



**RAPHAEL HENRIQUE MARQUES MARCILLI**

**FILMES DE POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) RETICULADOS LIBERADORES DE NO  
PARA AUMENTO DA VASODILATAÇÃO DÉRMICA**

**CAMPINAS**

**2013**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**RAPHAEL HENRIQUE MARQUES MARCILLI**

**FILMES DE POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) RETICULADOS LIBERADORES DE NO  
PARA AUMENTO DA VASODILATAÇÃO DÉRMICA**

**ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO GANZAROLLI DE OLIVEIRA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA AO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM QUÍMICA  
NA ÁREA DE FÍSICO-QUÍMICA.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR  
RAPHAEL HENRIQUE MARQUES MARCILLI, E ORIENTADO PELO PROF.DR. MARCELO  
GANZAROLLI DE OLIVEIRA.**

---

**Assinatura do Orientador**

**CAMPINAS**

**2013**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Química  
Danielle Dantas de Sousa - CRB 8/6490

M332f Marcilli, Raphael Henrique Marques, 1984-  
Filmes de poli(álcool vinílico) reticulados liberadores de NO para o aumento da vasodilatação dérmica / Raphael Henrique Marques Marcilli. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

1. Óxido nítrico. 2. Poli(álcool vinílico). 3. Reticulação. 4. Vasodilatação. 5. Ácido mercaptosuccínico. I. de Oliveira, Marcelo Ganzarolli. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Nitric oxide releasing crosslinked poly(vinyl alcohol) films for the increase of dermal vasodilation

**Palavras-chave em inglês:**

Poli(vinyl alcohol)

Vasodilation

Crosslink

Nitric oxide

Mercaptosuccinic acid

**Área de concentração:** Físico-Química

**Titulação:** Mestre em Química na área de Físico-Química

**Banca examinadora:**

Marcelo Ganzarolli de Oliveira [Orientador]

Ângela Maria Moraes

Maria Isabel Felisberti

**Data de defesa:** 01-11-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Química

Dedico esta dissertação aos meus pais, que sempre batalharam para que eu pudesse chegar até aqui.

*“E os que foram vistos dançando foram julgados  
insanos pelos que não conseguiam ouvir a música”*

*Friedrich Nietzsche*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente, aos meus pais, por todo empenho e suporte para que eu pudesse chegar até aqui.

A minha melhor amiga e namorada, Cilene da Silva Pereira, por estar comigo nas mais gloriosas e inóspitas situações.

A família, Jenny Jenny.

Aos amigos de laboratório, pelas discussões e conhecimento compartilhado e também pelos bons momentos de amizade. Em especial, ao Victor Baldim, pelas discussões e contribuições a este trabalho.

Ao professor Marcelo Ganzarolli de Oliveira, pelo empenho, dedicação e suporte, para que este trabalho se realizasse.

Aos técnicos, professores e funcionários, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao conselho nacional de pesquisa CNPq pelo apoio financeiro.

Aos vários amigos com os quais cruzei no caminho até aqui, meu muito obrigado.

## **CURRICULUM VITAE**

**Raphael Henrique Marques Marcilli**

Endereço: Rua Cardeal Joseph Cardjin n° 69, Jd. Eulina, Campinas-SP

e-mail: raphamarcilli@gmail.com

### **Experiência**

Tem experiência na área de Eletroquímica, com ênfase em dispositivos avançados de armazenamento de energia, tendo sido bolsista CNPq no projeto de iniciação científica “Preparação e Caracterização de Compósitos de Fibra de Carbono/Polipirrol(Ppy)/PSS(Poliestirenosulfonato)/Poli(DMcT)” para a produção de eletrodos alternativos em dispositivos secundários de armazenamento de carga na Universidade Federal de São Carlos. Tem experiência na área de eletroanalítica, tendo trabalhado com eletrodos sólidos e de mercúrio gotejante, com as técnicas de polarografia de pulso diferencial, onda quadrada, CSV (Cathodic Stripping Voltammetry), CSA (Anodic Stripping Voltammetry), AdSV (Adsorptive Stripping Voltammetry) e Rancimat (medida de estabilidade de óleos e gorduras). Atuou na área de desenvolvimento e aplicação de novas metodologias, preparo de amostras e suporte pela empresa Metrohm Pensalab Instrumentação analítica. Possui também experiência em processos de anodização e tratamentos de superfície em titânio CP grau médico, eletro-corrosão controlada em aços austeníticos e martensíticos e tratamentos de superfície para aplicações em dispositivos implantáveis na área de ortopedia e odontologia. Atuação na área de validação de processos e controle de ambientes de atmosfera controlada grau ISO 5,6,7 e 8 segundo norma NBRISO14644(1 a 7). Análise e controle microbiológico e de esterilidade, desenvolvimento de sistemas de validação e controle de processos e sistemas de verificação da qualidade de processos e produtos. Possui conhecimentos em análise de riscos segundo norma ABNT NBRISO 14971, validação e documentação de certificação, validação e implementação de novos produtos e processos. Atuou como Coordenador Químico na empresa MDT Indústria e Comercio de Importação e Exportação de produtos Ortopédicos. Atualmente desenvolve pesquisa como requisito para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Campinas na área de físico-química, com pesquisas em novos materiais/biomateriais, doadores de NO e matrizes poliméricas biocompatíveis. Realiza estudo cinético, termodinâmico, térmico, caracterização morfológica e de liberação de fármaco (NO), para o desenvolvimento de dispositivos médicos.

## **Formação acadêmica**

### **Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP**

Mestrado em Química

Agosto 2012 a Nov 2013

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

### **Universidade Federal de São Carlos - UFSCar**

Bacharelado em Química

Jan 2007 a Dez 2011

### **Participação em eventos científicos e publicações**

- R.H.M. Marcilli, M.G. de Oliveira, Nitric oxide-releasing poly(vinyl alcohol) film for increasing dermal vasodilation, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, aceito para publicação 2013 – <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.10.036>.
- Congresso Brasileiro de Polímeros. “Preparação e caracterização de filmes de poli(álcool vinílico) reticulados com ácido mercaptosuccínico” Florianópolis - SC, 2013.
- Congresso: Analítica Latin America. “Determinação de cobre por voltametria de redissolução anódica em etanol combustível para motores de carros”. 2011. (Congresso).
- Congresso: Analítica Latin America. “Determinação da estabilidade oxidativa de alimentos sólidos contendo gordura”. 2011. (Congresso).
- CICT - Congresso de Iniciação Científica - UFSCar- São Carlos. “Síntese e Caracterização de compósitos de Fibra de Carbono/Polipirrol para aplicação em dispositivos de armazenamento de energia da elevada capacidade específica”. 2010. (Congresso).
- CICT - Congresso de Iniciação Científica - UFSCar- São Carlos. “Síntese e Caracterização de compósitos de Fibra de Carbono/Polipirrol para aplicação em dispositivos de armazenamento de energia”. 2009. (Congresso).
- Simpósio de Química UNICENTRO - PR. 2007 e 2006. (Simpósio).

## RESUMO

### Filmes de poli(álcool vinílico) reticulados liberadores de NO para aumento da vasodilatação dérmica

Condições fisiológicas associadas à diminuição do nível de óxido nítrico (NO) na vasculatura, como na síndrome de Raynaud e na angiopatia diabética, têm estimulado o desenvolvimento de novos biomateriais capazes de liberar NO topicamente. Neste trabalho efetuamos a modificação do poli(álcool vinílico), PVA, pela sua reticulação química através da esterificação com o ácido mercaptosuccínico. Esta reação permitiu a moldagem de filmes de PVA sulfidrilados (PVA-SH). A calorimetria diferencial de varredura e a difratometria de raios X mostraram que a reação de reticulação suprimiu a cristalização do PVA, levando a um material sem poros, com uma distribuição homogênea de grupos sulfidrilado(-SH). Os grupos hidroxila remanescentes na rede de PVA-SH conferiram hidrofobicidade parcial ao material, associada a um grau de intumescimento de 80 a 120 % em meio aquoso. Os filmes de PVA-SH, foram submetidos a uma reação de S-nitrosação dos grupos -SH produzindo um PVA contendo grupos S-nitrosotióis (PVA-SNO). Medidas amperométricas e por quimiluminescência mostraram que os filmes de PVA-SNO contém *ca.* 6 nmols de NO/mg de filme e são capazes de liberar NO espontaneamente após imersão em meio fisiológico. A fluxometria por laser Doppler, usada para medir o fluxo sanguíneo na microcirculação dérmica, permite verificar que a aplicação tópica dos filmes de PVA-SNO hidratados sobre a pele saudável leva a um aumento dependente da dose e do tempo de mais de 5 vezes no fluxo sanguíneo basal em menos de 10 min de aplicação com uma ação prolongada de mais de 4 h durante a aplicação contínua. Estes resultados mostram que os filmes de PVA-SNO podem representar um novo material com potencial para o tratamento tópico no tratamento de distúrbios microvasculares da pele.

## ABSTRACT

### **Nitric oxide releasing crosslinked poly(vinyl alcohol) films for the increase of dermal vasodilation**

Pathological conditions associated with the impairment of nitric oxide (NO) production in the vasculature, like Raynaud's syndrome and diabetic angiopathy, have stimulated the development of new biomaterials capable of delivering NO topically. In this work, we have modified poly(vinyl-alcohol) (PVA) by chemically crosslinking it via esterification with mercaptosuccinic acid. This reaction allowed the casting of sulfhydrylated PVA (PVA-SH) films. Differential scanning calorimetry and X-ray diffractometry showed that the crosslinking reaction suppressed the crystallization of PVA, leading to a non-porous material with a homogeneous distribution of -SH groups. The remaining hydroxyl groups in the PVA-SH network conferred partial hydrophilicity to the material, associated with a swelling degree of 80 to 120 % in aqueous medium. The PVA-SH films were subjected to an S-nitrosation reaction of the SH groups yielding a PVA containing S-nitrosothiol groups (PVA-SNO). Amperometric and chemiluminescence measurements showed that the PVA-SNO films contain *ca.* 6 nmol NO/mg of film and are capable of releasing NO spontaneously after immersion in physiological medium. Laser Doppler-flowmetry, used to assess the blood flow in the dermal microcirculation, showed that the topical application of hydrated PVA-SNO films on the health skin leads to a dose and time dependent increase of more than 5-fold in the dermal baseline blood flow in less than 10 min with a prolonged action of more than 4 h during continuous application. These results show that the PVA-SNO films may represent a new material with potential for the topical treatment of microvascular skin disorders.

## ÍNDICE

1 – Introdução .....	1
1.1 - Óxido nítrico e vasodilatação.....	1
1.2 – Grupos doadores de NO.....	4
1.3 - Matrizes poliméricas para liberação de NO .....	6
1.4 - Reticulação do PVA.....	9
1.5 – Métodos de S-nitrosação de tióis.....	11
1.6 – S-nitrosação do PVA reticulado .....	12
2 – Objetivos .....	13
3 - Materiais e métodos.....	13
3.1 – Materiais .....	13
3.2 - Síntese do poli(álcool vinílico) reticulado com ácido mercaptosuccínico	14
3.3 – Moldagem (casting) dos filmes de PVA reticulados .....	16
3.4 - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)...	16
3.4 - Calorimetria diferencial de varredura (DSC) e Análise termogravimétrica (TGA) .....	16
3.5 - Medidas de ângulo de contato.....	17
3.6 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e energia dispersiva de raios-X (EDS) .....	18
3.7 - Difractometria de raios-X (DRX).....	18
3.8 - Medidas de grau de intumescimento .....	18

3.9 - Teste de solubilidade.....	19
3.10 - Quantificação da concentração de sulfidrilas pelo método de Ellman ..	20
3.11 - Otimização do tempo S-nitrosação.....	21
3.12 - S-nitrosação dos filmes de PVA sulfidrilados, em diferentes tempos de S-nitrosação .....	21
3.13 - Confirmação da reação de S-nitrosação .....	22
3.14 - Quantificação e cinéticas de liberação de NO .....	22
3.15 - Lavagem dos filmes S-nitrosados de PVA-SH .....	25
3.16 - Medidas de vasodilatação cutânea por laser Doppler .....	26
3.17 - Teste de estabilidade do filme S-nitrosado.....	28
4 - Resultados e discussões.....	28
4.1 - Caracterização da reticulação do poli(álcool vinílico) com ácido mercaptosuccínico.....	28
4.2 - Caracterização por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	33
4.3 - Caracterização por difratometria de raios-X (DRX) .....	34
4.4 – Análises térmicas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) e análise termogravimétrica (TGA).....	37
4.5 - Teste de dissolução do filme de PVA reticulado (PVA-SH).....	39
4.6 – Medida do grau de intumescimento para o PVA-SH.....	43
4.7 – Medidas de ângulo de contato .....	47
4.8 - Quantificação de grupos sulfidrilas pelo método de Ellman .....	49
4.9 - Confirmação da reação de S-nitrosação por espectroscopia UV-vis.....	52

4.10 – Cinética da reação de S-nitrosação .....	53
4.11 - Cálculo da carga de NO por amperometria e por quimiluminescência.	56
4.12 - Lavagem dos filmes S-nitrosados de PVA-SH .....	61
4.13 - Fluxometria por laser Doppler (LDF) .....	64
4.14 - Teste de estabilidade do filme S-nitrosado.....	68
5 – Conclusões.....	70
6 – Sugestões para trabalhos futuros.....	71
7 – Referências .....	72

## LISTA DE ABREVIações

AMS	ácido mercaptosuccínico
Cis-SNO	S-nitrosocisteína
DRX	difração de raios-x
DSC	calorimetria diferencial de varredura
DTNB	5,5'-ditiol bis-(2-ácido nitrobenzoico)
TNB	5 -tiol -(ácido nitrobenzoico)
EDS	energia dispersiva de raios-x
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
FTIR	infravermelho por transformada de Fourier
GMP <sub>c</sub>	guanosina monofosfato cíclico
GSH	S-glutationa
GSNO	S-nitroso-glutationa
GTP	guanosina trifosfato
LDF	fluxometria por laser Doppler
MEV	microscopia eletrônica de varredura
NO	óxido nítrico
PBS	solução tampão de fosfato salino
PTFE	politetrafluoretileno
PVA	poli(álcool vinílico)
PVA-SH	poli(álcool vinílico) reticulado
PVA-SNO	poli(álcool vinílico) reticulado e S-nitrosado
RSNOs	moléculas contendo grupos S-nitrosotiol
SBF	estado basal do fluxo sanguíneo
sGC	guanilato cilase
SNAC	S-nitroso-N-acetilcisteína
SNO	grupo S-nitrosotiol
T <sub>f</sub>	temperatura de fusão
T <sub>g</sub>	temperatura de transição vítrea
TGA	análise termogravimétrica
TPU	unidades de perfusão do tecido
TRIS	2-amino-2(hidroximetil)-1,3 propanodiol

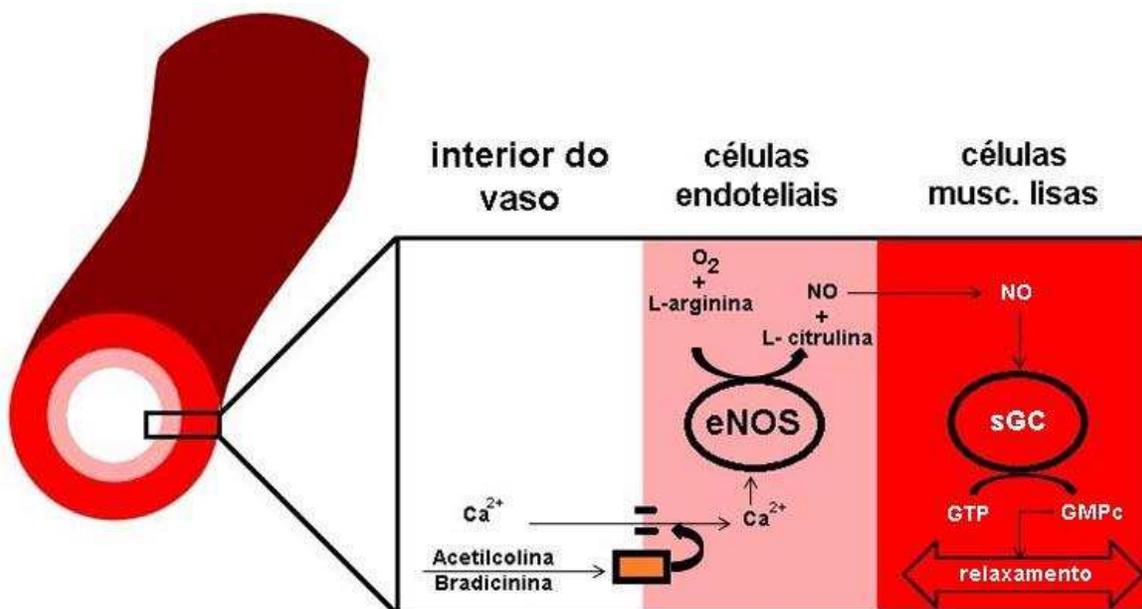
# 1 – Introdução

## 1.1 - Óxido nítrico e vasodilatação

O óxido nítrico (NO) é um radical livre diatômico, que constitui um dos mais importantes sinalizadores no sistema fisiológico dos mamíferos. A molécula de NO está envolvida em um extenso número de processos biológicos, como vasodilatação, processos de neurotransmissão, inibição da agregação plaquetária e cicatrização [1,2].

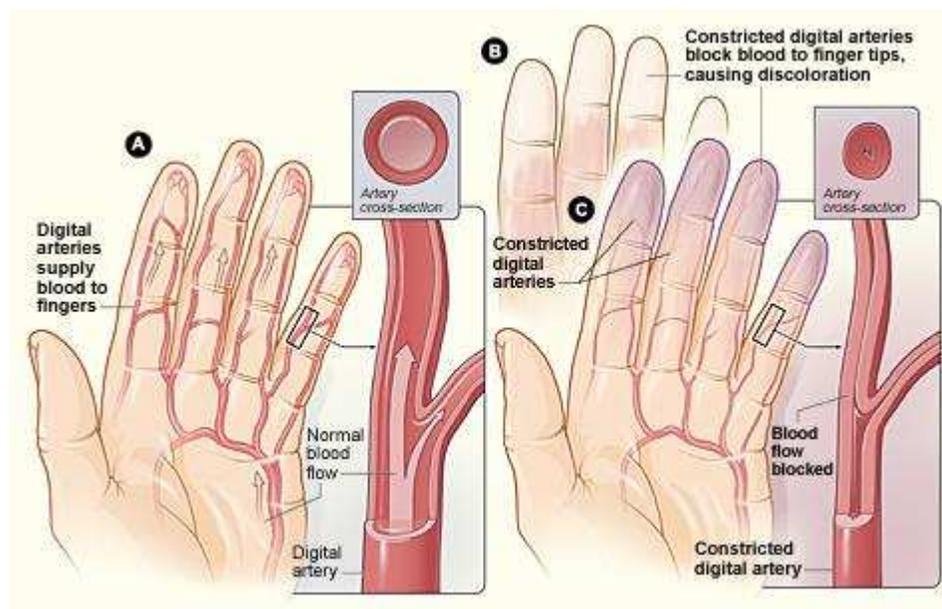
O NO é produzido endogenamente nas células endoteliais dos mamíferos e tem sua síntese ativada pela liberação de neurotransmissores na corrente sanguínea. A liberação de neurotransmissores como a acetilcolina e/ou bradicinina sinalizam a receptores específicos presentes na membrana das células endoteliais. Esta sinalização torna a membrana permeável aos íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), aumentando a concentração deste íon no interior da célula. Os íons  $\text{Ca}^{2+}$  ativam a enzima NO-sintase endotelial (eNOS), esta enzima converte L-arginina, na presença de  $\text{O}_2$ , em L-citrulina mais NO. O NO é uma molécula anfifílica, pequena e que se difunde facilmente pela membrana da célula endotelial e também das células musculares lisas [3–6]. A presença do NO no interior das células musculares lisas ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC). A sGC converte guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (GMPc) e o aumento da concentração de GMPc promove o relaxamento das células musculares lisas [1].

Os vasos sanguíneos têm seu diâmetro controlado pela camada celular mais externa composta por células musculares lisas. O relaxamento destas células promove um aumento no diâmetro dos vasos sanguíneos; este fenômeno é denominado vasodilatação. O mecanismo da vasodilatação está demonstrado na Figura 1.



**Figura 1.** Mecanismo de produção endógena de NO e de sua ação vasodilatadora.

Disfunções endoteliais cutâneas geralmente estão associadas a doenças cardiovasculares e podem ser sintoma de disfunções endoteliais mais generalizadas, que podem afetar o funcionamento normal do sistema circulatório e agravar quadros de lesões, como as decorrentes de diabetes e infecções cutâneas [7,8]. Quadro de vasoconstrição cutânea pode ser provocado por resfriamento parcial ou total do corpo ou podem ser resultado de uma condição patológica, como os sintomas causados pela síndrome de Raynaud (Figura 2), que causam prolongados espasmos vasculares (contração involuntária dos vasos) nas mãos, pés, nariz, orelhas e mamilos. Estes espasmos estão associados à redução da síntese endógena de NO ou a uma insuficiente sensibilidade ao NO. Estes espasmos levam à diminuição do diâmetro do vaso ou até mesmo a sua completa obstrução.



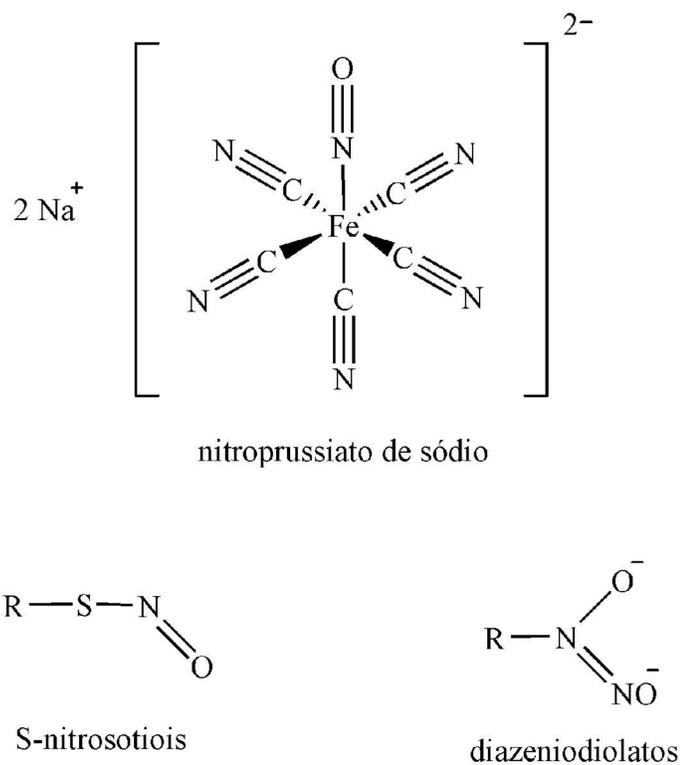
**Figura 2.** Imagens ilustrativas do estreitamento ou obstrução dos vasos sanguíneos por consequência da síndrome de Raynaud. (Ref.:<http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/raynaud/>)

Nestes casos, observa-se uma melhora dos pacientes quando há uma suplementação com L-arginina, um precursor na síntese de NO [3,4,9]. Este efeito é observado também com a aplicação tópica de sistemas ou dispositivos doadores de NO, capazes de estimular e aumentar o fluxo e o volume da microcirculação [10]. O efeito do NO se reflete de forma generalizada nas funções vasculares, uma vez que o NO também media a vasodilatação da pele e muitos outros processos fisiológicos e patofisiológicos. Mais recentemente, foi mostrado que a liberação tópica de NO exógeno pode também acelerar o processo de cicatrização de feridas, tanto na fase inflamatória, quanto na fase proliferativa [11].

Os potenciais benefícios associados à liberação tópica de NO no tratamento de distúrbios vasculares cutâneos e em feridas têm estimulado o desenvolvimento de novos biomateriais liberadores de NO, bem como o desenvolvimento de inúmeros trabalhos nesta área de pesquisa.

## 1.2 – Grupos doadores de NO

A literatura relata muitos trabalhos envolvendo algumas classes de moléculas capazes de liberar NO de forma espontânea. Como exemplo, podemos citar os nitritos e nitratos orgânicos e o nitroprussiato de sódio. Outras duas classes de moléculas orgânicas doadoras de NO que têm se destacado são os diazeniodiolatos e os S-nitrosotióis (RSNOs) (Figura 3). Os diazeniodiolatos apresentam, entretanto, um inconveniente para aplicações *in vivo*, pois o processo de liberação de NO resulta paralelamente na formação de subprodutos carcinogênicos como as nitrosaminas [12].

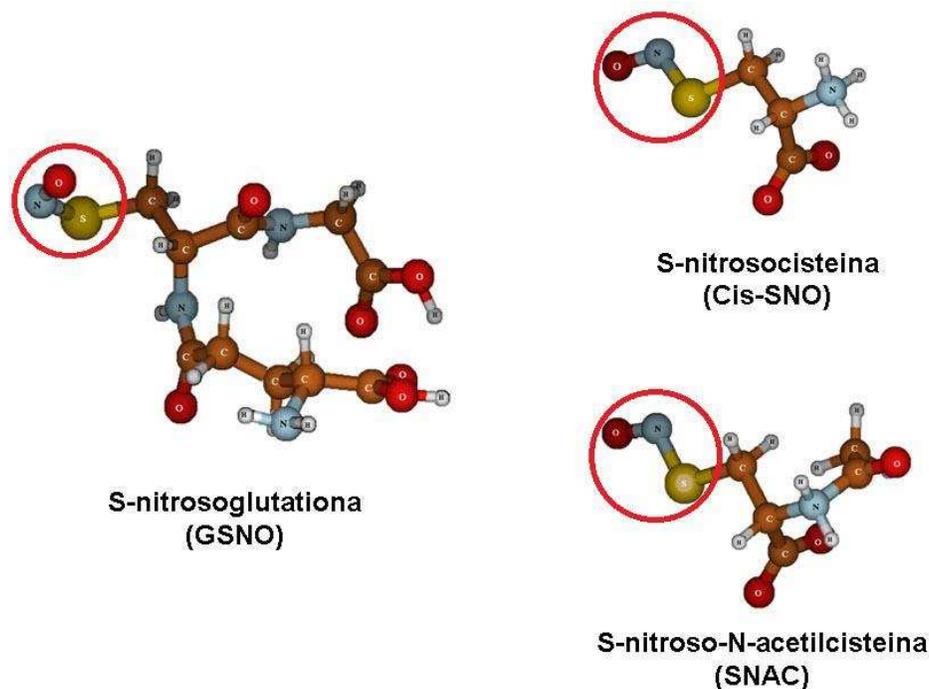


**Figura 3.** Estruturas do nitroprussiato de sódio, S-nitrosotióis e diazeniodiolatos.

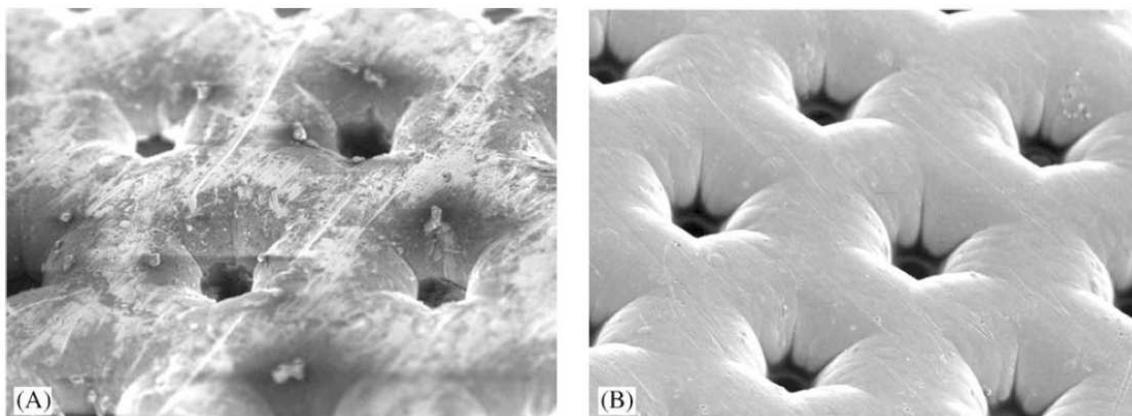
Os RSNOs são moléculas capazes de liberar ou transferir o NO pela quebra homolítica ou heterolítica (transnitroação) da ligação S-NO. A energia para quebra homolítica da ligação S-NO é relativamente fraca (~30 Kcal/mol) facilitando

a liberação do grupo NO [13]. Essa quebra ocorre de forma espontânea e é desencadeada por via térmica e fotoquímica [14,15].

A área de pesquisa na qual, está inserido, têm desenvolvido diversos trabalhos com aplicações de RSNOs como doadores de NO. Moléculas como S-nitroglutaciona (GSNO) [16], S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) [17] e S-nitrosocisteína (Cis-SNO) [15] foram utilizadas em estudos anteriores como moléculas doadoras de NO (Figura 4). Estes RSNOs foram incorporadas a matrizes poliméricas biocompatíveis [15] e em blends de PVA com polivinilpirrolidona (PVP), aplicadas no revestimento de telas de níquel [18] (Figura 5).



**Figura 4.** Estruturas dos RSNOs, GSNO, SNAC e Cis-SNO com destaque para o grupo SNO. (Estruturas fornecidas pelo Prof. Nelson Morgon – DFQ/IQ/Unicamp).



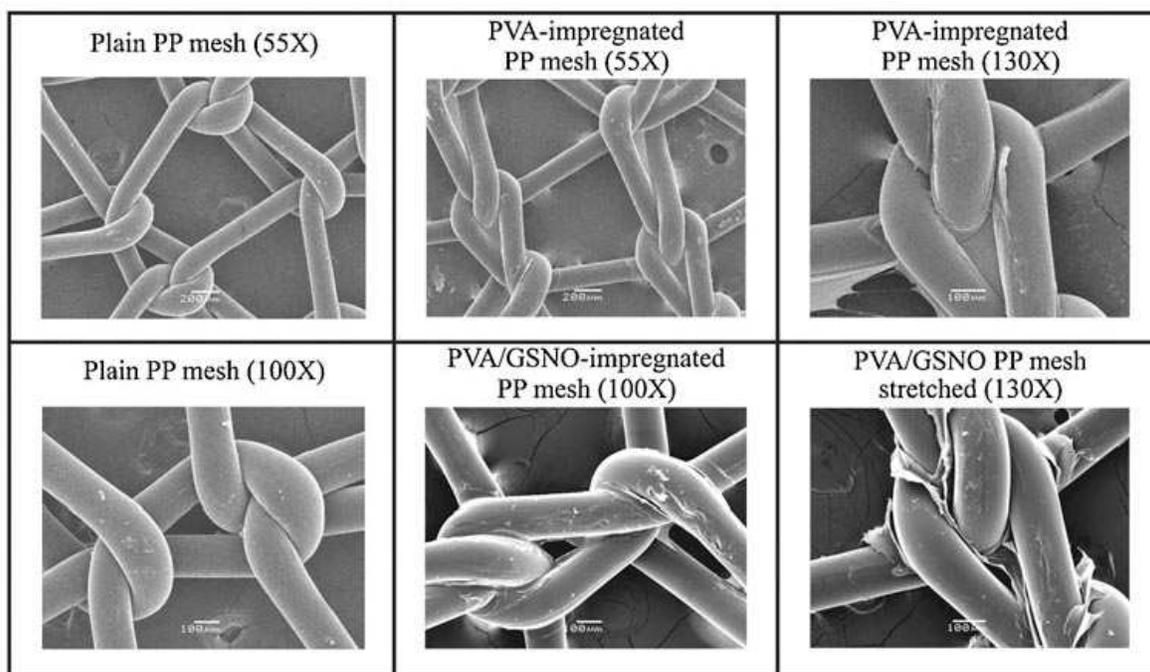
**Figura 5.** Micrografias de uma tela de níquel, (A) sem recobrimento, (B) recoberta com a blenda PVA/PVP com GSNO incorporada. (Reproduzida da ref. [19] com autorização da Elsevier).

### **1.3 - Matrizes poliméricas para liberação de NO**

Uma classe de materiais que tem se destacado como matriz polimérica em aplicações médicas são os hidrogéis. Estes materiais exibem grande capacidade em absorver água e alguns hidrogéis ainda têm como característica a baixa toxicidade, viabilizando sua aplicação em sistemas biológicos. Os hidrogéis são amplamente aplicados como matriz polimérica em dispositivos para aplicações médicas. Um grande atrativo desta classe de materiais são as suas propriedades específicas, tais como, lubrificação e habilidade para hidratar feridas [20]. Como exemplo, podemos citar as aplicações tópicas do hidrogel Pluronic F127, poli(óxido de etileno)<sub>99</sub>-(óxido de propileno)<sub>65</sub>-poli(óxido de etileno)<sub>99</sub>, modificado com a incorporação de SNAC e GSNO, que demonstraram produzir vasodilatação local em voluntários sadios e em modelos animais com diabetes induzida por estreptozotocina [8,21]. Outra aplicação desejável inclui o efeito de aceleração do processo de cicatrização de feridas [11,22,23] e um efeito antinociceptivo em modelos animais [24]. Embora hidrogéis fluidos, como o Pluronic F127, ofereçam algumas vantagens para aplicação tópica, a possibilidade da aplicação de um filme flexível hidrofílico capaz de liberar NO é também muito interessante. Esta característica viabiliza, por exemplo, a sua aplicação como bandagem, o que é

mais apropriado nos casos onde a absorção de exsudato também é desejada [16,25,26].

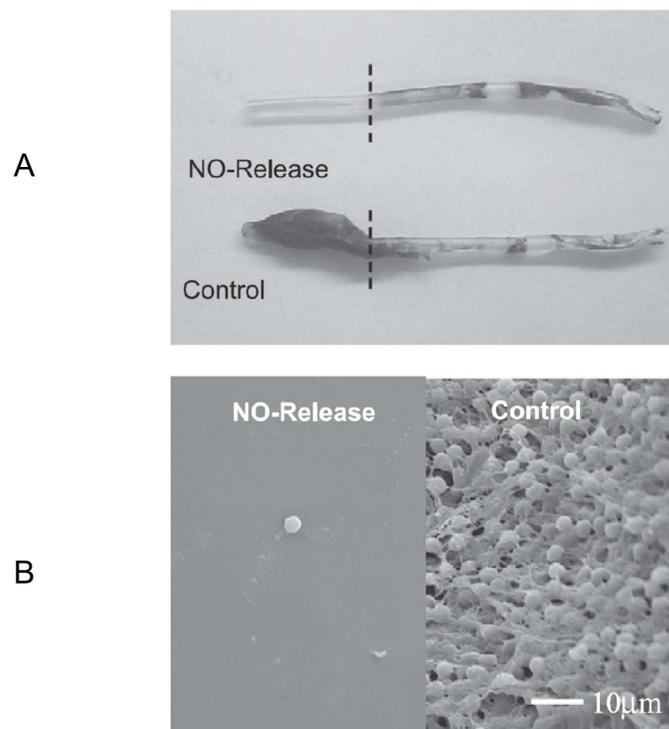
Os hidrogéis de PVA têm sido amplamente empregados na indústria alimentícia e farmacêutica [27–29]. O PVA é um polímero hidrofílico, de baixa toxicidade e que também apresenta boa biocompatibilidade e grande habilidade em absorver água. Filmes hidrofílicos de PVA contendo GSNO também já foram usados no recobrimento de telas de polipropileno. Este recobrimento produziu um aumento da molhabilidade das telas de polipropileno e também resultou na liberação local de NO [28] (Figura 6).



**Figura 6.** Micrografias de telas de polipropileno recobertas com PVA com GSNO incorporada. (Ref. [28], reproduzida com autorização da Elsevier).

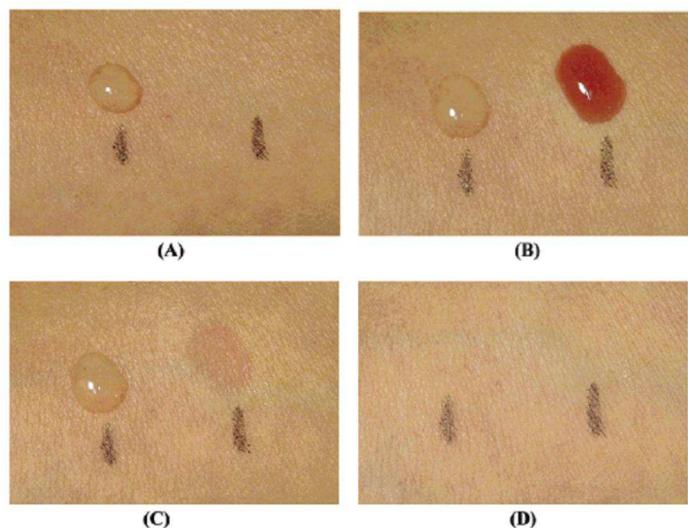
Matrizes poliméricas hidrofóbicas também têm sido amplamente usadas na incorporação de moléculas doadoras de NO para prevenção de adesão plaquetária. Matrizes como poli(cloreto de vinila) (PVC) [30,31], poliuretana (PU)

[32], polimetacrilatos (PM) [31] e poli(dimetoxosilano) com diazeniodiolatos (DACA-6N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-SR) ou borracha de silicone incorporada com diazeniodiolatos (SR) [31–33] (Figura 7) foram relatados por MEYERHOFF *et al.* como materiais poliméricos para incorporação de doadores de NO em sistemas de contato direto com sangue. Em um dos trabalhos, filmes de PVC incorporados com diazeniodiolatos foram utilizados para o revestimento de catéteres endovasculares de poliuretano e tubos de Tygon® para prevenção da adesão plaquetária na superfície destes dispositivos.



**Figura 7.** Imagens de sensores de O<sub>2</sub> revestidos com borracha de silicone reticulada com diazeniodiolatos doadores de NO incorporados, para prevenção de adesão plaquetária. (A) sensor revestido liberador de NO e controle não revestido. (B) micrografias da superfície revestida com liberador de NO e sem revestimento (superfície controle). (Ref. [31], reproduzida com autorização da Elsevier).

Poliésteres capazes de liberar NO por meio da S-nitrosação de grupos sulfidríla covalentemente ligados à cadeia principal, também foram desenvolvidos em trabalhos anteriores do grupo [34,35]. Estes materiais, quando aplicados topicamente, promoveram vasodilatação dérmica, como é possível observar na Figura 8, que corresponde à aplicação tópica do polietilenoglicol esterificado com o ácido mercaptosuccínico (AMS), produzindo um poliéster polisulfidrilado, que posteriormente foi S-nitrosado [34]. Outro polímero, citado na literatura, ao qual grupos doadores de NO foram ligados covalentemente à cadeia principal é a polietilenoimina (PEI). Por meio da formação de um grupo (N-NO) ligado à cadeia polimérica principal, este polímero foi capaz de liberar NO e prevenir a adesão plaquetária na superfície do material [25].



**Figura 8.** Aplicação tópica de poliésteres polinitrosados e não nitrosados no antebraço de voluntários, (A) poliéster não nitrosado como controle, (B) poliéster não nitrosado (transparente) e nitrosado (avermelhado) (C) efeito hiperêmico (formação de uma área avermelhada) produzido pela liberação tópica do NO, (D) desaparecimento do eritema após 7 min. (Ref: [34], reproduzido com autorização da *American Chemical Society*).

#### 1.4 - Reticulação do PVA

Como citado anteriormente, é desejável que o material para aplicações médicas exiba boa hidrofiliabilidade e capacidade de absorver água, estas

características podem ser observadas no PVA. Entretanto, as vantagens associadas à hidrofiliabilidade trazem também efeitos indesejados, associados a suas propriedades mecânicas devido ao seu intumescimento. A alta hidrofiliabilidade do PVA leva à sua completa solubilização, quando em contato com ambiente onde há presença de água por tempo prolongado. Estas limitações têm incentivado o desenvolvimento de diversas estratégias para tornar o polímero insolúvel por meio da reticulação das cadeias poliméricas, permitindo assim, a obtenção de filmes insolúveis de PVA.

Trabalhos anteriores apresentam variados métodos de reticulação do PVA, como por exemplo, o método por reticulação física utilizando a técnica de ciclos de congelamento e descongelamento (*freezing thawing*) [16]. Também são apresentados métodos por reticulação química, com formação de ligações covalentes inter e entre cadeias de PVA. Algumas técnicas utilizadas para promover a reticulação química são: irradiação com raios  $\gamma$  [36], auto-reticulação por via térmica [37], que pode ocorrer como subproduto da reação por raios  $\gamma$ , e também reações químicas com o emprego de um agente reticulantes como o glutaraldeído [38], o ácido propiônico [39] e o ácido sulfônico [40]. Estes agentes produzem pontos de ligação inter e entre as cadeias, impedindo assim, a dissolução completa deste polímero no processo de absorção de água, conferindo outras propriedades especiais ao material reticulado.

O maior inconveniente da maioria dos agentes de reticulação química é a alta toxicidade intrínseca dos reagentes e a grande necessidade da eliminação dos subprodutos tóxicos da reação, uma vez que se deseja aplicação em dispositivos médicos. Entretanto, atualmente existe um grande esforço na busca de agentes reticulantes que apresentem baixa toxicidade na obtenção de filmes de PVA reticulado para aplicações médicas.

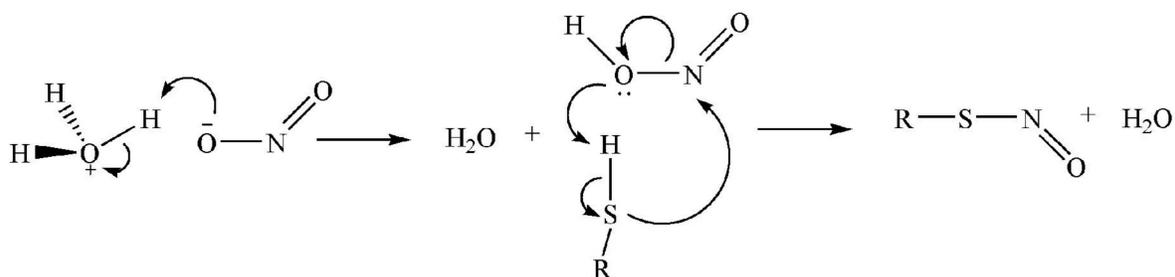
Neste trabalho, foi desenvolvida uma estratégia para evitar reagentes tóxicos no processo de reticulação química do PVA. Para isto, foi empregado um agente reticulante de baixa toxicidade, que ao promover a reticulação também

funcionaliza o filme de PVA com grupos S-nitrosáveis. Esta estratégia foi baseada na esterificação dos grupos hidroxila (OH) do PVA com o AMS.

O AMS é um ácido dicarboxílico que contém um grupo sulfidril (SH) vinílico à sua cadeia principal. Este diácido é capaz de estabelecer ligações éster intra e intermoleculares com as hidroxilas (OH) vinílicas do PVA. O AMS apresenta também baixa toxicidade e é amplamente utilizado em aplicações médicas nos casos de intoxicação por metais, atuando como agente quelante e eliminando os metais por excreção na urina [41–43]. A reação de esterificação com AMS tem como produtos a formação do PVA reticulado (PVA-SH) e a liberação de água. O ácido clorídrico (HCl) pode ser usado como agente catalisador da reação de esterificação e pode ser facilmente removido ao fim da reação.

## **1.5 – Métodos de S-nitrosação de tióis**

Dois processos de S-nitrosação têm sido reportados na literatura, a S-nitrosação por via gasosa e a S-nitrosação por via úmida. No processo de S-nitrosação por via gasosa, o agente nitrosante é o trióxido de dinitrogênio ( $N_2O_3$ ) [18,34]. A S-nitrosação por via úmida é feita por meio da preparação de uma solução com a adição de nitrito em meio ácido, produzindo uma solução de ácido nitroso (HONO). Amostras contendo grupos tióis (SH) são imersas ou adicionadas a esta solução, produzindo a reação de S-nitrosação destes grupos. O ácido nitroso reage com os grupos SH por meio da reação mostrada na Figura 9, produzindo grupos SNO e água. Esta reação já foi reportada na literatura [44] e foi utilizada como método de S-nitrosação para os filmes de PVA-SH produzidos neste trabalho.



**Figura 9.** Representação esquemática da reação de S-nitrosação de tióis por via úmida através da formação do ácido nitroso produzindo um grupo SNO.

### 1.6 – S-nitrosação do PVA reticulado

Os grupos SH presentes no agente reticulante (AMS) podem ser posteriormente S-nitrosados por meio da reação com solução de ácido nitroso (HONO), produzindo um PVA reticulado e funcionalizado com grupos SNO (PVA-SNO). Esta reação em condições estequiométricas (reação entre um mol de SH e um mol de HONO) também produz como subproduto água como citado anteriormente. Adicionalmente, devido a fatores estéricos, espera-se que a reticulação com AMS preserve grandes segmentos de PVA que não sofreram reação, mantendo assim parte da hidrofiliicidade do PVA inicial. Como é característico dos S-nitrosotióis, os filmes de PVA-SNO são capazes de liberar NO espontaneamente por reação térmica, abrindo assim uma nova perspectiva para aplicações dos filmes de PVA-SNO como biomateriais doadores de NO em aplicações tópicas, promovendo o aumento da vasodilatação dérmica.

Diferentemente da maior parte dos trabalhos desenvolvidos anteriormente neste grupo, o material produzido, PVA-SNO, não atua como matriz polimérica para a incorporação de grupos doadores de NO. Neste caso, a reticulação produz um material com grupos sulfidril (SH) nitrosáveis, covalentemente, ligados à estrutura do polímero. Esta característica é fundamental, pois permite uma distribuição homogênea dos grupos SNO tanto na superfície quanto no *bulk* (interior) do polímero e é fruto da incorporação de grupos SH no processo de reticulação do PVA. O processo de liberação espontânea de NO, para o PVA-

SNO, produz ainda um segundo processo de reticulação do material (formação de ligações S-S), levando a um material ainda mais insolúvel e com características desejáveis para aplicação tópica.

## **2 – Objetivos**

### **Objetivos gerais:**

Obtenção de filmes de PVA quimicamente reticulados com ácido mercaptosuccínico e insolúveis em meio aquoso, com capacidade de funcionalização com grupos SNO e de liberação espontânea de NO em aplicações tópicas.

### **Objetivos específicos:**

- Caracterizar o PVA reticulado com ácido mercaptosuccínico.
- Caracterizar as cinéticas de liberação de NO a partir dos filmes de PVA-SNO em condições fisiológicas.
- Caracterizar a ação vasodilatadora tópica dos filmes de PVA-SNO na pele íntegra.

## **3 - Materiais e métodos**

### **3.1 – Materiais**

Poli(álcool vinílico) (PVA), (99 % hidrolisado, massa molar nominal 85.000-146.000); ácido mercaptosuccínico (ácido 2-sulfidrilbutanodióico) (AMS), 97 %;

ácido clorídrico (HCl) 37 %; tampão fosfato salino (PBS), pH 7.4; 2-amino-2 (hidroximetil)-1,3 propanodiol (TRIS); 5,5'-ditiolbis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB); glutationa (GSH) (Aldrich Chemical Company, Co. Milwaukee, WI, USA); Nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) (Fisher Chemicals, Fair Lawn, New Jersey, USA); ácido ascórbico 99 %; cloreto de cobre(I) (CuCl) e bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) (Synth LTDA, São Paulo, Brasil), são de grau analítico e foram usados como recebidos. A S-nitrosoglutationa (GSNO) foi sintetizada de acordo com o método apresentado por PRUDENTE *et al.* [28].

### 3.2 - Síntese do poli(álcool vinílico) reticulado com ácido mercaptosuccínico

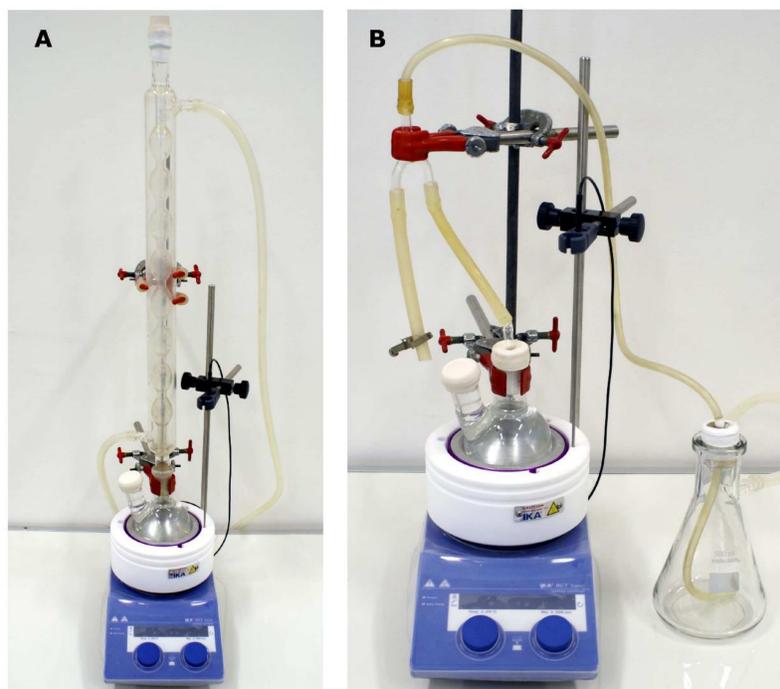
Como forma de facilitar a compreensão da etapa de síntese e obtenção dos filmes de PVA-SH, a Figura 10 apresenta um fluxograma esquemático mostrando as etapas da obtenção do material reticulado, as quais são detalhadas nos tópicos seguintes.



**Figura 10.** Fluxograma representativo das etapas de obtenção do material reticulado.

A esterificação do PVA foi realizada pela adição de AMS (concentração final 10 % em massa) em uma solução 5 % em massa de PVA. A solução de PVA foi previamente preparada pela dissolução do PVA em água deionizada sob agitação e aquecimento a 100 °C por 1 h. Como catalisador da reação, foi adicionado HCl até que a concentração de 0,15 mol L<sup>-1</sup> (pH 0,8) fosse atingida.

A reação foi conduzida sob refluxo, em atmosfera de N<sub>2</sub> a 100 °C e sob agitação, durante 3 h em balão de fundo redondo de duas bocas. O aquecimento foi realizado em manta de aquecimento com controle de temperatura (IKA, modelo C-MAG HS 7) (Figura 11 A). Ao término do tempo de reação, a temperatura foi reduzida a 70 °C e um sistema a vácuo foi utilizado para remover cerca de 2/3 do volume de água do frasco de reação. O sistema para redução do volume de água está representado na Figura 11 B.



**Figura 11.** (A) sistema reacional para reação de reticulação do poli(álcool vinílico); (B) sistema de aquecimento com sistema de vácuo acoplado para retirada de água do sistema.

### **3.3 – Moldagem (casting) dos filmes de PVA reticulados**

Após a etapa de redução de volume, o aquecimento foi desligado e o sistema foi resfriado ao ar até atingir a temperatura ambiente (~25 °C). Na etapa seguinte, toda a solução resultante foi transferida para um molde quadrado de acrílico (15 cm x 15 cm) e colocado em estufa a 70 °C por 72 h para secagem. Após este tempo, o filme foi removido do molde por imersão em água deionizada até o completo intumescimento do filme, que após ser hidratado soltou-se completamente do molde e apresentou espessura média de 500 µm. Após retirar o filme do molde o mesmo foi imerso em água deionizada (cerca 100 cm<sup>2</sup> em 1L água deionizada) por 72 h com troca total da água a cada 24 h. Este procedimento teve por objetivo, a remoção dos resíduos de reação por extração.

Após este procedimento de “lavagem”, os filmes de PVA-SH foram secos novamente em estufa a 70 °C por 72 h e posteriormente armazenados em dessecador com sílica ativada, para uso posterior.

### **3.4 - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

Filmes secos, de PVA não modificado e PVA-SH, foram mergulhados em N<sub>2</sub> líquido e em seguida transferidos a um almofariz e triturados. O pó resultante foi prensado na forma de pastilhas com KBr anidro (1 % em massa) para análise por espectrometria no infravermelho. O espectro de FTIR foi obtido a temperatura de 25 °C em um espectrômetro de FTIR (Bomen modelo MB102) na faixa espectral de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> com resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e acumulação de 30 varreduras.

### **3.4 - Calorimetria diferencial de varredura (DSC) e Análise termogravimétrica (TGA)**

Análises por calorimetria diferencial de varredura (DSC) de amostras de PVA não modificado e PVA-SH foram realizadas em um calorímetro (TA

*Instrument* modelo Q100) sob fluxo de argônio (50 mL min<sup>-1</sup>) na faixa de temperatura de -30 a 240 °C a uma taxa de aquecimento de 15 °C min<sup>-1</sup>. Somente o termograma do segundo ciclo de aquecimento foi usado na análise dos dados, pois, os perfis do terceiro e quarto ciclos obtidos são idênticos ao segundo. O primeiro ciclo de aquecimento apresenta um perfil que reflete um material com histórico térmico proveniente das etapas anteriores de produção dos filmes. Portanto, as informações do primeiro ciclo foram desconsideradas, pois, poderiam introduzir artefatos às medidas levando a uma interpretação que não reflete o comportamento térmico real do material.

Análises termogravimétricas dos filmes de PVA não modificado e PVA-SH foram realizadas em um calorímetro (*TA Instrument* modelo 2025) sob atmosfera de argônio (100 mL min<sup>-1</sup>) na faixa entre 25 e 690 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>.

### **3.5 - Medidas de ângulo de contato**

Medidas do ângulo de contato entre a interface ar/água foram obtidas em um tensiômetro ótico (*Theta Attension, KSV Instruments, Finland*) para filmes de PVA não modificado e PVA-SH. Os experimentos foram realizados a 25 °C em uma sala termostaticada, para todas as medidas foram utilizadas gotas de água deionizada com volume de 3 µL. As imagens das gotas de água na superfície do filmes foram obtidas por uma câmera digital acoplada ao tensiômetro. Estas imagens, posteriormente, foram analisadas com o software desenvolvido pelo fabricante, e forneceram os valores de ângulo de contato ar/água. Nove experimentos independentes foram realizados para cada amostra, sendo que, os ângulos do lado direito e esquerdo foram obtidos e a média entre os ângulos de contato foi calculada. Os ângulos obtidos foram apresentados na forma de valor médio ± desvio padrão.

Medidas de ângulo de contato comparativas entre quatro tipos de superfície foram realizadas conforme descrito anteriormente, utilizando-se amostras de PVA não modificado, PVA-SH, vidro e Teflon® (PTFE).

### **3.6 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e energia dispersiva de raios-X (EDS)**

Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram utilizadas para análise da superfície e da seção transversal, produzida por quebra criogênica dos filmes secos de PVA não modificado e PVA-SH. Amostras dos filmes de PVA não modificado e PVA-SH foram montadas em porta amostras (cilíndrico) de 10 mm de diâmetro. Em seguida, as amostras foram cobertas com ouro em pó em uma câmara de alto vácuo em um sistema modular de recobrimento à alto vácuo (Bal-Tec MED 020). Na seqüência, foram examinadas com um microscópio eletrônico (Jeol JSM 6360 LV - Tokyo, Japan) operando a 20 keV. Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS), também foi usada para análise elementar dos filmes de PVA-SH, o equipamento utilizado foi o mesmo que na obtenção das micrografias.

### **3.7 - Difratomia de raios-X (DRX)**

Difratogramas de raios-X dos filmes de PVA não modificado e PVA-SH, foram obtidos em um difratômetro (XRD7000 Shimadzu) operando a 40 kV com radiação  $\text{Cu } \alpha$  ( $\lambda = 0,154 \text{ nm}$ ) com ângulo  $2\theta$  variando de  $1.5$  à  $90^\circ$  usando um modo de tempo fixo com intervalo de passo de  $0,02^\circ$ .

### **3.8 - Medidas de grau de intumescimento**

O grau de intumescimento para os filmes de PVA-SH foi medido, por meio da pesagem de pedaços de filmes de PVA-SH, após a sua imersão em água

deionizada. As amostras foram pesadas em um intervalo de 2 min entre 0 e 20 min de medida e em um intervalo de 5 min entre 20 e 30 min. A variação da massa foi expressa em % de massa de água absorvida à 37 °C. Para este experimento foram utilizadas amostras de filme com ca. 1cm<sup>2</sup> de área superficial e 500µm de espessura.

A fim de avaliar o grau de intumescimento em meio biológico simulado, foi repetido o processo descrito anteriormente, porém neste ensaio as amostras foram imersas em solução de tampão PBS. As amostras foram pesadas em um intervalo de 2 min entre 0 e 20 min de medida e em um intervalo de 5 min entre 20 e 30 min. A variação da massa foi expressa em % de massa de tampão PBS absorvida à 37 °C.

### **3.9 - Teste de solubilidade**

A solubilidade dos filmes de PVA não modificado e de PVA-SH, secos nas mesmas condições experimentais, foi caracterizada colocando-se três amostras (1 cm x 1 cm, 500 µm de espessura) de cada material (PVA-SH e PVA não modificado) em 2 balões de fundo redondo. Os balões de fundo redondo continham água deionizada e foram mantidos a uma temperatura de 100 °C com a finalidade de acelerar o ensaio de dissolução, o sistema foi mantido sob agitação magnética e refluxo. As amostras permaneceram neste sistema por 1 h nas condições descritas. O efeito de dissolução, para o PVA não modificado e para o PVA-SH, foi determinado por meio da medida da variação da massa dos filmes secos, antes e após o teste. Os testes foram repetidos, nas mesmas condições descritas acima, utilizando fragmentos de filmes de PVA não modificado e PVA-SH em béqueres de 20 ml com água deionizada, com acompanhamento fotográfico durante 3600 s em intervalos variados de tempo. Os filmes foram tingidos com tinta vermelha insolúvel em água, com a finalidade de facilitar a visualização do efeito de dissolução.

### **3.10 - Quantificação da concentração de sulfidrilas pelo método de Ellman**

Inicialmente foi preparada uma solução 2 mM de DTNB, em solução 50 mM NaHCO<sub>3</sub>. Preparou-se também uma solução TRIS 1 M em água deionizada e o pH da solução foi ajustado para 8 com HCl.

Curvas de calibração foram obtidas a partir de uma solução de GSH com concentração conhecida (1M). Cinco alíquotas variáveis da solução de GSH foram colocadas em 5 tubos descartáveis de centrifuga (eppendorf) com volume de 2 mL. A cada tubo foi adicionado 100 µL da solução de TRIS e 50 µL da solução de DTNB, o volume foi então completado para 2 mL com água deionizada. O conteúdo de cada tubo foi transferido a uma cubeta de quartzo (2 mL de volume 1 cm de caminho ótico) e analisado individualmente em um espectrofotômetro com arranjo linear de diodo (Hewlett-Packard UV-VIS modelo: 8453) na região do UV-VIS, no comprimento de onda de maior absorção de radiação característico para o TNB (412 nm).

Três amostras de PVA-SH, previamente pesadas, foram colocadas individualmente em tubos descartáveis para centrifuga e a cada tubo foi adicionado 1850 µL água deionizada, 100 µL da solução de TRIS e 50 µL da solução de DTNB. As amostras foram mantidas sob agitação por 5 min ao abrigo da luz, a fim de evitar a foto decomposição do DTNB. O conteúdo de cada um dos tubos foi transferido a uma cubeta de quartzo e analisada individualmente em espectrofotômetro na região do UV-VIS, no comprimento de onda de maior absorção de radiação característico para o TNB (412 nm). Os dados espectrais das amostras foram tratados por interpolação de dados em uma curva de calibração obtida previamente. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas e foram expressas na forma de média ± DP.

### **3.11 - Otimização do tempo S-nitrosação**

Amostras de 1 cm<sup>2</sup> do filme de PVA-SH foram fixadas em um suporte para filmes (janela ótica 0,7x1,5) projetado para obtenção de espectros de UV-VIS no espectrofotômetro. Os suportes foram produzidos em Teflon® (PTFE), a fim de permitir a imersão do filme na solução nitrosante, sem que o mesmo fosse retirado do suporte. A solução nitrosante foi preparada a partir do nitrito de sódio produzindo HONO *in situ* pela reação demonstrada na Figura 9 (NaNO<sub>2</sub> 40 mmol L<sup>-1</sup> em HCl 1,2 mol L<sup>-1</sup>). Os filmes foram imersos nesta solução nitrosante por um período compreendido entre 0 e 60 min (o experimento foi realizado por 60 min porém após 12 min atinge o equilíbrio). Após a imersão, os filmes foram retirados com o auxílio de uma pinça, lavados com água deionizada (20 mL cm<sup>-2</sup>) e secos com um jato contínuo de N<sub>2</sub> por cerca de 5 s. Logo em seguida foi obtido o espectro na região do UV-VIS. Os espectros foram obtidos a cada 0,5 min no intervalo de 0 a 6 min de S-nitrosação e a cada 3 min no intervalo entre 6 e 12 min de S-nitrosação. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas e foram expressas na forma de média ± DP.

### **3.12 - S-nitrosação dos filmes de PVA sulfidrilados, em diferentes tempos de S-nitrosação**

A etapa de S-nitrosação dos filmes de PVA-SH foi realizada por imersão em solução nitrosante, preparada como descrito acima, em períodos de S-nitrosação de 5, 7 e 10 min, produzindo filmes com crescente grau de S-nitrosação. Após a S-nitrosação, os filmes S-nitrosados (PVA-SNO) foram extensivamente “lavados” com água deionizada (20 mL por cm<sup>2</sup>) e mergulhados em nitrogênio líquido. Os filmes, previamente congelados, foram secos por liofilização a -80 °C e 70 mtorr por 24 h e armazenados em um dissecador com sílica ativada, sob atmosfera de N<sub>2</sub>. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas e foram expressas na forma de média ± DP.

### 3.13 - Confirmação da reação de S-nitrosação

Uma amostra de filme de PVA-SH foi fixada em um suporte para filmes em Teflon® e o espectro na região do UV-VIS do filme não nitrosado foi obtido, em seguida o filme foi imerso em solução nitrosante por 10 min e um novo espectro foi obtido. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas e foram expressas na forma de média  $\pm$  DP.

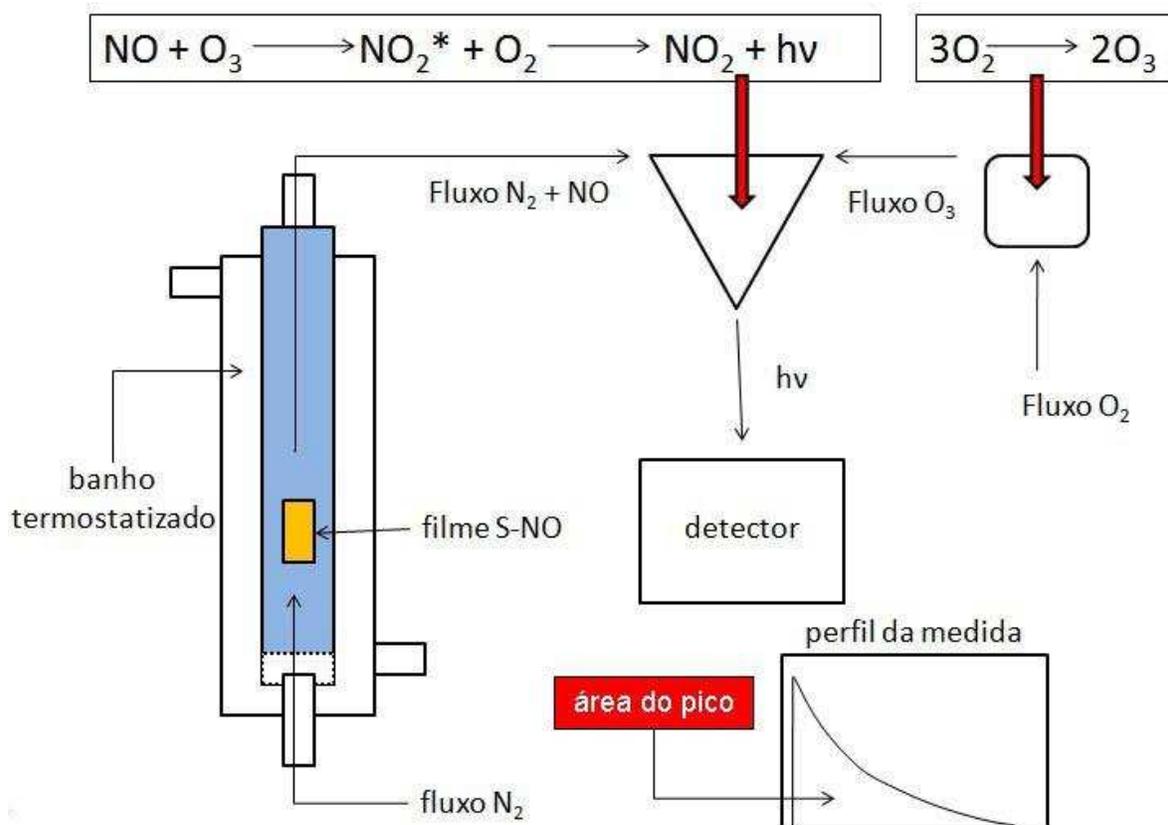
### 3.14 - Quantificação e cinéticas de liberação de NO

A carga total de NO dos filmes de PVA-SNO foi quantificada por quimiluminescência usando um analisador de NO (Sievers 280i Nitric Oxide Analyzer, NOA, Boulder, Col. USA). Uma solução de ascorbato (150 mM), pH 11 (ajustado com solução 1 M de NaOH) a 40 °C, foi utilizada como agente redutor nas medidas quantitativas de liberação de NO dos grupos SNO dos filmes de PVA-SNO, estas medidas foram realizadas seguindo o método descrito por NAGABABU and RIFKIND [45] and YANG *et al.* [46]. Uma curva de calibração foi obtida em triplicata com uma solução padrão de GSNO 70  $\mu$ M, pela injeção de alíquotas de 10 a 50  $\mu$ L da solução padrão, nas mesmas condições utilizadas para obtenção da carga de NO por quimiluminescência.

Na determinação do perfil cinético de liberação de NO por quimiluminescência, uma amostra do filme de PVA-SNO é imersa em solução de PBS à 37 °C e todo o NO presente na superfície e no *bulk* do filme, difunde para a solução. Por meio de um fluxo constante de N<sub>2</sub>, todo NO liberado em solução é arrastado até uma câmara de mistura. Nesta câmara o NO reage com O<sub>3</sub> produzindo “luz” (quimiluminescência), a intensidade luminosa é então medida por um fotodetector e o sinal é registrado. Analogamente, as medidas para determinação da carga de NO proveniente dos filmes de PVA-SNO por quimiluminescência, seguem o mesmo procedimento descrito para determinação da cinética, porém neste caso a liberação do NO é catalisada pela presença de

íons ascorbato em solução. O perfil característico do sinal obtido mostra um instantâneo aumento do sinal, seguida por um decaimento rápido.

A quantidade total de NO liberado é proporcional à área do pico e o tempo de liberação permite determinar a cinética de liberação do NO, na etapa envolvendo ascorbato. A carga de NO é calculada por interpolação do valor da área com uma curva de calibração previamente obtida. Um esquema do aparato instrumental para medidas de quimiluminescência é demonstrado na Figura 12. Em ambas as medidas por quimiluminescência, concentração e cinética de liberação de NO, o equipamento operou com pressão de O<sub>2</sub> a 6.0 psig e pressão de N<sub>2</sub> a 7.4 Torr.

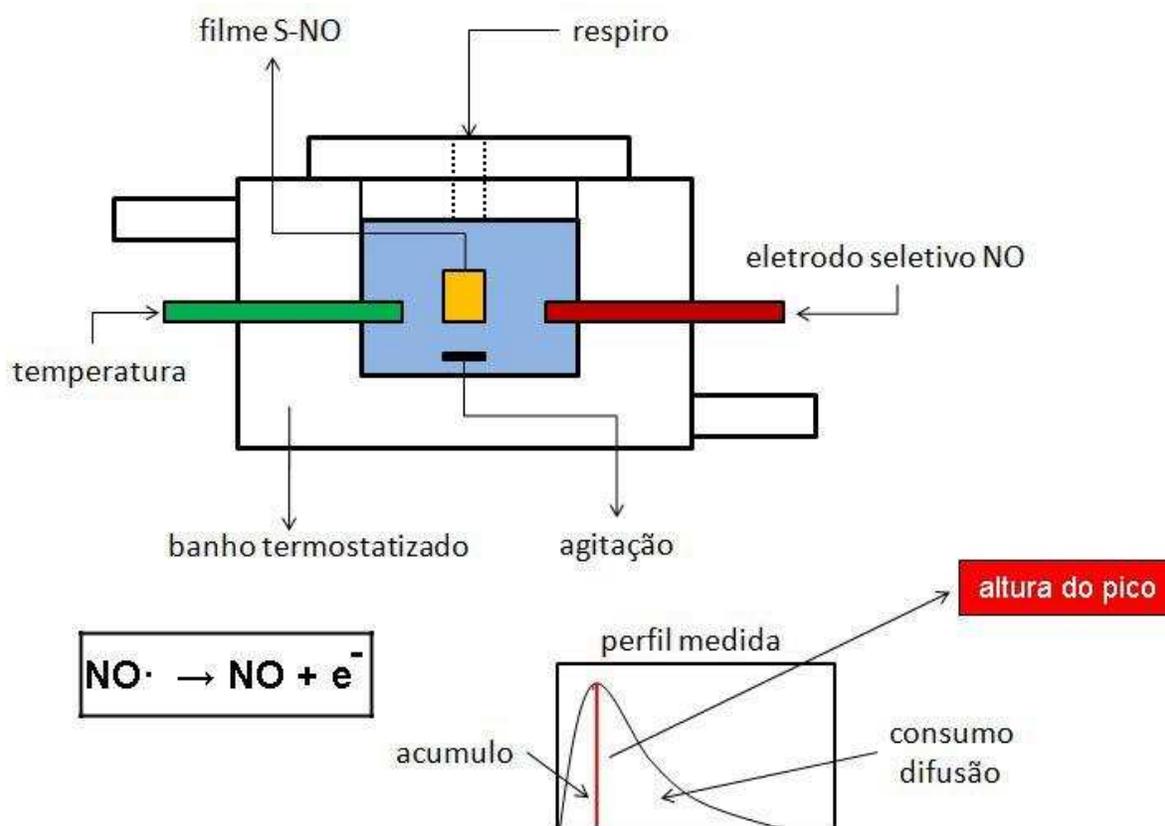


**Figura 12.** Representação esquemática do aparato instrumental para medidas de determinação da carga de NO e perfil cinético de liberação de NO, por técnica de quimiluminescência.

A carga total de NO dos filmes de PVA-SNO também foi medida por amperometria com um eletrodo seletivo de NO (Apollo 4000 analisador de radicais livres, *World Precision Instrument*, Sarasota, FL, USA). As medidas foram realizadas em uma solução desaerada contendo íons Cu(I) 3 mM, como catalisador para liberação de NO dos grupos –SNO dos filmes de PVA-SNO. As medidas foram realizadas segundo o método descrito por ZHANG [47]. Uma curva de calibração foi obtida em triplicata com uma solução padrão de GSNO 70  $\mu$ M, pela injeção de alíquotas de 10 a 50  $\mu$ L da solução padrão, nas mesmas condições utilizadas para obtenção da carga de NO por amperometria.

Na determinação da cinética de liberação pela técnica amperométrica, o filme é imerso em solução PBS à 37 °C, todo o NO presente na superfície e no *bulk* do filme difunde para a solução. Um eletrodo seletivo ao óxido nítrico monitora em tempo real a variação na concentração de NO. Analogamente, as medidas para determinação da carga de NO proveniente dos filmes de PVA-SNO por amperometria, seguem o mesmo procedimento descrito para determinação da cinética, porém neste caso a liberação do NO é catalisada pela presença de íons Cu(I) em solução. Caracteristicamente o sinal obtido é expresso na forma de um aumento rápido da concentração do NO em solução, seguido de um pequeno patamar (ponto de máximo) e um decaimento lento. O decaimento é resultado da difusão do NO para fora do sistema e do consumo do NO por O<sub>2</sub> dissolvido no meio.

A quantificação da carga de NO é calculada considerando-se a altura do pico e o valor é interpolado em uma curva de calibração previamente obtida, na etapa envolvendo Cu(I). Um esquema do aparato instrumental para medidas amperométricas é demonstrado na Figura 13.



**Figura 13.** Representação esquemática do aparato instrumental para medidas de determinação da carga de NO e perfil cinético de liberação de NO, por técnica amperométrica.

Tanto na técnica de medida por amperometria, quanto na técnica de medida por quimiluminescência, as medidas para determinação da carga de NO foram realizadas em quadruplicata e foram expressas na forma de média  $\pm$  DP.

### 3.15 - Lavagem dos filmes S-nitrosados de PVA-SH

Após o processo de S-nitrosação dos filmes, cada amostra (amostras de 1 cm<sup>2</sup>) foi lavada com 20 mL de água deionizada para retirada do excesso de ácido nítrico. A fim de verificar a eficiência do processo de lavagem, alíquotas de 1 mL de água deionizada foram utilizadas para lavagem das duas faces da amostra,

estas alíquotas foram então coletadas em tubos descartáveis para centrífuga (Eppendorf) individualmente. As alíquotas coletadas da lavagem de cada amostra foram transferidas a uma cubeta de quartzo (1 mL de volume e 1 cm de caminho ótico) e analisadas, individualmente, em espectrofotômetro na região do UV-VIS. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas e foram expressas na forma de média  $\pm$  DP.

### **3.16 - Medidas de vasodilatação cutânea por laser Doppler**

Medidas preliminares da vasodilatação dérmica local, provocada por aplicação tópica dos filmes de PVA-SNO, foram realizadas na pele do antebraço de dois voluntários (aluno e orientador), o efeito vasodilatador foi determinado através de medidas de fluxo por laser Doppler (LDF).

Todas as medidas foram realizadas em sala termostaticada a 25 °C com os voluntários na posição de supino e com o braço testado no nível do coração. Um equipamento de duplo canal para monitoramento de perfusão cutânea por laser Doppler modelo BLF21D (*Transonic Systems Inc.*, Ithaca, NY, USA) com diodo de luz infravermelha (comprimento de onda 780 nm, potencial ótica de saída  $< 2$  mW) e uma sonda de superfície tipo D1, amostrando uma área aproximada de 1 cm<sup>2</sup> e 1 mm de profundidade no tecido, foi utilizada para registrar em tempo real a perfusão sanguínea.

A sonda do laser Doppler foi fixada na superfície ventral do antebraço dos voluntários por fita adesiva hipoalergênica grau médico. O fluxo sanguíneo foi registrado em unidades de perfusão do tecido (TPU), que equivale a um fluxo por massa de tecido (1 mL x 1 min<sup>-1</sup> x 100g<sup>-1</sup>). Após registrar o estado basal do fluxo sanguíneo da pele (SBF), em um local específico do antebraço do voluntário, uma gota de 10  $\mu$ L de água deionizada foi aplicada, exatamente no mesmo local onde foi medido o fluxo basal. Em seguida, um pedaço de 1 cm x 1 cm do filme de PVA-SNO foi fixado sobre a gota de água com fita adesiva hipoalergênica grau médico. O filme foi mantido no local por períodos de 2, 5 e 10 min e à medida que os

tempos estabelecidos foram atingidos, a fita era então gentilmente levantada e o fluxo sanguíneo era medido nos locais de aplicação durante 15 minutos.

A gota de água foi utilizada a fim de assegurar um meio condensado para a difusão do NO do material para a pele, na interface filme/pele. Somente filmes de PVA-SNO recém S-nitrosados (durante 5, 7 e 10 min) e lavados foram usados e um novo filme foi usado a cada nova medida, para cada variável estudada. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas e foram expressas na forma de média  $\pm$  DP.

Os dados adquiridos por LDF foram expressos na forma da razão do aumento do fluxo sanguíneo, definido como a razão (fluxo sanguíneo pós-filme/fluxo sanguíneo basal), como demonstrado na Eq. 1.

$$\text{Razão de fluxo} = \frac{\text{Fluxo pós aplicação do filme de PVA – SNO}}{\text{Fluxo basal}}$$

Eq.1

A pressão sanguínea de cada voluntário foi medida antes e após a realização dos experimentos. Para esta medida foi utilizado um monitor de pressão arterial oscilométrico automático (Omron M7 HEM-780-E, Hoofddorp, the Netherlands), a fim de assegurar a ausência de efeitos sistêmicos decorrentes da aplicação dos filmes.

### **3.17 - Teste de estabilidade do filme S-nitrosado**

Amostras de 1 cm<sup>2</sup> do filme de PVA-SH foram fixadas em um suporte para filmes e imersas em solução nitrosante por 10 min. Após o processo de S-nitrosação os filmes foram liofilizados, durante os 7 primeiros dias em recipiente protegido da luz. Nos dias seguintes as amostras foram armazenadas em dissecador, com sílica ativada, em frasco protegido da luz e em sala termostatizada com temperatura em 25 °C. Foram realizadas medidas por espectrofotometria na região UV-VIS tomando-se o valor de absorbância em 336 nm. Os espectros foram obtidos em variados intervalos de tempo num total de 43 dias.

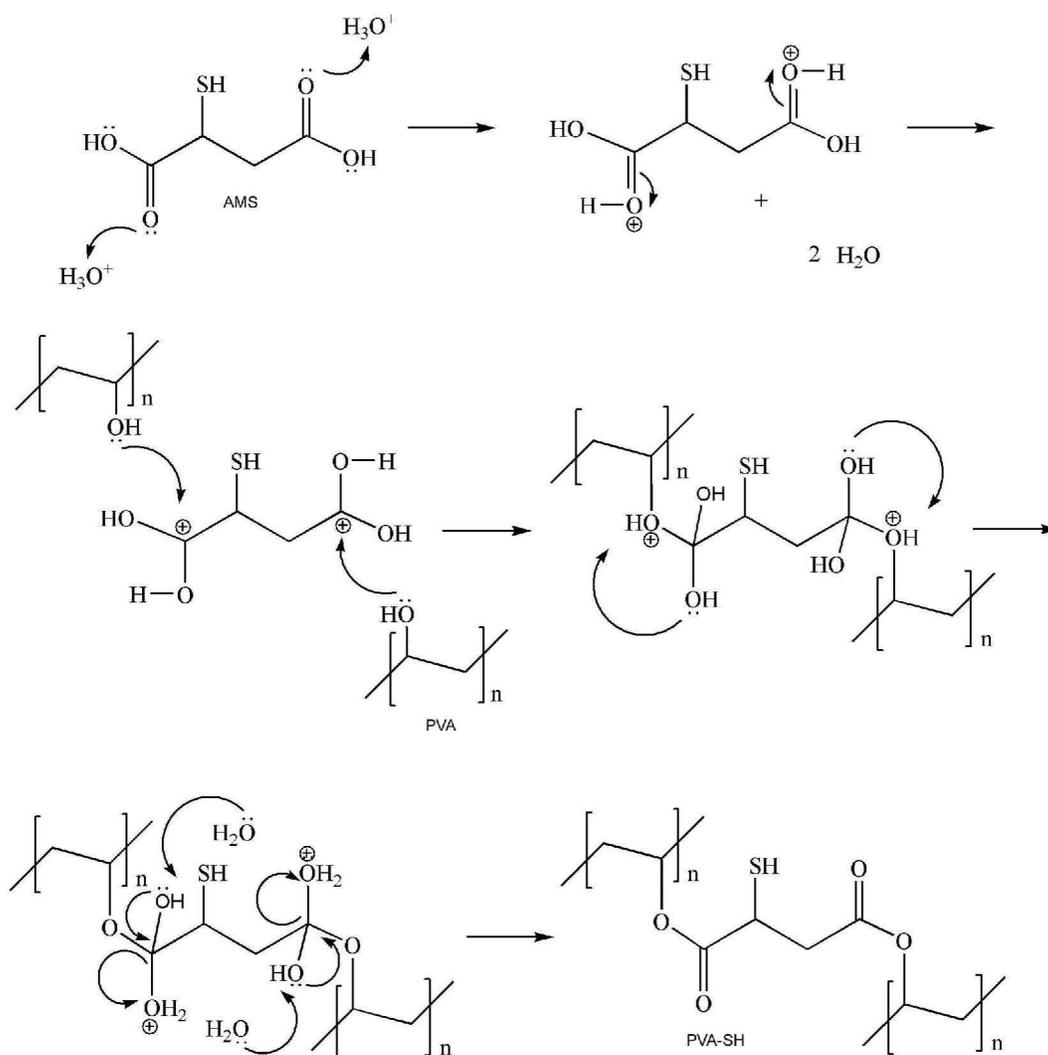
## **4 - Resultados e discussões**

### **4.1 - Caracterização da reticulação do poli(álcool vinílico) com ácido mercaptosuccínico**

A reação de esterificação do PVA, seguido da retirada do excesso de água, resultou em uma solução viscosa que imediatamente foi vertida sobre um molde de acrílico, produzindo após 72 h em estufa, o filme de PVA-SH. O filme obtido apresentou aparência translúcida na região central, enquanto que as extremidades do filme eram opacas (presença de bolhas). O filme foi facilmente retirado do molde, após intumescimento em água deionizada por ca. 10 min. Para a confecção das amostras de PVA-SH somente a área translúcida do filme (região excluindo as extremidades) foi utilizada para as análises subseqüentes, pois esta é a região que apresenta maior homogeneidade, e representa de forma mais precisa o produto da reação.

A reação de esterificação, do PVA com o ácido AMS, está representada na Figura 14. O AMS é representado como uma espécie neutra no pH 0,8 do meio reacional, pois se apresenta majoritariamente (cerca de 90 %) como uma espécie

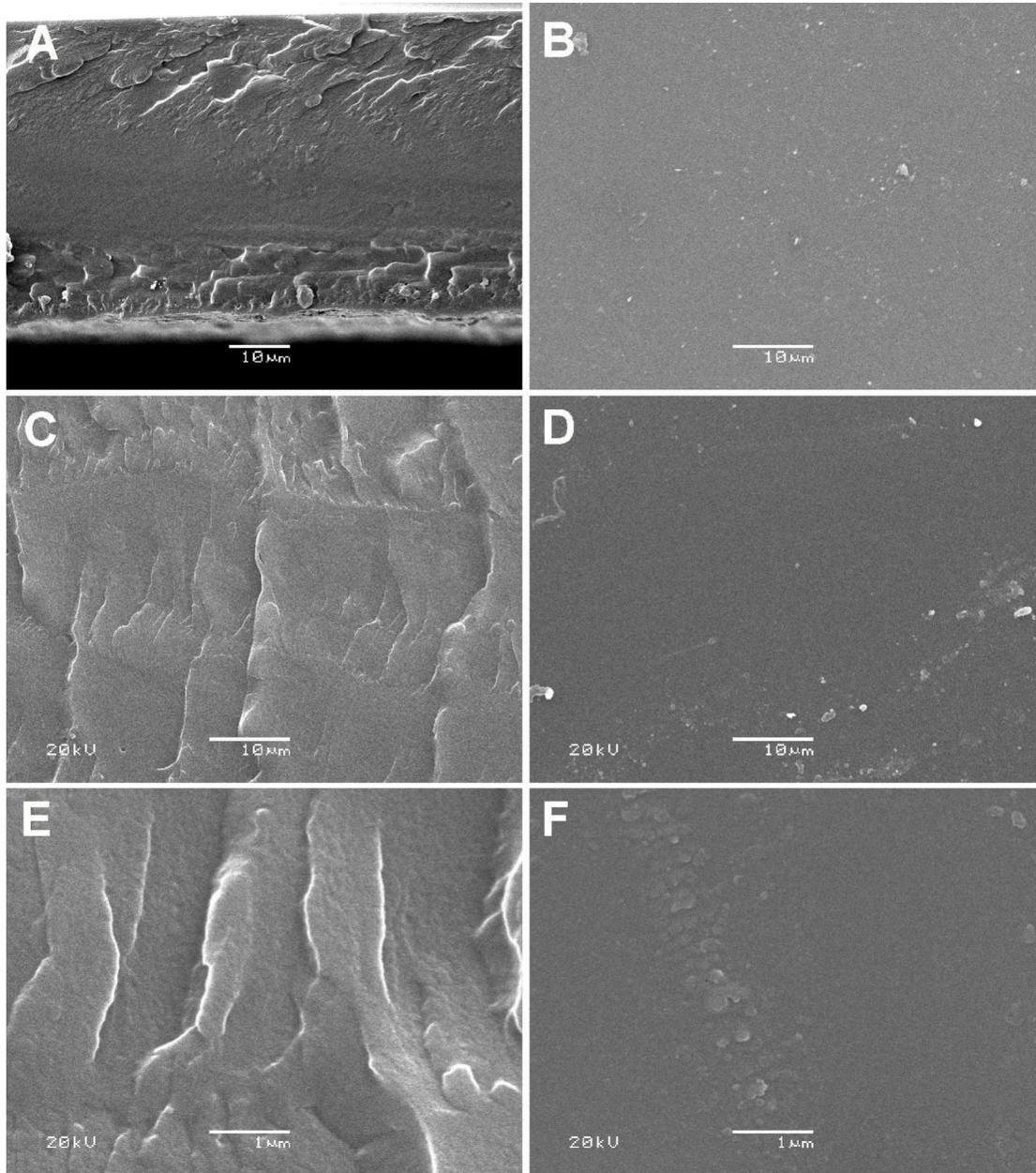
não carregada em pH abaixo de 3,0 [48]. Em meio ácido, pode-se assumir a protonação de dois oxigênios dos dois grupos carboxílicos do AMS, o qual sofre um ataque nucleofílico do grupo hidroxila do PVA no seu carbono parcialmente positivo  $SP^2$ . O intermediário tetraédrico sofre uma eliminação de água levando à formação de duas ligações éster, como mostrado na última estrutura da Figura 14.



**Figura 14.** Reticulação do poli(álcool vinílico), PVA, por reação de esterificação com ácido mercaptosuccínico produzindo PVA sulfidrilado (PVA-SH).

Como resultado da reação espera-se a formação de ligações intra e inter molecular, produzindo um PVA reticulado (PVA-SH). É importante verificar que as ligações éster formadas pela reação com AMS, impedem as interações de hidrogênio entre os grupos hidroxila remanescentes do PVA nas vizinhanças próximas a esta ligação éster. Desta forma, é esperado que a reticulação do PVA produza um material denso, característica verificada também nos filmes de PVA não modificado, o que está de acordo com a aparência verificada nas imagens superficiais de MEV para os filmes de PVA-SH e PVA não modificado (Figura 15 A e C). Estas micrografias mostram que os filmes de PVA-SH apresentam uma textura homogênea com ausência de poros tanto na superfície quanto na matriz (*bulk*) (Figura 15 C, D, E, F).

A comparação das imagens das fraturas, do PVA-SH e do PVA não modificado, permitem verificar que a matriz do PVA não modificado e do PVA-SH exibem um material denso. A Figura 15 B e D permitem comparar as superfícies do filme de PVA não modificado e do PVA-SH, aparentemente não há diferenças expressivas entre a superfície de ambos os materiais. Em ambas as superfícies é possível observar, uma superfície homogênea, com ausência de meso e macro poros na escala apresentada.

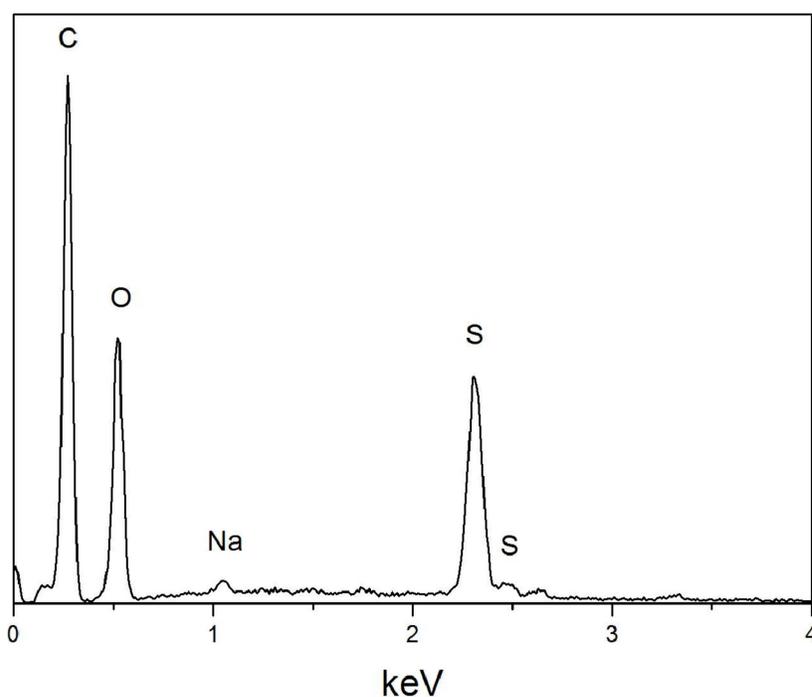


**Figura 15.** Micrografias representativas obtidas por MEV de filmes de PVA não modificado e PVA-SH; (A) secção transversal e (B) superfície, do PVA não modificado; (C) e (E) secção transversal do filme de PVA-SH e (D) e (F) superfície do PVA-SH, em ampliações diferentes.

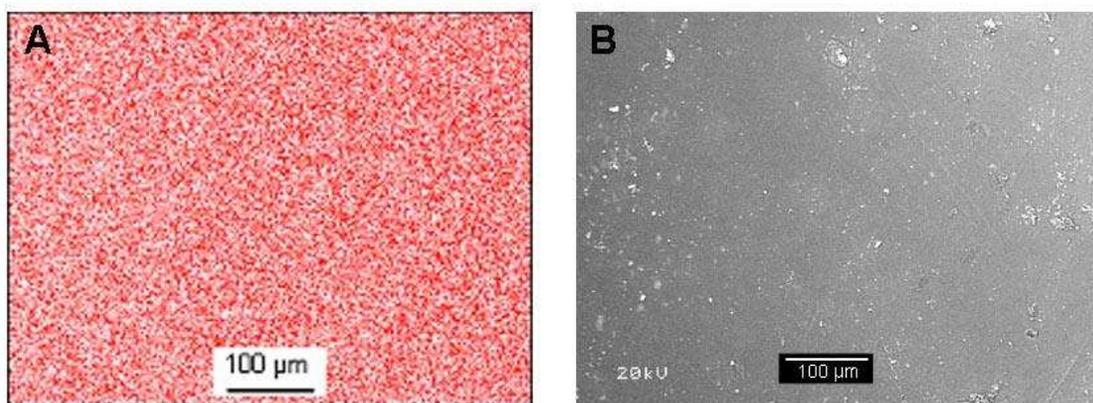
A incorporação do AMS foi confirmada pelo espectro de EDS (Figura 16), o qual permitiu identificar a presença dos átomos de enxofre e adicionalmente, os

átomos de carbono e oxigênio do PVA-SH. É possível notar traços de íons sódio, considerado contaminante da amostra devido à baixa intensidade do sinal.

O mapeamento dos átomos de enxofre por medidas de energia dispersiva de raios-x (Figura 17 A), permitiu observar, com uma ampliação de 500 x, que os grupos sulfidril (SH) estão homogêneamente distribuídos na superfície do filme. Este resultado é importante, pois, demonstra que a reticulação do polímero ocorre de uma forma homogênea, o que implica também, na formação de grupos SNO, durante a etapa de S-nitrosação, de forma homogênea na superfície do filme.



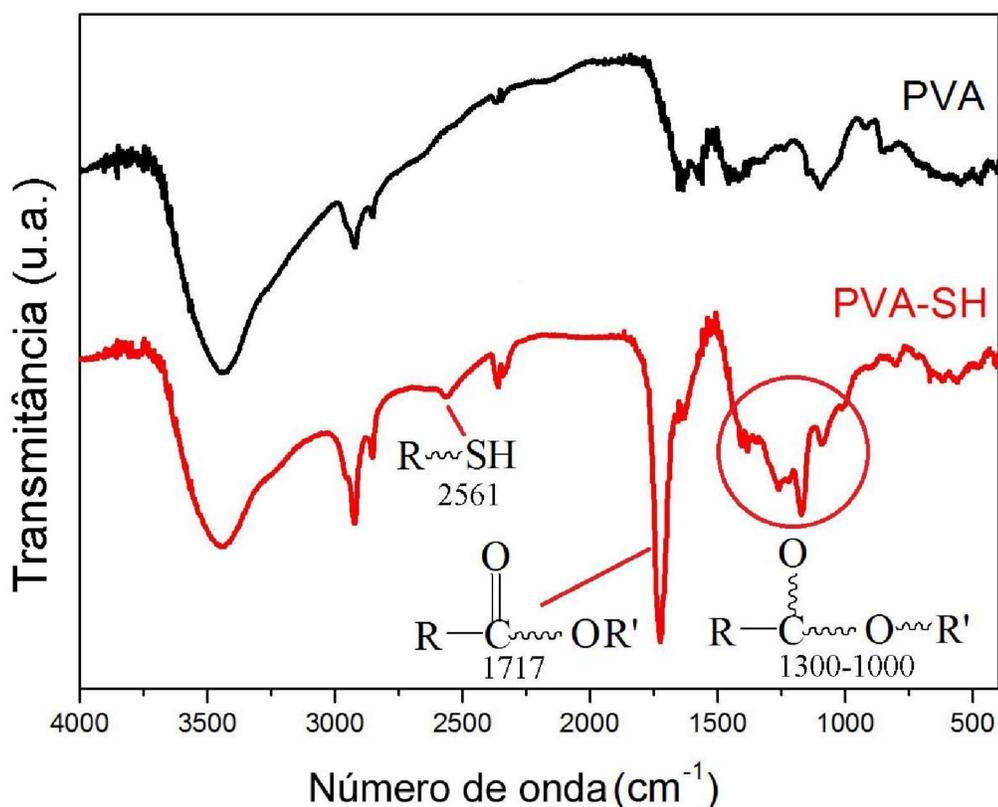
**Figura 16.** Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) da superfície do filme de PVA-SH.



**Figura 17.** (A) mapeamento por EDS correspondente aos átomos de S (B) imagem do filme correspondente área mapeada.

#### **4.2 - Caracterização por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

A reação de esterificação dos filmes de PVA, foi confirmada por espectroscopia de infravermelho (IV), comparando-se amostras do filme de PVA não modificado e do PVA-SH. A Figura 18 mostra os dois espectros obtidos, onde observa-se, para o PVA-SH, um pico em  $2561\text{ cm}^{-1}$  atribuído ao modo de vibração do grupo sulfidril. Observam-se também um intenso pico em  $1717\text{ cm}^{-1}$  e um largo envelope em cerca de  $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ , ambos característicos dos modos vibração de estiramentos C=O de ésteres. O pico e a banda, atribuídos a estiramentos característicos de grupos éster, confirmam a reação de esterificação do material. Podemos ainda notar que estas bandas estão ausentes no espectro de IV do PVA não modificado, exceto pela presença de uma banda fraca em cerca de  $1700\text{ cm}^{-1}$  atribuída aos grupos acetato remanescente do PVA não modificado [50].



**Figura 18.** Espectros de FTIR para amostras de filme de PVA não modificado e PVA-SH com identificação dos picos característicos dos grupos sulfidila e éster.

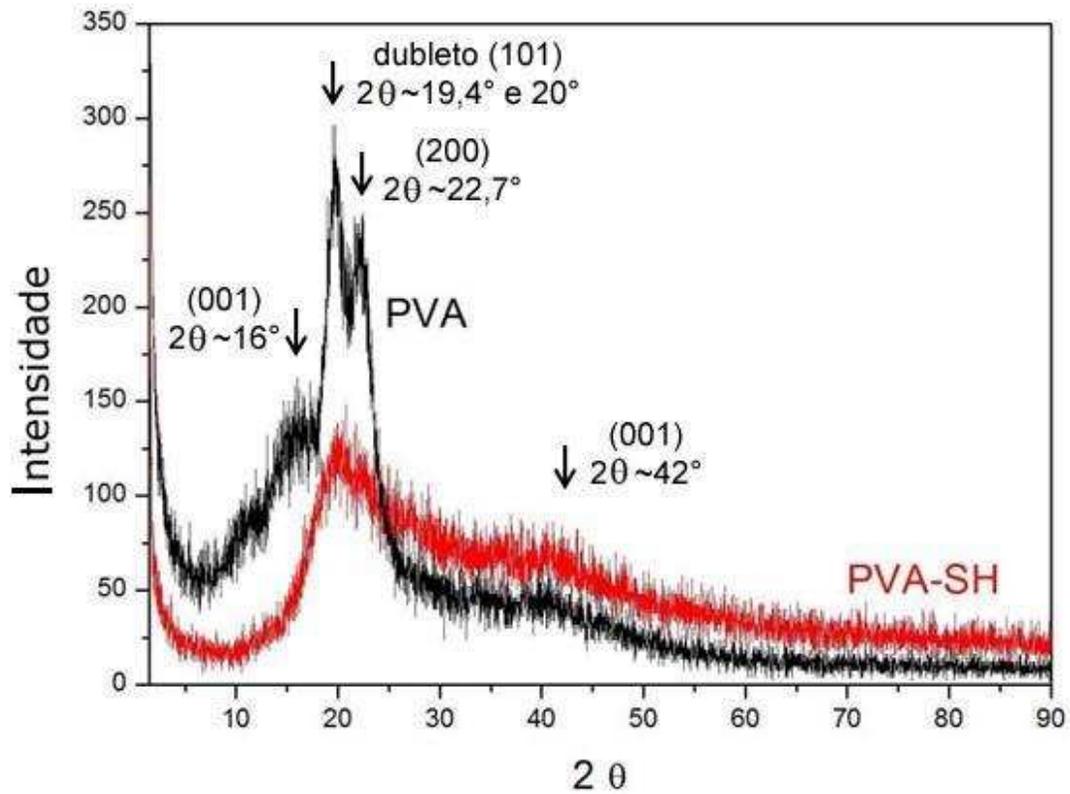
### 4.3 - Caracterização por difratometria de raios-X (DRX)

O PVA não modificado utilizado, com massa molar nominal na faixa de 85.000-146.000 g/mol, é sabidamente um polímero semicristalino e estrutura cristalina compreendida por repetições monoméricas, contendo duas hidroxilas arranjadas por ligação de hidrogênio em células monoclinicas [51]. A temperatura de fusão, relativamente alta 220 °C do PVA não modificado é resultado do alto nível de interações de hidrogênio, intra e intermolecular, nas regiões cristalinas. A cristalinidade dos filmes de PVA não modificado é claramente caracterizada no difratograma da Figura 19, que mostra a presença de quatro picos, sendo que o principal pico é na verdade um dubleto indexado como (101) em  $2\theta \approx 19.4^\circ$  e  $2\theta \approx 20.0^\circ$  que não podem ser resolvidos neste difratograma. O segundo pico mais

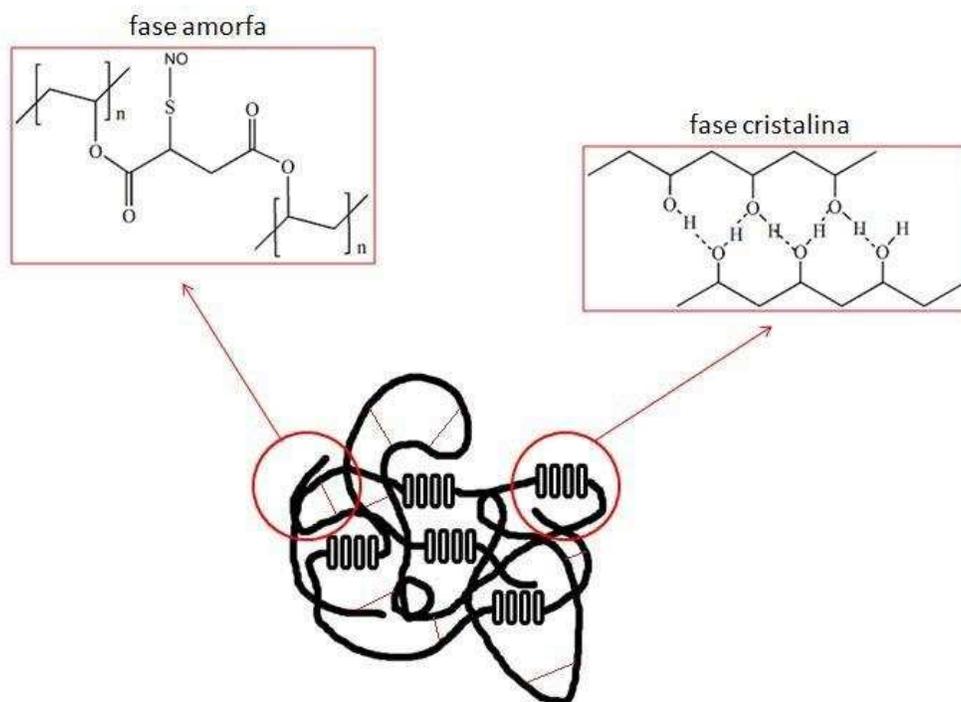
intenso pode ser indexado como (200) em  $2\theta \approx 22.7^\circ$ , observa-se ainda outros dois picos, menos intensos, que podem ser indexados como (001) em  $2\theta \approx 16^\circ$  e  $2\theta \approx 42^\circ$  [51,52].

Como resultado da reação de esterificação, observa-se que o pico de difração em  $2\theta \approx 16^\circ$  foi totalmente suprimido. Observamos também, que a intensidade do pico e do duplete  $2\theta \approx 19,4^\circ$ ,  $20,0^\circ$  e  $22,7^\circ$  foram substancialmente diminuídas nas medidas para o filme de PVA-SH. Por outro lado, ainda podemos observar a presença do pico  $2\theta \approx 42^\circ$  no material reticulado, indicando a presença de cristalitos de PVA remanescentes no material reticulado.

Podemos notar também, que todos os picos de difração remanescentes no filme de PVA-SH são sobrepostos por um halo amorfo aumentado. Essas mudanças indicam que a reação de esterificação leva a uma grande redução na cristalinidade do PVA, o que pode ser explicado por meio da formação das ligações com éster. As ligações produzem pontos de ligação, inter e entre cadeias, que não permitem a ocorrência de interações de hidrogênio entre as hidroxilas remanescentes, nos segmentos de cadeia “vizinhos” à ligação éster. Entretanto, é esperado que as ligações com o AMS sejam formadas de forma aleatória. Como resultado deste fenômeno, vários segmentos de cadeia não esterificados estão presentes no PVA-SH, estes segmentos possuem um grande número de grupos hidroxila (OH) que podem se associar por ligação de hidrogênio intra e intermolecular, formando cristalitos de PVA não modificado Figura 20. Estes cristalitos são, provavelmente, os responsáveis pelo duplete e o pico de baixa intensidade em  $2\theta \approx 19,4^\circ$ ,  $20^\circ$  e  $22,7^\circ$  e pelo pico remanescente em  $2\theta \approx 42^\circ$  observados na Figura 19.



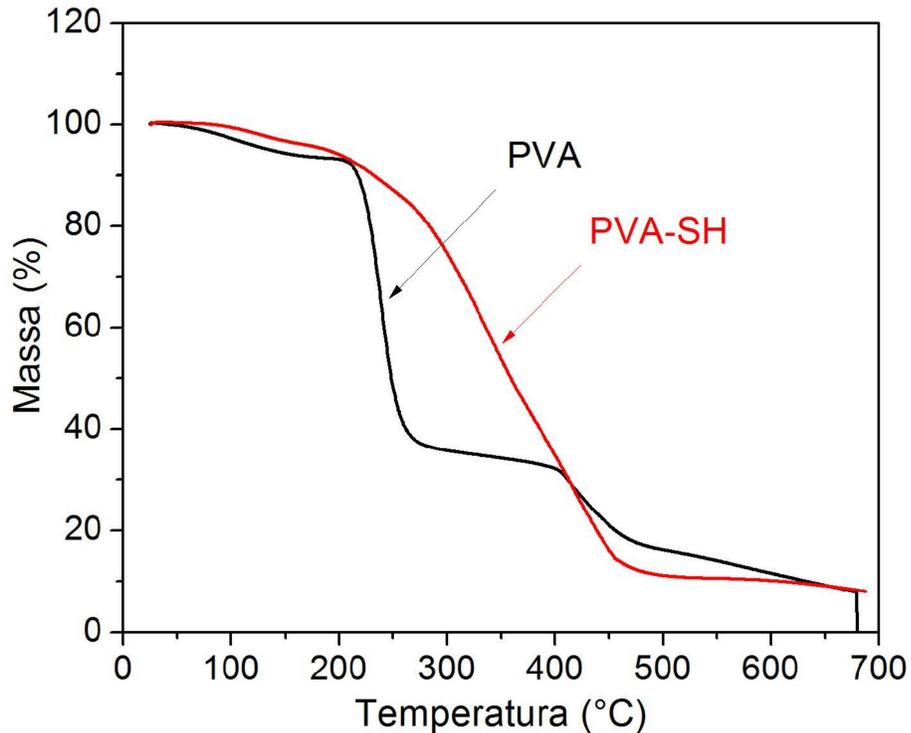
**Figura 19.** Difratomogramas de raios-X para amostras dos filmes de PVA não modificado e PVA-SH, com indicação dos picos cristalinos característicos do PVA não modificado.



**Figura 20.** Representação esquemática do PVA-SH mostrando as fases, amorfa e cristalina, presentes no material reticulado.

#### **4.4 – Análises térmicas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) e análise termogravimétrica (TGA)**

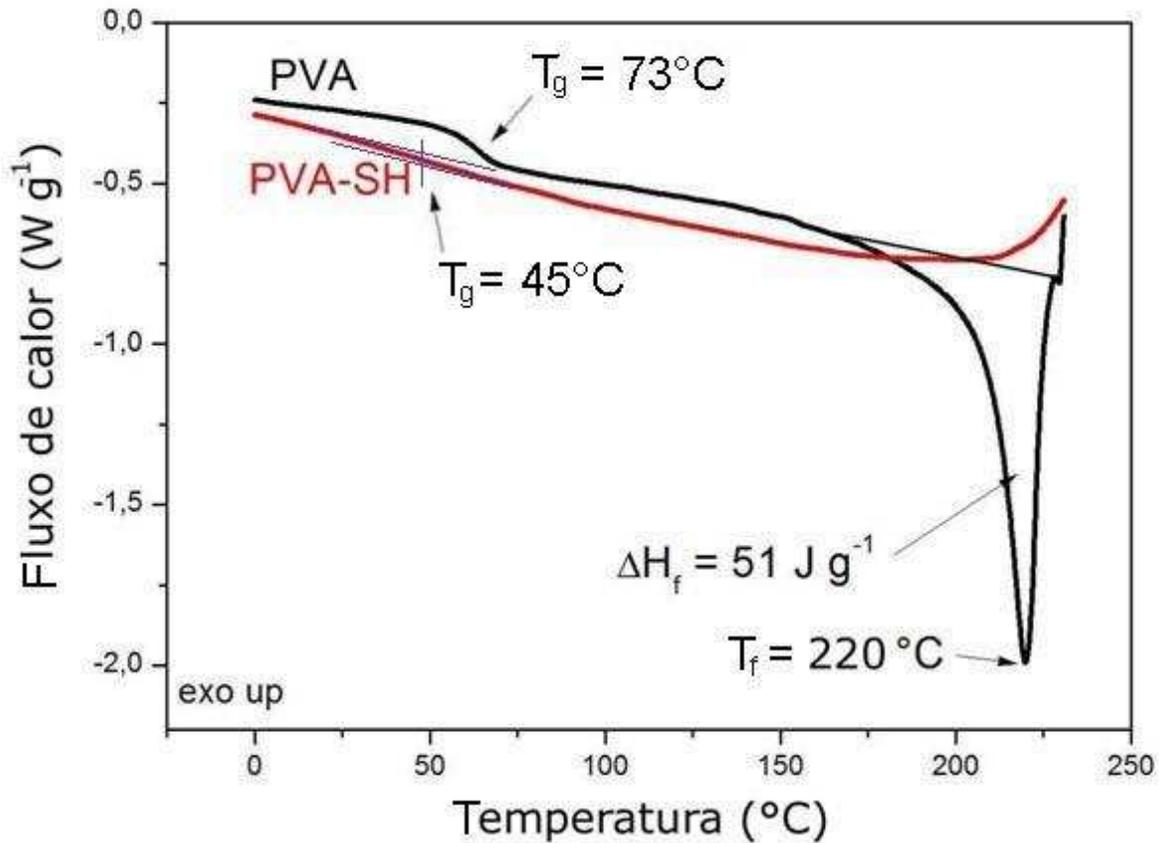
Análises de TGA mostram que os filmes de PVA não modificado e PVA-SH são termicamente estáveis até 230 °C, esta informação fornece o parâmetro de temperatura onde os dois materiais iniciam processos de degradação térmica (Figura 21).



**Figura 21.** Termogramas de TGA para análise dos filmes de PVA não modificado e PVA-SH.

Análises de DSC confirmaram o decréscimo substancial da cristalinidade no material reticulado. O perfil cristalino que apresenta o PVA não modificado, demonstrado na Figura 19, é resultado da formação de cristalitos por interação de hidrogênio entre as hidroxilas do poliálcool, como descrito anteriormente. A presença dos cristalitos, no PVA não modificado, está evidenciada no pico de fusão, com mínimo em 220 °C, observado no termograma de aquecimento do filme de PVA não modificado (Figura 22), este pico é resultado do fenômeno de fusão destes cristalitos. Entretanto, o perfil térmico do filme de PVA-SH mostra a completa ausência destes processos de fusão na faixa entre 0-230 °C, confirmando o decréscimo substancial da porção cristalina no PVA-SH. Além disso, a transição vítrea ( $T_g$ ) do PVA não modificado pode ser vista claramente em

73°C, nesta faixa de temperatura para o filme de PVA-SH a  $T_g$  sofre um decréscimo para uma temperatura ca. 45°C e verifica-se também um alargamento do processo de transição, comportamento característico de materiais que sofrem reticulação.



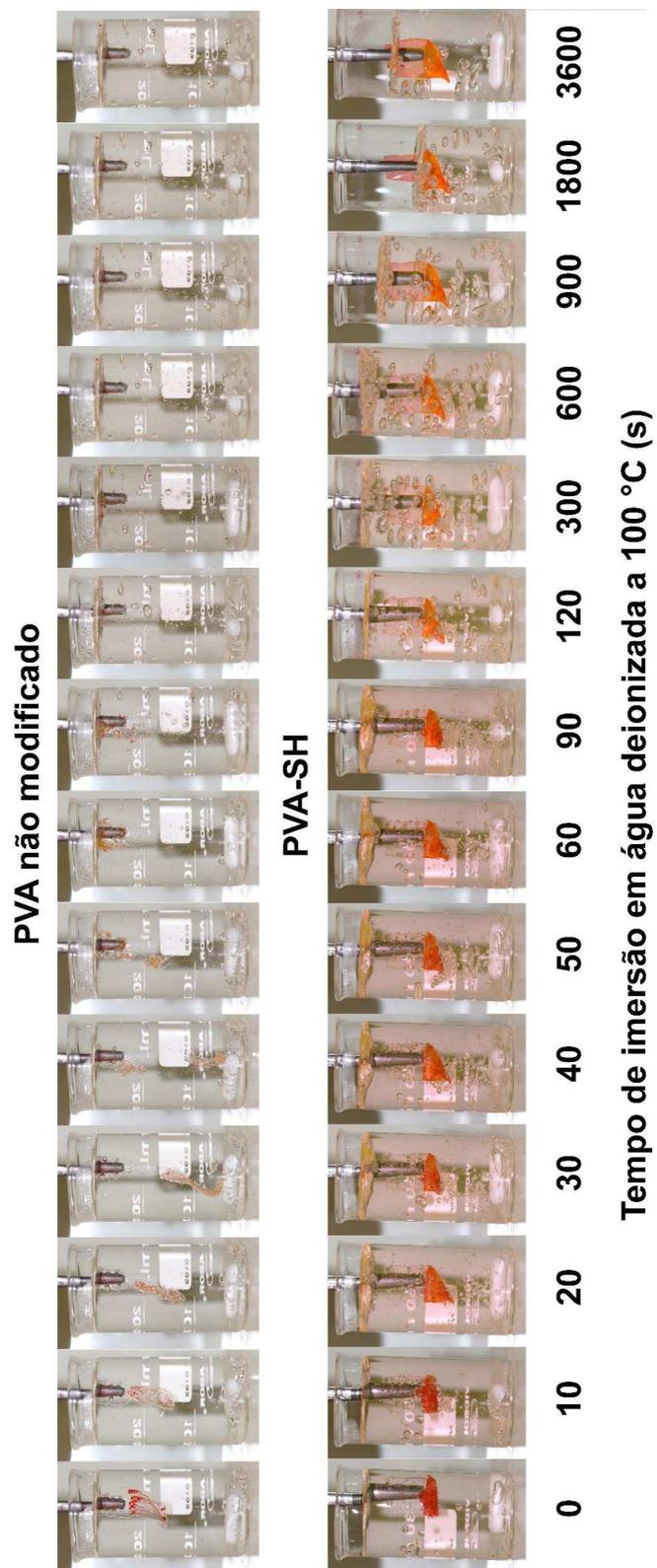
**Figura 22.** Curvas de DSC do processo de aquecimento para amostras dos filmes de PVA não modificado e PVA-SH.

#### 4.5 - Teste de dissolução do filme de PVA reticulado (PVA-SH)

Como resultado dos testes de solubilidade, observa-se que o PVA não modificado inicia processos de solubilização após ca. de 50 s e se dissolve completamente após 10 min em água deionizada a 100  $^{\circ}C$ . Porém, os filmes de

PVA-SH não mostram nenhuma solubilização ou desintegração mesmo após 1 h nas mesmas condições, apresentando apenas o intumescimento do filme. Após a secagem total do filme de PVA-SH verificou-se ainda, que nenhuma perda de massa significativa foi detectada, mesmo após 1 h do teste de solubilização. Isto evidencia que o grau de reticulação é suficiente para tornar o filme insolúvel, esta característica representa uma importante modificação do PVA para aplicação em dispositivos biomédicos. Pois, espera-se que o dispositivo, ao desempenhar sua função como biomaterial, permaneça íntegro, mantendo suas características, inclusive a sua estrutura.

As Figura 23 e Figura 24 mostram de forma representativa o teste de dissolução de amostras de PVA não modificado e PVA-SH em água deionizada a 100 °C. Nestas imagens os filmes de PVA não modificado e PVA-SH foram tingidos com corante vermelho, insolúvel em água, a fim de fornecer um melhor contraste entre o filme e a água, facilitando assim a observação do fenômeno de dissolução. Pode-se notar também que o corante adere de forma muito mais efetiva nos filmes de PVA-SH se comparado com os filmes de PVA não modificado, este fenômeno é resultado da interação do corante hidrofóbico com a superfície dos filmes. A superfície do PVA-SH é mais hidrofóbica devido ao consumo dos grupos -OH desta forma a sua adsorção é facilitada neste filme.

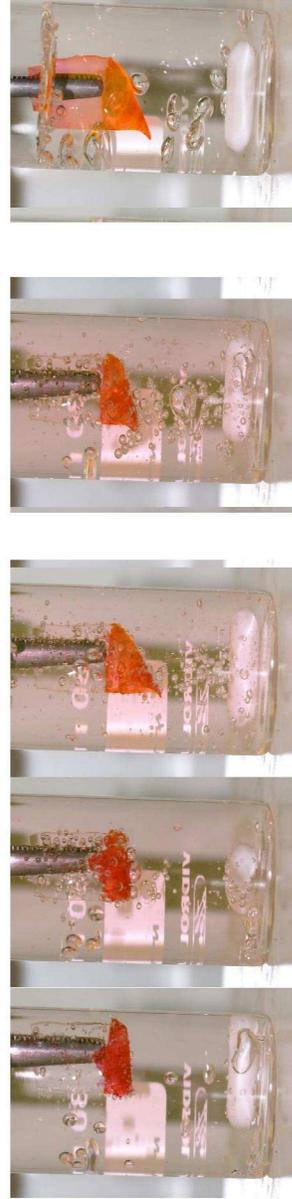


**Figura 23.** Mosaico de imagens do teste de dissolução do PVA não modificado e do PVA-SH em água a 100 °C durante 1 h.

## PVA não modificado



## PVA-SH



0 10 20 50 3600

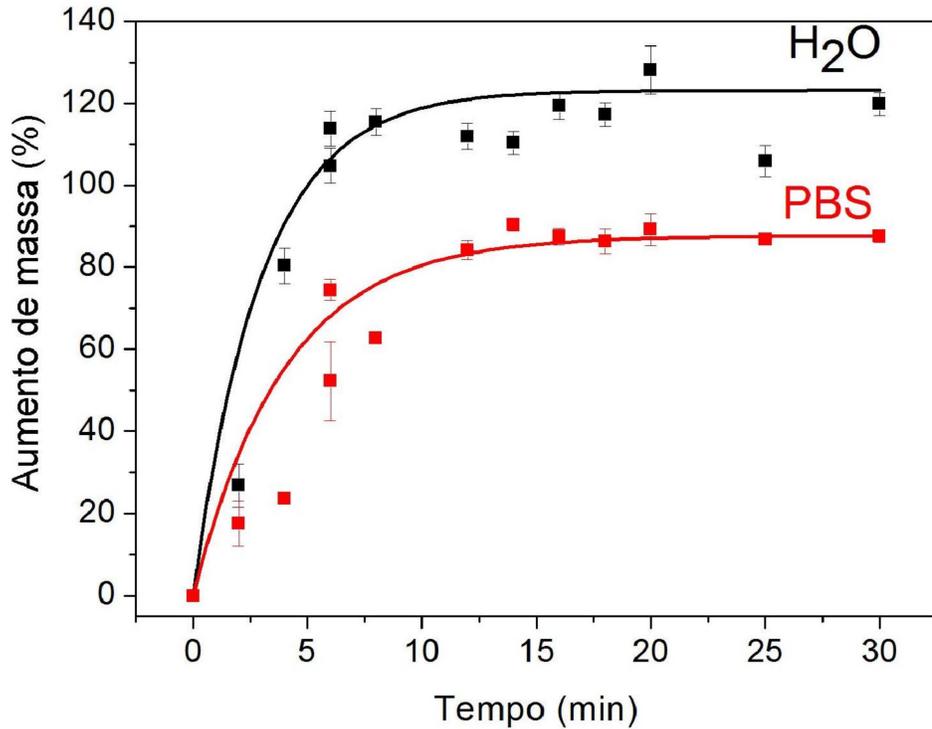
Tempo de imersão em água deionizada a 100°C (s)

**Figura 24.** Ampliação do mosaico de imagens do teste de dissolução do PVA não modificado e do PVA-SH em água a 100 °C durante 1 h.

#### 4.6 – Medida do grau de intumescimento para o PVA-SH

Outra característica importante, em materiais para aplicações biológicas, é a capacidade deste material em absorver água. Esta característica é analisada em termos do grau de intumescimento. Esta medida é geralmente expressa na forma de quantidade de água absorvida em relação à massa inicial do material. A fim de determinar o grau de intumescimento do PVA-SH foram realizadas medidas em água e complementarmente em tampão PBS, que fornece uma estimativa do comportamento do material em meio análogo ao fisiológico. Estas medidas demonstraram que o PVA-SH preserva sua hidrofiliicidade e um grau de intumescimento de mais de 80 %, em ambos os meios (Figura 25). Este fator é extremamente importante e permite boa integração tecidual, no caso de dispositivos de uso médico [28]. Materiais com capacidade de absorção de fluidos podem ser aplicados no recobrimento de lesões exsudativas.

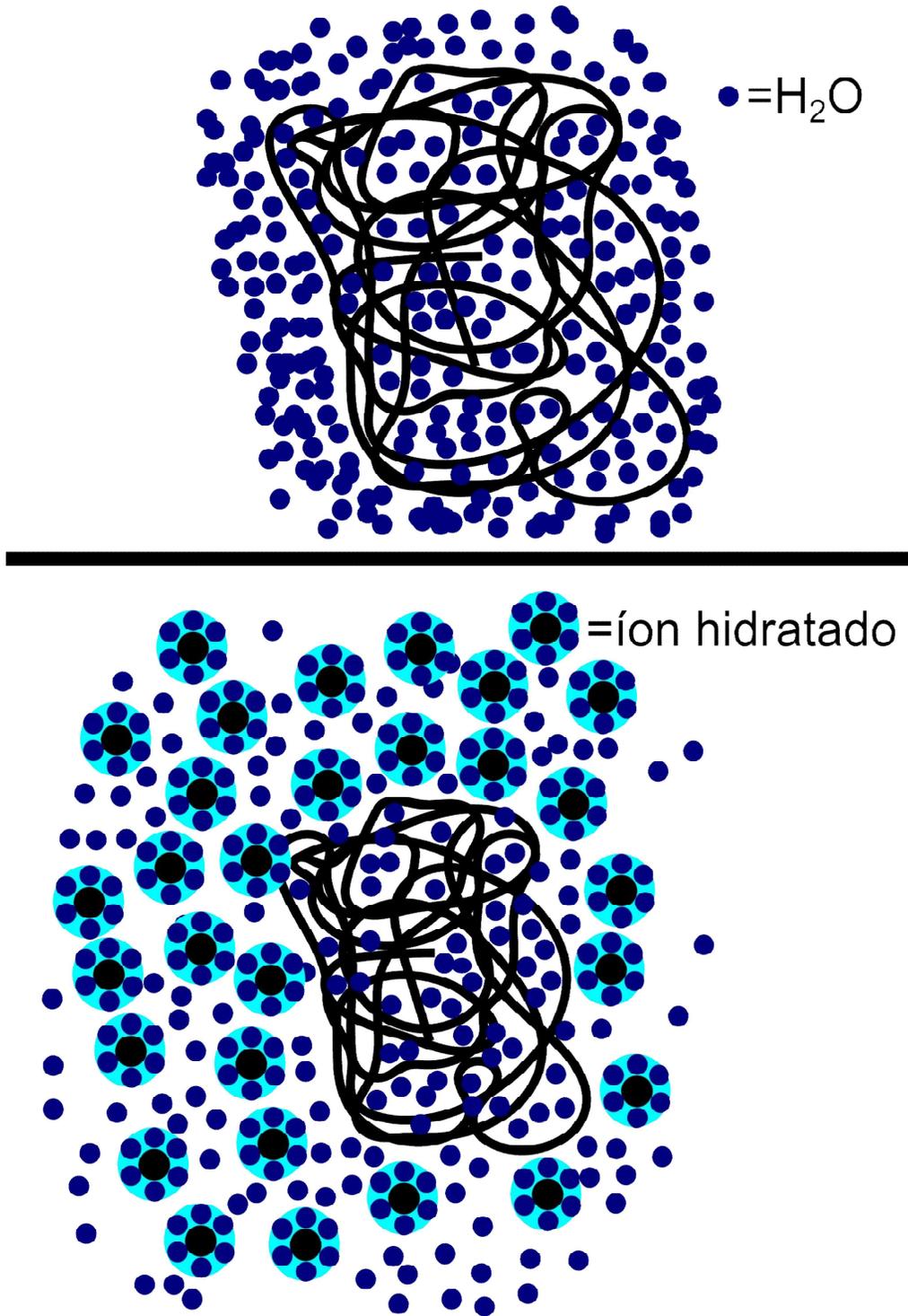
É possível notar que o filme de PVA-SH atinge o equilíbrio após 10 min, absorvendo cerca de 120 % de sua massa em água. Este comportamento demonstra uma rápida difusão da água para a matriz (*bulk*) do filme de PVA-SH, indicando que parte da hidrofiliicidade do PVA é preservada, apesar do decréscimo da molhabilidade inicial que é vista no PVA não modificado (Figura 25). O filme apresenta um perfil de intumescimento diferente em meio de tampão PBS, como demonstrado na Figura 25. Nestas condições o filme atinge o equilíbrio após 10 min absorvendo cerca de 80 % de sua massa em solução de PBS.



**Figura 25.** Perfis de aumento de massa (%) para amostras do filme de PVA-SH devido à absorção de água e tampão PBS após 30 min, à temperatura de 37° C.

O PVA-SH é um hidrogel neutro, reticulado e não apresenta poros, como demonstrado anteriormente (Figura 15). O modelo de intumescimento para materiais que exibem essas características foi amplamente descrito por FLORY [53], PEPPAS *et al.* [54] e GANJI *et al.* [55] e pode ser explicado pela difusão das moléculas de água através dos espaços vazios entre cadeias do polímero. A entrada das moléculas de água provoca uma expansão dos espaços vazios entre as cadeias poliméricas (intumescimento), porém, ao intumescer as cadeias exercem uma força que se opõe a esta expansão (expansão elástica retrativa), isto ocorre devido às restrições impostas pela reticulação. Este fenômeno tende a um equilíbrio, entre a expansão e a restrição imposta pela cadeia à entrada de água devido à pressão osmótica. O máximo de intumescimento é atingido quando o equilíbrio estes dois fenômenos é estabelecido [56].

A diferença observada entre o intumescimento em água e em solução de PBS pode ser explicada pelo aumento da força iônica na solução de PBS. Como resultado da presença de íons em solução, as moléculas de água estão dispostas em camadas de solvatação ao redor dos íons, desta forma o raio dos íons hidratados pode assumir dimensões da ordem dos volumes livres entre as cadeias poliméricas dificultando a sua difusão para o interior do polímero. Entretanto, parte das moléculas de água está livre para penetrar nestes volumes livres da cadeia polimérica, desta forma, é estabelecido um gradiente de concentração dentro e fora da estrutura polimérica [57–59]. Este fenômeno pode explicar a diferença de absorção de água nos filmes de PVA-SH, em meio de água deionizada e em meio contendo de íons (PBS). Neste segundo caso a diferença de pressão osmótica, dentro e fora da estrutura polimérica, resulta na difusão de menor quantidade de água para o interior do polímero, a fim de manter o equilíbrio das pressões osmóticas, da água, dentro e fora do material (Figura 26), este comportamento já foi descrito por GEISE *et al.* [57] em outros meios iônicos análogos aos deste trabalho.

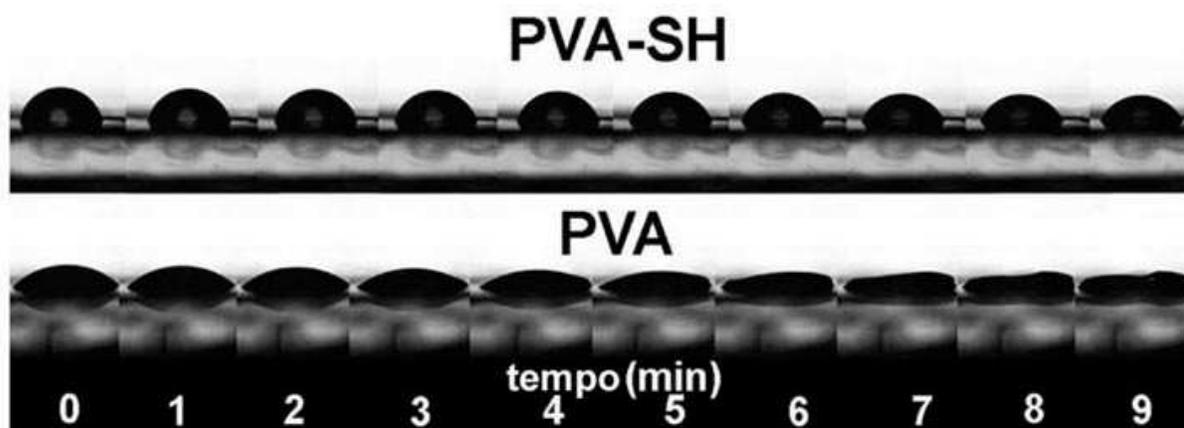


**Figura 26.** Representação esquemática do intumescimento em meio de água deionizada e em meio de tampão PBS.

#### 4.7 – Medidas de ângulo de contato

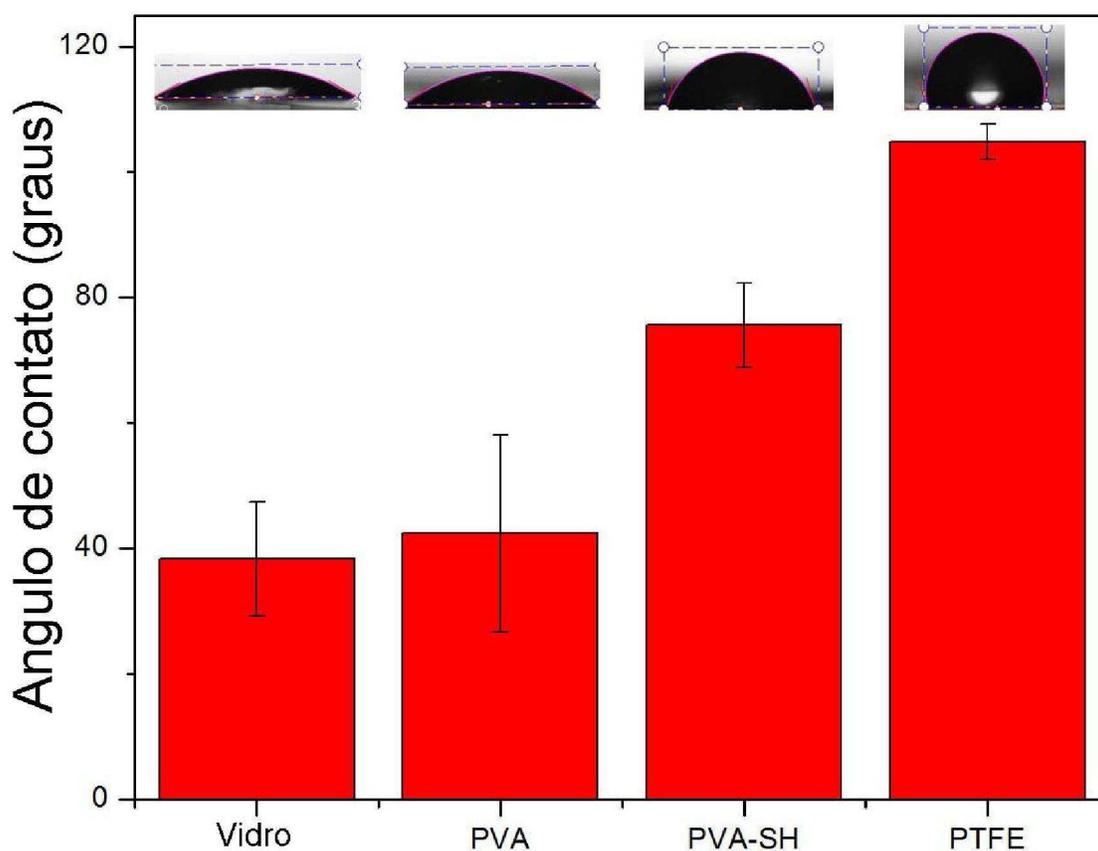
A molhabilidade dos filmes de PVA-SH foi confirmada por medidas de ângulo de contato, estas medidas estão representadas na imagem da Figura 27. Esta imagem mostra que o ângulo de contato da água decresce de um valor inicial médio de  $75^\circ$  para  $60^\circ$ , devido a um intumescimento local, após 9 minutos sem nenhuma evidência de solubilização para o PVA-SH. O decréscimo do ângulo de contato é resultado da absorção de água pelo filme. O filme de PVA não modificado mostra um menor ângulo de contato inicial médio ( $40^\circ$ ), devido ao maior número de hidroxilas disponíveis na superfície do filme resultando em uma superfície mais hidrofílica. Este filme, entretanto, sofre deformação ao longo do tempo, devido à grande capacidade de absorção de água, sendo impossível determinar seu ângulo de contato após 4 min, como pode ser observado na Figura 27.

Podemos ainda perceber uma notável diferença entre o ângulo de contato inicial médio do PVA não modificado ( $40^\circ$ ) e o ângulo inicial médio do PVA-SH ( $75^\circ$ ). O aumento do ângulo de contato para o filme de PVA-SH é consequência do consumo de hidroxilas do PVA pela reação de esterificação, como resultado, o PVA-SH apresenta uma menor hidrofiliabilidade em comparação com o PVA.



**Figura 27.** Variação do ângulo de contato devido à absorção de água para amostras de PVA não modificado e PVA-SH após 9 min.

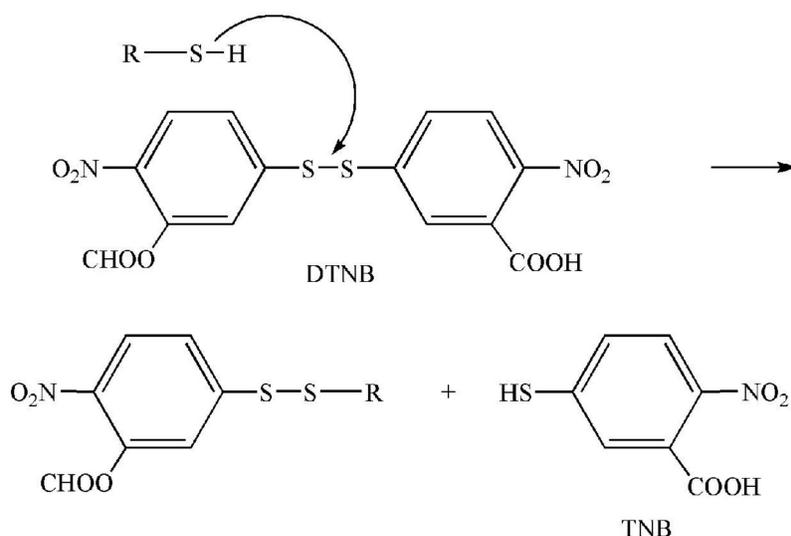
Um ensaio comparativo foi realizado e demonstrou a diferença na hidrofiliicidade das superfícies do PVA, PVA-SH em comparação com uma superfície de vidro, que exibe alta hidrofiliicidade e uma superfície de Teflon® (PTFE), que é sabidamente hidrofóbica. Os valores de ângulo de contato comparativo entre as superfícies estão demonstrados na Figura 28. Podemos notar que a hidrofiliicidade do PVA-SH em comparação ao PVA não modificado é reduzida. Porém, o filme de PVA-SH apresenta ainda um caráter hidrofílico, quando comparado a um material hidrofóbico como o Teflon®. Esta hidrofiliicidade é resultado da interação dos grupos hidroxila remanescentes (não esterificados) presentes no PVA-SH.



**Figura 28.** Análise dos ângulos de contato da superfície de amostras dos filmes de PVA e PVA-SH em comparação com vidro e Teflon® (PTFE).

## 4.8 - Quantificação de grupos sulfidril pelo método de Ellman

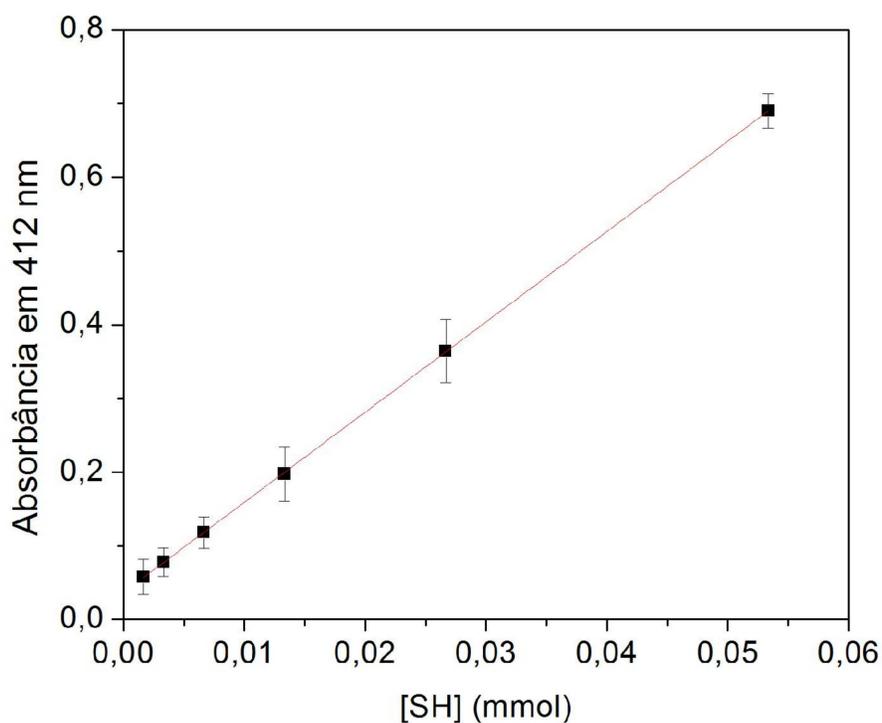
O método de quantificação de sulfidrilas (SH) proposto por Ellman permitiu determinar a concentração de grupos SH, por meio da reação com DTNB. Esta reação resultou na formação de uma ligação S-S entre um grupo R-SH e o DTNB. A reação também produziu o 5-tiol-(ácido nitrobenzóico), (TNB), que foi quantificado por sua banda de absorção característica em 412 nm [60,61]. Esta reação é demonstrada na Figura 29.



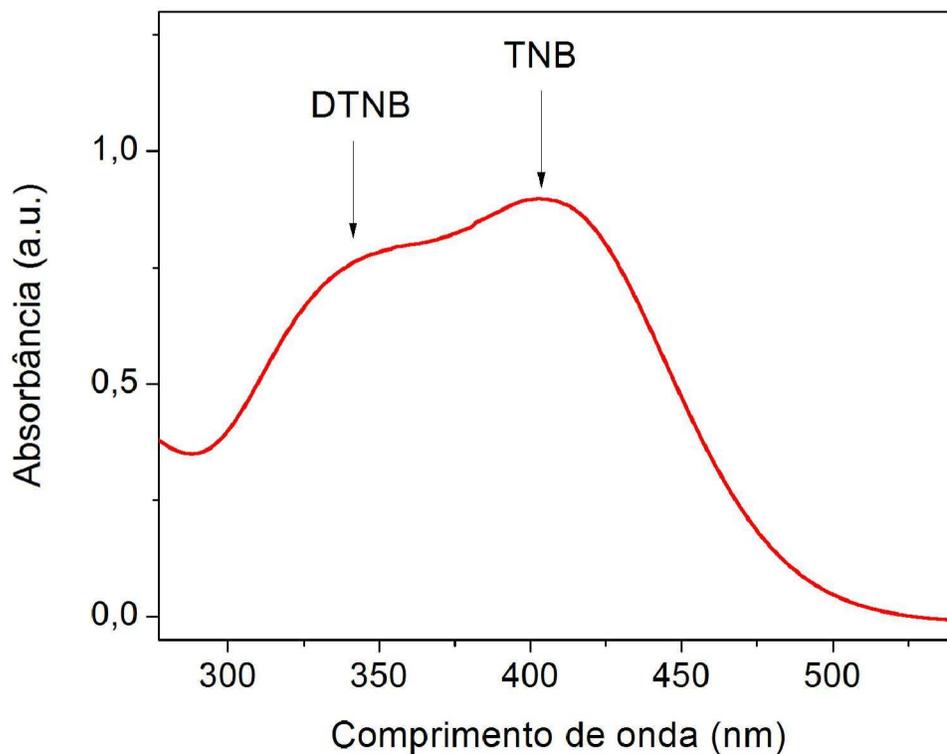
**Figura 29.** Representação da reação do DTNB com uma espécie R-sulfidril produzindo o TNB.

Foram realizadas medidas espectrofotométricas tomando-se os valores de absorbância em 412 nm, pico característico de absorção do TNB. A concentração molar do TNB corresponde diretamente à concentração de sulfidrilas presentes no filme de PVA-SH. Os valores obtidos foram interpolados em uma curva de calibração previamente obtida com uma solução de GSH (Figura 30). A concentração média de grupos SH presentes nas amostras de filme de PVA-SH determinada foi de  $10,8 \pm 2,9$  nmol de sulfidril por mg de filme. A fim de garantir

que todos os grupos R-SH fossem dimerizados, o DTNB foi colocado em excesso, assim nos espectro para determinação da concentração de SH foram observados dois picos sobrepostos, um referente ao TNB formado pela dimerização em 412 e outro pico referente ao excesso de DTNB (340 nm) em solução Figura 31.



**Figura 30.** Curva de calibração obtida por medidas espectrofotométrica para uma solução de GSH de concentração conhecida, para determinação da concentração de grupos SH pelo método de Ellman.

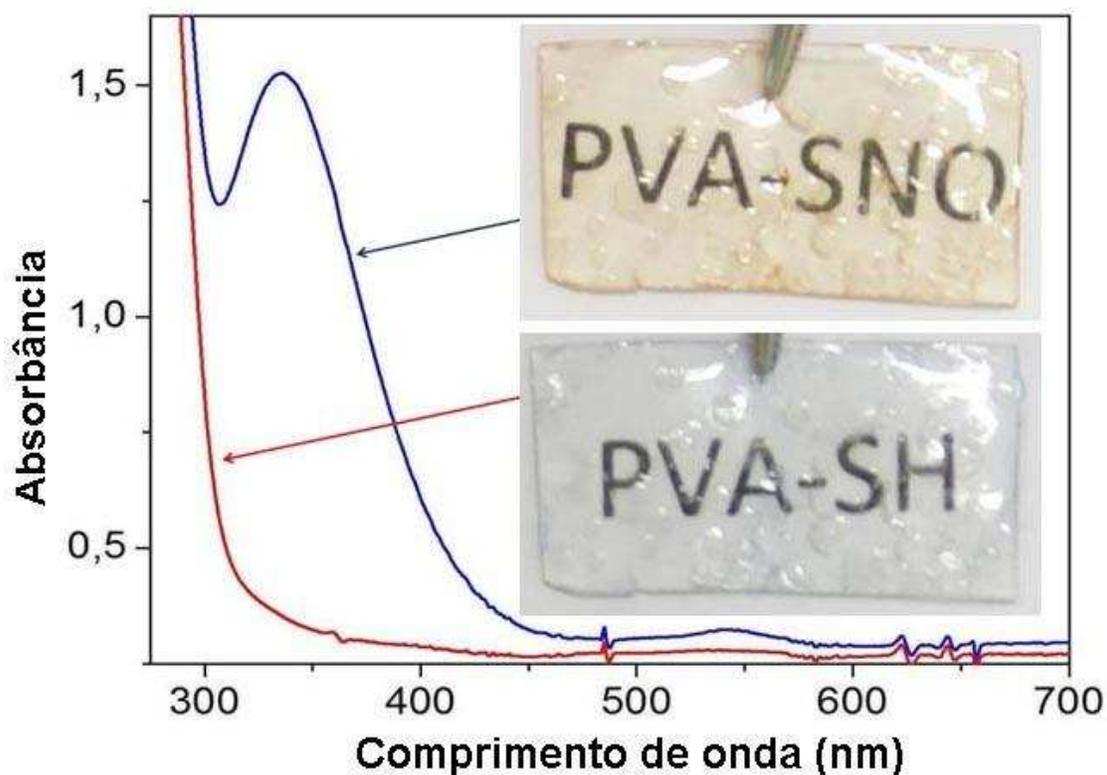


**Figura 31.** Espectro de absorção na região do UV-VIS representativo para amostras do filme de PVA-SH para quantificação de grupos SH pelo método de Ellman.

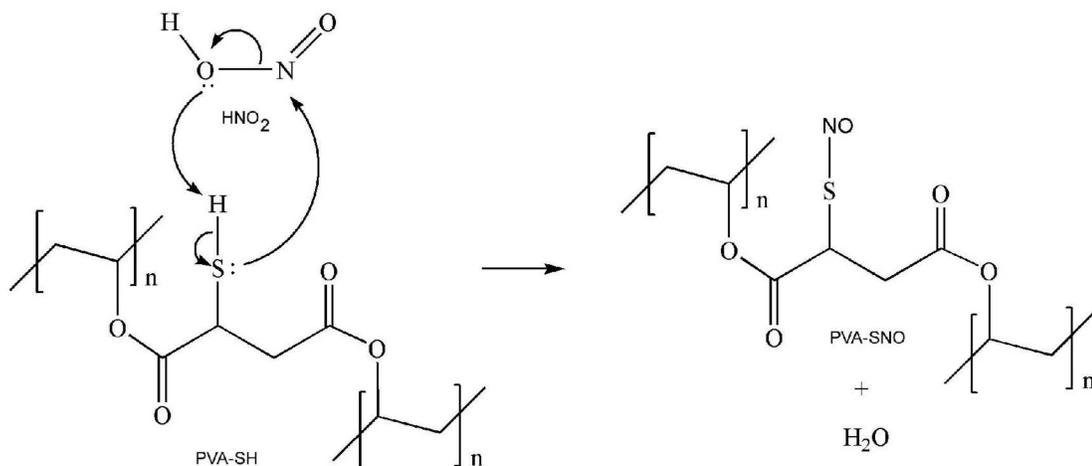
Por meio da concentração determinada para os grupos sulfidrilas é possível estimar o número de grupos OH consumidos por unidade de massa de PVA, sendo que para cada grupo SH ligado a cadeia ocorre concomitantemente o consumo de um par de hidroxilas, assim ca. 21,6 nmol de OH por mg de filme é consumido na reação de esterificação do PVA.

#### 4.9 - Confirmação da reação de S-nitrosação por espectroscopia UV-vis

A reação de S-nitrosação através da imersão dos filmes de PVA-SH em solução de ácido nitroso produz um filme S-nitrosado de PVA (PVA-SNO). Este processo pode ser acompanhado visualmente pelo desenvolvimento de uma coloração alaranjada no filme. Este fenômeno é característico da transição eletrônica do tipo  $N-\pi^*$  do grupo SNO em 545 nm (Figura 32). A reação de S-nitrosação é demonstrada na Figura 33, considerando-se uma S-nitrosação quantitativa onde o único subproduto da reação é água e PVA-SNO. A intensa banda UV-VIS em 336 nm no espectro do filme de PVA-SNO (Figura 32) também corresponde caracteristicamente ao grupo SNO [11,29], confirmando assim, a ligação S-NO nos filmes S-nitrosados.



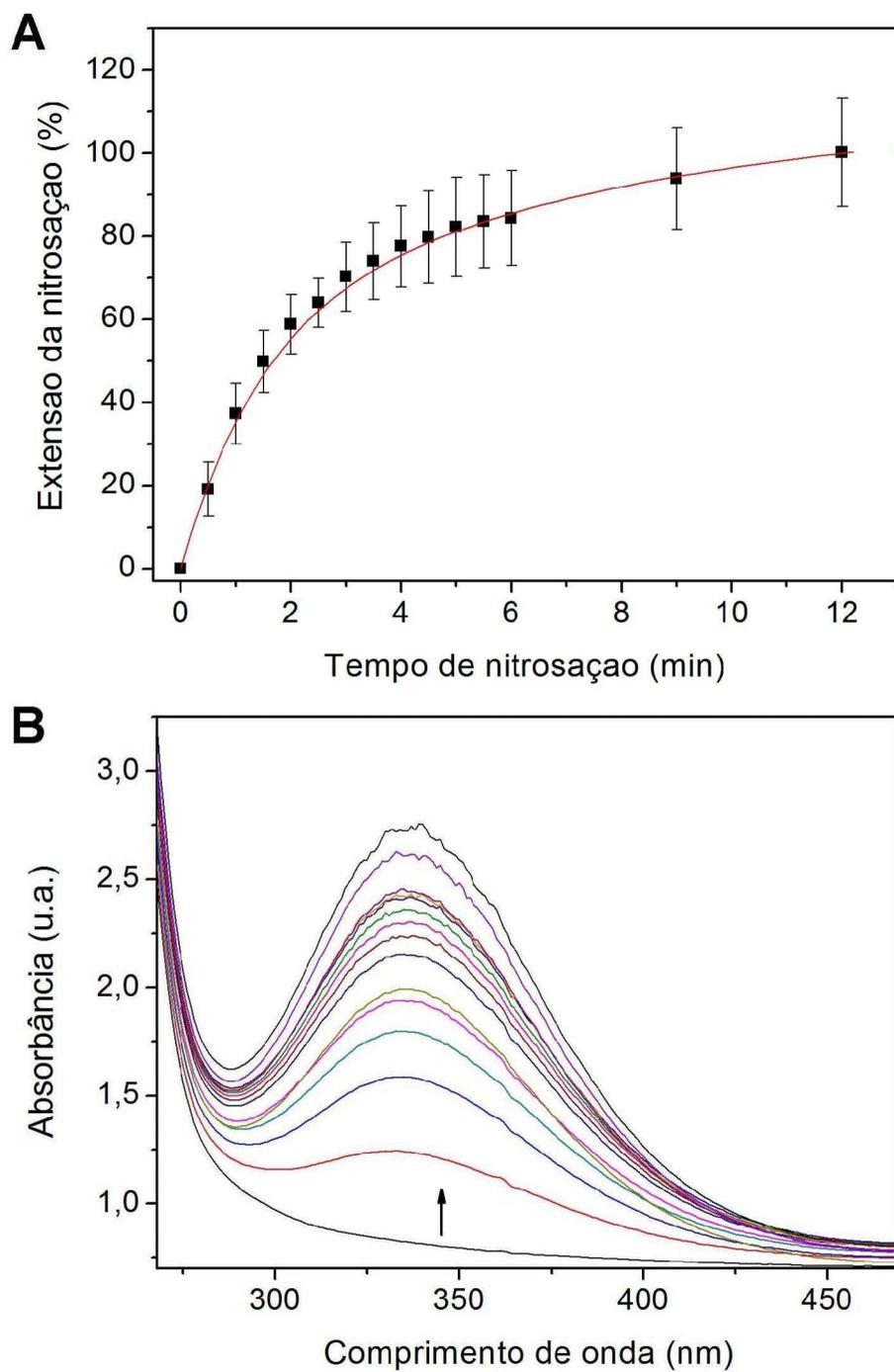
**Figura 32.** Espectros UV-VIS de amostras de filmes de PVA não modificado e PVA-SH correspondentes as imagens no inserto da figura.



**Figura 33.** Representação da reação de S-nitrosação do PVA-SH na presença de ácido nitroso.

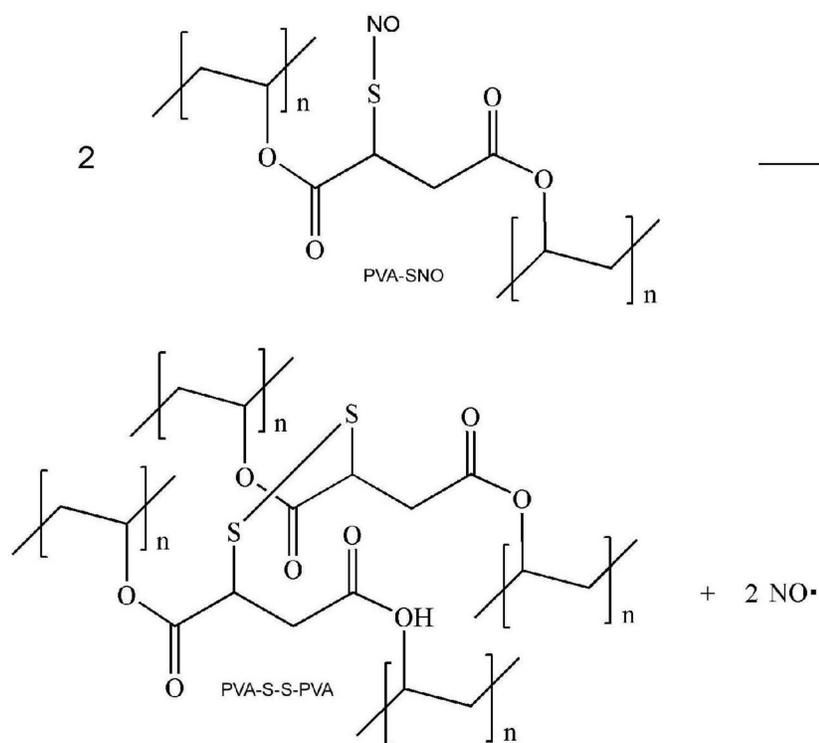
#### 4.10 – Cinética da reação de S-nitrosação

Com a finalidade de analisar a extensão da reação de S-nitrosação, foi realizado o acompanhamento da banda mais intensa, característica da ligação S-NO (336 nm), ao longo de 60 min, porém após 10 minutos é atingido o equilíbrio da reação de S-nitrosação e o sinal se mantém constante até 60 min. Por isso a curva da Figura 34 mostra apenas o período entre 0 e 12 min da reação de S-nitrosação. As amostras dos filmes de PVA-SH mostraram um aumento exponencial da concentração de NO, atingindo uma extensão de S-nitrosação de 100 % em um tempo médio de 10 min. Este fenômeno está representado na Figura 34, que demonstra o aumento da concentração de grupos S-NO ao longo do tempo de S-nitrosação. Este resultado permite ainda, estabelecer uma relação entre o tempo de S-nitrosação e a carga de NO que se deseja obter, por massa de filme. Este resultado, juntamente com o tempo de aplicação, permite modular a dose de NO que será liberado topicamente na aplicação do filme.



**Figura 34.** (A) Curva representativa da extensão de S-nitroação em função do tempo, para amostras do filme de PVA-SH; (B) Acompanhamento espectral, do aumento da concentração de grupos S-NO em função do tempo de S-nitroação, por meio da banda característica em 336 nm.

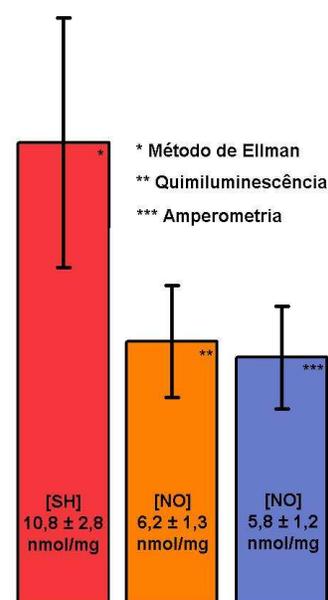
A literatura relata que S-nitrosotióis primários sofrem decomposição térmica espontânea, liberando NO, através da quebra homolítica da ligação S-N com a formação concomitante de pontes de enxofre (S-S) [14,18]. Esta reação, representada na Figura 35, promove uma segunda etapa de reticulação ao material por meio de formação das ligações S-S, tornando assim o material (PVA) ainda mais insolúvel, como proposto inicialmente por este trabalho.



**Figura 35.** Decomposição térmica espontânea do filme de PVA-SNO com a formação da ligação S-S e liberação do NO.

#### 4.11 - Cálculo da carga de NO por amperometria e por quimiluminescência.

A cinética e a carga de NO, proveniente do filme de PVA-SNO, foram medidas pelas técnicas de amperometria e quimiluminescência. As medidas por estas duas técnicas, permitiram quantificar uma carga de NO de  $6,2 \pm 1,3$  nmol por mg de filme pela técnica de quimiluminescência e  $5,8 \pm 1,2$  nmol por mg de filme pela técnica amperométrica. Estes valores são estatisticamente iguais e permitem verificar a consistência do teor de NO por meio das duas técnicas. Estes valores ainda permitem verificar que a concentração de grupos NO é diferente da concentração de grupos SH determinado previamente pelo método proposto por ELLMAN [60] ( $10,8 \pm 2,8$ ) e que está demonstrado na Figura 36. Esta diferença ocorre provavelmente pelo consumo dos grupos SH por reação de oxidação formando grupos sulfato e sulfito que não sofrem a reação de S-nitrosação, desta forma somente ca. 60% dos grupos SH iniciais são convertidos a grupos SNO.



**Figura 36.** Gráfico comparativo entre a concentração de grupos SH presentes no filme de PVA-SH, determinado pelo método proposto por Ellman (barra vermelha) e a concentração de grupos NO presente no filme de PVA-SNO, determinado por técnica de quimiluminescência (barra laranja) e amperometria (barra roxa).

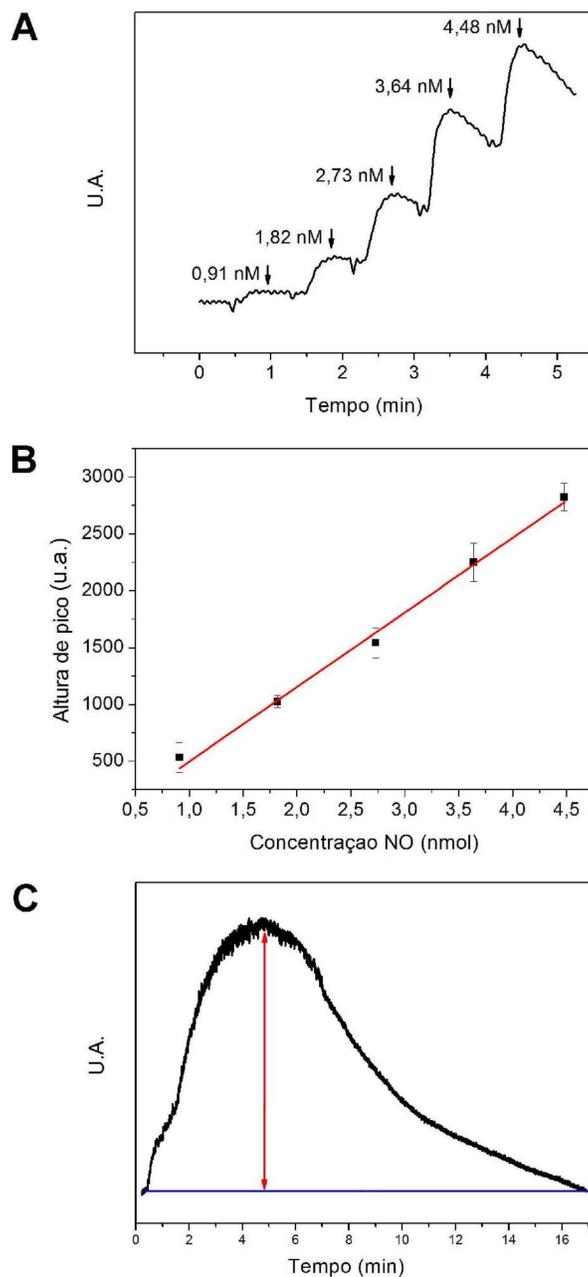
Os valores de carga de NO, proveniente dos filmes de PVA-SNO quantificados por ambas as técnicas, foram obtidos por interpolação dos valores correspondente às amostras, com curvas de calibração obtidas previamente com solução padrão de GSNO.

A Figura 37 mostra uma curva representativa do sinal obtido pela injeção da solução padrão de GSNO para obtenção de uma curva de calibração Figura 37 (A) e a medida de uma amostra do filme de PVA-SNO Figura 37 (C), por amperometria. Este sinal pode ser quantificado em função da altura do pico, fornecendo assim, uma correlação entre a altura de pico e concentração de NO. Desta forma, é possível medir a altura de pico, sinal produzido pelo filme de PVA-SNO, e determinar a concentração de NO liberado.

De forma análoga, a Figura 38 também mostra uma curva representativa do sinal obtido pela injeção da solução padrão de GSNO para obtenção de uma curva de calibração Figura 38 (A) e a medida de uma amostra do filme de PVA-SNO Figura 38 (C), por quimiluminescência. Este sinal pode ser quantificado em função da área do pico, fornecendo assim, uma correlação entre a área de pico e a concentração de NO. Desta forma é possível medir a área pico proveniente do sinal produzido pelo filme de PVA-SNO e determinar a concentração de NO liberado.

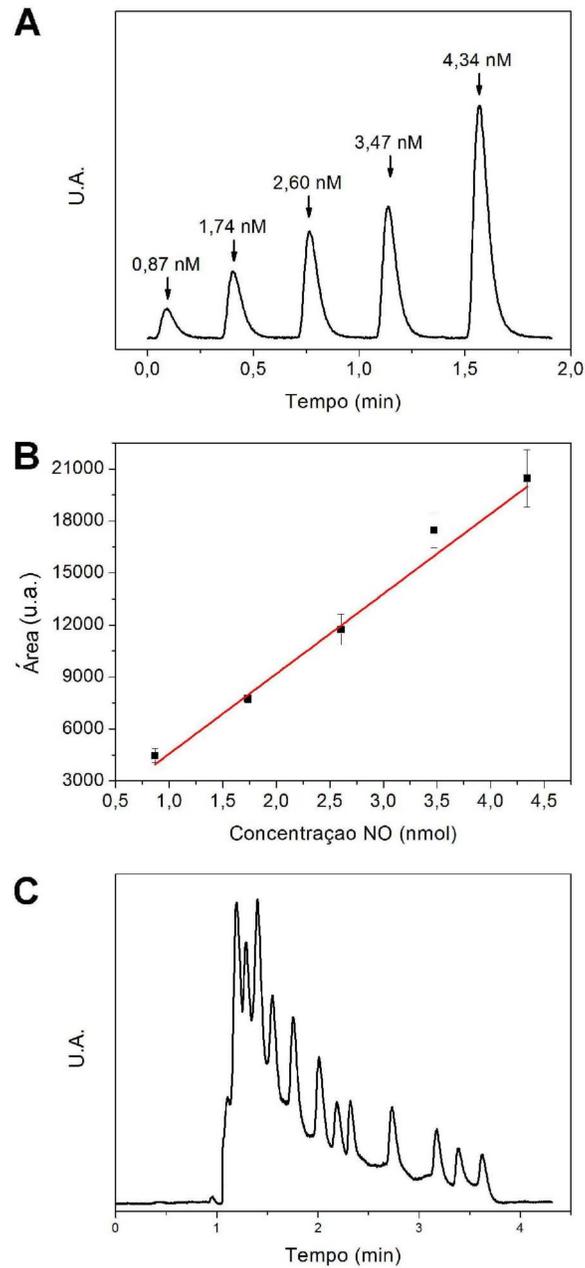
Em meios onde nenhum agente redutor está presente, o NO é liberado espontaneamente pela quebra da ligação S-NO dos filmes de PVA-SNO. Nesta condição a liberação de NO ocorre, inicialmente na interface filme/solução (NO superficial) e se difunde rapidamente para a solução, este efeito pode ser observado no *burst* de liberação de NO após o contato com do material com a solução de PBS (Figura 39). Porém, uma parcela do NO liberado é proveniente da matriz (*bulk*) do material, este NO deve se difundir por todo o ambiente polimérico durante o processo de absorção de solução e por isso leva a uma liberação mais lenta do NO proveniente da matriz (*bulk*).

## Amperometria



**Figura 37.** (A) perfil da medida de NO em solução padrão de GSNO 70  $\mu\text{M}$  (10-50  $\mu\text{L}$ ) obtido por técnica amperométrica; (B) curva de calibração obtida por medidas em triplicata pela técnica amperométrica; (C) perfil representativo de liberação de NO na presença de catalisador, obtido por medida amperométrica em solução de Cu(I).

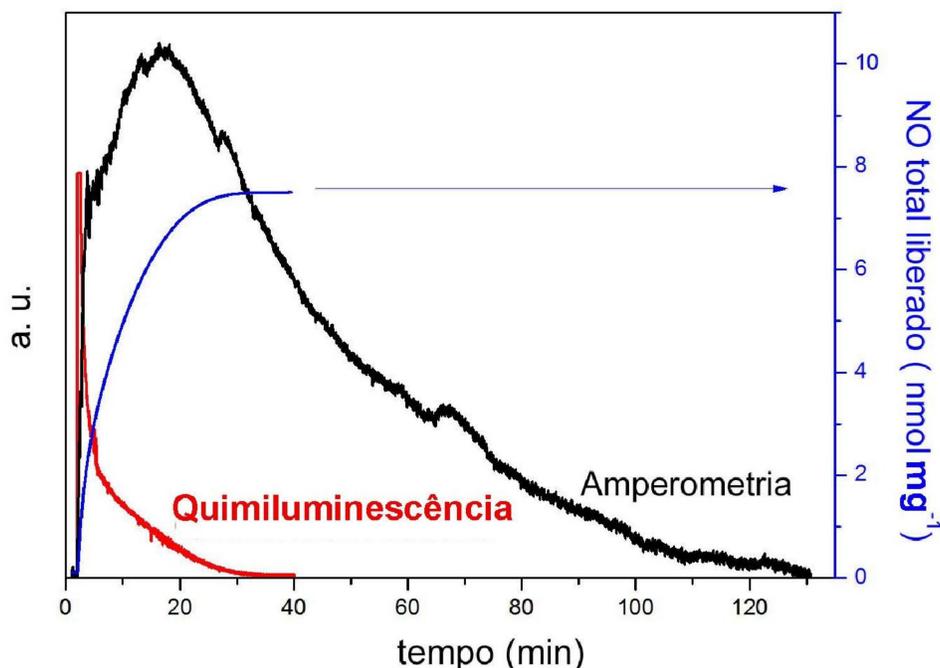
## Quimiluminescência



**Figura 38.** (A) perfil representativo da resposta amperométrica frente a dosagem de NO em solução padrão de GSNO 70  $\mu$ M (10-50  $\mu$ L) obtido por técnica de quimiluminescência; (B) curva de calibração obtida por meio de medidas em triplicata pela técnica de quimiluminescência; (C) perfil representativo de liberação de NO medido por quimiluminescência em solução de ascorbato, pH 11.

Estes dois fenômenos são mostrados na Figura 39, onde podemos observar as curvas de liberação obtidas pelas técnicas de quimiluminescência e amperometria. Na medida feita por quimiluminescência o NO é constantemente arrastado para o detector por um fluxo de N<sub>2</sub> impedindo o acúmulo de NO liberado na solução de PBS. Neste perfil de liberação observa-se um *burst* inicial em ca. 3 min, seguido por um decaimento que se estende até 40 min. Analogamente, nas medidas por amperometria observa-se um *burst* inicial também em ca. 3 min, porém, neste caso não há um fluxo de N<sub>2</sub> arrastando o NO, o que resulta em um acúmulo contínuo de NO. Após os 3 min iniciais, ocorre aumento da concentração de NO a uma taxa menor, este efeito se estende até ca. de 20 min (liberação total da carga de NO), esta seção, da curva amperométrica, é equivalente ao decaimento visto na curva obtida pelo método de quimiluminescência (Figura 39), sendo que este sinal se extingue após 40 min. A seção final da curva obtida por amperometria (após 20 min) reflete o consumo do NO pela presença de O<sub>2</sub> dissolvido na solução de PBS, sendo este sinal totalmente extinto após 130 min.

Para uma amostra particular, cuja liberação de NO está representada pela curva obtida por quimiluminescência na Figura 39, a carga de NO calculada foi de 7,5 nM por mg de filme. A taxa de liberação de NO para esta amostra está representada pela linha azul na Figura 39, onde se observa a liberação total após 20 min.



**Figura 39.** Curva cinética de liberação de NO em amostra de filme de poli(álcool vinílico) S-nitrosado (PVA-SNO) após imersão em solução PBS pH 7.4 a 37 °C, medidas por amperometria (linha preta) e quimiluminescência (linha vermelha), e curva de taxa de liberação de NO em tempo real (linha azul) do perfil obtido por técnica quimiluminescência.

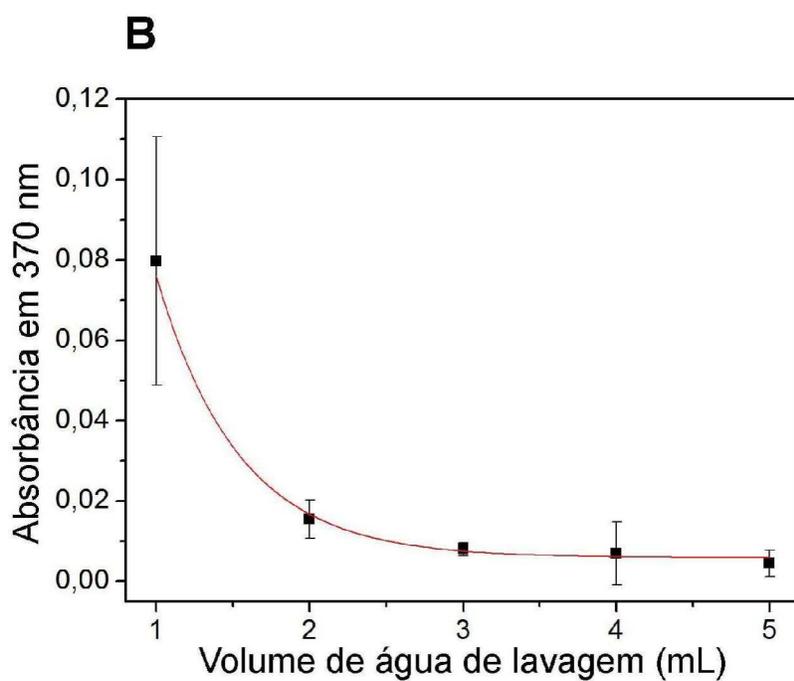
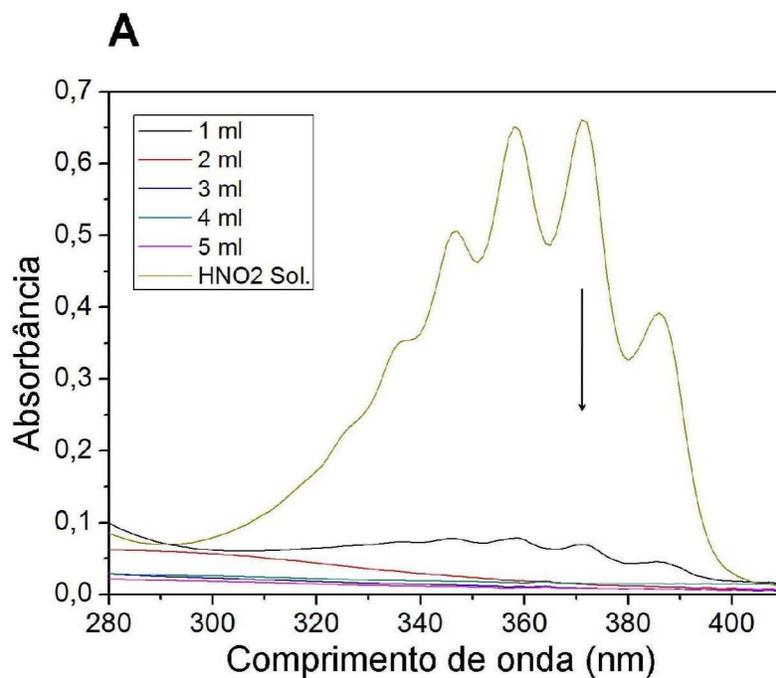
#### 4.12 - Lavagem dos filmes S-nitrosados de PVA-SH

Como forma de testar a eficiência do processo de lavagem dos filmes, após a etapa de S-nitrosação, amostras da água de lavagem dos filmes foram analisadas por espectroscopia UV-VIS. Esta análise permite afirmar que todo ácido nitroso (HONO) é removido das amostras de filme após a etapa de S-nitrosação. Permite também afirmar que o efeito observado na aplicação tópica do material se deve exclusivamente à liberação do NO proveniente do filme.

O ácido nitroso tem banda de absorção característica que se apresenta como uma larga banda com resolução vibracional (5 picos). O acompanhamento do pico em 370 nm permite verificar que após lavar o filme (1 cm<sup>2</sup> de área) com 5

mL de água deionizada (em alíquotas sucessivas de 1 mL), é suficiente para remover a maior parte do HONO sendo apenas observado um pequeno sinal, relativo a traços do HONO remanescentes, após a lavagem dos filmes.

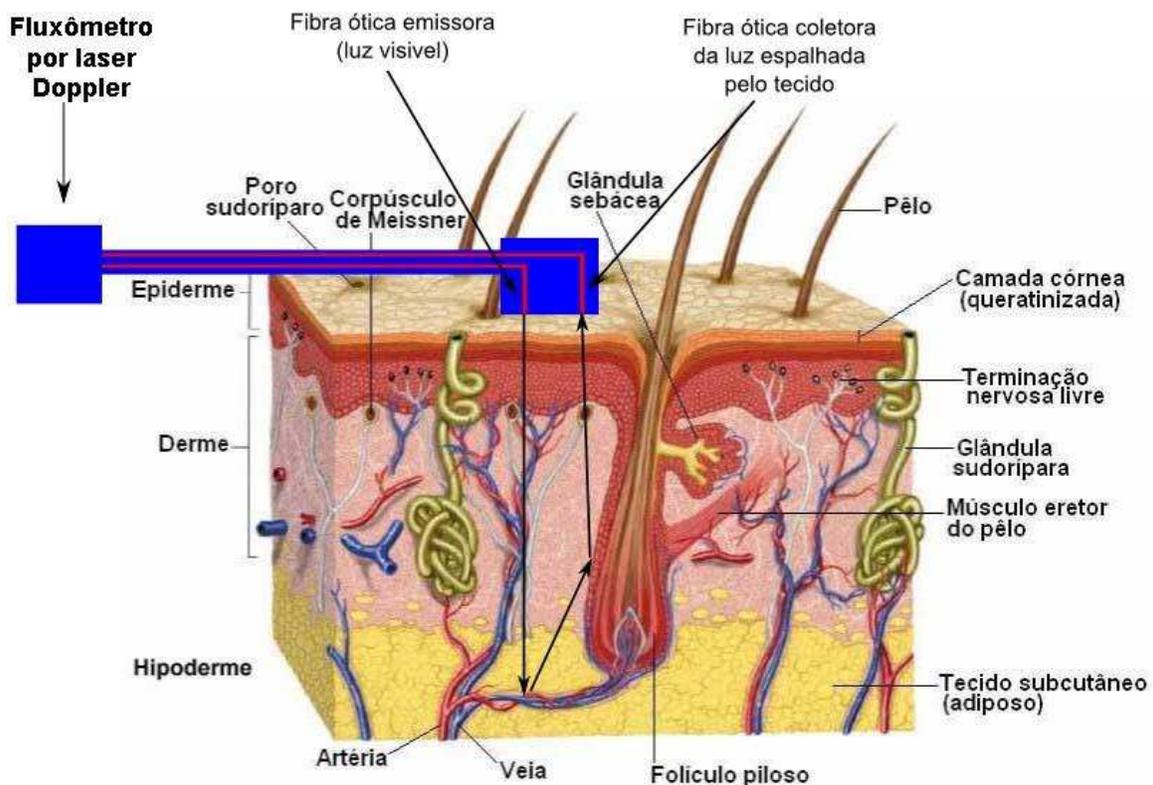
Os filmes produzidos e S-nitrosados, após a etapa de S-nitrosação, são lavados com 20 mL de água deionizada para cada  $\text{cm}^2$  de filme (10 mL por face de filme) antes dos testes de aplicação sobre a pele. Este resultado permite verificar que 20 mL de água deionizada por  $\text{cm}^2$  de filme, equivalem a quatro vezes o volume mínimo necessário para remover de forma eficiente o HONO das amostras. Este resultado confirmou que todo efeito decorrente da aplicação tópica do filme, é resultado da difusão do NO liberado, exclusivamente, pelo filme de PVA-SNO. Os espectros característicos e a curva do decaimento da concentração de HONO estão expressos na Figura 40.



**Figura 40.** (A) Acompanhamento espectral, em 370 nm, do decaimento da concentração de HONO, por meio da banda com resolução vibracional característica, após a S-nitrosação dos filmes de PVA-SNO. (B) Curva de decaimento de concentração de HONO em amostras de PVA-SNO durante o processo de lavagem dos filmes.

### 4.13 - Fluxometria por laser Doppler (LDF)

A medida de fluxometria por laser Doppler se baseia na emissão de um feixe de laser que incide sobre a pele por meio de uma fibra ótica da sonda de medida. Este feixe, penetra até 1 mm na camada mais superficial da pele e atinge os microvasos subcutâneos. As células vermelhas do sangue (eritrócitos), ao se movimentarem, com o fluxo sanguíneo, modificam o comprimento de onda do feixe ao refleti-lo (efeito Doppler). O feixe refletido é espalhado pelas estruturas internas da pele (Figura 41), sendo que uma parte deste feixe é então espalhado em direção a superfície da pele. Este feixe que chega a superfície da pele é captado por uma segunda fibra ótica na sonda e em função da variação do comprimento de onda do laser, é possível determinar uma variação no fluxo sanguíneo. A Figura 41 ilustra de forma esquemática a medida por fluxometria por laser Doppler.



**Figura 41.** Ilustração esquemática da medida de fluxometria por laser Doppler (Imagem adaptada de <http://www.betaneamartins.com.br/procedures-view/estrutura-da-pele/>).

A técnica de medida, por fluxometria por laser Doppler (LDF) é uma técnica bem estabelecida e não invasiva para medidas da microcirculação [16,24,62]. Neste trabalho a técnica permitiu uma estimativa no quadro de aumento do fluxo sanguíneo, associado a um eritema local de 1 cm x 1 cm, produzido pela aplicação tópica do filme de PVA-SNO.

Para as medidas com os filmes de PVA-SNO, as sondas foram fixadas exatamente no local de aplicação dos filmes e estes foram aplicados no antebraço dos voluntários e retirados após o tempo pré-estabelecido. As amostras de filme e as sondas foram fixadas com fita adesiva hipoalergênica grau médico, garantindo assim um efeito exclusivamente ligado à liberação local de NO proveniente do filme. A Figura 42 ilustra as sondas fixadas na parte ventral do antebraço de um voluntário. As imagens da Figura 42 são ilustrativas, porém para a medida da razão de aumento, inicialmente fixou-se uma sonda no braço e depois de medido o fluxo basal, a sonda foi retirada e o filme foi aplicado pelo período determinado. Em seguida, o filme foi retirado e a sonda reposicionada exatamente no local de aplicação do filme, mediu-se então novamente o fluxo sanguíneo.

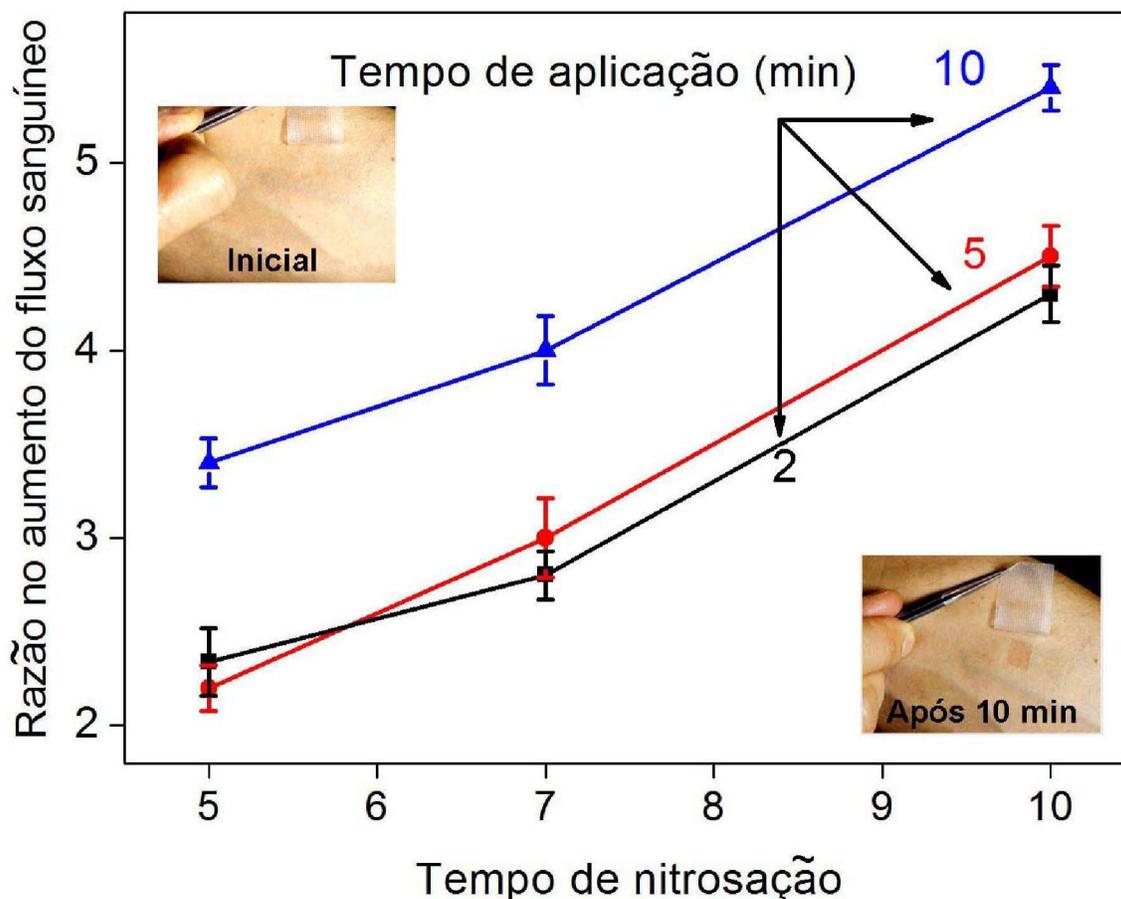


**Figura 42.** Imagem ilustrativa da fixação das sondas para obtenção de dados pela técnica de LDF obtida no laboratório onde foi desenvolvido o trabalho da tese.

Nas medidas de LDF somente um volume local de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> e uma profundidade de 1 mm dentro do tecido é amostrado, isto é, a medida do efeito é restrita à área visual do eritema, o qual tem a mesma área do filme aplicado (Insero da Figura 43). Verificou-se que o eritema desaparece após a remoção do filme, em intervalos de tempo que variam de 10 min até algumas horas, dependendo do tempo de contato anterior, da pele com o filme e do tempo de S-nitrosação. A Figura 43 mostra a relação entre o aumento do fluxo sanguíneo, em função da aplicação tópica do filme sobre a pele do antebraço dos voluntários. Estes são resultados preliminares e outros voluntários não foram recrutados para este estudo.

Estudos anteriores, realizados no grupo onde esta inserido este trabalho, envolvendo a aplicação tópica de géis liberadores de NO no antebraço de voluntários, foram aprovados por um comitê de ética local da Universidade Estadual de Campinas. Neste estudo anterior, os testes com materiais levaram a aumentos no fluxo sanguíneo da ordem de 2 a 4 vezes, em relação ao nível basal nos respectivos locais de aplicação, sendo que o fluxo retornava ao estado basal após 10 min de aplicação do gel [16,24].

Neste presente estudo uma dose-resposta, quase linear para a razão do aumento do fluxo sanguíneo, foi obtida com a aplicação dos filmes de PVA-SNO nitrosados por imersão em solução de ácido nitroso por períodos de 5,7 e 10 minutos. O aumento do fluxo sanguíneo verificado, é similar após tempos de aplicação de 2 e 5 min, levando a um aumento de 2 a 4,5 vezes maior que o nível basal. Níveis mais altos de fluxo sanguíneo são observados após a aplicação por 10 min, levando a um aumento da ordem de 3,5 a 5,5 vezes maior que o nível basal, como mostrado na Figura 43.



**Figura 43.** Tempos e doses-respostas de aplicações tópicas de filmes de PVA-SNO liberador de oxido nítrico sobre tecido do antebraço de voluntários. As curvas mostram a razão de aumento de fluxo sanguíneo na região exposta ao filme de PVA-SNO aumentando a carga com o tempo de S-nitroação (5,7 e 10 min) aplicados durante 2,5 e 10 min. As imagens nos inserts mostram a aplicação do filme sobre o antebraço do autor antes da aplicação do filme e após a aplicação por 10 min, que provoca uma resposta hiperêmica (vermelhidão) local.

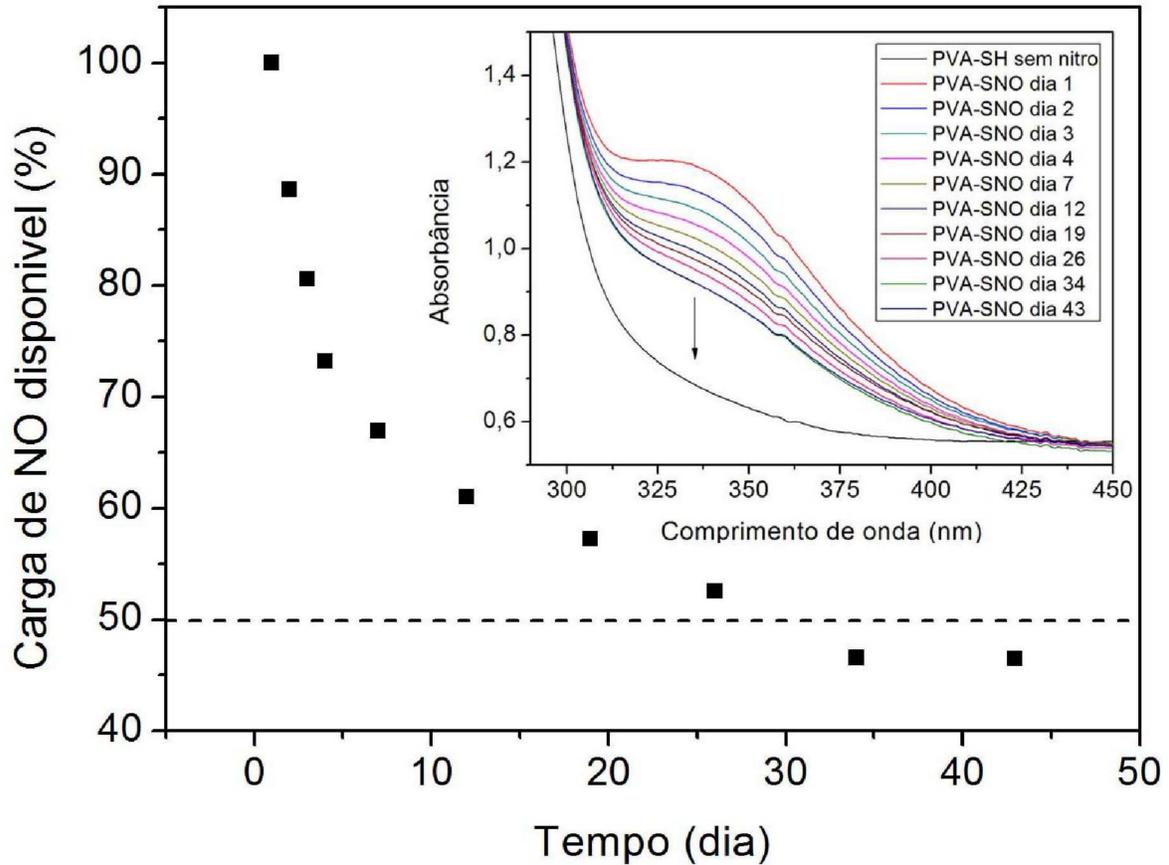
Estes resultados mostram que o efeito de liberação local de NO para a vasodilatação dérmica pode ser modulado pelo aumento no tempo de S-nitroação, o qual leva a maiores concentrações de NO, limitado apenas pelo número de grupos SH disponíveis para ser S-nitrosado. Os resultados mostram também que os filmes de PVA-SNO podem ser aplicados topicamente

promovendo uma rápida, e duradoura vasodilatação dérmica. Testes adicionais demonstram também que o efeito vasodilatador se mantém por pelo menos 4 h se o filme for mantido no local de aplicação e que seu efeito cessa em menos de 10 min após a retirada do filme.

Assim, podemos afirmar que este material apresenta grande potencial para o tratamento de doenças microvasculares dérmicas tais como, as associadas à síndrome de Raynaud e angiopatias decorrentes da diabetes.

#### **4.14 - Teste de estabilidade do filme S-nitrosado**

Medidas de absorvância em 336 nm, banda característica da ligação (S-NO), demonstram um decaimento da concentração de NO para os filmes de PVA-SNO ao longo do tempo (Figura 44). A metade da carga inicial de NO ( $t_{1/2}$ ) é atingida entre o dia 26 e o dia 34, nota-se também que o decaimento da carga de NO após 34 dias se mantém praticamente inalterada até o 43° dia de medida. Isto permite dizer que os filmes de PVA-SNO, quando armazenados em embalagens hermeticamente fechadas, livre de umidade e com invólucro que os proteja da luz (metalizado) a temperatura de 25 °C preserva, ao menos, uma concentração *ca.* 50 % da carga inicial do filme de PVA-SNO (linha tracejada).



**Figura 44.** Perfil característico do decaimento da concentração de NO em filmes de PVA-SNO ao longo do tempo. Inseto: espectros de absorção na região UV-VIS com pico em 336 nm, demonstrando o decaimento da concentração de NO. A linha tracejada representa 50% da carga inicial de NO.

## 5 – Conclusões

- A modificação do poli(álcool vinílico), PVA, pela sua reticulação química através da esterificação com o ácido mercaptosuccínico produziu um material reticulado e insolúvel em meio aquoso.
- Esta reticulação suprime a cristalização do PVA, levando a um material sem poros, com uma distribuição homogênea de grupos sulfidril (-SH).
- Os grupos hidroxila remanescentes na rede de PVA-SH conferiram uma hidrofiliabilidade parcial ao material, associada a um grau de intumescimento de 80 a 120 % em meio aquoso.
- A S-nitrosação dos filmes de PVA-SH levou à sua funcionalização com grupos S-nitrosotióis (PVA-SNO) capazes de liberar NO espontaneamente após imersão em meio fisiológico.
- A aplicação tópica dos filmes de PVA-SNO hidratados sobre a pele saudável, levou a um aumento dependente da dose e do tempo de mais de 5 vezes no fluxo sanguíneo basal em menos de 10 min de aplicação com uma ação prolongada de mais de 4 h durante a aplicação contínua.
- Estes resultados mostram que os filmes de PVA-SNO podem representar uma alternativa no desenvolvimento de novos biomateriais e tem potencial para o tratamento tópico de desordens microvasculares da pele.

## 6 – Sugestões para trabalhos futuros

- Realização de ensaios mecânicos para verificar a resistência do material.
- Investigar se é possível aumentar o grau de reticulação e a concentração de grupos SH disponíveis para S-nitrosação.
- Desenvolver estratégias para evitar o consumo de grupos sulfidrilas por oxidação.
- Investigar qual o efeito da reação de S-nitrosação por outras vias, como a via por nitrosação gasosa.

## 7 – Referências

- [1] K. Mujoo, J.S. Krumenacker, F. Murad, Nitric oxide-cyclic GMP signaling in stem cell differentiation, *Free Radic. Biol. Med.*, 51 (2011) 2150–7.
- [2] S. Moncada, M.W. Radomski, R.M. Palmer, Endothelium-derived relaxing factor Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function, *Biochem. Pharmacol.*, 37 (1988) 2495–501.
- [3] D. Tsikas, R.H. Böger, J. Sandmann, S.M. Bode-Böger, J.C. Frölich, Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox, *FEBS Lett.*, 478 (2000) 1–3.
- [4] R. Iyengar, D.J. Stuehr, M.A. Marletta, Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 84 (1987) 6369–73.
- [5] U. Förstermann, E.I. Closs, J.S. Pollock, M. Nakane, P. Schwarz, I. Gath, H. Kleinert, Nitric oxide synthase isozymes Characterization, purification, molecular cloning, and functions, *Hypertension*, 23 (1994) 1121–1131.
- [6] E.I. Closs, F.Z. Basha, A. Habermeier, U. Förstermann, Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y<sup>+</sup> carrier hCAT-2B, *Nitric Oxide*, 1 (1997) 65–73.
- [7] L.A. Holowatz, C.S. Thompson-Torgerson, W.L. Kenney, The human cutaneous circulation as a model of generalized microvascular function, *J. Appl. Physiol.*, 105 (2008) 370–2.
- [8] A.B. Seabra, a Fitzpatrick, J. Paul, M.G. de Oliveira, R. Weller, Topically applied S-nitrosothiol-containing hydrogels as experimental and pharmacological nitric oxide donors in human skin, *Br. J. Dermatol.*, 151 (2004) 977–83.
- [9] E. Turton, vascular review - The aetiology of Raynaud's phenomenon, *Cardiovasc. Surg.*, 6 (1998) 431–440.
- [10] A.T. Tucker, R.M. Pearson, E.D. Cooke, N. Benjamin, Effect of nitric-oxide-generating system on microcirculatory blood flow in skin of patients with severe Raynaud's syndrome: a randomised trial, *Lancet*, 354 (1999) 1670–5.
- [11] T.P. Amadeu, A.B. Seabra, M.G. de Oliveira, A. Monte-Alto-Costa, Nitric oxide donor improves healing if applied on inflammatory and proliferative phase, *J. Surg. Res.*, 149 (2008) 84–93.

- [12] M.C. Jen, M.C. Serrano, R. Van Lith, G.A. Ameer, Polymer-Based Nitric Oxide Therapies: Recent Insights for Biomedical Applications, *Adv. Funct. Mater.*, 22 (2012) 239–260.
- [13] Q.K. Timerghazin, G.H. Peslherbe, A.M. English, Resonance description of S-nitrosothiols: insights into reactivity, *Org. Lett.*, 9 (2007) 3049–52.
- [14] M.G. De Oliveira, M. Shishido, A.B. Seabra, N.H. Morgon, Thermal Stability of Primary S-Nitrosothiols: Roles of Autocatalysis and Structural Effects on the Rate of Nitric Oxide Release, *J. Phys. Chem. A*, 2002, 106 (38), pp 8963–8970.
- [15] S.M. Shishido, A.B. Seabra, W. Loh, M.G. de Oliveira, Thermal and photochemical nitric oxide release from S-nitrosothiols incorporated in Pluronic F127 gel: potential uses for local and controlled nitric oxide release, *Biomaterials*, 24 (2003) 3543–3553.
- [16] M.M.D.S.G. Simões, M.G. de Oliveira, Poly(vinyl alcohol) films for topical delivery of S-nitrosoglutathione: effect of freezing-thawing on the diffusion properties, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, 93 (2010) 416–24.
- [17] C.P.M.S. Oliveira, V.A.F. Alves, V.M.R. Lima, J.T. Stefano, V. Debbas, S.V. Sá, A. Wakamatsu, M.L. Corrêa-Giannella, E.S. de Mello, S. Havaki, D.G. Tiniakos, E. Marinos, M.G. de Oliveira, D. Giannella-Neto, F.R. Laurindo, S. Caldwell, F.J. Carrilho, Modulation of hepatic microsomal triglyceride transfer protein (MTP) induced by S-nitroso-N-acetylcysteine in ob/ob mice, *Biochem. Pharmacol.*, 74 (2007) 290–7.
- [18] A.B. Seabra, M.G. De Oliveira, Poly(vinyl alcohol) and poly(vinyl pyrrolidone) blended films for local nitric oxide release, *Biomaterials*, 25 (2004) 3773–82.
- [19] A.B. Seabra, M.G. De Oliveira, Poly(vinyl alcohol) and poly(vinyl pyrrolidone) blended films for local nitric oxide release, *Biomaterials*, 25 (2004) 3773–82.
- [20] J. Kopeček, J. Yang, Hydrogels as smart biomaterials, *Polym. Int.*, 56 (2007) 1078–1098.
- [21] A.B. Seabra, E. Pankotai, M. Fehér, A. Somlai, L. Kiss, L. Bíró, C. Szabó, M. Kollai, M.G. de Oliveira, Z. Lacza, S-nitrosoglutathione-containing hydrogel increases dermal blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats, *Br. J. Dermatol.*, 156 (2007) 814–8.
- [22] T.P. Amadeu, A.B. Seabra, M.G. de Oliveira, A.M.A. Costa, S-nitrosoglutathione-containing hydrogel accelerates rat cutaneous wound repair, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 21 (2007) 629–37.

- [23] J.L. Georgii, T.P. Amadeu, A.B. Seabra, M.G. de Oliveira, A. Monte-Alto-Costa, Topical S-nitrosoglutathione-releasing hydrogel improves healing of rat ischaemic wounds, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 5 (2011) 612–9.
- [24] R. Vercelino, T.M. Cunha, E.S. Ferreira, F.Q. Cunha, S.H. Ferreira, M.G. Oliveira, Skin vasodilation and analgesic effect of a topical nitric oxide-releasing hydrogel, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, (2013).
- [25] M.C. Frost, M.M. Reynolds, M.E. Meyerhoff, Polymers incorporating nitric oxide releasing/generating substances for improved biocompatibility of blood-contacting medical devices, *Biomaterials*, 26 (2005) 1685–93.
- [26] V.B. Damodaran, J.M. Joslin, K.A. Wold, S.M. Lantvit, M.M. Reynolds, S-Nitrosated biodegradable polymers for biomedical applications: synthesis, characterization and impact of thiol structure on the physicochemical properties, *J. Mater. Chem.*, 22 (2012) 5990.
- [27] C.C. DeMerlis, D.R. Schoneker, Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA), *Food Chem. Toxicol.*, 41 (2003) 319–26.
- [28] A. Prudente, C.L.Z. Riccetto, M.M.D.S.G. Simões, B.M. Pires, M.G. De Oliveira, Impregnation of implantable polypropylene mesh with S-nitrosoglutathione-loaded poly(vinyl alcohol), *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 108C (2013) 178–184.
- [29] M. Qi, Y. Gu, N. Sakata, D. Kim, Y. Shirouzu, C. Yamamoto, A. Hiura, S. Sumi, K. Inoue, PVA hydrogel sheet macroencapsulation for the bioartificial pancreas, *Biomaterials*, 25 (2004) 5885–92.
- [30] T.C. Major, D.O. Brant, M.M. Reynolds, R.H. Bartlett, M.E. Meyerhoff, H. Handa, G.M. Annich, The attenuation of platelet and monocyte activation in a rabbit model of extracorporeal circulation by a nitric oxide releasing polymer, *Biomaterials*, 31 (2010) 2736–45.
- [31] M.M. Reynolds, M.C. Frost, M.E. Meyerhoff, Nitric oxide-releasing hydrophobic polymers: preparation, characterization, and potential biomedical applications, *Free Radic. Biol. Med.*, 37 (2004) 926–36.
- [32] K.A. Mowery, M.H. Schoenfisch, J.E. Saavedra, L.K. Keefer, M.E. Meyerhoff, Preparation and characterization of hydrophobic polymeric films that are thromboresistant via nitric oxide release, *Biomaterials*, 21 (2000) 9–21.
- [33] H. Zhang, G.M. Annich, J. Miskulin, K. Osterholzer, S.I. Merz, R.H. Bartlett, M.E. Meyerhoff, Nitric oxide releasing silicone rubbers with improved blood compatibility: preparation, characterization, and in vivo evaluation, *Biomaterials*, 23 (2002) 1485–94.

- [34] A.B. Seabra, R. da Silva, M.G. de Oliveira, Polynitrosated polyesters: preparation, characterization, and potential use for topical nitric oxide release, *Biomacromolecules*, 6 (2005) 2512–20.
- [35] A.B. Seabra, D. Martins, M.M.S.G. Simões, R. da Silva, M. Brocchi, M.G. de Oliveira, Antibacterial nitric oxide-releasing polyester for the coating of blood-contacting artificial materials, *Artif. Organs*, 34 (2010) E204–14.
- [36] I.M. Jipa, M. Stroescu, A. Stoica-Guzun, T. Dobre, S. Jinga, T. Zaharescu, Effect of gamma irradiation on biopolymer composite films of poly(vinyl alcohol) and bacterial cellulose, *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*, 278 (2012) 82–87.
- [37] T. Moritani, T. Okaya, Functional modification of poly(vinyl alcohol) by copolymerization: IV Self-crosslinkable poly(vinyl alcohol)s, *Polymer*, 39 (1998) 923–931.
- [38] A. Hasimi, A. Stavropoulou, K.G. Papadokostaki, M. Sanopoulou, Transport of water in polyvinyl alcohol films: Effect of thermal treatment and chemical crosslinking, *Eur. Polym. J.*, 44 (2008) 4098–4107.
- [39] P. Chetri, N.N. Dass, N. Sen Sarma, Synthesis of poly(vinyl propionate) from poly(vinyl alcohol) in nonaqueous medium using ethyl nitrate dimethyl sulfoxide as a catalyst, *J. Appl. Polym. Sci.*, 102 (2006) 5675–5679.
- [40] D. Kim, H. Park, J. Rhim, Y. Lee, Proton conductivity and methanol transport behavior of cross-linked PVA/PAA/silica hybrid membranes, *Solid State Ionics*, 176 (2005) 117–126.
- [41] M. Gomez, J.L. Domingo, J.M. Llobet, J. Corbella, Evaluation of the efficacy of various chelating agents on urinary excretion and tissue distribution of vanadium in rats, *Toxicol. Lett.*, 57 (1991) 227–34.
- [42] A.P. Arnold, A.J. Canty, P.W. Moors, G.B. Deacon, Chelation therapy for methylmercury(II) poisoning Synthesis and determination of solubility properties of MeHg(II) complexes of thiol and dithiol antidotes, *J. Inorg. Biochem.*, 19 (1983) 319–27.
- [43] R.M. Maiorino, H.V. Aposhian, Determination and metabolism of dithiol chelating agents, *Biochem. Pharmacol.*, 38 (1989) 1147–1154.
- [44] A.B. Seabra, D. Martins, M.M.S.G. Simões, R. Silva, M. Brocchi, M.G. de Oliveira, Antibacterial Nitric Oxide-Releasing Polyester for the Coating of Blood-Contacting, *Artif. Organs*, 34 (2010) 204–214.

- [45] E. Nagababu, J.M. Rifkind, Measurement of plasma nitrite by chemiluminescence, *Methods Mol. Biol.*, 610 (2010) 41–9.
- [46] F. Yang, E. Troncy, M. Francœur, B. Vinet, P. Vinay, G. Czaika, G. Blaise, Effects of reducing reagents and temperature on conversion of nitrite and nitrate to nitric oxide and detection of NO by chemiluminescence, 662 (1997) 657–662.
- [47] X. Zhang, Real time and in vivo monitoring of nitric oxide by electrochemical sensors--from dream to reality, *Front. Biosci.*, 9 (2004) 3434–46.
- [48] M. Tirfu Zekarias, G. Nageswara Rao, Evaluation of protonation constants of mercaptosuccinic acid in aqueous solutions of propylene glycol and dioxan, *J. Chil. Chem. Soc.*, 57 (2012) 1054–1057.
- [49] J. W. D. Callister, Material Science and Engineering An introduction, in: W.& Sons (Ed.), *Mater. Sci. Eng. An Introd.*, 7 th, New York, 2007: pp. 208–251.
- [50] D.L. Pavia, G.M. Lampman, G.S. Kriz, J.R. Vyvyan, Introduction to Spectroscopy, 4<sup>a</sup> Ed., Cengage Learning, Belmont, CA - USA, 2009.
- [51] H.E. Assendert, A.H. Windle, Crystallinity in poly ( vinyl alcohol ) 1 An X-ray diffraction study of atactic PVOH, *Polymer*, 39 (1998) 4295–4302.
- [52] M.A. Mateescu, H.D. Schell, M. Dimonie, S. Todireanu, O. Maior, Some peculiar properties of cross-linked polyvinyl alcohol (CL-PVA) related to the reticulation degree, *Polym. Bull.*, 11 (1984) 421–427.
- [53] P.J. Flory, Chapter 13: Phase equilibria in polymer systems, in: *Princ. Polym. Chemistry*, Cornel University Press, 1986: pp. 576–590.
- [54] N.A. Peppas, S.L. Wright, Drug diffusion and binding in ionizable interpenetrating networks from poly ( vinyl alcohol ) and poly ( acrylic acid ), *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 46 (1998) 15–29.
- [55] F. Ganji, S. Vasheghani-Farahani, E. Vasheghani-Farahani, Theoretical Description of Hydrogel Swelling:A Review, *Iran. Polym. J.*, 19 (2010) 375–398.
- [56] N.A. Peppas, Chapter 7 Kinetics of Smart Hydrogels, in: N. Yui, R.J. Mrsny, K. Park (Eds.), *Reflexive Polym. Hydrogels Underst. Des. Fast Responsive Polym. Syst.*, 2004: pp. 97–114.
- [57] G.M. Geise, D.R. Paul, B.D. Freeman, Fundamental Water and Salt Transport Properties of Polymeric Materials, *Prog. Polym. Sci.*, (2013) 1–42.

- [58] H. Omidian, K. Park, Swelling agents and devices in oral drug delivery, *J. Drug Del. Sci. Tech.*, 18 (2008) 83–93.
- [59] N.A. Peppas, A.R. Khare, Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 11 (1993) 1–35.
- [60] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.*, 82 (1959) 70–77.
- [61] J. Sedlak, R. H. Lindsay, Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent., 205 (1968) 192–205.
- [62] G.E. Nilsson, T. Tenland, P.A. Oberg, Evaluation of a laser Doppler flowmeter for measurement of tissue blood flow, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 27 (1980) 597–604.



RightsLink®

[Home](#)[Account Info](#)[Help](#)ACS Publications  
High quality. High impact.**Title:** Polynitrosated Polyesters:  
Preparation, Characterization,  
and Potential Use for Topical  
Nitric Oxide ReleaseLogged in as:  
Raphael Marcelli[LOGOUT](#)**Author:** Amedea B. Seabra, Regiane da  
Silva, and, and Marcelo G. de  
Oliveira\***Publication:** Biomacromolecules**Publisher:** American Chemical Society**Date:** Sep 1, 2005

Copyright © 2005, American Chemical Society

**PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE**

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

[BACK](#)[CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2013 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement.](#)  
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com)