



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE COPOLIÉSTER E MODIFICAÇÃO
POR REAÇÃO TIOL-ENO PARA APLICAÇÕES
BIOMÉDICAS**

BRENA BEATRIZ PEREIRA RIBEIRO

Florianópolis
Julho/2022

Brena Beatriz Pereira Ribeiro

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE COPOLIÉSTER E MODIFICAÇÃO POR
REAÇÃO TIOL-ENO PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio II (QMC 5512)



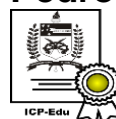
Documento assinado digitalmente
Alexandre Luis Parize
Data: 30/07/2022 20:16:21-0300
CPF: 027.543.499-01
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize



Documento assinado digitalmente
Pedro Henrique Hermes de Araujo
Data: 02/08/2022 10:28:16-0300
CPF: 018.308.657-06
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo



Documento assinado digitalmente
Jeovandro Maria Beltrame
Data: 01/08/2022 15:29:14-0300
CPF: 041.387.569-57
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

M. Sc. Jeovandro Maria Beltrame

Florianópolis
Julho/2022

Agradecimentos

Aos meus orientadores: Prof. Dr. Alexandre Luis Parize, pela orientação na construção desse trabalho durante este último ano de curso e Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo pela oportunidade concedida de trabalhar como aluna IC neste projeto. Obrigada por todo incentivo e suporte fornecido.

Ao meu coorientador, MSc. Jeovandro Maria Beltrame, por sempre acreditar no meu potencial, pelos ensinamentos repassados e auxílio durante todos esses anos de parceria.

Ao Laboratório de Controle e Processos Poliméricos (LCP) e ao Laboratório de Sistemas Porosos (LASIPO).

À Universidade Federal de Santa Catarina, professores e demais funcionários do Departamento de Química e da Engenharia Química.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

À minha família, que sempre me apoiou e festejou a cada etapa concluída. Em especial minha avó, Dona Eliene, por todas orações e carinho.

À minha mãe, minha maior inspiração. Obrigada por garantir que meus irmãos e eu tivéssemos as melhores oportunidades e que nada nos faltasse, principalmente amor.

Aos meus irmãos Beatriz e Bernardo, por me ajudarem em tantos momentos e me trazerem as mais sinceras risadas.

À minha irmã gêmea, Bruna, que desde sempre compartilha a vida ao meu lado. Obrigada pela nossa conexão que ultrapassa qualquer limite imaginável e por me incentivar a seguir meus sonhos.

Ao meu namorado Vinícius, agradeço por termos nos encontrado! Obrigada por sempre me mostrar o lado positivo de tudo, acreditar em mim e topa ser meu companheiro nessa jornada. Agradeço também à sua família: Maiquel, Moacir e Vitória, que me acolheram tão bem e se tornaram minha segunda família.

Aos meus cunhados Marcus, por toda ajuda e apoio, e João, que conviveu comigo nesse último semestre e me ouviu tantas vezes em momentos de lamentações e comemorações.

Aos meus amigos que me acompanharam ao longo do ensino médio e graduação: David, Gabriel, Indianara, João Vitor, José, Luan, Mendes, Marie, Damasceno e Yasmin.

Em especial a Indianara, pela nossa amizade e por todos momentos compartilhados que fez e faz toda a diferença;

Luan, por toda a ajuda, companheirismo e muitas risadas;

e Emanoele ou “Manuela” pela parceria especial que construímos durante a graduação.

Vocês foram essenciais para a conclusão de mais essa etapa, obrigada por tornarem a graduação um período mais leve e divertido.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 13 |
| 2.1 Biomateriais | 13 |
| 2.1.1 Aplicações de biomateriais poliméricos | 13 |
| 2.1.2 Polímeros biodegradáveis | 14 |
| 2.2 Poliésteres | 14 |
| 2.3 Polimerização enzimática por abertura de anel (e-PAA) | 16 |
| 2.3.1 Lipases (Novozym 435) | 17 |
| 2.3.2 Mecanismo catalítico | 17 |
| 2.4 Modificação via reação tiol-eno | 18 |
| 3 OBJETIVOS | 21 |
| 3.1 Objetivos Gerais | 21 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 21 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 22 |
| 4.1 Materiais | 22 |
| 4.2 Síntese do copolímero poli(globalide-co- ϵ-caprolactona) por e-PAA | 22 |
| 4.3 Modificação do PGICL com Cisteína via reação Tiol-eno | 23 |
| 4.4 Caracterização Físico-Química dos Copolímeros | 24 |
| 4.4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) | 24 |
| 4.4.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) | 24 |
| 4.4.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC) | 25 |
| 4.4.4 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) | 25 |
| 4.5 Ângulo de contato | 25 |
| 4.6 Ensaio de viabilidade celular | 26 |
| 4.7 Segurança no laboratório e tratamento/destino dos resíduos gerados | 26 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 27 |
| 5.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) | 27 |
| 5.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 5.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC) | 30 |
| 5.4 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) | 32 |
| 5.5 Ângulo de contato | 32 |
| 5.6 Ensaio de viabilidade celular | 34 |
| 6 CONCLUSÃO | 36 |
| 7 REFERÊNCIAS | 37 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estrutura do copolímero PGICL..... | 15 |
| Figura 2. Estrutura da ϵ -caprolactona e do polímero poli(ϵ -caprolactona)..... | 15 |
| Figura 3. Estrutura da globalide e do polímero poli(globalide)..... | 16 |
| Figura 4. Mecanismo e-PAA de lactonas catalisadas por lipase | 18 |
| Figura 5. Mecanismo tiol-eno | 19 |
| Figura 6. Modificação do polímero PGICL com NAC via reação tiol-eno | 20 |
| Figura 7. Estrutura do aminoácido cisteína (Cys)..... | 20 |
| Figura 8. Mecanismo de polimerização enzimática por abertura de anel..... | 23 |
| Figura 9. Mecanismo de modificação do copolímero via reação tiol-eno | 23 |
| Figura 10. Espectro de FT-IR para o PGICL, PGICLCys e Cys, respectivamente.... | 28 |
| Figura 11. Espectro de RMN ^1H para o PGICL e PGICLCys | 30 |
| Figura 12. Termograma dos polímeros PGICL e PGICLCys | 31 |
| Figura 13. Análise do ângulo de contato | 33 |
| Figura 14. Viabilidade celular dos copolímeros usando ensaio de MTT (**** (p < 0,0001))..... | 35 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Conversão da modificação do PGICLCys calculado a partir do espectro de RMN | 29 |
| Tabela 2. Propriedades térmicas dos polímeros..... | 31 |
| Tabela 3. Valores de Massa Molar média (M_n) e ponderada (M_w) para os copolímeros | 32 |
| Tabela 4. Valores de ângulo de contato e energia de superfície dos copolímeros ... | 34 |
| Tabela 5. Resultado da análise de MTT | 35 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ATR - Reflectância Total Atenuada

CL – Caprolactona

Cys – Cisteína

DCM – Diclorometano

DMPA – 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona

DSC – Calorimetria diferencial de varredura

e-PAA – Polimerização enzimática por Abertura de Anel

FT-IR – Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

GI – Globalide

GPC - Cromatografia de Permeação em Gel

Mn – Massa molecular média numérica

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

Mw – Massa molecular média ponderal

NAC – N-acetilcisteína

NZ 435 – Novozym 435

PAA – Polimerização por Abertura de Anel

PCL – Policaprolactona

PGL – Poliglobalide

PGICL – Poli(globalide-co- ϵ -caprolactona)

PGICLCys - Poli(globalide-co- ϵ -caprolactona)-cisteína

RMN ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

T_m – Temperatura de fusão

X_c – Grau de cristalinidade

ΔH – Entalpia de fusão

RESUMO

No desenvolvimento de biomateriais poliméricos, os poliésteres recebem destaque em decorrência das suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioreabsorção. A polimerização enzimática por abertura de anel (e-PAA) emerge como uma rota ambientalmente mais favorável para a obtenção de poliésteres, permitindo a síntese de polímeros com massa molar elevada e sem necessitar de catalisadores organometálicos. Entretanto, o poliéster sintetizado possui aplicação limitada devido à sua alta cristalinidade e hidrofobicidade. Deste modo, a fim de alterar essas propriedades, pode-se incorporar biomoléculas nas insaturações da cadeia linear do poliéster através de modificações via reações de tiol-eno. Desta forma, o presente trabalho possui como objetivo a síntese do copolímero poli(globalide-co- ϵ -caprolactona) por e-PAA e a modificação via reação tiol-eno com o aminoácido cisteína. A presença de grupos funcionais característicos foi avaliada de modo qualitativo por Espectroscopia de Infravermelho, onde há a confirmação da ligação C-S entre o copolímero e o aminoácido, além da presença dos grupos éster, aminas e C=C. Os resultados obtidos por Espectroscopia de Ressonância Magnética de Hidrogênio demonstraram um acoplamento de 18% de aminoácido, avaliado pelo consumo das insaturações do copolímero. Ainda, na análise de Calorimetria Diferencial de Varredura foi observado uma redução de 9% no grau de cristalinidade do copolímero, verificado pela redução da temperatura e entalpia de fusão. A molhabilidade e energia superficial dos copolímeros demonstram o maior caráter hidrofílico do PGICLCys em comparação ao PGICL. Os estudos biológicos preliminares certificaram a biocompatibilidade do material em células de fibroblastos L929. Sendo assim, a modificação do PGICL com cisteína contribui para a redução da cristalinidade e aumento da biocompatibilidade e hidrofiliicidade, possibilitando a utilização deste copoliéster modificado como um biomaterial para diversas aplicações biomédicas.

Palavras-chave: biomateriais, poli(globalide-co- ϵ -caprolactona), modificação tiol-eno, cisteína, biocompatibilidade.

1 INTRODUÇÃO

Devido à crescente demanda por biomateriais para o uso como dispositivos biomédicos, novas estratégias têm sido desenvolvidas para se obter um material com propriedades requeridas na aplicação. Os polímeros se destacam nessa área, principalmente aqueles que apresentam características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioreabsorção. Uma classe de polímeros que ganha visibilidade são os poliésteres pois apresentam boas propriedades mecânicas, são biocompatíveis e bioreabsorvíveis. Estes poliésteres são empregados na regeneração de tecidos e órgãos, como carregadores para liberação de fármacos e nas embalagens biodegradáveis na indústria alimentícia.¹

Os poliésteres biodegradáveis ganham atratividade na biomedicina, com destaque ao copolímero poli(globalide-co- ϵ -caprolactona) (PGICL), derivado de uma lactona (ϵ -caprolactona) e uma macrolactona insaturada (globalide) em virtude de suas propriedades mecânicas, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Os polímeros obtidos a partir da copolimerização tem a vantagem de somar a característica de dois monômeros em uma cadeia polimérica. Ainda, o uso de monômeros que mantém a insaturação na cadeia principal do copolímero apresentam a vantagem de serem pós-modificados via reações de *click chemistry* propondo um melhor direcionamento do biomaterial a ser confeccionado.

A rota mais empregada para a síntese do PGICL é a polimerização enzimática por abertura de anel (e-PAA).² Esta não necessita de temperaturas elevadas, ao contrário das polimerizações por abertura de anel que utilizam catalisadores organometálicos. Temperaturas mais brandas permitem que o copolímero preserve as insaturações da unidade monomérica. Na e-PAA o uso de solventes orgânicos é reduzido e seus catalisadores enzimáticos, além de serem considerados fontes renováveis e reutilizáveis, são preferíveis para o uso biomédico por serem atóxicos. Por conta disso, esta rota é considerada ambientalmente favorável.³

As modificações após a polimerização dos copolímeros podem alterar características que limitam a aplicação desses poliésteres, como a hidrofobicidade e a cristalinidade. Reações de tiol-eno, um método *click chemistry*, permitem a modificação nas insaturações da lactona, incorporando grupos funcionais na estrutura linear do copolímero de forma rápida e seletiva, descartando o uso de múltiplas etapas

de síntese para a obtenção de um biomaterial com funções específicas.⁴ Estudos relatam que a modificação do poliéster que emprega biomoléculas como aminoácidos e derivados, permitem o melhoramento das propriedades físico-químicas do copolímero, o que contribui para o aumento da biocompatibilidade do biomaterial final.

5

No estudo realizado foi utilizado a cisteína, um aminoácido que contém um grupo tiol em sua estrutura e que concede característica hidrofílica e biocompatibilidade desejável, quando usado como grupo pendente na cadeia de um polímero.

Posto isso, o presente trabalho teve como objetivo a síntese do copoliéster poli(globalide-co- ϵ -caprolactona) por e-PAA e sua modificação via reação tiol-eno com o aminoácido cisteína a fim de obter-se um biomaterial para aplicações biomédicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biomateriais

A demanda por biomateriais vem crescendo continuamente nos últimos anos, aumentando o incentivo ao desenvolvimento de novas estratégias para obtenção de materiais mais eficientes.⁶ Um biomaterial deve possuir biocompatibilidade, baixa toxicidade e dependendo da sua aplicação precisa ser biocompatível, biodegradável e bioreabsorvível. Ao exercer sua função, o biomaterial não deve causar perturbações nos processos fisiológicos e nem danos indesejáveis para as células.^{7,8} Caso a biodegradabilidade seja uma propriedade deste material, deve-se verificar que os produtos de degradação gerados sejam atóxicos e biocompatíveis. Dentro dos biomateriais, os poliméricos ganham destaque pois podem ser sintetizados de forma relativamente fácil, barata e com um amplo conjunto de propriedades.⁸

2.1.1 Aplicações de biomateriais poliméricos

Algumas das principais aplicações dos biomateriais poliméricos são na engenharia de tecidos, como nanocarregadores para diagnóstico, terapia e sistemas de entregas de droga.⁹⁻¹¹ Para regeneração de tecidos o biomaterial deve apresentar uma estrutura de suporte, constituído de uma matriz tridimensional temporária que seja idêntica ao meio natural e sua principal função é atuar como plataforma de suporte que propicie o desenvolvimento do novo tecido.¹² As propriedades como porosidade, degradação, rigidez, definem a qualidade estrutural final do biomaterial. A degradação controlada do biomaterial implantado é outro ponto relevante, pois o suporte deve permanecer tempo suficiente até a regeneração total da área desejada.¹³

Outra aplicação dos polímeros é como revestimentos para a estabilização de nanopartículas magnéticas. As nanopartículas são muito utilizadas em aplicações biomédicas como nanocarregadores, podendo exercer funções de diagnóstico de câncer e liberação de drogas.^{14,15} Para que estas partículas se tornem biocompatíveis, estáveis e atuem como suporte de biomoléculas é necessário que possuam um revestimento orgânico ou inorgânico.^{16,17} Esses revestimentos, em conjunto com o

método de síntese, influenciam no diâmetro, cristalinidade, propriedades magnéticas e estabilidade coloidal da nanopartícula. Os polímeros se tornam uma alternativa para esta aplicação, estabilizando a nanopartícula e permitindo uma modificação posterior de superfície, para atender melhor a função do dispositivo.¹⁸ Os polímeros também são essenciais para dispositivos de liberação de fármaco. O encapsulamento de fármacos permite maior controle do tempo de circulação na corrente sanguínea, reduz possíveis efeitos colaterais e evita degradação antes do tempo essencial e direcionar melhor para o local alvo.^{19,20}

2.1.2 Polímeros biodegradáveis

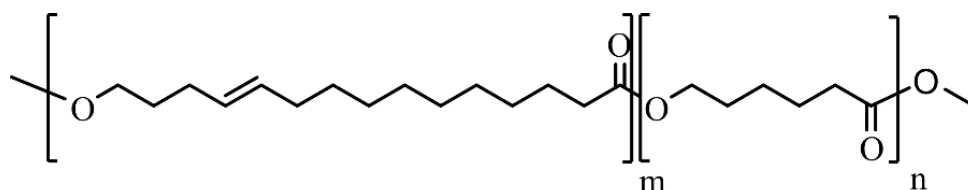
Alguns biomateriais tem ação temporária no organismo, dada a necessidade momentânea para sustentar, orientar e propiciar o crescimento celular. Sendo assim, os polímeros biodegradáveis e bioreabsorvíveis possuem significativa relevância, e podem ser bioabsorvidos pelo organismo após exercida a função. Os polímeros considerados biodegradáveis são aqueles que sofrem a quebra de ligações, por enzimas ou reações de hidrólise, o que propicia a sua degradação.²¹ O que viabiliza o emprego destes polímeros na área da biomedicina é devido sua facilidade de síntese e ajustes nas propriedades físico-químicas, térmicas e mecânicas.²² Os principais polímeros biodegradáveis que são utilizados na fabricação desses dispositivos são os polianidridos, poliamidas, poliuretanos, polifosfatos e poliésteres.²³ Estudos se voltam para a utilização dos poliésteres, pois estes são considerados polímeros versáteis, biocompatíveis, bioreabsorvíveis e com boas propriedades mecânicas.³

2.2 Poliésteres

Os poliésteres possuem na sua estrutura a repetição de grupos éteres na cadeia principal e sua fórmula química pode ser representada como $-(COOR)_x-$, com o R correspondendo a diferentes grupos funcionais. O grupamento éster presente na estrutura do polímero é o que o torna propenso à degradação hidrolítica. Ao ser hidrolisado, o poliéster é fragmentado em unidades menores e pode ser reabsorvido por vias metabólicas.²⁴⁻²⁶ Os poliésteres biodegradáveis mais comumente empregados são poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ϵ - caprolactona), poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA).²³ Sendo assim, um copoliéster

(copolímero formado por monômeros com grupos ésteres) que vem ganhando atenção é o poli(globalide-co- ϵ -caprolactona) (PGICL), apresentado na Figura 1, sintetizado a partir dos monômeros de ϵ -caprolactona e globalide. Estudos relatam sua síntese, modificação e biocompatibilidade para aplicações biomédicas.^{5,27,28}

Figura 1. Estrutura do copolímero PGICL

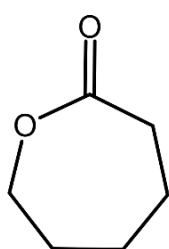


Poli(globalide-co- ϵ -caprolactona) (PGICL)

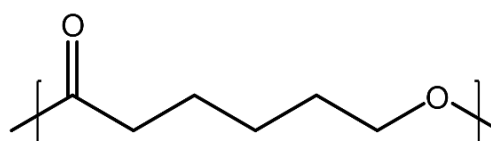
Fonte: Adaptado de Guindani et al. (2017)²⁹

A ϵ -caprolactona é o monômero utilizado na síntese do poliéster linear alifático poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (Figura 2). Este poliéster é considerado biodegradável, semicristalino e biocompatível, muito presente na literatura, com sínteses e aplicações bem estabelecidas, dentre elas na área biomédica.^{30,31}

Figura 2. Estrutura da ϵ -caprolactona e do polímero poli(ϵ -caprolactona)



ϵ -caprolactona



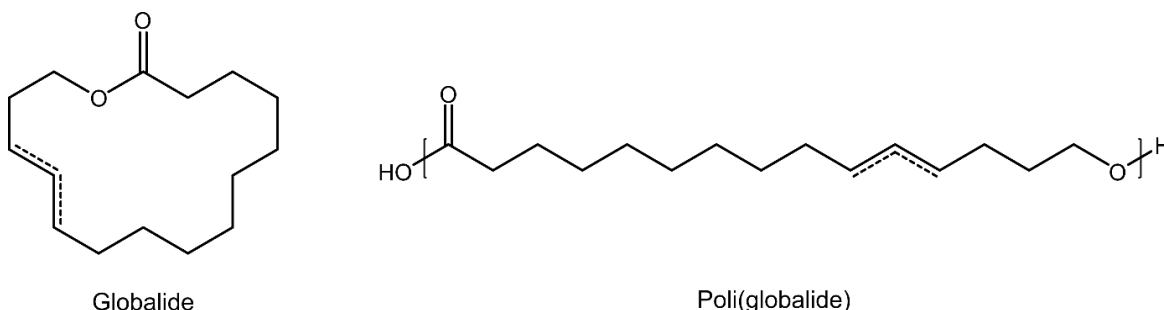
Poli(ϵ -caprolactona)

Fonte: Adaptado de Guindani et al. (2017)²⁹

A globalide (GI) é uma macrolactona insaturada com grande aplicação na indústria de perfumes e cosméticos. É comumente utilizada como monômero na síntese do homopolímero poliglobalide (PGI) (Figura 3), um poliéster alifático biocompatível, hidrofóbico, semicristalino e não tóxico. O PGI se destaca por

apresentar uma insaturação na sua estrutura, permitindo *crosslinking* e modificação após a polimerização.³²

Figura 3. Estrutura da globalide e do polímero poli(globalide)



Fonte: Adaptado de Guindani et al. (2017)²⁹

Estes monômeros são semicristalinos quando polimerizados sozinhos, contudo, quando se realiza a polimerização por abertura de anel (e-PAA) entre eles para a formação do PGICL, o copolímero obtido possui maior mobilidade nas cadeias, tornando-o menos cristalino. Entretanto, ainda mantém propriedades importantes como excelentes propriedades mecânicas, biocompatibilidade e biodegradabilidade.³³

2.3 Polimerização enzimática por abertura de anel (e-PAA)

A principal rota empregada para obtenção de copoliésteres é a polimerização por abertura de anel (e-PAA). A polimerização ocorre a partir da abertura do anel do monômero, de modo que modifica-o para uma estrutura polimérica linear, e então o grupo terminal deste polímero atua como um centro reativo e os monômeros se adicionam consecutivamente, para formar uma cadeia polimérica maior.³⁴

Uma etapa importante da reação é a seleção do catalisador, visto que ele irá determinar o método síntese e purificação, e a partir dos resíduos gerados, determinar as aplicações seguintes do polímero sintetizado.³⁵ Os mais usados em reações de PAA (polimerização por abertura de anel) são catalisadores organometálicos, orgânicos e enzimáticos. Nas rotas sintéticas com uso dos organometálicos, se faz necessária o uso de temperaturas elevadas para a polimerização.^{36,37} Mas, quando se deseja obter um polímero com insaturações na cadeia principal, é preciso uma polimerização em temperaturas mais brandas para que não ocorra a degradação térmica das insaturações.³⁸ Sendo assim, a polimerização enzimática por abertura de

anel é uma rota utilizada para a obtenção destes polímeros.³⁹ Além de não necessitar de temperaturas altas, a e-PAA reduz o uso de solventes orgânicos e possui a particularidade de obtenção de polímeros mais uniformes e com altas massas molares⁴⁰, pois as enzimas apresentam apenas um sítio ativo, não gerando produtos secundários durante a síntese.⁴¹

Ademais, os catalisadores enzimáticos são considerados naturais, podendo ser obtido por bactérias, fungos ou plantas, o que os torna uma fonte renovável. Apresentam funções de quimioseletividade, regioseletividade e estereosseletividade, tornando-as fortemente específicas. São preferíveis em relação aos organometálicos devido a sua não-toxicidade para o uso biomédico^{40,42}, podendo também serem reutilizadas em diversas reações, sem que perca seu poder catalítico, tornando o processo com um custo final menor. Sendo assim, a e-PAA é considerada uma técnica promissora e indispensável no desenvolvimento de sínteses mais verdes para obtenção de poliésteres.³

2.3.1 Lipases (Novozym 435)

Lipases são enzimas muito utilizadas como catalisadores biológicos em reações de transesterificação, policondensação, polimerização de abertura de anel e modificações de polímeros e podem ser aplicadas em reações de hidrólise de ésteres.^{43,44} A lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em resina polimérica macroporosa de metacrilato de metila (Lewatit VP OC 1600, Bayer), comercialmente conhecida como Novozym 435, é altamente ativa e apresenta notável eficácia na e-PAA de lactonas, com uma alta taxa de reação na polimerização de macrolactona.³⁸ Esta enzima é considerada um catalisador altamente versátil, podendo ser aplicada em diversas condições de reação. Isto se deve a característica de possuir uma imobilização estável em temperaturas e pH diferentes, com atividade sobre uma grande variedade de substratos em vários solventes orgânicos.⁴⁵

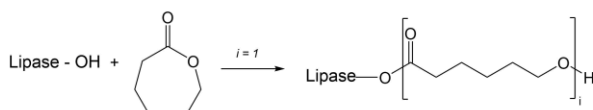
2.3.2 Mecanismo catalítico

Na Figura 4 é possível observar o mecanismo catalítico da e-PAA. Na etapa 1 ocorre a ativação da lactona, onde a enzima faz a abertura do anel do monômero

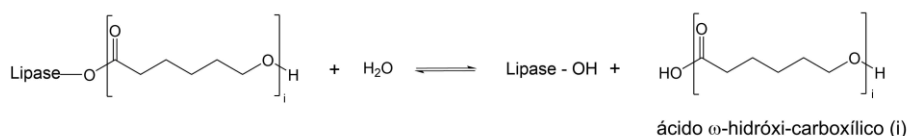
formando um complexo entre monômero-enzima, também chamado de intermediário acil-enzima. Após a abertura do anel, ocorre o ataque nucleofílico no complexo formado, onde a água (iniciador) atua como o nucleófilo, ocasionando a desacilação do complexo. Essa desacilação gera um oligômero (o ácido ω -hidróxi-carboxílico) e libera o sítio ativo a enzima para abertura de um novo anel. A propagação da polimerização ocorre na etapa 3, de modo que os oligômeros são adicionados por policondensação. Nesta etapa o ataque nucleofílico ocorre a partir do grupo hidroxiterminal do ácido ω -hidróxi-carboxílico, liberando a enzima e formando a cadeia polimérica como produto final.^{41,45}

Figura 4. Mecanismo e-PAA de lactonas catalisadas por lipase

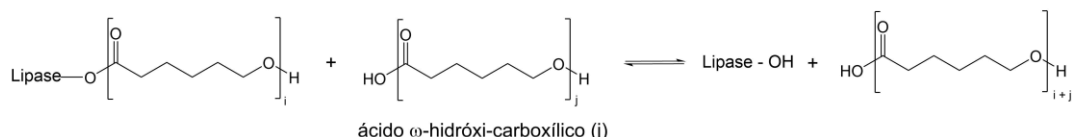
Etapa 1: Abertura do anel pela enzima e formação do complexo enzima-monômero



Etapa 2: Ataque nucleofílico e regeneração do sítio ativo da enzima



Etapa 3: Propagação por policondensação



Fonte: Adaptado de Johnson et al. (2011)⁴⁶

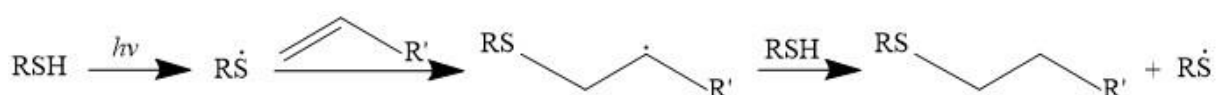
2.4 Modificação via reação tiol-eno

A reação de *click chemistry* tiol-eno consiste em uma estratégia de modificação da cadeia de polímeros pré-sintetizados que altera as suas propriedades físico-químicas. Esta reação amplia as possibilidades de aplicação e garante um melhor direcionamento para o uso na área biomédica. Os poliésteres apresentam certa limitação na sua aplicação devido à sua hidrofobicidade e cristalinidade, sendo assim, é possível realizar a modificação nas insaturações da lactona presente na cadeia

polimérica, aumentando a biocompatibilidade com o meio hidrofílico. Este método pode ser realizado de forma direta utilizando um iniciador térmico ou fotoluminescente⁴⁷, conjuga as moléculas com grupos tiol de maneira rápida, seletiva e possui um alto rendimento, dispensando a utilização de procedimentos em múltiplas etapas, o que o torna uma importante ferramenta.

As reações tiol-eno fotoluminescentes (Figura 5) consistem em reações em que o fotoiniciador, após absorver um fóton de luz, gera um radical tiol pela abstração direta do hidrogênio do tiol (ou ele é adicionado à uma dupla que gera um radical e então abstrai um hidrogênio do tiol). O radical tiol formado se liga ao carbono da dupla ligação gerando um radical intermediário, que novamente abstrai um hidrogênio de outro grupo tiol gerando um novo radical e segue este ciclo. ^{48,49}

Figura 5. Mecanismo tiol-eno

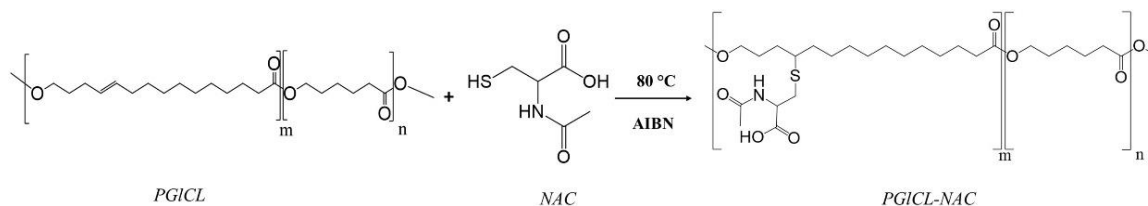


Fonte: Adaptado de Fairbanks et al. (2017)⁴⁹

Além da hidrofiliidade, outras propriedades que podem ser ajustadas são a viscosidade, adesão, cristalinidade e solubilidade.⁴ As modificações permitem a conjugação de estruturas mais complexas como proteínas e anticorpos aos polímeros, trazendo uma interação mais específica com as células.⁵⁰⁻⁵³

Os aminoácidos por serem moléculas biocompatíveis podem fornecer maior biocompatibilidade e hidrofiliidade ao copoliéster, devido as possíveis ligações de hidrogênio com os grupos ácido carboxílico e amina.⁵⁴ Estudos relatam a biocompatibilidade desses copolímeros modificados com aminoácidos e derivados, como a bioconjugação com a N-acetilcisteína (NAC) (Figura 6).^{5,27,55}

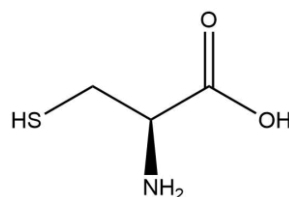
Figura 6. Modificação do polímero PGICL com NAC via reação tiol-eno



Fonte: Guindani et al. (2018) ⁵

A cisteína (Cys) é um aminoácido essencial que apresenta em sua estrutura os grupos funcionais amina, ácido carboxílico e tiol (Figura 7). Desenvolve inúmeras funções biológicas e químicas no nosso organismo, sendo importante na síntese, estrutura e atuação de proteínas e enzimas, manutenção da homeostase redox^a e precursor metabólico de compostos bioquimicamente importantes. ^{56,57,58}

Figura 7. Estrutura do aminoácido cisteína (Cys)



Fonte: Adaptado de Hayashi et al. (2016)⁵⁹

^a A homeostase redox representa um equilíbrio entre as espécies oxidantes e antioxidantes nas células. ⁵⁸

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Este trabalho tem como objetivo a síntese enzimática do copolímero poli(globalide-co- ϵ -caprolactona) e sua modificação com o aminoácido cisteína via reação tiol-eno visando aplicações biomédicas.

3.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar o copolímero poli(globalide-co- ϵ -caprolactona) (PGICL) via reação de polimerização enzimática por abertura de anel;
- Modificar o copolímero PGICL via reação tiol-eno com o aminoácido cisteína (Cys);
- Realizar a caracterização físico-química e ângulo de contato dos copolímeros PGICL e PGICLCys;
- Realizar ensaio *in vitro* de viabilidade celular em células de fibroblasto L929.

4 MATERIAL E MÉTODOS

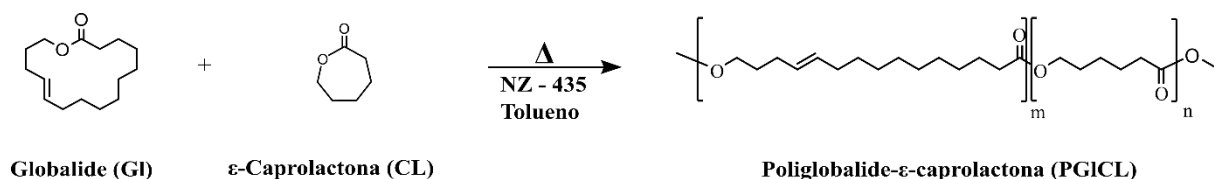
4.1 Materiais

Diclorometano P.A. 99,8% (DCM), clorofórmio P.A. 99,8%, tetrahidrofurano P.A. 99,9% (THF), etanol P.A. 99,8% (EtOH), tolueno P.A. 99,8% foram adquiridos da Vetec Química (Brasil). Dimetilformamida (DMF) (NEON). O fotoiniciador 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMPA) CAS: 24650-42-8 foi doado por IGM resinas. Cisteína 99,8% (Cys) foi comprada da Gemini (Brasil). Novozym 435 (lipase B comercial de *Candida antarctica* imobilizada em grânulos de poliacrilato reticulado) foi doada por Novozymes, Brasil, A/S. Globalide (GI) foi doado da Symrise. A ϵ -caprolactona (CL) (Sigma Aldrich Brasil), O globalide e a ϵ -caprolactona (CL) serão secos sob vácuo por 24 horas e mantidos em um dessecador sobre sílica e peneiras moleculares de 4 Å (Sigma Aldrich – Brasil). O meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO, Baltimore, EUA) utilizado para estimular o crescimento celular possui uma formulação baseada e utiliza sistema tamponamento com bicarbonato e determinada concentração de aminoácidos e vitaminas. O Soro fetal bovino (10%), penicilina (100 U/mL) estreptomicina (100 μ g/mL) e Glutamina 2mM foram adquiridas da Thermo Fisher Scientific - GIBCO. Sal de tetrazólio (MTT) (Brometo de [3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) adquirido da Sigma-Aldrich. Cloreto de cobalto imitador de hipoxia (CoCl_2) e corante azul de tripan Células L929. A água utilizada para as reações será purificada por um sistema de purificação de água Milli-Q.

4.2 Síntese do copolímero poli(globalide-co- ϵ -caprolactona) por e-PAA

A síntese do PGICL foi realizada pela técnica e-PAA utilizando os monômeros globalide (GI) e ϵ -caprolactona (CL) na proporção de massa 50:50 (GI:CL) (Figura 8), adaptado de Guindani et al. (2017)²⁹. O tolueno foi usado como solvente e o sistema mantido a uma temperatura de 65°C durante 4 horas. O teor de enzima foi fixado em 5% (massa) em relação à quantidade de monômero total, e a relação massa de solvente:monômeros fixada em 1:2. Após a polimerização, o material foi disperso em diclorometano (DCM), seguida da separação das enzimas. Após, precipitou-se o polímero em uma mistura de etanol:acetona 70:30 (v:v) gelada. O polímero foi então filtrado à vácuo e seco em estufa a 50°C por 48 horas.

Figura 8. Mecanismo de polimerização enzimática por abertura de anel

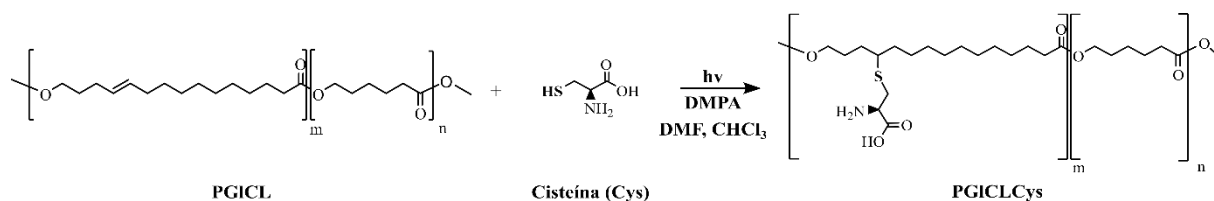


Fonte: Adaptado de Guindani et al. (2017)²⁹

4.3 Modificação do PGICL com Cisteína via reação Tiol-eno

A modificação via tiol-eno do PGICL com a Cisteína para a síntese do PGICLCys (Poli(globalide-co-ε-caprolactona)-cisteína) foi realizada com o método de fotopolimerização utilizando o iniciador fotoluminescente 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMPA) (Figura 9), adaptado de Ates e Heise (2014)⁴. Juntamente em um frasco foi adicionado 0,300g de PGICL, 0,224g de Cys (100% em excesso em relação as insaturações) e 0,016g do fotoiniciador DMPA, usando uma mistura de clorofórmio:Dimetilformamida (2:1 v:v) como solvente. Deixou-se reagir em câmara ultravioleta por um período de 4 horas, sob agitação magnética contínua. Após esse tempo, foi realizado a purificação do polímero. A purificação consistiu em lavagens com água gelada, precipitando o polímero modificado e a cisteína e DMPA que não reagiram ficaram solúveis, sendo separados por decantação.

Figura 9. Mecanismo de modificação do copolímero via reação tiol-eno



Fonte: Adaptado de Ates e Heise (2014)⁴

4.4 Caracterização Físico-Química dos Copolímeros

4.4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Para a identificação dos grupos funcionais presentes na estrutura do polímero foi utilizado a análise de Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) no modelo Shimadzu IR Prestige 21 com janela de ZnSe. Os espectros de infravermelho foram registrados em uma faixa de número de onda de 400-4000 cm^{-1} , 32 números de scans e resolução 4,0 cm^{-1} utilizando aparato de ATR (Reflectância Total Atenuada) para as amostras dos polímeros e pastilha de KBr para amostra de cisteína. Esta análise foi realizada no Laboratório de Controle e Processos de Polimerização (LCP/UFSC).

4.4.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

A análise de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) foi realizada no equipamento Bruker AC-200F, na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC, operando em 200 MHz. O Deslocamento químico são relatados em ppm em relação ao padrão tetrametilsilano (TMS) 0,01% (vol%) ($\delta=0.00$). Todas as amostras foram solubilizadas em CDCl_3 ($\delta = 7.27$ ppm para RMN ^1H).

Poli(globalide-co- ϵ -caprolactona) RMN ^1H (CDCl_3 200 MHz): δ (ppm) 5,49–5,32 (m, $\text{CH}=\text{CH}$); 4,10–4,04 (m, $\text{CH}_2\text{O}(\text{C}=\text{O})$); 2,35–2,26 (m, $\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{O}$); 2,07–1,97 (m, $\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CH})$); 1,71–1,62, 1,29 (m, CH_2).

Poli(globalide-co- ϵ -caprolactona)-Cys RMN ^1H (CDCl_3 200 MHz): δ (ppm) 5,49–5,32 (m, $\text{CH}=\text{CH}$); 4,10–4,04 (m, $\text{CH}_2\text{O}(\text{C}=\text{O})$); 2,90–2,70 (m, $\text{S}-\text{CH}_2$); 2,41–2,28 (m, $\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{O}$); 2,11–1,94 (m, $\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CH})$); 1,73–1,56, 1,27 (m, CH_2).

4.4.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As temperaturas de fusão e cristalinidade dos polímeros foram determinadas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) (Jade DSC, Perkin-Elmer). A análise foi realizada com amostras de aproximadamente 5mg do polímero seco sob atmosfera de nitrogênio (20 mL.min⁻¹), com temperatura variando de - 20 a 150°C a uma taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹. O histórico térmico foi removido antes das análises (para amostras de polímero puro) a uma taxa de aquecimento de 20°C.min⁻¹ de -20 a 150°C e uma taxa de resfriamento de 10°C.min⁻¹ até - 20°C, este procedimento é realizado a fim de retirar o histórico de processamento e síntese das amostras e garantir um valor verdadeiro dos parâmetros a serem determinados. Esta análise foi realizada na Central de análise da Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA/UFSC).

4.4.4 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A massa molecular média numérica (M_n) e a massa molecular média ponderal (M_w) foram determinados por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC). Para essa análise 0,020g do polímero foi dissolvido em 4 mL de Tetrahidrofurano (THF). A solução obtida é filtrada utilizando um filtro de poro 0,45 μm . As distribuições de peso molecular foram obtidas usando equipamento de Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC, modelo LC 20-A, Shimadzu) e colunas Shim Pack da série GPC800 (GPC 801, GPC 804 E GPC 807), também de Shimadzu. Como eluente, o THF foi usado em fluxo volumétrico de 1 mL.min⁻¹ a 40°C e a calibração realizada usando padrões de poliestireno. Esta análise foi realizada no Laboratório de Controle e Processos de Polimerização (LCP/UFSC).

4.5 Ângulo de contato

Para a determinação da molhabilidade e energia de superfície dos copolímeros PGICL e PGICLCys mediu-se o ângulo de contato entre o copolímero e solvente. Os copolímeros foram dispersos na forma de filmes (100 mg/mL) em lâminas de vidro e o ângulo de contato entre os filmes de polímero e as gotas de solvente foi medido em um goniômetro (Rame-Hart Instrument 250). Os solventes de 3 polaridades diferentes

utilizados foram: água, formamida e diiodometano. Todas as medidas foram realizadas em temperatura ambiente com volume de gotas constante (5 µL).

4.6 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio biológico foi realizado com linhagem celular normal de fibroblastos L929. As células L929 foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO, Baltimore, EUA) suplementado com soro fetal bovino (10%), penicilina (100 U/mL) (GIBCO, Baltimore, EUA), estreptomicina (100 µg/mL) (GIBCO, Baltimore, EUA) e Glutamina 2mM. Todas as células foram mantidas em condições controladas (37°C em atmosfera de 5% CO₂ com 95% de umidade do ar) durante o período estudado (24 e 72h). Os resultados foram expressos como uma média de três experiências independentes e análise estatística realizada usando ANOVA one-way.

A viabilidade celular *in vitro* do copolímero PGICL e PGICLCys em normoxia e hipóxia foi avaliada através do método de coloração pelo sal de tetrazólio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) e quantificada por espectrofotômetro. As células foram então incubadas durante 24 e 72 h com 100 µL de meio completo ou meio completo contendo 100 µM do cloreto de cobalto imitador de hipoxia (CoCl₂) com os materiais.⁶⁰ Este ensaio foi realizado em parceria com o Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX/UFSC).

4.7 Segurança no laboratório e tratamento/destino dos resíduos gerados.

No laboratório a utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) é obrigatória. Sempre que necessário, o manuseio de reagentes foi feito na capela com sistema de exaustão. Os solventes descartados após as purificações foram armazenados no laboratório e serão coletados por uma empresa contratada pela UFSC, que realiza o devido tratamento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização dos copolímeros PGICL e PGICLCys foi realizada através das técnicas de FT-IR, RMN ^1H , DSC e GPC. Na análise de FT-IR foi possível detectar qualitativamente grupos funcionais presentes nas amostras e verificar a modificação do copolímero. No RMN ^1H determinou-se o grau de acoplamento de cisteína às insaturações da cadeia polimérica. O DSC foi utilizado para verificar o grau de cristalinidade antes e após a modificação. Pelo GPC a massa molecular do polímero foi determinada. O ângulo de contato foi medido para verificar a molhabilidade e a energia de superfície dos copolímeros. Para ser utilizado como um biomaterial, este polímero não deve causar nenhuma perturbação às células, sendo assim, a viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de MTT.

5.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Na Figura 10 está apresentado o espectro de infravermelho para os copolímeros PGICL, PGICLCys e para a cisteína pura (Cys).

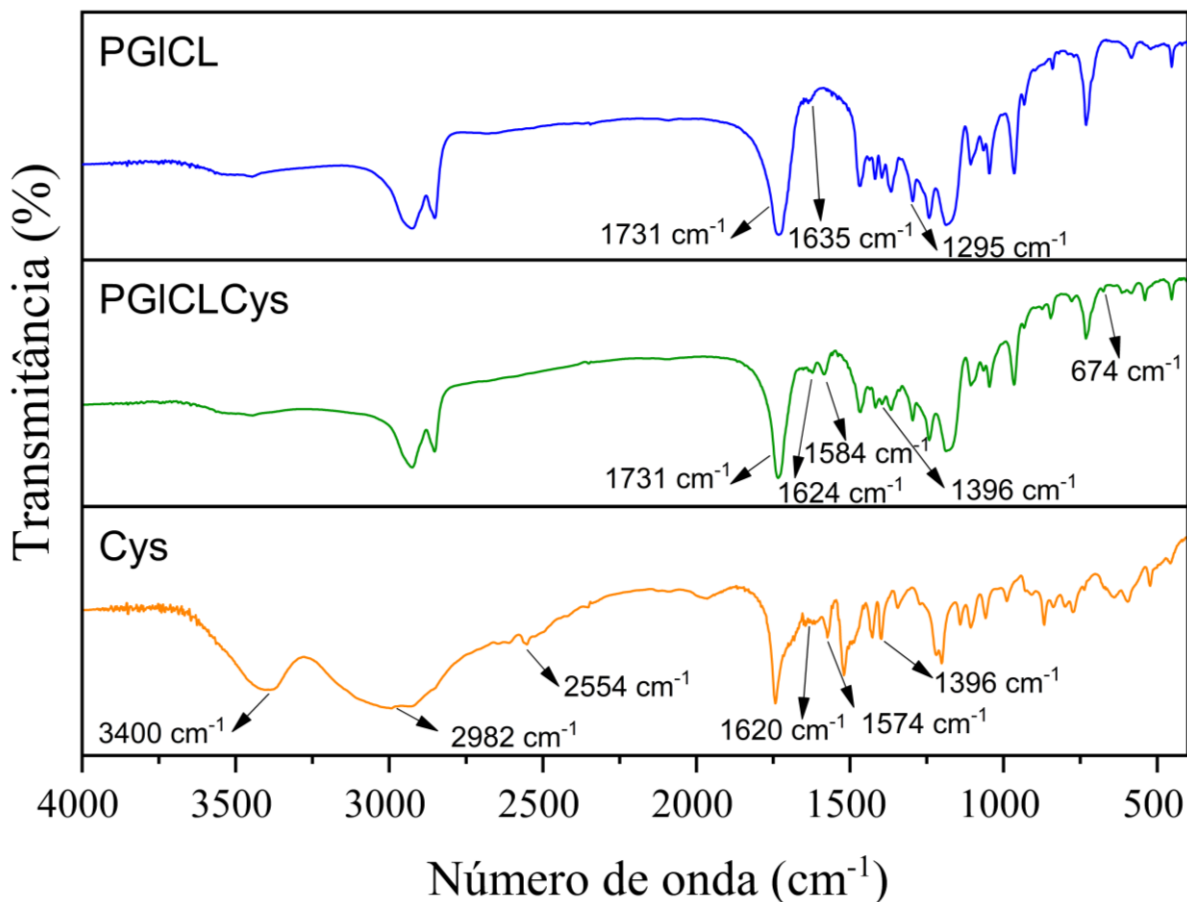
Com relação ao espectro do PGICL, foi possível verificar a presença de bandas características do grupamento éster pelo estiramento C-O-C em 1295 cm^{-1} e estiramento do grupo carboxila (C=O) em 1731 cm^{-1} .⁶¹ O estiramento -C=C-, referente a ligação dupla presente na cadeia linear do copolímero pode ser observada em 1635 cm^{-1} .⁶²

No espectro do PGICLCys, as bandas referentes ao grupo éster (1295 e 1731 cm^{-1}) são mantidas sem sofrer alterações. As bandas referentes aos grupos COO, C-N e N-H provenientes do aminoácido acoplados se apresentaram em 1624 , 1584 e 1396 cm^{-1} , respectivamente. É observado também o surgimento da banda em 674 cm^{-1} referente a ligação -C-S.⁶³ No PGICLCys não é observada a banda em 2554 cm^{-1} referente a ligação S-H. Isto evidencia o consumo da cisteína na reação de modificação tiol-eno, onde ocorre a formação da ligação C-S entre o carbono da insaturação e o enxofre do aminoácido na etapa de modificação entre a Cys e PGICL. Ainda, essa ausência demonstra que não há cisteína livre na amostra do copolímero.

A cisteína possui a fórmula molecular $\text{H}_2\text{N-CH}(\text{CH}_2\text{SH})\text{-COOH}$. No seu espectro foi possível identificar uma banda de baixa intensidade em 2554 cm^{-1} , característica

do grupo tiol livre -S-H.⁶⁴ Bandas em 1620 e 1396 cm^{-1} referentes ao alongamento assimétrico e simétrico grupo COO e em 1574 cm^{-1} banda do estiramento C-N e dobramento N-H no plano.⁶⁵ Outras duas bandas largas e intensas são apresentadas, uma em 2982 cm^{-1} referente a ligação C-H⁶⁶ e uma 3400 cm^{-1} , que representa a soma das ligações de hidrogênio intermoleculares resultantes de NH₂ e OH.⁶⁷

Figura 10. Espectro de FT-IR para o PGICL, PGICLCys e Cys, respectivamente.



Fonte: Do autor.

5.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H)

Na análise de RMN de ¹H foi possível avaliar a reatividade da reação e o grau de modificação do PGICL com o aminoácido. Os espectros dos copolímeros PGICL e PGICLCys estão apresentados na Figura 11 e os resultados na Tabela 1.

O grau de modificação ou acoplamento é uma característica que se relaciona à quantidade de insaturações presentes na cadeia linear do copolímero. Portanto, o grau de modificação foi estimado a partir do consumo das ligações duplas do PGICL.

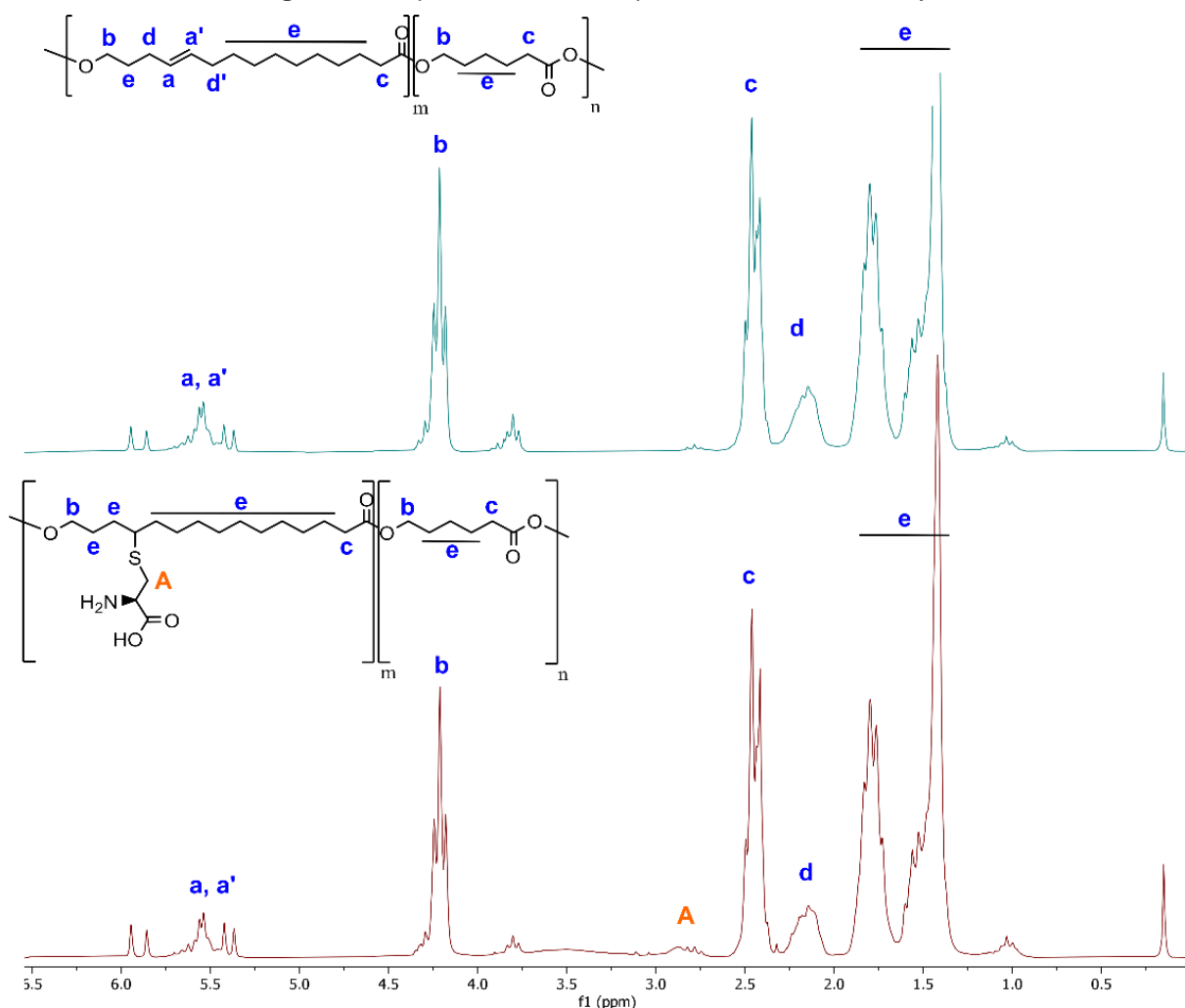
Neste trabalho não foi avaliado a variação da quantidade de modificação de acordo com o grau de insaturação do copolímero.

Ao comparar os dois espectros é possível observar que ocorre uma diminuição da área do sinal em 5,40 ppm e o surgimento do sinal em 2,90-2,70 ppm. O sinal em 5,40 ppm corresponde as insaturações na cadeia polimérica, já o sinal entre 2,90-2,70 ppm é referente ao grupo S-CH₂ da cisteína.⁵ Assim, quantificou-se que em 18% houve a conversão das ligações duplas. Durante a integração dos sinais de RMN, o sinal em 4,06 ppm, referente ao grupo metileno do éster, foi usado como referência uma vez que a quantidade de metileno permanece constante.

Tabela 1. Conversão da modificação do PGICLCys calculado a partir do espectro de RMN

| Polímero | Integração do sinal correspondente (ppm) | | | Conversão de ligação dupla (%) |
|----------|--|-----------------------|--------------------------|--------------------------------|
| | Ligação dupla (5,40 ppm) | Referência (4,06 ppm) | Cisteína (2,90–2,70 ppm) | |
| PGICL | 1,00 | 1,00 | - | - |
| PGICLCys | 0,82 | 1,00 | 3,00 | 18 |

Figura 11. Espectro de RMN ^1H para o PGICL e PGICLCys



Fonte: Do autor.

5.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

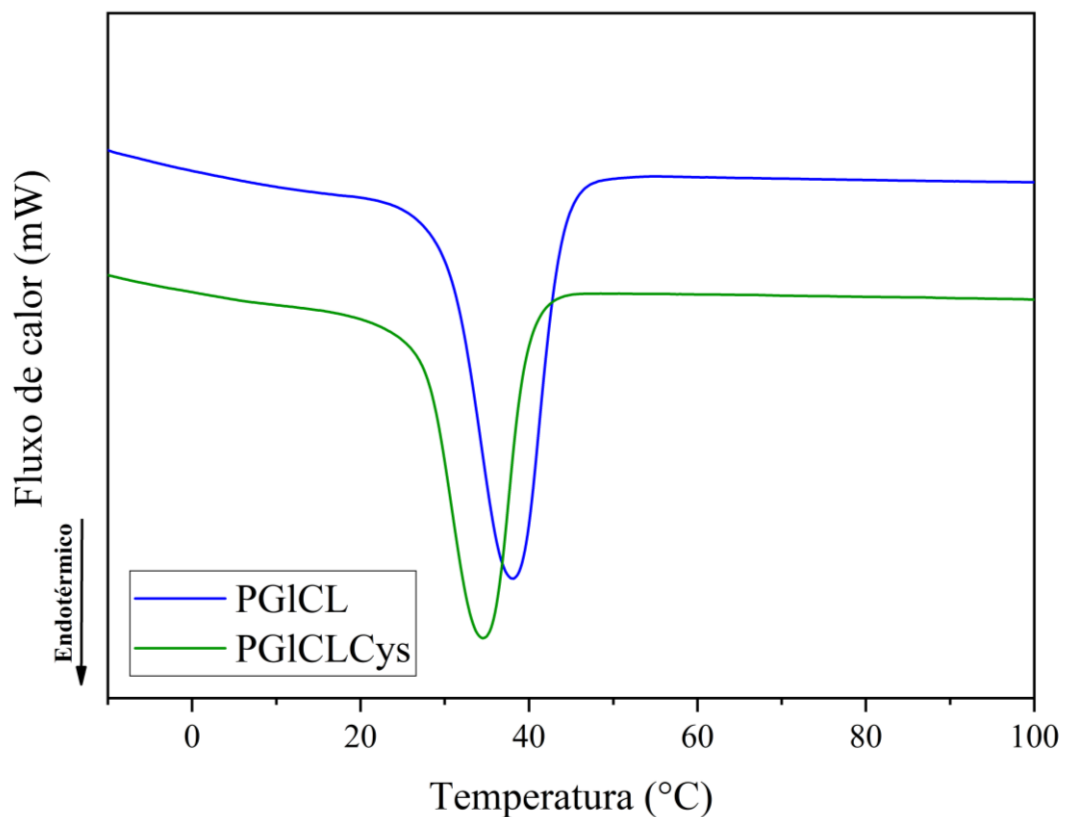
Pela técnica de calorimetria diferencial de varredura determinou-se a cristalinidade das estruturas dos copolímeros PGICL e PGICLCys, onde os resultados de temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH) e grau de cristalinidade (X_c) estão apresentados na Tabela 2. Para o cálculo do grau de cristalinidade uma amostra de Policaprolactona 100% cristalina foi utilizada como referência e seu valor relacionado com o ΔH de cada amostra.⁶⁸ Ao analisar o termograma (Figura 12) e os dados da tabela temos que o ponto de fusão do PGICL puro é de 38°C e o ΔH 59,2 J/g. Após a modificação com a cisteína os valores passaram para 35°C o ponto de fusão e o ΔH 47,7 J/g. O valor de redução do grau de cristalinidade observado após a modificação é de 9%, de modo que a presença desse grupo lateral na cadeia polimérica eleva a

mobilidade do polímero fazendo com que o empacotamento regular das cadeias seja mais dificultado, desfavorecendo a cristalização. Isso contribui para a redução das forças intermoleculares, tornando o arranjo cristalino mais frágil e conseqüentemente, reduz a quantidade de energia necessária para desfazê-las. Justificando a redução da temperatura e entalpia de fusão do PGICL para o PGICLCys, observada na análise.^{28,69}

Tabela 2. Propriedades térmicas dos polímeros

| Polímero | T _{m1} (°C) | T _{m2} (°C) | ΔH (J/g) | X _c (%) |
|----------|-------------------------|-------------------------|-------------|--------------------|
| PGICL | 38 | - | 59,2 | 44 |
| PGICLCys | 35 | - | 47,7 | 35 |

Figura 12. Termograma dos polímeros PGICL e PGICLCys



Fonte: Do autor

5.4 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Pela técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC) foi possível determinar a massa molecular média e ponderal (M_n e M_w) do copoliéster PGICL. Como pode ser observado na Tabela 3, a massa molecular média apresentou um valor de 24,5 kDa e a ponderal de 57 kDa. Esse valor de comprimento da cadeia polimérica se encontra em uma faixa satisfatória para a utilização como suporte para a criação e estabilização de materiais. Após a modificação do PGICL com o aminoácido Cys a amostra se torna anfifílica e a solubilização em solventes apolares é dificultada para a realização do GPC.⁵ Porém, assumindo que a modificação permite que as moléculas de cisteína estejam ligadas como pendentas ao longo da cadeia linear do copolímero e que não há destruição da estrutura polimérica primária, realizou-se um cálculo teórico da M_n e M_w do copolímero modificado (PGICLCys). Para isso, admitiu-se a massa molar obtida no GPC e, somou-se à essa, a quantidade de moléculas de cisteína adicionada levando em consideração a conversão de ligações duplas determinada por RMN de ^1H (Tabela 1, tópico 5.1). O valor teórico da massa molar do PGICLCys encontrado foi de 26,2 kDa, ou seja, um aumento de 7%. Isso demonstra que a modificação do PGICL com as moléculas de cisteína não altera de modo significativo a massa molar, mas propicia o remanejamento das propriedades físico-químicas do copolímero.

Tabela 3. Valores de Massa Molar média (M_n) e ponderada (M_w) para os copolímeros

| Polímero | M_n (kDa) | M_w (kDa) |
|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| PGICL | 24,5 | 57 |
| PGICLCys | 26,2* | 60,8* |

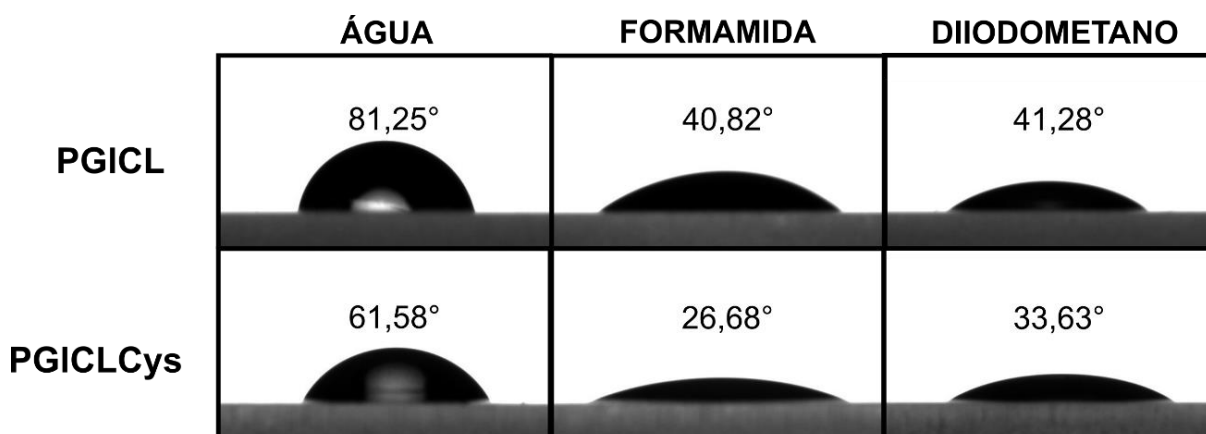
*Valores teóricos calculados com base no consumo da dupla ligação

5.5 Ângulo de contato

O ângulo de contato entre a superfície dos filmes de copolímeros e os solventes foram determinados para a análise da molhabilidade e energia de superfície de ambos

copolímeros. Para isso foi utilizado solventes de polaridades diferentes (água, formamida e diiodometano) e a diferença da interação de cada polímero com os solventes foi avaliada. As imagens das gotas estão apresentadas na Figura 13, juntamente com os respectivos valores de ângulo de contato. É possível verificar a mudança na superfície do copolímero modificado (PGICLCys) através da diferença obtida nas leituras. Para o PGICL, os valores de ângulo de contato obtidos foram 81,25°, 40,82° e 41,28° para água, formamida e diiodometano, respectivamente. Já para o PGICLCys os valores para os mesmos solventes foram de 61,58°, 26,68° e 33,63°. Sendo assim, é possível verificar que os filmes de PGICLCys apresentaram valores menores de ângulo de contato em todos os três solventes analisados (água, formamida e diiodometano), quando comparado ao copolímero PGICL. Verificando ao PGICLCys uma maior interação com os solventes e um caráter de maior molhabilidade.

Figura 13. Análise do ângulo de contato



Fonte: Do autor.

Na Tabela 4 está disposto os valores do ângulo de contato e o desvio padrão amostral das leituras, juntamente com os valores de energia superficial de cada copolímero. A energia da superfície está relacionada a capacidade que a superfície possui de interagir de forma espontânea com outros materiais afim de formar novas ligações. Superfícies que possuem alta energia superficial são hidrofílicas e possuem maior adesão celular do que as superfícies de baixa energia superficial, que são mais hidrofóbicas.⁷⁰ Para o PGICL obteve-se um valor de 41,80 mJ/m² ± 10,04, já para o PGICLCys 49,02 mJ/m² ± 7,50. Desta maneira, a incorporação da cisteína na cadeia

polimérica propiciou uma redução da hidrofobicidade do copolímero, pois a presença de grupos hidrofílicos na estrutura da cisteína na superfície, como os grupos amino e ácido carboxílico, possibilita uma maior interação entre o copolímero e o material através de ligações de hidrogênio, aumentando a hidrofiliabilidade em comparação ao PGICL.

Tabela 4. Valores de ângulo de contato e energia de superfície dos copolímeros

| Amostra | Ângulo de contato | | | Energia de superfície (mJ/m ²) |
|-----------------|-------------------|---------------|---------------|--|
| | Água | Formamida | Diiodometano | |
| PGICL | 81,25° ± 0,09 | 40,82° ± 0,18 | 41,28° ± 0,06 | 41,80 ± 10,04 |
| PGICLCys | 61,58° ± 0,05 | 26,68° ± 0,12 | 33,63° ± 0,05 | 49,02 ± 7,50 |

Os valores de ângulo de contato e energia superficial estão de acordo entre si, evidenciando o caráter hidrofílico concedido ao PGICL pelo acoplamento da cisteína. Resultados semelhantes foram observados por Guindani et al (2019)⁵ em estudos de modificação do PGICL com o derivado de aminoácido N-acetilcisteína.

5.6 Ensaio de viabilidade celular

Para que o copolímero sintetizado seja viável para aplicações biomédicas, este deve apresentar biocompatibilidade e não deve causar nenhuma perturbação indesejada às células. Uma avaliação preliminar foi realizada para verificar a biocompatibilidade dos copolímeros PGICL e PGICLCys por meio do ensaio MTT em células de fibroblastos L929. O Ensaio de viabilidade por MTT avalia o dano celular através da capacidade redox da enzima desidrogenase mitocondrial. Essas enzimas quando ativas reduzem o reagente MTT (coloração amarela) ao composto formazan (coloração roxa), sendo assim, é possível relacionar a quantidade de cristais de formazan gerado com a viabilidade celular do material. Esta análise é quantificada por espectrofotômetro.⁷¹ A Tabela 5 apresenta o resultado em porcentagem de células viáveis para as amostras de PGICL e PGICLCys, em relação ao controle (100%). Após 24 e 72 horas de incubação, os copolímeros PGICL e PGICLCys apresentaram uma porcentagem acima de 100%, demonstrando que as amostras não apresentaram

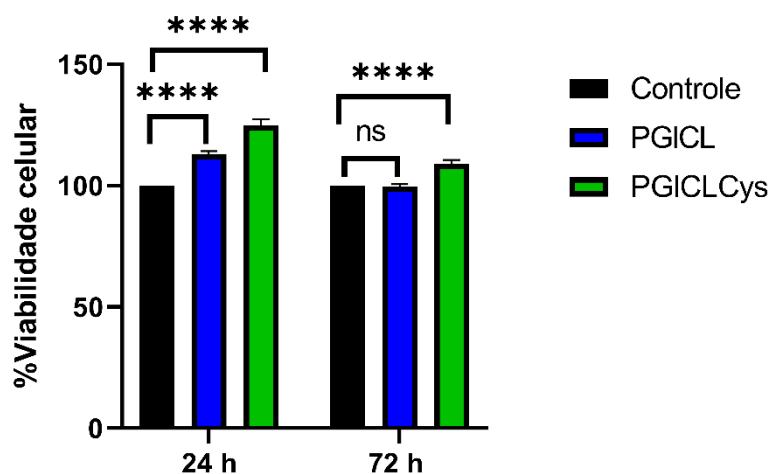
nenhum efeito citotóxico para as células em até 72 h de incubação. Ainda, pode-se observar também que para um mesmo período de incubação, o polímero modificado com cisteína obteve valores de viabilidade celular superior ao não modificado, podendo ser justificado pela maior molhabilidade que este polímero possui, verificado pela análise do ângulo de contato. Esse resultado demonstra o aumento da biocompatibilidade que o aminoácido fornece ao material.

Tabela 5. Resultado da análise de MTT

| Amostra | % viabilidade celular | |
|-----------------|-----------------------|-------------|
| | 24 h | 72 h |
| PGICL | 113,0 ± 1,1 | 99,7 ± 0,9 |
| PGICLCys | 124,8 ± 2,5 | 108,9 ± 1,6 |

Na Figura 14 está apresentado a representação gráfica destes resultados obtidos. A análise estatística dos resultados de viabilidade indicou diferença estatística em comparação ao controle para as amostras de PGICL em 24 h e PGICLCys em 24 e 72h (**** (p < 0,0001)). Neste ensaio preliminar de viabilidade celular foi possível confirmar a ausência de toxicidade no material em até 72 h de incubação, conferindo ao PGICLCys seu potencial para ser empregado em dispositivos para aplicações biomédicas.

Figura 14. Viabilidade celular dos copolímeros usando ensaio de MTT (**** (p < 0,0001))



Fonte: Do autor.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo foi apresentado a síntese de um copoliéster por e-PAA, partindo dos monômeros de globalide e ϵ -caprolactona. O copolímero PGICL sintetizado foi modificado, via reação de tiol-eno, com o aminoácido cisteína. O objetivo da modificação é o acoplamento de moléculas de cisteína nas insaturações presentes na cadeia linear polimérica, formando o copolímero PGICLCys. Os copolímeros PGICL e PGICLCys foram caracterizados por FT-IR, RMN ^1H , DSC e GPC. A análise do FT-IR demonstrou o aparecimento de bandas referente aos grupos amina e C-S, caracterizando a modificação do copolímero. Com o espectro de RMN ^1H foi determinado o grau de 18% de acoplamento de cisteína nas insaturações do PGICL, calculado através da redução do sinal dos hidrogênios da dupla ligação. Essa quantidade de aminoácido na estrutura garante maior mobilidade às cadeias poliméricas, reduzindo a cristalinidade do copolímero em 9%, verificado pela análise de DSC. O ângulo de contato do copolímero verificou a mudança da superfície após a modificação, onde o PGICLCys apresentou maior molhabilidade e caráter hidrofílico. Testes preliminares de viabilidade celular, realizado pelo ensaio de MTT, confirmaram a ausência de toxicidade no material em até 72 h de incubação.

Os resultados de caracterização aqui apresentados evidenciam que a modificação do PGICL com cisteína foi bem sucedida e que a adição destas moléculas às insaturações do copolímero forneceu uma menor cristalinidade, maior hidrofiliabilidade e biocompatibilidade ao material, além de consistir numa estratégia para obtenção de grupos laterais para uma possível nova modificação de superfície. Portanto, o PGICLCys demonstra grande potencial para a construção e desenvolvimento de novos biodispositivos para aplicações biomédicas.

7 REFERÊNCIAS

¹CHIARADIA, Viviane e colab. Polyester nanoparticles from macrolactones via miniemulsion enzymatic ring-opening polymerization. **Colloid and Polymer Science** 2018 296:5, v. 296, n. 5, p. 861–869, 17 Mar 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00396-018-4306-y>>. Acesso em: 9 ago 2021.

²GUINDANI, Camila e colab. Enzymatic ring opening copolymerization of globalide and ϵ -caprolactone under supercritical conditions. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, n. June, p. 404–411, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.06.008>>.

³ADHAMI, Wissal; BAKKOUR, Youssef; ROLANDO, Christian. Polylactones synthesis by enzymatic ring opening polymerization in flow. **Polymer**, v. 230, p. 124040, 16 Set 2021.

⁴ATES, Zeliha; HEISE, Andreas. Functional films from unsaturated poly(macrolactones) by thiol-ene cross-linking and functionalisation. **Polymer Chemistry**, v. 5, n. 8, p. 2936–2941, 2014.

⁵GUINDANI, Camila; DOZORETZ, Pablo e colab. N-acetylcysteine side-chain functionalization of poly(globalide-co- ϵ -caprolactone) through thiol-ene reaction. **Materials Science and Engineering C**, v. 94, n. September 2018, p. 477–483, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.09.060>>.

⁶SAMADIAN, Hadi e colab. Natural polymers-based light-induced hydrogels: Promising biomaterials for biomedical applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 420, p. 213432, 1 Out 2020.

⁷WILLIAMS, David F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941–2953, 2008.

⁸IMANISHI, Yukio. Polymeric biomaterials. **Materials Science and Engineering: C**, v. 1, n. 3, p. 143–147, 1 Abr 1994.

⁹LIU, Xu Ying e colab. Degradable cationic polyesters via ring-opening copolymerization of valerolactones as nanocarriers for the gene delivery. **Bioorganic Chemistry**, v. 116, p. 105299, 1 Nov 2021.

¹⁰BANORIYA, Deepen; PUROHIT, Rajesh; DWIVEDI, R. K. Advanced Application of Polymer based Biomaterials. **Materials Today: Proceedings**, v. 4, n. 2, p. 3534–3541, 1 Jan 2017.

¹¹LIANG, Yingkai; KIICK, Kristi L. Heparin-functionalized polymeric biomaterials in tissue engineering and drug delivery applications. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 4, p. 1588–1600, 1 Abr 2014.

¹²MAIA F., A. L.M. e colab. Morphological and chemical evaluation of bone with apatite-coated Al₂O₃ implants as scaffolds for bone repair. **Ceramica**, v. 59, n. 352, p. 533–538, 2013.

¹³PATEL, Minal; FISHER, John P. Biomaterial scaffolds in pediatric tissue engineering. **Pediatric Research**, v. 63, n. 5, p. 497–501, 2008.

¹⁴ZOTTIS, Alexandre D.A. e colab. Pheomelanin-coated iron oxide magnetic nanoparticles: A promising candidate for negative T2 contrast enhancement in magnetic resonance imaging. **Chemical Communications**, v. 51, n. 56, p. 11194–11197, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C5CC02536B>>.

¹⁵PERILLO, Emiliana e colab. Synthesis and in vitro evaluation of fluorescent and magnetic nanoparticles functionalized with a cell penetrating peptide for cancer theranosis. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 499, p. 209–217, 1 Ago 2017.

¹⁶DUAN, Meng e colab. Matrix metalloproteinase-2-targeted superparamagnetic Fe₃O₄-PEG-G5-MMP2@Ce6 nanoprobos for dual-mode imaging and photodynamic therapy. **Nanoscale**, v. 11, n. 39, p. 18426–18435, 21 Out 2019. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2019/nr/c9nr06774d>>. Acesso em: 20 mai 2021.

¹⁷ARRUEBO, Manuel e colab. Magnetic nanoparticles for drug delivery. **Nano today**, v. 2, n. 3, p. 22–32, 2007.

¹⁸GUINDANI, Camila; FREY, Marie-Luise e colab. Covalently Binding of Bovine Serum Albumin to Unsaturated Poly(Globalide-Co-ε-Caprolactone) Nanoparticles by Thiol-Ene Reactions. **Macromolecular Bioscience**, v. 19, n. 10, p. 1900145, 6 Out 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mabi.201900145>>.

¹⁹BOSE, Susmita; ROBERTSON, Samuel Ford; BANDYOPADHYAY, Amit. Surface modification of biomaterials and biomedical devices using additive manufacturing. **Acta Biomaterialia**, v. 66, p. 6–22, 15 Jan 2018.

²⁰FU, Ding Yi e colab. Polymer-metal-organic framework hybrids for bioimaging and cancer therapy. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 456, p. 214393, 1 Abr 2022.

²¹AL SHARABATI, Miral e colab. Biodegradable polymers and their nano-composites for the removal of endocrine-disrupting chemicals (EDCs) from wastewater: A review. **Environmental Research**, v. 202, p. 111694, 1 Nov 2021.

²²PATRA, Rishik e colab. Advances in the Development of Biodegradable Polymeric Materials for Biomedical Applications. **Reference Module in Materials Science and Materials Engineering**, 1 Jan 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128203521002522>>. Acesso em: 20 fev 2022.

²³PRAJAPATI, Shiv Kumar e colab. Biodegradable polymers and constructs: A novel approach in drug delivery. **European Polymer Journal**, v. 120, p. 109191, 1 Nov 2019.

²⁴POLLONI, André Eliezer. **Polimerização de ω -pentadecalactona e funcionalização com poli(tioéter-fosfoéster)**. 2018. 167f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

²⁵BASU, Arijit e colab. Poly(α -hydroxy acid)s and poly(α -hydroxy acid-co- α -amino acid)s derived from amino acid. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 82–96, 15 Dez 2016.

²⁶HAYAT, Uzma e colab. Biodegradable polymeric conduits: Platform materials for guided nerve regeneration and vascular tissue engineering. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 67, p. 103014, 1 Jan 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224721006948>>. Acesso em: 27 fev 2022.

²⁷BELTRAME, Jeovandro Maria e colab. Covalently Bonded N -Acetylcysteine-polyester Loaded in PCL Scaffolds for Enhanced Interactions with Fibroblasts. **ACS Applied Bio Materials**, 2021.

²⁸GUINDANI, Camila e colab. Controlling the biodegradation rates of poly(globalide-co- ϵ -caprolactone) copolymers by post polymerization modification. **Polymer Degradation and Stability**, v. 179, p. 109287, Set 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391020302196>>.

²⁹GUINDANI, Camila e colab. Enzymatic ring opening copolymerization of globalide and ϵ -caprolactone under supercritical conditions. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, n. May, p. 404–411, 2017.

³⁰PACHENCE, James M.; BOHRER, Michael P.; KOHN, Joachim. **Biodegradable polymers**. Third Edit ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2007.

³¹XU, Chunjiang; CHEN, Chao; WU, Defeng. The starch nanocrystal filled biodegradable poly(ϵ -caprolactone) composite membrane with highly improved properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 182, p. 115–122, 15 Feb 2018.

³²REBELATTO, Evertan A. e colab. Determination of high-pressure phase equilibrium data of systems containing supercritical carbon dioxide and globalide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 166, p. 104996, 1 Dez 2020.

³³GUINDANI, Camila. **Enzymatic ring opening polymerization of poly (globalide-co- ϵ -caprolactone) by means of supercritical technology and post functionalization by thiol-ene reactions**. 2018. 163 f. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2018.

³⁴CAMA, G. e colab. Synthetic biodegradable medical polyesters: Poly- ϵ -caprolactone. **Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers: Materials and Properties**, p. 79–105, 1 Jan 2017.

³⁵ROSSO COMIM, Sibeles R. e colab. Enzymatic synthesis of poly(ϵ -caprolactone) in liquified petroleum gas and carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 96, p. 334–348, 1 Jan 2015.

³⁶ARAÚJO, A. e colab. Influence of clay organic modifier on the thermal-stability of PLA based nanocomposites. **Applied Clay Science**, v. 88–89, p. 144–150, 1 Feb 2014.

³⁷MAHAPATRO, Anil e colab. Lipase-catalyzed polycondensations: Effect of substrates and solvent on chain formation, dispersity, and end-group structure. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 3, p. 544–551, Mai 2003.

³⁸JIANG, Yi e colab. Enzyme-catalyzed synthesis of unsaturated aliphatic polyesters based on green monomers from renewable resources. **Biomolecules**, v. 3, n. 3, p. 461–480, 2013.

³⁹DENG, Fang; GROSS, Richard A. Ring-opening bulk polymerization of ϵ -caprolactone and trimethylene carbonate catalyzed by lipase Novozym 435. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, n. 1–3, p. 153–159, 1 Jun 1999.

⁴⁰DONG, Feng Xia e colab. Thermodynamics and kinetics of Novozym 435 catalyzed ring-opening polymerization of 1,4-dioxan-2-one. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 96, p. 40–45, 1 Dez 2013.

⁴¹MILETIĆ, Nemanja; LOOS, Katja; GROSS, Richard A. Enzymatic Polymerization of Polyester. **Biocatalysis in Polymer Chemistry**, 2010.

⁴²ZHANG, Jianxu e colab. Recent developments in lipase-catalyzed synthesis of polymeric materials. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 797–806, 1 Mai 2014.

⁴³DUTRA, Luciana da Silva e colab. How the biodiesel from immobilized enzymes production is going on: An advanced bibliometric evaluation of global research. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 153, p. 111765, 1 Jan 2022.

⁴⁴POULHS, Florent e colab. Novozym 435-catalyzed synthesis of polyetheramides from amino-esters, or diesters and diamines built on ethylene- and diethylene- glycol moieties. **Polymer**, v. 53, n. 6, p. 1172–1179, 9 Mar 2012.

⁴⁵ DE GEUS, Matthijs. Enzymatic catalysis in the synthesis of new polymer architectures and materials. **Dissertation Abstracts International**, v. 68, n. 04, 2007.

⁴⁶JOHNSON, Peter M.; KUNDU, Santanu; BEERS, Kathryn L. Modeling enzymatic kinetic pathways for ring-opening lactone polymerization. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 9, p. 3337–3343, 12 Set 2011. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/bm2009312>>. Acesso em: 4 mar 2022.

⁴⁷HOYLE, Charles E e colab. Thiol–Ene Click Chemistry. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 9, p. 1540–1573, 22 Fev 2010. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anie.200903924>>. Acesso em: 26 fev 2022.

⁴⁸UYGUN, Mustafa; TASDELEN, Atilla; YAGCI, Yusuf. **Influence of Type of Initiation on Thiol-Ene “Click” Chemistry**. [S.d.]. Disponível em: <www.mcp-journal.de>.

⁴⁹FAIRBANKS, Benjamin D.; LOVE, Dillon M.; BOWMAN, Christopher N. Efficient Polymer-Polymer Conjugation via Thiol-ene Click Reaction. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 218, n. 18, p. 1700073, 1 Set 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/macp.201700073>>. Acesso em: 29 jul 2022.

⁵⁰TUNCA, Umit. Orthogonal multiple click reactions in synthetic polymer chemistry. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 52, n. 22, p. 3147–3165, 15 Nov 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pola.27379>>. Acesso em: 9 ago 2021.

⁵¹LIN, Fei e colab. Peptide-functionalized oxime hydrogels with tunable mechanical properties and gelation behavior. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 10, p. 3749–3758, 14

Out 2013. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/bm401133r>>. Acesso em: 3 mar 2022.

⁵²LI, Qian e colab. Synthesis of E7 peptide-modified biodegradable polyester with the improving affinity to mesenchymal stem cells. **Materials Science and Engineering: C**, v. 73, p. 562–568, 1 Abr 2017.

⁵³NOEL, Samantha e colab. Development of a Polyester Coating Combining Antithrombogenic and Cell Adhesive Properties: Influence of Sequence and Surface Density of Adhesion Peptides. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 6, p. 1682–1694, 1 Jan 2015.

⁵⁴DOLCI, Sara e colab. Immune compatible cystine-functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles as vascular contrast agents in ultrasonography. **RSC Advances**, v. 6, n. 4, p. 2712–2723, 4 Jan 2016. Disponível em: <www.rsc.org/advances>. Acesso em: 28 mai 2021.

⁵⁵MRÓWKA, Maciej; JASZCZ, Katarzyna; SKONIECZNA, Magdalena. Anticancer activity of functional polysuccinates with N-acetyl-cysteine in side chains. **European Journal of Pharmacology**, v. 885, p. 173501, 15 Out 2020.

⁵⁶LOMONT, Justin P.; SMITH, Joseph P. In Situ Raman Spectroscopy for Real Time Detection of Cysteine. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, p. 121068, 25 Fev 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142522002165>>. Acesso em: 26 fev 2022.

⁵⁷HUAYU, Wang e colab. A red dicyanoisophorone-based fluorescent probe for monitoring cysteine fluctuations due to redox imbalances in living organisms even in the presence of other biological molecules. **Microchemical Journal**, v. 174, p. 107093, 1 Mar 2022.

⁵⁸SAMANTA, Debangshu; SEMENZA, Gregg L. Maintenance of redox homeostasis by hypoxia-inducible factors. **Redox Biology**, v. 13, p. 331–335, 1 Out 2017.

⁵⁹HAYASHI, Koichiro; SAKAMOTO, Wataru; YOGO, Toshinobu. Smart Ferrofluid with Quick Gel Transformation in Tumors for MRI-Guided Local Magnetic Thermochemotherapy. **Advanced Functional Materials**, v. 26, n. 11, p. 1708–1718, 15 Mar 2016. Disponível em: <www.MaterialsViews.com>. Acesso em: 28 mai 2021.

⁶⁰MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 Dez 1983.

⁶¹COLEMAN, M. M.; VARNELL, D. F. FOURIER-TRANSFORM INFRARED STUDIES OF POLYMER BLENDS - 3. POLY(beta -PROPIOLACTONE)-POLY(VINYL CHLORIDE) SYSTEM. **Journal of polymer science**. Part A-2, Polymer physics, v. 18, n. 6, p. 1403–1412, 1980.

⁶²VAN DER MEULEN, Inge e colab. Polymers from functional macrolactones as potential biomaterials: Enzymatic ring opening polymerization, biodegradation, and biocompatibility. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 12, p. 3404–3410, 8 Dez 2008. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/bm800898c>>. Acesso em: 21 jun 2022.

⁶³ATES, Zeliha; THORNTON, Paul D.; HEISE, Andreas. Side-chain functionalisation of unsaturated polyesters from ring-opening polymerisation of macrolactones by thiol-ene click chemistry. **Polymer Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 309–312, 2011.

⁶⁴ARYAL, Santosh e colab. Spectroscopic identification of SAu interaction in cysteine capped gold nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 63, n. 1, p. 160–163, 1 Jan 2006.

⁶⁵PICQUART, Michel e colab. Spectroscopic study of N-acetylcysteine and N-acetylcystine/hydrogen peroxide complexation. **Chemical Physics**, v. 228, n. 1–3, p. 279–291, 1 Mar 1998.

⁶⁶ANKIREDDY, Seshadri Reddy; KIM, Jongsung. Selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid via fluorescence quenching of inp/zns quantum dots. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 113–119, 25 Ago 2015.

⁶⁷NAFADY, A e colab. Direct Synthesis and Stabilization of Bi-Sized Cysteine-Derived Gold Nanoparticles: Reduction Catalyst for Methylene Blue. **JOURNAL OF THE Iranian Chemical Society**, v. 8, p. 34–43, 2011.

⁶⁸CRESCENZI, V. e colab. Thermodynamics of fusion of poly-β-propiolactone and poly-ε-caprolactone. comparative analysis of the melting of aliphatic polylactone and polyester chains. **European Polymer Journal**, v. 8, n. 3, p. 449–463, 1 Mar 1972.

⁶⁹CANEVAROLO JR., Sebastião Vicente. **Ciência dos Polímeros** - Um texto básico para tecnólogos e engenheiros. 2a Edição ed. São Paulo: Artliber, 2006.

⁷⁰SYROMOTINA, D. S. e colab. Surface wettability and energy effects on the biological performance of poly-3-hydroxybutyrate films treated with RF plasma. **Materials Science and Engineering: C**, v. 62, p. 450–457, 1 Mai 2016.

⁷¹RISS, Terry L e colab. Cell Viability Assays. **Assay Guidance Manual**, 1 Jul 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>>. Acesso em: 28 jun 2022.