial da carbonila (C=O) do grupo éster. O sinal observado em 3500 cm^{-1} corresponde às vibrações de deformação axial dos grupos hidroxilas (OH) devido à polimerização com glicerol. Os sinais em 2945 cm^{-1} e 2952 cm^{-1} correspondem às deformações axiais assimétricas de C—H e CH_2 . O sinal detectado em 2864 cm^{-1} corresponde às deformações axiais simétricas de C—H e CH_2 . O sinal em 1471 cm^{-1} corresponde às deformações angulares simétricas no plano. Em 1245 cm^{-1} observa-se as vibrações de deformação axial de C—O do éster, que são, na verdade, duas vibrações assimétricas acopladas: C—C(=O)—O e O—C—C.

Figura 3 – Espectro do filme PCLE obtido no espectrômetro Perkin-Elmer Spectrum One.

3.2. Determinação das propriedades térmicas

As curvas de DSC para o polímero PCLE sintetizado neste trabalho estão apresentadas nas “Figuras 4 e 5”. A T_m obtida foi de 57,3°C e a ΔH_m foi de 100,80. Esses valores estão compatíveis com os valores descrito na literatura para o PCLL “Fig. 4”.

Figura 4 – Curva DSC do PCLE ilustrando a temperatura de fusão cristalina.

A baixa temperatura de transição vítrea observada ($T_g = -64,3^\circ\text{C}$) “Fig. 5”, indica que o PCLE é um polímero muito maleável à temperatura ambiente e fisiológica (37°C).

Figura 5 – Curva DSC do PCLE ilustrando a temperatura de transição vítrea (T_g).

Os valores de T_m e ΔH_m encontrados para o PCLE são ligeiramente mais baixos do que os descritos para o PCLL. A presença de ramificações reduz o valor das T_m e da ΔH_m quando comparadas com os valores para o PCLL. A quantidade de ramificações e o tamanho das ramificações também alteram esses valores, sendo que quanto mais ramificações, menor será a T_m e a ΔH_m e quanto maior o tamanho das ramificações maior será a T_m e a ΔH_m . Esses valores também têm relação com a cristalinidade do polímero, quanto mais altos, mais cristalino será o polímero [Choi et al, 2005; Lang et al, 2002].

3.4. Avaliação da citotoxicidade

O resultado da avaliação da citotoxicidade obtido foi ausência de citotoxicidade (100 % de viabilidade celular) na concentração de 100 mg/mL. Na “Figura 6” é mostrado o gráfico da curva dose resposta da viabilidade celular em função das concentrações dos extratos do controle negativo (CN), do controle positivo (CP) e do PCLE.

Figura 6 – Curva dose resposta da viabilidade celular em função das diferentes concentrações dos extratos do PCLL comercial (CN), do Fenol 0,5% (CP) e do PCLE.

3.5 Avaliação da Biodegradação

Ao se utilizar um polímero biorreabsorvível para o desenvolvimento de suportes para engenharia de tecidos, propriedades como solubilidade em água, cristalinidade, modelagem e forma do dispositivo devem ser estudadas para se obter a cinética de degradação do polímero.

Neste trabalho a biodegradação das partículas de PCLL e PCLE foi avaliada pela alteração do seu raio hidrodinâmico (Rh) que está diretamente relacionada com a alteração na massa molecular do PCLL e do PCLE durante o processo de biodegradação.

As partículas de PCLE apresentaram maior susceptibilidade à ação enzimática do que as partículas de PCLL, uma vez que elas sofreram redução de 80,5 % em seu Rh após 24 h de incubação. Já as partículas do PCLL sofreram uma redução de 72,9 % em seu Rh no mesmo período de incubação. Essa diferença pode ser explicada pela menor

massa molecular do PCLE [Sun et al, 2006]. Outro fator que pode ter colaborado para a maior redução do Rh das partículas do PCLE foi a conformação estrelada de suas moléculas, uma vez que os polímeros de arquitetura estrelada apresentam maior perda de massa durante o processo de biodegradação [Cho et al, 2003; Liu et al, 2009].

Na “Figura 7” está representado o gráfico da redução relativa do Rh das partículas em função do tempo de biodegradação a 37 °C. A redução da taxa de biodegradação após 24 h pode ser resultante da redução da atividade enzimática.

Figura 7 – Redução do raio hidrodinâmico das partículas de PCLL e de PCLE em função do tempo de biodegradação enzimática em solução de PBS pH 7,4 contendo lípase e colesterol esterase.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível determinar as características estruturais, as propriedades térmicas, a citotoxicidade e a taxa de biodegradação do PCLE. Foi possível obter um polímero não citotóxico, biodegradável e de baixa massa molecular

(em torno de 10^3 g/mol), características favoráveis à utilização do PCLE como biomaterial, uma vez que poderá ser eliminado do organismo sem causar efeitos tóxicos aos tecidos.

O resultado da avaliação das propriedades térmicas indicou que o PCLE é semi-cristalino com baixa temperatura de fusão e de transição vítrea.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FINEP e ao CNPQ pelo auxílio financeiro. Ao Laboratório Biosíntese P&D do Brasil LTDA pelo apoio científico. Ao Laboratório de Biomateriais da UNIFEI, pelas análises de FTIR e DSC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angelova, N. e Hunkeler, D. (1999), "Rationalizing the design of polymeric biomaterials", *TIBTECH*, 17, 409-421.
- Bartrop, J.A., Owen, T.C., CORY, A.H. e CORY, J.G. (1991), "5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulphophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators", *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, 1, 611-614.
- Cho, D. K., Park, J. W., Kim, S. H., Kim, Y. H. e Im, S. S. (2003) "Effect of molecular orientation on biodegradability of poly(glycolide-co- ϵ -caprolactone)", *Polymer Degradation and Stability*, 80, 223-232.
- Choi, J., Kim, I-K. e Kwak, S-Y. (2005) "Synthesis and characterization of a series of star-branched poly(ϵ -caprolactone)s with the variation in arm numbers and lengths", *Polymer*, 46, 9725-9735.
- Inoue, K., (2000), "Functional dendrimers, hyperbranched and star polymers", *Progress in Polymer Science*, 25, 453-571.
- International Organization For Standardization. (2007), "*Biological evaluation of medical devices: Sample preparation and reference materials*", ISO, (ISO 10993-12).
- Lang, M., Wong, R. P. e Chu, C-C. (2002), "Synthesis and structural analysis of functionalized poly(ϵ -caprolactone)-based three-arm star polymers", *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 40, 1127-114.

- Liu, F., Zhao, Z., Yang, J., Wei, J. e Li, S. (2009), "Enzyme-catalyzed degradation of poly(L-lactide)/poly(ϵ -caprolactone) diblock, triblock, and four-armed copolymers", *Polymer Degradation and Stability*, 94, 227-233.
- Pitt, C. G., Jeffcoat, A. R. e Zweidinger, R. A. (1979), "Sustained drug delivery systems. I. The permeability of poly(ϵ -caprolactone), poly(DL-lactic acid) and their copolymers", *Journal of Biomedical Materials Research*, 13, 497-507.
- Qiu, L.Y. e Bae, Y.H. (2006), "Polymer Architectures and Drug Delivery" *Pharmaceutical Research*, 23, 1-30.
- Sun, H., Mei, L., Song, C., Cui, X., Wang, P. (2006), "The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant", *Biomaterials*, 27, 1735-1740.
- Vauthier, C. e Bouchemal, K. (2008), "Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles", *Pharmaceutical Research*, 26, 1025-1058.
- Woodruff, M. A. e Hutmacher, D. W. (2010), "The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century", *Progress in Polymer Science*, 35, 1217-1256.

STAR-SHAPED POLY(ϵ -CAPROLACTONE): PHYSICAL-CHEMICAL PROPERTIES, BIODEGRADATION BEHAVIOUR AND CYTOTOXICITY

Tatiana F. Cunha¹, Álvaro A. A. Queiroz², Olga Z. Higa¹

¹Center of Biotechnology, Institute of Energetic and Nuclear Research, São Paulo, SP, Brazil.

²Institute of Exact Science, Federal University of Itajubá (UNIFEI), Itajubá, MG, Brasil.

E-mail: tatianafc@usp.br

Abstract: The poly(ϵ -caprolactone) (PCL) is a biocompatible and biodegradable polymer which has been approved by Food and Drug Administration (FDA). Many studies that are using its linear or branched form have showed promising results for medical devices and controlled drug delivery applications. The aim of this research was the evaluation of physical-chemical properties, the biodegradation behaviour and the cytotoxicity of star-shaped PCL (SPCL) synthesized in partnership with UNIFEI. The synthesis of SPCL was conducted by ring-open polymerization with glycerol as initiator and stannous octanoate (SnOct)₂ as catalyst. The physical-chemical properties were characterized by Gel Permeation Chromatography (GPC), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FT-IR). The toxicological property was investigated by colorimetric assay using CHO-K1

cells and the vital dye (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) (MTS) and the electron acceptor phenazine methosulfate (PMS). The biodegradation behavior was evaluated in the presence of lipase at 37 °C and pH 7.4. The PCLE was biodegradable and characterized as low molecular weight polymer with monomodal distribution and about 68,8 % of the molecules were three-arm branched. The melting and glass transition temperatures were 57.3 °C and - 54.3 °C, respectively. The cytotoxicity evaluation showed that PCLE extract was cell compatible. The physical-chemical, biological and biodegradability properties show that the SPCL can be a promising biomaterial for tissue engineering applications.

Keyword: Poly(ϵ -caprolactone), Star-shaped, Synthesis, Physical-chemical properties, Cytotoxicity.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALI, S.A.M.; ZHONG, S.-P.; DOHERTY, P. J.; WILLIAMS, D.F. Mechanisms of polymer degradation in implantable devices: I. Poly(caprolactone). *Biomaterials*. v. 14, n.º 9, 1993.
2. ANGELOVA, N.; HUNKELER, D. Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *TIBTECH*. v. 17, p. 409-421, 1999.
3. ATHANASIOU, K.A.; NIEDERAUER, G.G.; AGRAWAL, C.M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*. v. 17, p. 93-102, 1996.
4. BARBANTI, S.H.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R.. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos: Polímeros. *Ciência e Tecnologia*. v. 15 n.º. 1, p. 13-21, 2005.
5. BARLTROP, J.A.; OWEN, T.C.; CORY, A.H.; CORY, J.G.; 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*. v. 1, n. 11, p. 611-614, 1991.
6. BUCHELLA, R.; SCHÜTTLER, C.; BÖGL, K.W. Radiation sterilization of medical devices. Effects of ionizing radiation on ultra-high molecular-weight polyethylene. *Radiation Physics Chemistry*. v. 46, n. 4-6, p. 579-585, 1995.
7. CALVET, J.L; GRAFAHREND, D.; KLEE, D.; MÖLLER, M. Sterilization effects on starPEG coated polymer surfaces: characterization and cell viability. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*. v. 19, p. 1631-1636, 2008.
8. CAO, X.; SHOICHET, M.S. Delivering neuroactive molecules from biodegradable microspheres for application in central nervous disorders. *Biomaterial*. v. 20, p. 329-339, 1999.
9. CAUCHETIER, E.; DENIAU, M.; FESSI, H.; ASTIER, A.; PAUL, M. Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics. *International journal of pharmaceutics*. v. 250, p. 273-281, 2003.

10. CHANDY, T.; WILSON, R.F.; RAO GUNDU, H.R.; DAS, G. Changes in cisplatin delivery due to surface-coated poly (lactic acid)-poly(epsilon-caprolactone) microspheres. *Journal of Biomaterial Application*. V.16, p. 275–291, 2002.
11. CHEN, B.; SUN, K. Mechanical and Dynamic Viscoelastic Properties of Hydroxyapatite Reinforced poly(e-caprolactone). *Polymer Testing*. v. 24, p. 978-982, 2005.
12. CHIELLINE, E.; SOLARO, R. Biodegradable polymeric materials. *Advanced Materials*. v. 8, n.º 4, 1996.
13. CHIM, H.; HUTMACHER, D.W.; CHOU, A.M.; OLIVEIRA, A.L.; REIS, R.L., LIM, T.C.; SCHANTZ, J.-T. A comparative analysis of scaffold material modifications for load-bearing applications in bone tissue engineering. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*. v. 35, p. 928-934, 2006.
14. CHO, D. K.; PARK, J. W.; KIM, S. H.; KIM, Y. H.; IM, S. S. Effect of molecular orientation on biodegradability of poly(glycolide-co-ε-caprolactone). *Polymer Degradation and Stability*. v. 80, p. 223-232.
15. CHOI, J.; KIM, I-K.; KWAK, S-Y. Synthesis and characterization of a series of star-branched poly(ε-caprolactone)s with the variation in arm numbers and lengths. *Polymer*. v. 46, p. 9725-9735, 2005.
16. CHONG, E.J. ; PHAN, T. T.; LIM, I. J.; ZANG, Y. Z.; BAY B. H.; RAMAKRISHNA, S.; LIM C. T. Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. *Acta Biomaterialia*. v. 3, p. 321-330, 2007.
17. COURTNEY, J.M.; LAMBA, N.M.K.; SUNDARAM, S.; FORBES, C.D. Biomaterials for blood-contact applications. *Biomaterials*. v. 15 p. 737-744, 1994.
18. CUI, Y.; MA, X.; TANG, X.; LUO, Y.; Synthesis, characterization, and thermal stability of star-shaped poly(e-caprolactone) with phosphazene core. *European Polymer Journal*. v. 40, p. 299–305, 2004.
19. DARWIS, D.; MITOMO, H.; ENJOJI, T.; YOSHII, F.; MAKUUCHI, K. Enzymatic degradation of radiation crosslinked poly(ε-caprolactone). *Polymer Degradation and Stability*. v. 62, p. 259-265, 1998.

20. DASH, T. K.; KONKIMALLA, V. B. Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: a review. *Journal of Controlled Release*. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.09.064, 2012.
21. DU, F.; WANG, H.; ZHAO, W.; LI, D.; KONG, D.; YANG, J.; ZHANG, Y. Gradient nanofibrous chitosan/poly ϵ -caprolactone scaffolds as extracellular microenvironments for vascular tissue engineering. *Biomaterials*. v. 33, p. 762-770, 2012.
22. DUARTE, A. R.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Enzymatic degradation of 3D scaffolds of starch-poly- (ϵ -caprolactone) prepared by supercritical fluid technology. *Polymer Degradation and Stability*. v. 95, p. 2110-2117, 2010.
23. DUBERNET, C.; BENOIT, J.P.; COUARRAZE, G.; DUCHENE, D.; Microencapsulation of nitrofurantoin in poly (ϵ -caprolactone): tableting and in vitro release studies. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 35, p. 145–156, 1987.
24. ESPUELAS, M.S.; LEGRAND, P.; IRACHE, J.M.; GAMAZO, C.; ORECCHIONI, A. M.; DEVISSAGUET, J.-Ph.; YGARTUA, P. Poly(ϵ -caprolactone) nanospheres as an alternative way to reduce amphotericin B toxicity. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 158, p. 19-27, 1997.
25. FERRANTI, Y.; MAOCHAS, H., CHABENAT, C.; ORECCHIONI, A.M.; LAFONT, O. Primidone-loaded poly (ϵ -caprolactone) nanocapsules: incorporation efficiency and in vitro release profile. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 193, p. 107–111, 1999.
26. FORREST, L.M.; YÁÑEZ, J.A.; REMSBERG, C.M.; OHGAMI, Y.; KWON, G. S; DAVIES, N.M.; Paclitaxel prodrugs with sustained release an high solubility in poly(ethylene glycol)-*b*-poly(ϵ -caprolactone) micelle nanocarriers: pharmacokinetic disposition, tolerability, and citotoxicity. *Pharmaceutical Research*. v. 25. p. 194-206, 2007.
27. FRÉCHET, J.M.J.; Dendrimers and Other Dendritic Macromolecules: From Building Blocks to Functional Assemblies in Nanoscience and Nanotechnology. *Journal of Polymer Science*. v. 41, p. 3713-3725, 2003. Part A: Polymer Chemistry.
28. FRENCH, R. I. *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. 5^a ed. USA.: Wiley & Sons Inc., 2005.

29. FUKUSAKI, H.; YOSHIDA, M.; ASANO, M.; KUMAKURA, M. Synthesis of low-molecular-weight copoly(L-lactic acid/ ϵ -caprolactone) by direct copolycondensation in the absence of catalysts, and enzymatic degradation of the polymers. *Polymer*. v. 31, p. 2006-2014, 1990.
30. GAN, Z.; LIANG, Q.; ZHANG, J.; JING, X. Enzymatic degradation of poly(ϵ -caprolactone) film in phosphate buffer solution containing lipases. *Polymer Degradation and Stability*. v. 56, p. 209-213, 1996.
31. GANTA, S.; DEVALAPALLY, H.; SHAHIWALA, A.; AMIJI, M. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release*. v. 126, p. 187-204, 2008.
32. GIBAUD, S.; BONNEVILLE, A.; ASTIER, A. Preparation of 3,4-diaminopyridine microparticles by solvent-evaporation methods. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 242, p. 197-201, 2002.
33. GIUNCHEDI, P.; CONTI, B.; MAGGI, L.; CONTE, U. Cellulose acetate butyrate and polycaprolactone for ketoprofen spray-dried microsphere preparation. *Journal of Microencapsulation*. v. 11, p. 381-393, 1994.
34. GORNA, K.; GOGOLEWSKI, S. The effect of gamma radiation on molecular stability and mechanical properties of biodegradable polyurethanes for medical applications. *Polymer Degradation and Stability*. v. 79, p. 465-474, 2003.
35. GUZMAN, M.; MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M.R.; RODRIGUEZ, M. Formation and characterization of cyclosporin loaded nanoparticles. *Journal of Pharmaceutics Science*. v. 82, p. 498-502, 1993.
36. HAKKARAINEN, M.; ALBERTSSON, A-C. Heterogeneous biodegradation of polycaprolactone – low molecular weight products and surface changes. *Macromolecular Chemistry and Physics*. v. 203, p. 1357-1363, 2002.
37. HOU, Y.; CHEN, J.; SUN, P.; GAN, Z.; ZHANG, G. In situ investigations on enzymatic degradation of poly(ϵ -caprolactone). *Polymer*. v. 48, 6348-6353, 2007.
38. INOUE, K.; Functional dendrimers, hyperbranched and star polymers. *Progress in Polymer Science*. v. 25, p. 453-571, 2000.
39. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *Biological evaluation of medical devices: Tests for cytotoxicity: in vitro methods*. Switzerland: ISO, 2009. (ISO 10993-5).

40. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *Biological evaluation of medical devices: Sample preparation and reference materials*: ISO, 2007. (ISO 10993-12).
41. JIAO, Y.Y.; UBRICH, N.; HOFFART, V.; MARCHAND-ARVIER, M.; VIGNERON, C.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Preparation and characterization of heparin-loaded polymeric microparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. v. 28, p. 1033–1041, 2002.
42. KIM, H-W.; LEE, E-J.; JUN, I-K.; KIM, H-E.; KNOWLES, J. C. Degradation and release of phosphate glass/polycaprolactone biological composites for hard-tissue regeneration. *Journal of Material Research*. Part B: Applicable Biomaterial. v. 75B, p. 34-41, 2005.
43. KOH, Y.; JUN, I., KIM, H. Fabrication of poly(ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite scaffold using rapid direct deposition. *Materials Letters*. v. 60, p. 1184-1187, 2005.
44. KULKARNI, A.; REICHE, J.; HARTMANN, J.; KRATZ, K.; LENDLEIN, A. Selective enzymatic degradation of poly(ϵ -caprolactone) containing multiblock copolymers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v. 68, p. 46-56, 2008.
45. KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. B. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 75, p. 1-18, 2010.
46. LANG, M.; WONG, R. P.; CHU, C-C. Synthesis and structural analysis of functionalized poly(ϵ -caprolactone)-based three-arm star polymers. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*. v. 40, p. 1127-1141, 2002.
47. LE, D.M.; KULANGARA, K.; ADLER, A.F.; LEONG, K.W.; ASHBY, V.S.; Dynamic topographical control of mesenchymal stem cells by culture on responsive poly(ϵ -caprolactone) surfaces. *Advanced Materials*. v. 23, p.3278-3283, 2011.
48. LELE, B.S.; LEROUX, J.-C. Synthesis of novel amphiphilic star-shaped poly(1-caprolactone)-blockpoly(N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide) by combination of ring-opening and chain transfer polymerization. *Polymer*. v. 43, p. 5595–5606, 2002.

49. LI, W-J.; COOPER JR. J. A.; MAUCK, R.; TUAN, R. S. Fabrication and characterization of six electrospun poly(α -hydroxy ester)-based fibrous scaffolds for tissue engineering applications. **Acta Biomaterialia**. v. 2, p. 377-385, 2006.
50. LIM, H-A.; RAKU, T.; TOKIWA, Y. Hydrolysis of polyesters by serine proteases. **Biotechnology Letters**. v. 27, p. 459-464, 2005.
51. LIU, F.; ZHAO, Z.; YANG, J.; WEI, J.; LI, S. Enzyme-catalyzed degradation of poly(L-lactide)/poly(ϵ -caprolactone) diblock, triblock, and four-armed copolymers. **Polymer Degradation and Stability**. v. 94, p. 227-233, 2009.
52. MARCHAL-HEUSSLER, L.; SIRBAT, D.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Poly(epsilon-caprolactone) nanocapsule in cartelol ophthalmic delivery. **Pharmaceutics Research**. v. 10, p. 386-390, 1993.
53. MARTIN, I.; MIOT, S.; BARBERO, A.; JAKOB.; WENDT, D. Osteochondral tissue engineering. **Journal of Biomechanics**. v. 40, p. 750-765, 2007.
54. MOCHIZUKI, M.; HIRANO, M.; KANMURI, Y.; KUDO, K.; TOKIWA, Y. Hydrolysis of polycaprolactone fibers by lipase: effects of draw ratio on enzymatic degradation. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 55, p. 289-296, 1995.
55. MURILO, M.; GAMAZO, C.; GONI, M.; IRACHE, J.; BLANCO-PRIETO, M. Development of microparticles prepared by spray-drying as a vaccine delivery system against brucellosis. **International journal of pharmaceutics**. v. 242, p. 341-344, 2002.
56. NGUYEM, H; MORGAN, D. F. A.; FORWOOD, M. R; Validation of 11 kGy as a Radiation Sterilization dose for frozen bone allografts. **The Journal of Arthroplasty**. v. 26, n. 2, p. 303-308, 2011.
57. NÚÑEZ, E.; FERRANDO, C.; MALMSTRÖM, E.; CLAESSONA, H.; WERNERB, P.-E.; GEDDEA, U. W.; Crystal structure, melting behaviour and equilibrium melting point of star polyesters with crystallisable poly(1-caprolactone) arms. **Polymer**. v. 45, p. 5251-5263, 2004.
58. ODELIUS, K.; PLIKK, P.; ALBERTSON, A-C.; The influence of composition of porous copolyester scaffolds on reactions induced by irradiation sterilization. **Biomaterials**. v. 29, p. 129-140. 2008.
59. OLIVEIRA, J. M.; SOUSA, R. A.; KOTOBUKI, N.; TADOKORO, M.; HIROSE, M.; MANO, J. F.; REIS, R. L.; OHGUSHI, H. The osteogenic

- differentiation of rat bone marrow stromal cells cultured with dexamethasone-loaded carboxymethylchitosan/poly(amidoamine) dendrimer nanoparticles. *Biomaterials*. v. 30, p. 804-813, 2009.
60. ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M; MANSUR, H.S. *Biomateriais Fundamentos & Aplicações*. [Ed]. Rio de Janeiro, RJ.: Cultura Médica, 2006.
 61. PANT, H. R.; NEUPANE, M. P.; PANT, B.; PANTHI, G.; OH, H-J.; LEE, M. H.; KIM, H. Y. Fabrication of highly porous poly(ϵ -caprolactone) fibers for novel tissue scaffold via water-bath electrospinning. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 88, p. 587-592, 2011.
 62. PENG, C-L.; SHIEH, M-J.; TSAI, M-H.; CHANG, C-C.; LAI, P-S. Self-assembled star-shaped chlorin-core poly(3-caprolactone)–poly(ethyleneglycol) diblock copolymer micelles for dual chemo-photodynamic therapies. *Biomaterials*. v. 29, p. 3599-3608, 2008.
 63. PEREZ, M.H.; ZINUTTI, C.; LAMPRECHT, A.; UBRICH, N.; ASTIER, A.; HOFFMAN, M.; BODMEIER, R.; MAINCENT, P. The preparation and evaluation of poly(ϵ -caprolactone) microsparticles containing both lipophilic and hydrophilic drug. *Journal of Controlled Release*. V. 65, p. 429–438, 2000.
 64. PITT. C. G.^[a]; CHASALOW, F. I.; HIBIONADA, Y. M.; KLIMAS, D. M.; SCHINDLER, A. Aliphatic polyester. I. The degradation of poly(ϵ -caprolactone) *in vivo*. *Journal of Applied Polymer Science*. v. 26, p. 3779-3787, 1981.
 65. PITT, C. G.^[b]; GRATZL, M. M.; KIMMEL, G.L.; SURLES, J.; SCHINDLER, A. Aliphatic polyesters II. The degradation of poly(DL-lactide), poly(ϵ -caprolactone), and their copolymers *in vivo*. *Biomaterials*. v. 2, p. 215-220, 1981.
 66. PITT, C. G.; JEFFCOAT, A. R.; ZWEIDINGER, R. A. Sustained drug delivery systems. I. The permeability of poly(ϵ -caprolactone), poly(DL-lactic acid) and their copolymers. *Journal of Biomedical Materials Research*. v. 13, p. 497-507, 1979.
 67. PULKKINEN, M.; MALIN, M.; TARVAINEN, T.; SAARIMÄKI, T.; SEPPÄLÄ, J.; JÄRVINEN, K. Effects of block length on the enzymatic degradation and erosion of oxazoline linked poly- ϵ -caprolactone. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 31, p. 119-128, 2007.

68. PULKKINEN, M.; MALIN, M.; BÖHM, J.; TARVAINEN, T.; WIRTH, T.; SEPPALÄ, J.; JÄRVINEN, K. In vivo implantation of 2,2'-bis(oxazoline)-linked poly- ϵ -caprolactone: proof for enzyme sensitive surface erosion and biocompatibility. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 36, p. 310-319, 2009.
69. PUPPI, D.; DETTA, N.; PIRAS, A. M.; CHIELLINI, F.; CLARKE, D. A.; REILLY, G. C.; CHIELLINI, E. Development of electrospun three-arm star poly(ϵ -caprolactone) meshes for tissue engineering applications. *Macromolecular Bioscience*. v. 10, p. 887-897, 2010.
70. QIU, L.Y.; BAE, Y.H.; Polymer Architectures and Drug Delivery. *Pharmaceutical Research*. v. 23, n. 1, p. 1-30, 2006.
71. RAMAKRISHNA, S.; MAYER, J.; WINTERMANTEL, E.; LEONG, K.W. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. *Composites Science and Technology*. v. 61, p. 1189-1224, 2001.
72. RATNER, B.D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. *Biomaterials Science*. 2.ed. San Diego, CA.: Elsevier Academic Press, 2004.
73. REICHE, J.; KULKARNI, A.; KRATZ, K.; LENDLEIN, A. Enzymatic monolayer degradation study of multiblock copolymers consisting of poly(ϵ -caprolactone) and poly(p-dioxanone) blocks. *Thin Solid Films*. v. 516, p. 8821-8828, 2008.
74. RÍHOVÁ, B. Biocompatibility of biomaterials: hemocompatibility, immunocompatibility and biocompatibility of solid polymeric materials and soluble targetable polymeric carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 21, p. 157-176, 1996.
75. RUTALA, W.A. APIC Guidelines for infection control practice. *Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology*. p. 313-342, Aug. 1996.
76. SAHAY, G.; ALAKHOVA, D. Y.; KABANOV, A. V. Endocytosis of nanomedicines. *Journal of Controlled Release*. v. 145, p. 182-195, 2010.
77. JANG, S. P.; LEE, K. H.; KIM, M. N. Biodegradability of aliphatic copolyester blown films. *Polymers for Advanced Technologies*. v. 8, p. 146-151, 1997.
78. SHAULUMON, K. T.; BINULAL, N. S.; DEEPTHY, M.; JAYAKUMAR, R.; MANZOOR, K.; NAIR, S. V. Preparation, characterization and cell attachment studies of electrospun multi-scale poly(caprolactone) fibrous scaffolds for tissue

- engineering. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*. v. 48, 21-30, 2010.
79. SHEN, J. Y.; PAN, X. Y.; LIM, C. H.; CHAN-PARK, M. B.; ZHU, X.; BEUERMAN, R. W. Synthesis, characterization, and in vitro degradation of a biodegradable photo-cross-linked film from liquid poly(ϵ -caprolactone-co-lactide-co-glycolide) diacrylate. *Biomacromolecules*. v. 8, p. 376-385, 2007.
 80. SHENOY, D.B.; D'SOUZA, R.J.; TIWARI, S.B.; UDUPA, N. Potential applications of polymeric microsphere suspension as subcutaneous depot for insulin. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. v. 29, p. 555–563, 2003.
 81. SHOR, L.; GÜÇERİ, S.; WEN, X.; GUANDHI, M.; SUN, W. Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions in vitro. *Biomaterials*. v. 28, n° 35, p. 5291-5297, 2007.
 82. SINHA, V.R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A.; Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 278, p. 1-23, 2004.
 83. SONDHOF, A.F.; MALLAPRAGADA, S.; BOOTH, L.C.; HEATH, C.; ROSENBUSCH, R.; APLEY, M.; HSU, W. Polylactic acid (biodegradable) microspheres for sustained antimicrobial drug release in the equine joint: preliminary in vivo results. *International Journal Symposium on Controlled Release Bioactive Materials*. v. 25, p. 651–652, 1998.
 84. SUN, H.; MEI, L.; SONG, C.; CUI, X.; WANG, P. The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. *Biomaterials*. v. 27, p. 1735-1740, 2006.
 85. SURIANO, F.; COULEMBIER, O.; DUBOIS, P. Synthesis of amphiphilic A₃B mikto-arm copolymers from a sugar core: combination of hydrophobic PCL and hydrophilic glycopolymers for biocompatible nanovector preparation. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*. v. 48, 3271-3280, 2010.
 86. THEILER, S.; MELA, P.; DIAMANTOUROS, S. E.; JOCKENHOEVEL, S.; KEUL, H.; MÖLLER, M. Fabrication of highly porous scaffold for tissue engineering based on star-shaped functional poly(ϵ -caprolactone). *Biotechnology and Bioengineering*. v. 108, n° 3, p. 694-703, 2011.

87. TOKIWA, Y.; SUZUKI, T. Hydrolysis of polyesters by lipases. *Nature*. v. 270, p. 76-78, 1977.
88. TÖRMÄLÄ, P.; POHJONEN, T. Ultrahigh-strength self-reinforced polylactide composites and their surgical applications. *Macromolecular Symposia*. v. 123. p. 133-131, 1997.
89. VANDERMEULEN, G.; ROUXHET, L.; ARIEN, A.; BREWSTER, M. E.; PRÉAT, V. Encapsulation of amphotericin B in poly(ethylene glycol)-block-poly(ϵ -caprolactone-co-trimethylenecarbonate) polymeric micelles. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 309, p. 234-240, 2006.
90. VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical Research*. v. 26, n.º 5, p. 1025-1058, 2008.
91. VAZ, C. M.; TUIJL, S. V.; BOUTEN, C. V. C.; BAAIJENS, F. T. P. Design of scaffolds for blood vessel tissue engineering using a multi-layering electrospinning technique. *Acta Biomaterialia*. v. 1, p. 575-582, 2005.
92. VOGELSANGER, N.; FORMOLO, M. C.; PEZIN, A. P. T.; SCHENEIDER, A. L. S. S.; FURLAN, S. A.; BERNARDO, H. P.; PEZZIN, S. H.; PIRES, A. T. N.; DUEK, E. A. R. Blendas biodegradáveis de poli(3-hidroxiburato)/poli(ϵ -caprolactona): obtenção e estudo da miscibilidade. v. 6, n.º 3, p. 359-365, 2003.
93. WANG, J-L.; DONG, C-M. Physical properties, crystallization kinetics, and spherulitic growth of well-defined poly(ϵ -caprolactone)s with different arms. *Polymer*. v.47, 3218-3228, 2006.
94. WANG, C., WANG, Y.; WANG, Y.; FAN, M.; LUO, F., QIAN, Z.; Characterization, pharmacokinetics and disposition of novel nanoscale preparation of paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics* v. 414, p. 251-259, 2011.
95. WIRIA, F. E.; LEONG, K. F.; CHUA, C.K.; LIU, Y. Poly- ϵ -caprolactone/hydroxyapatite for tissue engineering scaffold fabrication via selective laser sintering. *Acta Biomaterialia* v. 3, p. 1-12, 2007.
96. WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*. v. 35, p. 1217-1256, 2010.

97. XUE, L.; DAI, S.; LI, Z. Biodegradable shape-memory block co-polymers for fast self-expandable stents. *Biomaterials*. v. 31, p. 8132-8140, 2010.
98. YIM, E. K. F.; WEN, J.; LEONG, K. W. Enhanced extracellular matrix production and differentiation of human embryonic germ cell derivatives in biodegradable poly(e-caprolactone-co-ethyl ethylene phosphate) scaffold. *Acta Biomaterialia*. v. 2, p. 365-376, 2006.