

WSTĘPNA OCENA CYTOTOKSYCZNOŚCI BIOMEDYCZNEGO POLI(ϵ -KAPROLAKTONU) OTRZYMANEGO W OBECNOŚCI OKTANIANU CYNY

KAROLINA ŻÓŁTOWSKA¹, MARCIN SOB CZAK^{1*},
GRZEGORZ NAŁĘCZ-JAWECKI², EWA OŁĘDZKA¹,
ANDRZEJ JAKLEWICZ¹, WACŁAW LECHOSŁAW KOŁODZIEJSKI¹

¹ WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY,
KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII NIEORGANICZNEJ I ANALITYCZNEJ,
UL. BANACHA 1, 02-097 WARSZAWA

² WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY, ZAKŁAD BADAŃ ŚRODOWISKA,
UL. BANACHA 1, 02-097 WARSZAWA

* E-MAIL: MARCIN.SOB CZAK@WUM.EDU.PL, MARCIN.SOB CZAK@WP.PL

Abstrakt

Otrzymano szereg próbek biomedycznego poli(ϵ -kaprolaktonu) (PCL) stosując metodę polimeryzacji z otwarciem pierścienia katalizowanej 2-etyloheksanianem cyny (II). Uzyskane produkty polireakcji poddano operacji oczyszczania z pozostałości po katalizatorze cynoorganicznym. Zawartość metalu w otrzymanych polimerach oznaczano za pomocą elektrotermicznej absorpcyjnej spektrometrii atomowej. Toksyczność uzyskanych polimerów oceniano w odniesieniu do bakterii luminescencyjnych oraz dwóch pierwotniaków. Wstępne wyniki zaprezentowane w niniejszym artykule sugerują, że zastosowane operacje oczyszczania redukują zawartość cyny w polimerach bez ich degradacji. Można również stwierdzić, że polimery o zredukowanej zawartości cyny nie wykazują toksyczności w stosunku do bakterii luminescencyjnych *V. fischeri* oraz pierwotniaków *S. ambiguum* i *T. termophila*.

Słowa kluczowe: polimery biomedyczne, poliestry alifatyczne, poli(ϵ -kaprolakton), elektrotermiczna absorpcyjna spektrometria atomowa, toksyczność

[Inżynieria Biomateriałów 114 (2012) 41-45]

Wprowadzenie

Od wielu lat poliestry alifatyczne są szeroko stosowane w medycynie i farmacji. Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) jest używany w wielu obszarach biomedycyny, m.in. w inżynierii tkankowej, w technologii systemów terapeutycznych o przedłużonym uwalnianiu i proleków wielkocząsteczkowych oraz jako materiał opakowaniowy substancji leczniczych. Tak szerokie jego zastosowanie wynika ze zdolności do kontrolowanej degradacji, dobrej mieszalności z innymi polimerami oraz biokompatybilności. PCL w zależności od masy cząsteczkowej, stopnia krystaliczności oraz warunków środowiskowych ulega całkowitej biodegradacji od siedmiu miesięcy do kilku lat [1-5]. PCL otrzymywany jest dwiema metodami, w procesie polikondensacji kwasu 6-hydroksyheksanowego lub na drodze polimeryzacji z otwarciem pierścienia ϵ -kaprolaktonu (ϵ -CL). Proces polimeryzacji z otwarciem pierścienia (ROP) jest częściej stosowany, ponieważ pozwala on na otrzymanie poliestrów charakteryzujących się wyższą masą cząsteczkową oraz niższą polidispersyjnością.

PRELIMINARY EVALUATION OF CYTOTOXICITY OF THE BIOMEDICAL POLY(ϵ -CAPROLACTONE)S OBTAINED IN THE PRESENCE OF TIN OCTANOATE

KAROLINA ŻÓŁTOWSKA¹, MARCIN SOB CZAK^{1*},
GRZEGORZ NAŁĘCZ-JAWECKI², EWA OŁĘDZKA¹,
ANDRZEJ JAKLEWICZ¹, WACŁAW LECHOSŁAW KOŁODZIEJSKI¹

¹ MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, FACULTY OF PHARMACY,
DEPARTMENT OF INORGANIC AND ANALYTICAL CHEMISTRY,
1 BANACHA ST., 02-097 WARSAW, POLAND

² MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, FACULTY OF PHARMACY,
DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCE,
1 BANACHA ST., 02-097 WARSAW

* E-MAIL: MARCIN.SOB CZAK@WUM.EDU.PL, MARCIN.SOB CZAK@WP.PL

Abstract

A series of biomedical poly(ϵ -caprolactone)s were synthesized by the ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone in the presence of tin(II) 2-ethylhexanoate. The obtained products were subjected to the purification procedures for removing the residual of tin catalyst. The metal content in the received polymers were determined using the Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. The toxicity of the resulted polymers was evaluated using bacterial luminescence test and two protozoan assays. The preliminary studies presented in this paper suggest that the purification of the polymers reduces tin concentration in the final products without causing product degradation. It was found that the purified polymers are not toxic relative to luminescent bacteria *V. fischeri* and two ciliated protozoans *S. ambiguum* and *T. termophila*.

Keywords: biomedical polymers, aliphatic polyesters, poly(ϵ -caprolactone), electrothermal atomic absorption spectroscopy, toxicity

[Engineering of Biomaterials 114 (2012) 41-45]

Introduction

Aliphatic polyesters are widely used in medicine and pharmacy since many years. Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) has been used in different biomedical fields such as scaffolds in tissue engineering, long-term drug delivery systems, macromolecular prodrugs and packaging materials of the medical substances due to its interesting properties like controlled degradability, miscibility with other polymers or biocompatibility. PCL is biodegraded from several months to several years depending on its molecular weight, degree of crystallinity and condition of the degradation [1-5]. There are two methods for the preparation of biomedical PCL: the condensation of 6-hydroxyhexanoic acid and the ring-opening polymerization (ROP) of ϵ -caprolactone (ϵ -CL). ROP is more often used due to a higher molecular weight and lower polydispersity of the received polyesters. A large number of catalysts and other catalytic systems of ROP (organic-, metal- or enzyme-based) spanning virtually the whole periodic table have been recently investigated [1].

Do chwili obecnej została przebadana ogromna liczba katalizatorów i systemów katalitycznych (organicznych i nieorganicznych zawierających metale lub enzymy) procesu ROP obejmujących praktycznie cały układ okresowy pierwiastków [1]. Mechanizm procesu ROP (anionowy, kationowy, aktywowanego monomeru i insercyjno-koordynacyjny) ϵ -CL zależy od zastosowanego katalizatora. Większość biomedycznych poliestrów zawiera śladowe ilości toksycznych zanieczyszczeń metalicznych, co jest niekorzystne z punktu widzenia ich zastosowania w medycynie czy farmacji [1]. 2-etyloheksanian cyny (II) (oktanian cyny, SnOct_2) jest powszechnie stosowany w procesie ROP ϵ -CL. SnOct_2 jest katalizatorem komercyjnym, bardzo efektywnym, łatwo dostępnym na rynku i rozpuszczalnym w większości rozpuszczalników organicznych. Zastosowanie go wraz z czynnikiem nukleofilowym (np. alkoholem lub aminą) pozwala prowadzić proces ROP w sposób kontrolowany. Główną wadą SnOct_2 jest to, że wymaga on prowadzenia reakcji przy stosunkowo wysokiej temperaturze, co może powodować zwiększenie udziału reakcji ubocznych, tj. transestryfikacji wewnątrz- i międzycząsteczkowej, skutkiem czego jest wzrost rozrzutu masy cząsteczkowej polimeru [1].

Polimerom biomedycznym stawiane są coraz wyższe wymagania pod względem właściwości fizykochemicznych oraz biokompatybilności. SnOct_2 jest dopuszczony do stosowania w syntezie różnych biomateriałów polimerowych w wielu krajach europejskich oraz USA, brak jest jednak precyzyjnych uregulowań normatywnych. Zgodnie z Farmakopeą Europejską V, maksymalne stężenie cyny w materiałach polimerowych mających kontakt z krwią lub składnikami krwi wynosi 20 ppm [6-8].

Nasze wcześniejsze badania, prowadzone we współpracy z Zakładem Badania Środowiska Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wskazują, że zawartość cyny w polimerach biomedycznych na poziomie kilkudziesięciu ppm może być szkodliwa dla organizmów [2]. W związku z powyższym, głównym celem naszej pracy była ocena cytotoxyczności serii próbek PCL (zawierających różną ilość pozostałości po katalizatorze cynowym) w odniesieniu do bakterii luminescencyjnych *V. fischeri* oraz dwóch pierwotniaków *S. ambiguum* i *T. thermophila*.

Materiały i metody

Materiały

ϵ -Kaproilakton (2-oksepanon, 99%, ϵ -CL, Aldrich) przed użyciem był suszony i destylowany z nad CaH_2 pod zmniejszonym ciśnieniem. 2-etyloheksanian cyny(II) (SnOct_2 , 97%, Aldrich), chlorek metylenu (cz., POCH), kwas solny (POCH), kwas azotowy(V) (65% m/m, $d = 1,4 \text{ g/ml}$, J.T.Baker), wzorzec cyny 1000 mg/l w 2% roztworze HNO_3 i 1% roztworze HF (J.T.Baker), wzorzec cyny 100 $\mu\text{g/l}$ w 20% roztworze HNO_3 (V/V), bakterie luminescencyjne *Vibrio fischeri* (SDI, USA), pierwotniaki *Tetrahymena thermophila* (MicroBioTests, Belgium) i *Spirostomum ambiguum* były stosowane bez operacji przygotowawczych.

Synteza poly(ϵ -kaproilaktanu)

Polimeryzację z otwarciem pierścienia ϵ -CL prowadzono w różnym stosunku molowym monomeru do katalizatora (TABELA 1). Odpowiednią ilość ϵ -CL i SnOct_2 umieszczano w atmosferze argonu w szklanym reaktorze o pojemności 10 ml. Reaktor termostatowano w łaźni olejowej w temperaturze 140°C przez 24 godziny. Po zakończeniu reakcji mieszaninę poreakcyjną schładzano, rozpuszczano w CH_2Cl_2 , a następnie polimer wytrącano w 5% roztworze kwasu solnego. Produkty finalne suszono pod zmniejszonym ciśnieniem przez 2-3 dni.

The mechanism of ROP (anionic, cationic, monomer-activated and coordination-insertion) of ϵ -CL depends on the catalyst used. The most biomedical polyesters contain the traces of metal pollutants causing their high toxicity thus might be undesirable for pharmaceutical or biomedical applications [1]. The tin(II) 2-ethylhexanoate catalyst (tin octanoate, SnOct_2) is commonly used for ROP of ϵ -CL. SnOct_2 is effective, commercially available, easy to handle and soluble in the most commonly used organic solvents. It must be used together with a nucleophilic compound (alcohol or amine) to initiate the reaction if a controlled synthesis of the polymer has to be obtained. The major drawback of SnOct_2 is that it requires a high temperature, which encourages inter- and intramolecular transesterification thus broadening the polydispersity [1].

Biomedical polymers are subjected to more and more requirements in consideration to their physicochemical properties and biocompatibility. The SnOct_2 is approved for using in the synthesis of biomedical PCL in many countries, but without detailed normative regulations in this regard. According to European Pharmacopoeia V the maximum concentration of residual tin in the containers for human blood and blood components has to be 20 ppm [6-8].

Our earlier studies, conducted in collaboration with the Department of Environmental Health Science of Medical University of Warsaw, have shown that doses of several ppm of tin might be harmful to organisms [2]. Thereby, the goal of this work was to determine the content of residual Sn in several PCLs prepared in the presence of SnOct_2 and their cytotoxicity evaluation using luminescent bacteria *V. fischeri* and two ciliated protozoans *S. ambiguum* and *T. thermophila*.

Materials and methods

Materials

ϵ -Caprolactone (2-oxepanone, 99%, ϵ -CL, Aldrich) was dried and distilled over CaH_2 at reduced pressure before use. Tin(II) 2-ethylhexanoate (SnOct_2 , 97%, Aldrich), methylene chloride (cz., POCH), hydrochloric acid (POCH), nitric acid (v) suprapur (65 % m/m, $d = 1,4 \text{ g/ml}$, J.T.Baker), standard of tin 1000 mg/l in 2% HNO_3 and 1% HF (J.T.Baker), operating standard of tin 100 $\mu\text{g/l}$ in 20% HNO_3 (V/V), luminescent bacteria *Vibrio fischeri* (SDI, USA), protozoan *Tetrahymena thermophila* (MicroBioTests, Belgium) and *Spirostomum ambiguum* were used as supplied.

Synthesis of poly(ϵ -caprolactone)

The reaction of ring-opening polymerization of ϵ -CL was carried out for different molar ratios of the monomer to catalyst (TABLE 1). The required amount of ϵ -CL and SnOct_2 were placed in a 10 mL glass ampoule under argon atmosphere. The reaction vessel was then kept standing in a thermostated oil bath at 140°C for 24h. When the reaction time was completed, the cold reaction product was dissolved in CH_2Cl_2 precipitated from distilled water with diluted hydrochloric acid (5% aqueous solution) and dried under vacuum for 2-3 days.

Measurements

The polymerization products were characterized by means of ^1H - or ^{13}C -NMR (Varian 300 MHz recorded in CDCl_3) and FT-IR spectroscopy (Spectrum 1000, Perkin-Elmer) recorded in KBr pellets.

The molecular weights of the received PCLs were determined by the viscosity techniques. The polymer viscosity was measured in N,N-dimethylformamide (at 30°C) using Stabinger Viscometer SVM 3000. The molecular weights of the resulted polymers were calculated from the Mark-Houwink formula using the following equation constants: $K = 1.94 \times 10^{-4}$ and $\alpha = 0.73$.

Metody badań

Widma ^1H i ^{13}C NMR produktów polimeryzacji zarejestrowano przy zastosowaniu spektrometru Varian 300 MHz w deuterowanym CDCl_3 , w temperaturze pokojowej. Widma absorpcyjne w podczerwieni rejestrowano przy użyciu spektrometru z transformacją Fouriera firmy Perkin-Elmer (Spectrum 1000) dla próbek w postaci pastylek w KBr.

Masa cząsteczkowa otrzymanych PCL została wyznaczona metodą wiskozymetryczną. Lepkość polimerów mierzono w N,N-dimetyloformamidzie jako rozpuszczalniku (w temperaturze 30°C) stosując aparat Stabinger Viscometer SVM 3000. Masa cząsteczkowa otrzymanych polimerów została obliczona na podstawie równania Marka-Houwinka stosując następujące stałe: $K = 1.94 \times 10^{-4}$ i $\alpha = 0.73$.

Zawartość cyny w PCL została oznaczona metodą elektrotermicznej absorpcyjnej spektrometrii atomowej przy użyciu spektrometru Avanta Ultra GPC (GBC, Australia) wyposażonego w atomizer elektrotermiczny i autosampler PAL4000. Próbkę polimerów poddawano mineralizacji na mokro przy użyciu stężonego HNO_3 . Proces prowadzono przez około 30 minut. Po zakończeniu procesu mineralizacji, produkty przenoszono ilościowo do kolbek o pojemności 25 ml i mieszano z wodą destylowaną.

Test Microtox® (bakterie luminescencyjne *Vibrio fischeri*) został wykonany przy użyciu bakterii liofilizowanych zakupionych w firmie SDI (USA). Prowadzono go w jednorazowych kuwetach szklanych. Próbkę były inkubowane w temperaturze 15°C w ciągu 15 minut, a luminescencję rejestrowano przy pomocy analizatora Microtox® M500. Jako rozcieńczalnik i próbę kontrolną zastosowano 2% roztwór NaCl [9].

Test Protoxkit FTM: Protoxkit FTM to wielopokoleniowy test z zastosowaniem pierwotniaka z grupy orzęsków *Tetrahymena thermophila* (Protoxkit F, 1998). Test oparty jest na przekształceniu substratu (zawiesiny pożywki) w biomasę. Podczas gdy normalnie rozmnażające się hodowle klarują zawiesinę w ciągu 24 godzin, zahamowanie wzrostu kultury odzwierciedla się poprzez pozostające zmętnienie. Test oparty jest na pomiarze gęstości optycznej próbek. Pierwotniak i pożywka zostały zakupione w MicroBio Tests (Belgia). Test przeprowadzono przy użyciu jednorazowych spektrofotometrycznych kuwet zgodnie z protokołem operacyjnym sugerowanym przez producenta. Jako rozcieńczalnik i próbę kontrolną użyto wody dejonizowanej (jakość Mili-Q) [9].

Test Spirotox: test wykorzystujący pierwotniaka *Spirostomum ambiguum* został wykonany zgodnie ze standardowymi regułami postępowania. Przeprowadzono go przy użyciu jednorazowych polistyrenowych mikroplitek (24 studzienki). Dziesięć organizmów zostało dodanych do każdej studzienki z osobna. Próbkę inkubowano w ciemności w temperaturze 25°C przez 24 godziny. Następnie odczytano wyniki testu sprawdzając liczbę zdeformowanych pierwotniaków tj. komórek, np. komórek skróconych lub wygiętych. Śmiertelność populacji pierwotniaka obserwowano używając mikroskopu analitycznego (przy 10-krotnym powiększeniu). Jako rozcieńczalnik i próbę kontrolną zastosowano płyn Tyrod'a [9].

Wyniki i dyskusja

Seria próbek biomedycznego poli(ϵ -kapolaktonu) (PCL) została otrzymana w procesie ROP ϵ -CL katalizowanym przy użyciu 2-etyloheksanianu cyny(II) (SnOct_2) jako katalizatora. Wydajność reakcji oraz wiskozymetryczna masa cząsteczkowa otrzymanych PCL została wyszczególniona w TABELI 1. Proces polimeryzacji był prowadzony w temperaturze 140°C przez 24 godziny.

The concentration of tin in the received PCLs was determined by atomic absorption spectrometer Avanta Ultra GPC Z spectrometer (GBC, Australia) equipped with electrothermal atomizer and PAL4000 autosampler. The background correction was performed using the longitudinal Zeeman's effect measuring ETAAS signals in the peak height mode. The polymeric samples were subjected to the wet mineralization with the concentrated HNO_3 . The process was carried out for about 30 min. When the mineralization process was completed, the products were quantitatively moved to 25 ml flask and mixed with distilled water.

Microtox®: Microtox® assay with the luminescent bacteria *Vibrio fischeri* was performed with the lyophilized bacteria purchased from SDI (USA). The test was performed with the use of disposable glass cuvettes. Samples were incubated at 15°C for 15 min and the light output of the samples was recorded with a Microtox® M500 analyzer. As a diluent and a control 2% NaCl was used [9].

Protoxkit FTM: Protoxkit FTM is a multigeneration protozoan growth inhibition bioassay with the ciliate *Tetrahymena thermophila*. The test is based on the turnover of the substrate (food suspension) into ciliate biomass. While normal proliferating cell cultures clear the substrate suspension in 24 hours, inhibited culture growth is reflected by remaining turbidity. The test is based on optical density measurements. The protozoa and the food were obtained from MicroBioTests (Belgium). The test was performed in disposable spectrophotometric cuvettes according to the standard operational protocol of the producer. As a diluents and a control deionized water (Milli-Q quality) was used [9].

Spirotox: Spirotox test with the protozoan *Spirostomum ambiguum* was performed according to the standard protocol. The test was carried out in disposable, polystyrene multiwell plates (24 wells). Ten organisms were added to each well of the multiwell. The samples were incubated in the darkness at 25°C for 24 hours. Afterwards test responses: different deformations such as shortening, bending of the cell, etc., and lethal response were observed with the use of dissection microscope (magnification of 10). As a diluents and a control Tyrod solution was used [9].

Results and Discussions

A series of biodegradable poly(ϵ -caprolactone)s (PCLs) has been obtained by ROP of ϵ -CL catalyzed by tin(II) 2-ethylhexanoate (SnOct_2). The reaction yields and the viscosity molecular weight of the obtained PCLs are summarized in TABLE 1. The polymerization process was carried out at 140°C for 24 h.

TABELA 1. Homopolimeryzacja ϵ -CL w obecności SnOct_2 .

TABLE 1. Homopolymerization of ϵ -CL in the presence of SnOct_2 .

Kod Code	Stosunek molarowy ϵ -CL/ SnOct_2	Wydajność Yield [%]	M_v^1 [g/mol]	M_v^2 [g/mol]	M_v^3 [g/mol]	M_v^4 [g/mol]
PCL1	50 : 1	≈ 100	6 400	-	-	-
PCL2	70 : 1	≈ 100	8 000	-	-	-
PCL3	88 : 1	≈ 100	9 100	-	-	-
PCL4	117 : 1	≈ 100	10 100	-	-	-
PCL5	175 : 1	≈ 100	12 800	-	-	-
PCL6	350 : 1	≈ 100	20 300	19 300	19 200	19 000

M_v – wiskozymetryczna masa cząsteczkowa PCL,
 $1, 2, 3, 4$ – po pierwszej, drugiej, trzeciej i czwartej operacji wytrącania polimeru
 M_v – viscosity molecular weights of PCL,
 $1, 2, 3, 4$ – after the first, second, third or fourth operation of the polymer precipitation

Masa cząsteczkowa otrzymanych PCL oznaczona metodą wiskozymetryczną wahała się w granicach od 6 400 do 20 300 g/mol. Wydajność wszystkich reakcji wynosiła około 100%.

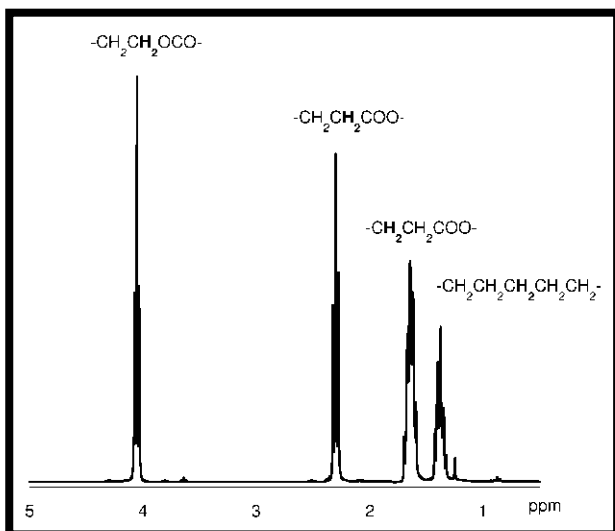
Struktura zsyntezowanych PCL została potwierdzona za pomocą technik spektroskopowych ^{13}C , ^1H NMR i FT-IR. Na RYS. 1 i 2 przedstawiono typowe widma NMR produktów polireakcji $\epsilon\text{-CL}$.

Dane spektroskopowe otrzymanych produktów są następujące:

^1H NMR (CDCl_3 , δ , ppm): 4.02 (2H, t, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})-$); 3.69 (2H, t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 2.26 (2H, t, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$); 1.58 (4H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$); 1.38 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$).

^{13}C NMR (CDCl_3 , δ , ppm): 173.1 ($-\text{C}(\text{O})\text{O}-$); 63.7 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})-$); 33.6 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$); 27.9 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})-$); 25.1 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$); 24.1 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$).

FT-IR (KBr, cm^{-1}): 2943 ($\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$), 2862 ($\nu_{\text{s}} \text{CH}_2$), 1721 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1291 (C-O and C-C), 1240 ($\nu_{\text{as}} \text{COC}$), 1190 ($\nu_{\text{OC-O}}$), 1170 ($\nu_{\text{s}} \text{COC}$), 1157 (C-O and C-C).



RYS. 1. Widmo ^1H -NMR PCL (w DMSO).
FIG. 1. ^1H -NMR spectrum of the PCL (in DMSO).

Katalizator cynowy został zastosowany w stosunku molowym 1:50, 1:70, 1:88, 1:117, 1:175, 1:350 do monomeru, a następnie był usuwany w wyniku wytrącania polimeru za pomocą 5% roztworu kwasu solnego (TABELA 2). Zawartość pozostałości cyny w próbkach wynosiła od 488 do 1631 ppm po pierwszej operacji wytrącania polimeru.

Po każdej operacji wytrącania polimeru monitorowano stopień degradacji PCL wykorzystując metodę wiskozymetryczną (TABELA 1). Jak widać z tabeli zmiana masy cząsteczkowej polimerów po kolejnych operacjach była nieznaczna i wynosiła kilka procent.

Zawartość cyny w otrzymanych PCL w wyniku przeprowadzenia trzeciej i czwartej operacji wytrącania polimeru została wyraźnie zmniejszona do poziomu 12 ppm dla PCLb i 11 ppm dla PCLc (TABELA 2). Wynik ten jest wystarczająco satysfakcjonujący biorąc pod uwagę wymagania Farmakopei Europejskiej zgodnie z którymi zawartość cyny w materiałach mających kontakt z krwią lub komponentami krwi nie mogą przekroczyć 20 ppm [6].

Wstępnej oceny toksykologicznej otrzymanych biomedycznych PCL dokonano na podstawie wyników testów wykorzystujących bakterie luminescencyjne *V. fischeri* oraz pierwotniaki *S. ambiguum* and *T. thermophila* (TABELA 3). Polimer uważany był za toksyczny, jeżeli odsetek efektów toksycznych (PE) wywołanych przez badaną próbkę przekraczał 20%.

The molecular weights of the obtained PCLs determined by viscosity method were ranged from 6 400 to 20 300 g/mol. The reaction yields were quantitative.

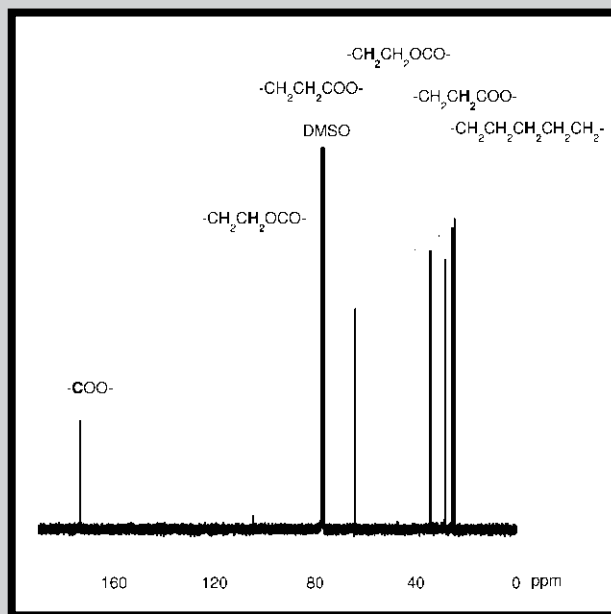
The structure of the received PCLs was confirmed by ^{13}C , ^1H NMR and FT-IR techniques. FIG. 1 and 2 show typical spectra of the obtained products.

The spectroscopy data are as follow:

^1H NMR (CDCl_3 , δ , ppm): 4.02 (2H, t, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})-$); 3.69 (2H, t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 2.26 (2H, t, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$); 1.58 (4H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$); 1.38 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$).

^{13}C NMR (CDCl_3 , δ , ppm): 173.1 ($-\text{C}(\text{O})\text{O}-$); 63.7 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})-$); 33.6 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$); 27.9 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})-$); 25.1 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$); 24.1 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$).

FT-IR (KBr, cm^{-1}): 2943 ($\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$), 2862 ($\nu_{\text{s}} \text{CH}_2$), 1721 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1291 (C-O and C-C), 1240 ($\nu_{\text{as}} \text{COC}$), 1190 ($\nu_{\text{OC-O}}$), 1170 ($\nu_{\text{s}} \text{COC}$), 1157 (C-O and C-C).



RYS. 2. Widmo ^{13}C -NMR PCL (w DMSO).
FIG. 2. ^{13}C -NMR spectrum of the PCL (in DMSO).

Tin catalyst was used in the molar ratio of 1:50, 1:70, 1:88, 1:117, 1:175, 1:350 to the monomer and then removed by washing of the polymer solutions with diluted hydrochloric acid (5% aqueous solution) (TABLE 2). The concentration of the residual tin was in the range of 488-1631 ppm after the first polymer precipitation.

The possible biodegradation of PCLs after the polymer precipitation was controlled by the viscosity method (TABLE 1). As is shown in table the variation of the above parameter was relatively slight (about several percent).

The tin content in the received PCLs after the third or fourth operation of the polymer precipitation was significantly reduced to 12 (PCLb) and 11 ppm (PCLc) (TABLE 2). In accordance with the guidelines of the European Pharmacopeia, the tin content in the materials there are in contact with blood or blood components may not exceed 20 ppm [6]. Therefore our results are satisfactory enough especially for biomedical applications of the resulted PCLs.

The cytotoxicity evaluation of the received biomedical PCLs using the luminescent bacteria *V. fischeri* and two ciliated protozoans *S. ambiguum* and *T. thermophila* are listed in TABLE 3. As is evidence in TABLE 3, the obtained polymers were non-toxic in all assays in the concentrations up to 1 mg mL^{-1} . One exception was the PCL6 with PE slightly higher than 20. A higher concentration of the polymers (10 mg mL^{-1}) was tested only on the Spirotox test, as it does not disturb visual observations of the effects under a dissection microscope.

Wartość PE wyznaczana była na podstawie protokołu bazowego - analizy wykonywanej poprzez serię rozcieńczeń danej próbki. Jak widać z TABELI 3, wszystkie otrzymane polimery nie wykazały toksyczności w stężeniu do 1 mg/ml. Jedyny wyjątek stanowił PCL6, który spowodował śmiertelność niewiele powyżej 20% organizmów. Próbki o wyższym stężeniu (10 mg/ml) były analizowane tylko przy zastosowaniu testu Spirotox, ponieważ w tym przypadku możliwa była wizualna obserwacja efektów działania testu pod mikroskopem analitycznym (sekcyjnym). W przypadku testów Microtox (luminescencja) i Protoxkit F (zmętnienie) dla próbek o wyższym stężeniu otrzymywano wyniki bliskie wartościom granicznym. Próbki „nie oczyszczonych” polimerów powodowały 100% śmiertelność mikroorganizmów w teście Spirotox. Warto podkreślić, że próbki polimerów oczyszczonych (PCL6a, PCL6b, PCL6c) nie wykazywały toksyczności we wszystkich przeprowadzonych testach (TABELA 3).

Wnioski

Otrzymane w obecności 2-etyloheksanianu cyny(II) próbki biomedycznego PCL zawierają śladowe ilości metalu (po trzeciej i czwartej operacji wytrącania). Należy podkreślić, że zawartość metalu w badanych polimerach jest niższa od wartości dopuszczalnej dla biomateriałów zgodnie z Farmakopeą Europejską. Przeprowadzone przez nas wstępne badania wskazują, że oczyszczone PCL nie wykazują cytotoksyczności i mogą znaleźć zastosowanie w farmacji i medycynie.

Podziękowania

Niniejsza praca była finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Projekt MNiSzW-0451/B/H03/2010/39, N N209 045139).

Piśmiennictwo

References

- [1] Labet M., Thielemans W.: Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical Society Reviews* 38 (2009) 3484-3504.
- [2] Sobczak M., Ołędzka E., Kołodziejcki W.L., Kuźmicz R.: Polimery do zastosowań farmaceutycznych. *Polimery* 52(6) (2007) 411-420.
- [3] Puppi D., Chiellini F., Piras A.M., Chiellini E.: Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science* 35 (2010) 403-440.
- [4] Mansour H.M., Sohn M., Al-Ghananeem A., DeLuca P.P.: Materials for Pharmaceutical Dosage Forms: Molecular Pharmaceutics and Controlled Release Drug Delivery Aspects. *International Journal of Molecular Sciences* 11 (2010) 3298-3322.
- [5] Ołędzka E., Sobczak M.: Polymers in the Pharmaceutical Applications - Natural and Bioactive Initiators and Catalysts in the Synthesis of Biodegradable and Bioresorbable Polyesters and Polycarbonates. In: Eddy C, editor. *Innovations in Biotechnology*. InTech, 2012. p. 139-160.
- [6] *European Pharmacopoeia V, 5th Edition*, 15 June 2004.
- [7] Sobczak M., Żółtowska K., Jaklewicz A., Kołodziejcki W.: Oznaczenie zawartości cyny w syntetyzowanych biomedycznych poliesterach alifatycznych metodą elektrochemicznej absorpcyjnej spektrometrii atomowej. *Polimery* 55(9) 2010 674-680.
- [8] Sobczak M., Plichta A., Ołędzka E., Jaklewicz A., Kuras M., Cwil A., Kołodziejcki W.L., Florjańczyk Z., Szatan K., Udzielak I.: Some atomic spectrometric determinations of metals in aliphatic polyester and polycarbonate biomedical polymers. *Polimery* 54(2) (2009) 114-119.
- [9] Nałęcz-Jawecki G.: Rozprawa habilitacyjna, Medical University of Warsaw, 2008.

TABELA 2. Oznaczenie zawartości cyny w otrzymanych polimerach metodą elektrotermicznej absorpcyjnej spektrometrii atomowej.

TABLE 2. The tin content determination in the received polymers using the electrothermal atomic absorption spectrometry.

Kod / Code	OP	C _{Sn} [ppm]
PCL1	1	1580
PCL2	1	1520
PCL3	1	1631
PCL4	1	842
PCL5	1	975
PCL6	1	488
PCL6a	2	146
PCL6b	3	12
PCL6c	4	11

OP - liczba operacji wytrącania polimeru

C_{Sn} - zawartość Sn

PCL6, PCL6a, PCL6b, PCL6c – polimer PCL6 po pierwszej, drugiej, trzeciej i czwartej operacji wytrącania

OP - the number of the operation of polymer precipitation

C_{Sn} - the content of Sn

PCL6, PCL6a, PCL6b, PCL6c - polymer PCL6 after the first, second, third or fourth operation of polymer precipitation

TABELA 3. Toksyczność polimerów wyrażona jako wynik procentowy (PE).

TABLE 3. The toxicity of polymers. The toxicity expressed as percent of the effect (PE).

Stężenie Concentration [mg/ml]	Spirotox (24 h)		Microtox (15 min)		Protoxkit F (24 h)	
	10	1	1	0,5	1	0,5
PCL1	100	0	8	8	5	5
PCL2	100	0	9	11	11	10
PCL3	100	0	8	8	13	6
PCL4	100	0	9	15	15	15
PCL5	100	0	4	12	19	19
PCL6	100	0	9	7	27	24
PCL6a	0	0	0	0	2	3
PCL6b	0	0	0	0	11	5
PCL6c	0	0	0	0	0	4

However, higher amounts of a polymer affect the measurement of the endpoints both in the Microtox (luminescence) and Protoxkit F (turbidity), assays. A high level of the tested 'non-purified' polymers (after the first operation of polymer precipitation) caused 100% mortality in Spirotox test. The purified samples (after the second, third or fourth operations of polymer precipitation) were not toxic in all assays (TABLE 3).

Conclusions

The synthesized in the presence of tin(II) 2-ethylhexanoate biomedical PCLs contain only residual metal content (after the third and fourth operation of the polymer precipitation). Importantly this value is below the limit of the pharmacopoeia standards for the biomedical materials. Our preliminary studies suggest that the purified PCLs are not cytotoxic and therefore suitable for pharmaceutical and medical applications.

Acknowledgements

The work was supported by the research program (Project MNiSW-0451/B/H03/2010/39, N N209 045139) of the Ministry of Science and Higher Education in Poland.