

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“Impacto das Nanopartículas de Sílica na Transição de
Polímeros Termossensíveis Usados na Administração
Controlada de Medicamentos”**

Lucas da Silva Ribeiro*

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de
concentração: FÍSICO-QUÍMICA

Orientador: Emerson Rodrigues de Camargo

*** Bolsista FAPESP (2018/12871-0)**

São Carlos - SP

2024

Folha de Aprovação



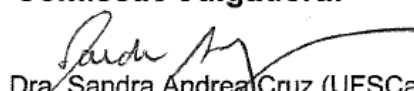
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

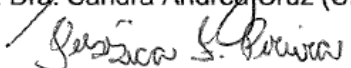
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Lucas da Silva Ribeiro, realizada em 26/01/2024.

Comissão Julgadora:


Profa. Dra. Sandra Andrea Cruz (UFSCar)


Profa. Dra. Jessica Fernanda Pereira (UFSCar)


Prof. Dr. André Esteves Nogueira (ITA)


Profa. Dra. Dayane Batista Tada (UNIFESP)


Profa. Dra. Simone Milani Brandão (UFSCar)

“A experiência nunca falha, apenas as nossas opiniões falham, ao esperar da experiência aquilo que ela não é capaz de oferecer.”

Leonardo da Vinci

Dedicatória

Aos meus pais Cristina e Geraldo e aos meus irmãos Gabriella e Eduardo que sempre se esforçaram para que eu pudesse superar as dificuldades e chegasse até aqui, pelo incentivo e pela infinita dedicação.

À minha namorada Ana Leticia que sempre esteve do meu lado, nos momentos bons e ruins, apoiando e incentivando com seu amor, compreensão e muita paciência.

A todos meus amigos e familiares que têm caminhado comigo em todos os momentos da minha vida.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo pela orientação, ensinamentos, liberdade, compreensão, paciência e confiança creditada em mim ao longo dos anos.

Ao Prof. Dr. João Mano pela oportunidade de pesquisa, ensinamentos e disponibilizar toda a estrutura do COMPASS para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. André Esteves Nogueira, à Dra. Renata Lang Sala, ao Dr. Francisco Nunes de Souza Neto e à Dra. Ana Rita Sobreiro-Almeida que além de amigos, sempre me incentivaram, orientaram e contribuíram com inúmeras discussões.

Ao Prof. Dr. Elson Longo e ao Prof. Dr. Edson Roberto Leite por disponibilizarem o LIEC para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Tiago Venâncio e ao Laboratório de RMN da UFSCar pelas medidas de RMN e discussões.

Ao Prof. Dr. Cauê Ribeiro de Oliveira e aos colegas da Embrapa pela disponibilidade de realizar as análises de DLS.

À Profa. Dra. Sandra Andrea Cruz pelas análises de reologia, ensinamentos em polímeros, discussões e sugestões.

Ao Prof. Dr. Ricardo Borra e à Dra. Thaianne Robeldo pelos ensaios biológicos.

Aos técnicos e funcionários Rorivaldo Camargo, Daniela Caceta, Luma Garcia, Ricardo Tranquilin e Paulo Laranjeira por todo apoio e análises.

Aos colegas do LIEC, da UFSCar e da EMBRAPA, em especial: Marcelo Martinho, Leticia Onoue, Iago de Oliveira, Bruno Rossi, Sara Novak, Luiz Gorup, Patrícia Francatto, Arthur Martins, Guilherme Arioli, Jordana Assis, Andressa Kubo, Mitchell González, Fiana Cutrim, Amanda Giroto, Juliana Torres, Guilherme Esteves e Stella Valle.

Aos colegas do COMPASS e do CICECO, em especial: Diana Santiago, Beatriz Moura, Cristiana Sousa, Maria Monteiro, João Maia, João Pereira e Pedro Lavrador.

A FAPESP pelas bolsas de doutorado direto (2018/12871-0) e BEPE (2021/10844-8) concedidas.

Ao CNPq, CAPES e CEPID/CDMF.

A todos os professores do Departamento de Química da UFSCar e ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ).

E meu agradecimento a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e colaboraram para o meu desenvolvimento.

Muito obrigado!

Lista de abreviações

PNVCL – poli(N-vinilcaprolactama)

NVCL – N-vinilcaprolactama

LCST – temperatura crítica inferior de solubilidade

DOX – cloridrato de doxorubicina

SiO₂ – óxido de silício ou sílica

PNIPAAm – poli(N-isopropilacrilamida)

TEOS – tetraetilortosilicato

NH₃ – amônia

NH₄OH – hidróxido de amônio

DMSO – dimetilsulfóxido

AIBN - 2,2'-azo-bis-isobutironitrila

MPS - 3-(trimetoxisilil)propil metacrilato

DSC- calorimetria exploratória diferencial

UV-vis – ultravioleta-visível

TG – análise termogravimétrica

DLS – espalhamento de luz dinâmico

RMN – ressonância magnética nuclear

MEV – microscopia eletrônica de varredura

SEC – cromatografia por exclusão de tamanho

FTIR - espectroscopia vibracional na região de infravermelho

T_g – temperatura de transição vítrea

T_{cp} – temperatura de turbidez

F_s – fase solvatada

F_c – fase colapsada

OD – densidade ótica

ODs – densidade ótica da fase solvatada

ODc – densidade ótica da fase colapsada

G' – módulo de armazenamento

G'' – módulo de perda

η^* - viscosidade complexa

ATP - trifosfato de adenosina

PEG – poli(etilenoglicol)

PCLA - poli(ϵ -caprolactona-co-lático)

Lista de tabelas

TABELA 5.1 - Modos vibracionais identificados nos espectros de FTIR das nanopartículas de SiO ₂	33
TABELA 5.2 - Modos vibracionais identificados nos espectros do polímero puro e dos nanocompósitos.	38
TABELA 5.3 - Porcentagem real de nanopartícula de sílica ancorada em cada nanocompósito calculada por medidas de TG.	41
TABELA 5.4 - Valores de temperatura de transição vítrea encontrados para os polímeros sintetizados calculados pelo ponto de inflexão.....	42
TABELA 5.5 - Valores de T _{cp} encontrados avaliando a variação da transmitância das soluções poliméricas com o aumento de temperatura.	48
TABELA 5.6 - Parâmetros termodinâmicos obtidos da montagem da Equação 15 a dados experimentais de variação da densidade ótica (OD) com a temperatura das soluções PNVCL e nanocompósitos.	58
TABELA 5.7 – Valores de perda de massa dos polímeros em pH ácido e neutro sob as mesmas condições do teste de liberação.....	68
Tabela 5.8 – Valores de tempo de retenção e massa molar no pico da distribuição de índice de retenção obtidos na análise de SEC.....	70
TABELA 5.9 - Valores cumulativos de DOX liberado pelo polímero e nanocompósitos após 168 h de teste.....	72
TABELA 5.10 - Parâmetros obtidos após a aplicação dos modelos cinéticos em todas as curvas de liberação de DOX.....	74
TABELA 5.11 - Valores cumulativos de naringina liberada pelo polímero e nanocompósitos após 168 h de teste.....	76
TABELA 5.12 – Parâmetros obtidos após a aplicação dos modelos cinéticos em todas as curvas de liberação de naringina.....	77

Lista de Figuras

FIGURA 2.1 - Esquema do mecanismo que acontece na síntese das nanopartículas de sílica utilizando o método de Stöber.....	6
FIGURA 2.2 – Esquema representando a estrutura tridimensional dos hidrogéis e os grupos hidrofílicos das cadeias poliméricas que permitem a interação com as moléculas de água.	7
FIGURA 2.3 - Representação estrutural do monômero N-vinilcaprolactama (NVCL) e do polímero Poli(N-vinilcaprolactama) (PNVCL).	10
FIGURA 2.4 - Representação do padrão de liberação de fármaco por sistemas convencionais e sistemas de liberação controlada.	12
FIGURA 2.5 - Representação esquemática da saída de moléculas de fármaco da matriz polimérica por difusão.....	15
FIGURA 2.6 - Representação esquemática da liberação de fármaco controlada por erosão da matriz polimérica.	16
FIGURA 4.1 - Esquema representando a metodologia utilizada na síntese das nanopartículas de SiO ₂	18
FIGURA 4.2 - Esquema do sistema reacional utilizado para a síntese do polímero poli-N(vinilcaprolactama).....	20
FIGURA 4.3 - Representação esquemática do frasco utilizado para o teste de liberação controlada de fármacos a partir de matrizes de hidrogel.	24
FIGURA 5.1 - Esquema do ancoramento do agente organosilano MPS na superfície das esferas de sílica de forma monodentada, bidentada e tridentada.	27
FIGURA 5.2 - Imagem de MEV (a) e distribuição de tamanho (b) de nanopartículas de SiO ₂ sintetizadas com 2 mL de NH ₃ não funcionalizadas.....	28
FIGURA 5.3 - Imagem de MEV (a) e distribuição de tamanho (b) de nanopartículas de SiO ₂ sintetizadas com 2 mL de NH ₃ funcionalizadas.	29
FIGURA 5.4 - Imagem de MEV (a) e distribuição de tamanho (b) de nanopartículas de SiO ₂ sintetizadas com 1 mL de NH ₃ funcionalizadas.	30
FIGURA 5.5 - Distribuições de diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas SiO ₂ -330 nm (a) e SiO ₂ -80 nm (b).	31
FIGURA 5.6 - Espectros de FTIR das nanopartículas de SiO ₂ sintetizadas pelo método de Stöber.....	32

FIGURA 5.7 - Curvas de análises termogravimétricas das nanopartículas de SiO ₂ .	34
FIGURA 5.8 - Curvas termogravimétricas normalizadas em 190 °C das nanopartículas funcionalizadas (a) e sua primeira derivada (dTG) (b).	35
FIGURA 5.9 - Esquema representando a polimerização entre o monômero NVCL e as nanopartículas de sílica funcionalizadas para formar os nanocompósitos com 1 e 5% de SiO ₂ .	36
FIGURA 5.10 - Espectro de RMN em núcleo de ¹ H do polímero PNVCL.	37
FIGURA 5.11 - Espectros de infravermelho do polímero puro e dos nanocompósitos obtidos em KBr.	38
FIGURA 5.12 - Curvas termogravimétricas dos polímeros aquecidos até 600 °C em atmosfera de gás oxigênio.	39
FIGURA 5.13 - Curvas termogravimétricas dos polímeros normalizadas em 200 °C (a) e a primeira derivada de todas as curvas (b).	40
FIGURA 5.14 – Curvas de DSC do polímero puro e dos nanocompósitos utilizadas para calcular o valor da temperatura de transição vítrea.	42
FIGURA 5.15 - Esquema representando uma solução de PNVCL em uma temperatura abaixo da LCST e após ser aquecida a uma temperatura acima da LCST, ocorrendo a transição sol-gel com formação de glóbulos e separação de fases.	43
FIGURA 5.16 - Espectros de UV-vis do polímero PNVCL em diferentes temperaturas.	44
FIGURA 5.17 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos com esferas de 80 nm em diferentes temperaturas.	46
FIGURA 5.18 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos com esferas de 330 nm em diferentes temperaturas.	47
FIGURA 5.19 - Análise da distribuição numérica do diâmetro hidrodinâmico dos glóbulos poliméricos com temperatura para PNVCL, NC-5%-80 e NC-5%-330 medidos no DLS.	50
FIGURA 5.20 - Viscosidade dinâmica das soluções aquosas de PNVCL, NC-5%-80 e NC-5%-330 com concentração de 1% m/v em diferentes temperaturas.	51
FIGURA 5.21 - Variação da transmitância a 500 nm das soluções dos polímeros PNVCL, NC-1%-80, NC-1%-330, NC-5%-80 e NC-5%-330 com o aumento da temperatura.	52

FIGURA 5.22 - Valores de OD a 500 nm para solução (1% m/v) de PNVCL em diferentes temperaturas e ajuste da Equação 15 aos dados experimentais.	54
FIGURA 5.23 - Valores de OD a 500 nm para soluções (1% m/v) de NC-1%-80 (a) e NC-5%-80 (b) em diferentes temperaturas e ajuste da Equação 15 aos dados experimentais.	56
FIGURA 5.24 - Valores de OD a 500 nm para soluções (1% m/v) de NC-1%-330 (a) e NC-5%-330 (b) em diferentes temperaturas e ajuste da Equação 15 aos dados experimentais.	57
FIGURA 5.25 - Representação da estrutura dos nanocompósitos na qual as nanopartículas de sílica interligam cadeias poliméricas agindo como agentes reticulantes.	59
FIGURA 5.26 - Teste de varredura dos módulos de armazenamento e perda em função da deformação de uma solução 20 % m/v de PNVCL a 1 Hz e 37 °C para determinar o regime linear viscoelástico (RLV).	60
FIGURA 5.27 – Módulos de armazenamento (G') e perda (G'') de soluções 20% m/v de PNVCL, NC-5%-80 e NC-5%-330 a 25 °C e 37 °C.	61
FIGURA 5.28 – Comparação de G' e G'' obtidos em testes em função do tempo usando uma frequência de 1 Hz, 5% de deformação e em diferentes temperaturas. A análise estatística foi realizada usando o software Graph Pad Prism 9 e o teste ANOVA de uma via. A significância estatística foi assumida para valores de $p < 0,05$: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001.	63
FIGURA 5.29 - A viscosidade complexa do PNVCL e seus nanocompósitos em função do tempo medida na temperatura ambiente e na temperatura fisiológica.	64
FIGURA 5.30 - Curvas de liberação de doxorrubicina (DOX) em pH 4 a partir de diferentes hidrogéis.	66
FIGURA 5.31 - Curvas de liberação de doxorrubicina (DOX) em pH 7 a partir de diferentes hidrogéis.	67
FIGURA 5.32 - Gráfico do índice de retenção em função do tempo de retenção dos polímeros utilizados no teste de erosão e do polímero sem sofrer tratamento.	69
FIGURA 5.33 – Espectros ^1H RMN do hidrogel após o teste de erosão e do sobrenadante contendo as cadeias liberadas.	71
FIGURA 5.34 - Curvas de liberação de naringina em pH 7,4 durante sete dias a partir de diferentes polímeros.	75

FIGURA 5.35 - Determinação da viabilidade celular realizada de forma indireta em células L929 (1×10^5 células/poço) tratadas com alíquotas de 24 h do teste de liberação de DOX. A análise estatística foi realizada usando o software Graph Pad Prism 9 e o teste ANOVA de uma via. A significância estatística foi assumida para valores de $p < 0,05$: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$	78
FIGURA 5.36 – Análise do diâmetro hidrodinâmico dos polímeros PNVCL e NC-5%-330 medido por DLS após os testes de erosão.....	79
FIGURA 5.37 - Determinação da viabilidade celular realizada de forma indireta em células MB49 (1×10^5 células/poço) tratadas com alíquotas de 24 h do teste de liberação de DOX. A análise estatística foi realizada usando o software Graph Pad Prism 9 e o teste ANOVA de uma via. A significância estatística foi assumida para valores de $p < 0,05$: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$	81

RESUMO

IMPACTO DAS NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA NA TRANSIÇÃO DE POLÍMEROS TERMOSENSÍVEIS USADOS NA ADMINISTRAÇÃO CONTROLADA DE MEDICAMENTOS. Métodos convencionais de entrega sistêmica de medicamentos têm demonstrado eficácia reduzida em comparação com sistemas de liberação localizada. Portanto, foram sintetizados nanocompósitos termossensíveis utilizando poli(N-vinilcaprolactama) (PNVCL) e nanopartículas de sílica para a liberação controlada e localizada de medicamentos tanto hidrofílicos (cloridrato de doxorrubicina - DOX) quanto hidrofóbicos (naringina). As nanoesferas foram produzidas em dois tamanhos distintos (80 e 330 nm), e suas superfícies foram modificadas com organossilano MPS para permitir sua ligação ao polímero. Embora a inclusão de sílica não tenha impactado a temperatura de transição sol-gel do PNVCL, provocou alterações no perfil de transição, resultando em uma transição difusa devido à menor solvatação das cadeias poliméricas. Além disso, houve uma redução na entalpia de transição, atribuída à formação de unidades cooperativas menores resultantes do papel de agente reticulante das nanopartículas. Experimentos de liberação controlada demonstraram que todos os materiais regularam efetivamente a liberação dos medicamentos ao longo de sete dias em temperatura fisiológica e em condições de pH ácido e neutro. A maior liberação em condições ácidas foi atribuída ao aumento da erosão da matriz polimérica. Por outro lado, a menor liberação de naringina em condições fisiológicas foi atribuída à maior interação com o interior hidrofóbico do polímero após a transição. Por fim, testes de citotoxicidade foram conduzidos em polímeros puros ou carregados com DOX usando células não tumorais (L929) e células tumorais de carcinoma de bexiga (MB49). Os polímeros não carregados não apresentaram diminuição na viabilidade em nenhuma linha celular após 24 horas, confirmando a biocompatibilidade dos materiais. No entanto, os polímeros carregados demonstraram citotoxicidade especificamente quando aplicados a células tumorais, com um efeito sinérgico entre as nanopartículas de 330 nm e o fármaco, resultando em uma redução de 80% na viabilidade em apenas 24 horas.

ABSTRACT

IMPACT OF SILICA NANOPARTICLES ON THE TRANSITION OF THERMOSENSITIVE POLYMERS USED IN DRUG DELIVERY SYSTEMS. Conventional systemic drug delivery methods have shown reduced effectiveness compared to localized release systems. Therefore, thermosensitive nanocomposites were synthesized using poly(N-vinylcaprolactam) (PNVCL) and silica nanoparticles for controlled and localized release of both hydrophilic (doxorubicin hydrochloride - DOX) and hydrophobic (naringin) drugs. The nanospheres were produced in two distinct sizes (80 and 330 nm), and their surfaces were modified with organosilane MPS to enable binding to the polymer. Although the inclusion of silica did not impact the sol-gel transition temperature of PNVCL, it induced changes in the transition profile, resulting in a diffuse transition due to reduced solvation of the polymeric chains. Additionally, there was a reduction in the transition enthalpy, attributed to the formation of smaller cooperative units resulting from the crosslinking role of the nanoparticles. Controlled release experiments demonstrated that all materials effectively regulated the release of the drugs over seven days at physiological temperature and under acidic and neutral pH conditions. The higher release under acidic conditions was attributed to increased erosion of the polymeric matrix. On the other hand, the lower release of naringin under physiological conditions was attributed to enhanced interaction with the hydrophobic interior of the polymer after the transition. Finally, cytotoxicity tests were conducted on pure or DOX-loaded polymers using non-tumor cells (L929) and bladder carcinoma tumor cells (MB49). The unloaded polymers showed no decrease in viability in any cell line after 24 hours, confirming the biocompatibility of the materials. However, the loaded polymers demonstrated cytotoxicity specifically when applied to tumor cells, with a synergistic effect between the 330 nm nanoparticles and the drug, resulting in an 80% reduction in viability in just 24 hours.

SUMÁRIO

1 - Introdução	1
2 - Revisão de Literatura	3
2.1 - Biomateriais poliméricos	3
2.2 - Nanopartículas de sílica	4
2.3 - Hidrogéis	6
2.4 - Poli(N-vinilcaprolactama).....	10
2.5 - Sistemas de liberação controlada.....	12
3 - Objetivos	17
4 - Metodologia experimental	18
4.1 - Materiais	18
4.1.1 - Síntese de nanopartículas de sílica	18
4.1.2 - Purificação do iniciador da polimerização.....	19
4.1.3 - Síntese de Poli(N-vinilcaprolactama).....	19
4.1.4 - Síntese de nanocompósitos PNVCL/SiO ₂	20
4.2 - Caracterização dos polímeros e nanopartículas.....	21
4.2.1 - Espectrofotometria na região do ultravioleta e visível (UV-vis).....	21
4.2.2 - Espectroscopia vibracional na região de infravermelho (FTIR)	21
4.2.3 - Microscopia eletrônica de varredura (FEG-MEV)	22
4.2.4 - Termogravimetria (TG)	22
4.2.5 - Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	22
4.2.6 - Espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	22
4.2.7 - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	23
4.2.8 - Viscosimetria	23
4.2.9 - Liberação de doxorrubicina (DOX) e naringina <i>in vitro</i>	23
4.2.10 - Teste de erosão dos hidrogéis	25
4.2.11 - Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).....	25

4.2.12 - Viabilidade celular	25
4.2.13 - Análise estatística	26
5 - Resultados e discussões	27
5.1 - Nanopartículas de SiO ₂	27
5.2 - Poli(N-vinilcaprolactama) (PNVCL).....	36
5.3 - Transição sol-gel	43
5.4 - Liberação controlada de medicamentos.....	64
5.5 - Estudo da atividade biológica dos polímeros.....	78
6 - Conclusões	82
7 - Referências Bibliográficas.....	84
Anexos	96

1 - INTRODUÇÃO

Estudos recentes têm demonstrado que a eficácia de um medicamento está relacionada com a forma como ele é administrado ^{1,2}. O controle da liberação do medicamento em diferentes locais do corpo humano, associado à velocidade de liberação, traz benefícios em relação aos métodos tradicionais de administração, tais como aumento da biodisponibilidade e diminuição dos efeitos colaterais ^{3,4}. Devido a esta constatação, pesquisas sobre novos materiais nanoestruturados ou supraorganizados para transporte e administração controlada de medicamentos (drug delivery) têm ganhado importância crescente ^{3,5,6}.

Nos últimos anos, os biomateriais poliméricos têm se destacado como uma alternativa para o desenvolvimento de sistemas de transporte e liberação controlada de medicamentos ⁷⁻⁹. Estes biomateriais podem ser utilizados como implantes em engenharia tecidual e na fabricação de sistemas injetáveis para o transporte e liberação controlada de medicamentos devido a sua compatibilidade com os sistemas biológicos ^{8,10}. Dentre os diferentes biomateriais poliméricos, os hidrogéis responsivos tem se destacado por permitir o controle da liberação de medicamentos variando parâmetros do sistema como temperatura, pH, campo magnético e campo elétrico ^{11,12}, sendo a sensibilidade à temperatura uma das propriedades mais usadas nos sistemas de resposta a estímulos ¹³.

Os hidrogéis termossensíveis são materiais poliméricos aquosos que se transformam em gel quando expostos a uma determinada temperatura, conhecida como temperatura crítica inferior de solubilidade (LCST) ^{7,14}. Este fenômeno é resultado da transição de um estado onde as cadeias poliméricas estão solvatadas para outro estado onde elas se aglomeram, ocasionando a separação de fases. Esta transição pode ser explicada pela formação ou quebra de ligações de hidrogênio. Em temperaturas abaixo da LCST, as cadeias poliméricas estão solvatadas pela água. No entanto, durante o aquecimento, as forças intra e intermoleculares das cadeias poliméricas são favorecidas, resultando na formação de glóbulos autoagregados que expõem as moléculas de água ^{15,16}.

Dentre os hidrogéis termossensíveis, o poli(N-vinilcaprolactama) (PNVCL) tem se mostrado uma opção mais biocompatível em comparação ao poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), o hidrogel termossensível mais estudado

para aplicações biomédicas. A degradação do PNVCL não libera amidas tóxicas no organismo, tornando-o uma opção segura para aplicações biomédicas. Além disso, o PNVCL apresenta uma LCST entre 32-34 °C, que é dependente tanto do comprimento da cadeia polimérica quanto da concentração em meio aquoso.^{16,17}

Os hidrogéis são materiais que apresentam uma desvantagem, a baixa resistência à tração, o que pode causar dissolução prematura do material durante a liberação do medicamento⁶. Para superar essa limitação, uma estratégia é utilizar nanopartículas durante a síntese dos hidrogéis, formando nanocompósitos. Esses materiais são multifásicos, onde pelo menos uma das fases apresenta dimensões na escala nanométrica^{18,19}. A inserção de nanopartículas inorgânicas em matrizes poliméricas, como os hidrogéis, resulta em nanocompósitos com propriedades físico-químicas e funcionalidades ajustáveis.

Os nanocompósitos podem ser fabricados com diferentes tipos de nanopartículas, como metálicas, poliméricas ou cerâmicas. Dentre as cerâmicas, as nanopartículas de sílica são uma opção interessante devido à sua biocompatibilidade, estabilidade química, capacidade de serem sintetizadas em diferentes formas, tamanhos e funcionalidades. Essas nanopartículas têm sido utilizadas para melhorar as propriedades mecânicas e térmicas dos nanocompósitos, bem como para sistemas de liberação de fármacos²⁰⁻²².

Neste contexto, este estudo tem como objetivo sintetizar um hidrogel nanocompósito termossensível e biocompatível baseado no poli(N-vinilcaprolactama) (PNVCL) modificado com nanopartículas esféricas de sílica para a liberação controlada de fármacos. O polímero termorresponsivo PNVCL será utilizado para controlar a liberação do fármaco, enquanto as nanopartículas de sílica atuam como agentes de reforço mecânico. Além disso, serão avaliados os efeitos da inserção das nanopartículas na matriz polimérica sobre a transição sol-gel do PNVCL e sobre seus parâmetros termodinâmicos.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Biomateriais poliméricos

Biomateriais são materiais de origem natural ou sintética que são utilizados para direcionar, suplementar ou substituir funções de tecidos vivos do corpo humano ²³. RAMAKRISHNA (2001) estendeu esta definição para materiais superficialmente ou estruturalmente compatíveis. Para o seu uso superficial, considera-se as propriedades químicas, físicas, biológicas e a sua morfologia superficial, enquanto que para a compatibilidade estrutural, adiciona-se às propriedades citadas anteriormente o seu desempenho mecânico ²⁴.

Uma interação otimizada entre o material e o hospedeiro é alcançada quando a compatibilidade é atingida tanto de modo superficial quanto estrutural. Existem diversos exemplos da utilização de biomateriais durante as civilizações antigas na produção de olhos, dentes, orelhas e narizes artificiais encontrados em múmias egípcias ²⁵.

Atualmente, esses materiais têm sido estudados em novas áreas, destacando-se a área de saúde. Nesse caso, os biomateriais podem ser utilizados como implantes ou como dispositivos médicos ²⁶. No primeiro caso, alguns exemplos de aplicações são as suturas, placas ósseas e a substituição de juntas e ligamentos. Já os dispositivos médicos são bastante utilizados na substituição ou restauração das funções de tecidos ou órgãos danificados, na cura destes tecidos, na correção de anomalias e na melhora da qualidade de vida do paciente ^{24,27}.

Os materiais que podem ser utilizados em aplicações biomédicas podem ser separados em metais, cerâmicas e polímeros. Os óxidos de alumínio, titânio e zircônio, assim como os biovidros, são utilizados como cerâmicas biocompatíveis. Metais como ouro, tântalo e ligas de aço inoxidável, Co-Cr e NiTi também possuem a capacidade de serem utilizados como biomateriais ^{24,28,29}.

Recentemente, biomateriais poliméricos envolvendo a liberação controlada de fármacos e a engenharia tecidual conquistaram o interesse de vários grupos de pesquisa. Estes materiais são desenvolvidos a partir de recursos naturais e/ou sintéticos ^{30,31}.

Biomateriais constituídos por polímeros de origem natural formam estruturas regulares e biocompatíveis, porém podem ser difíceis de esterilizar, além de conter contaminantes. Exemplos de biomateriais poliméricos de origem natural são as proteínas e polissacarídeos, como colágeno e quitosana, respectivamente ³².

Já os polímeros sintéticos podem ser preparados com composição e propriedades controladas e são esterilizados facilmente. Os materiais de origem sintética mais estudados são o poli(etilenoglicol) (PEG), o poli(hidroxietilmetacrilato) (PHEMA), o poli(N-isopropilacrilamida), o poli(álcool vinílico) (PVA), a poliacrilimida e a poli- ϵ -caprolactona (PCL) ³³.

Na liberação controlada de fármacos, geralmente, o agente bioativo está aprisionado ou encapsulado em uma matriz insolúvel, da qual é liberado para o organismo de forma controlada. Polímeros biocompatíveis são utilizados como essas matrizes insolúveis trazendo algumas vantagens como a redução da toxicidade do fármaco, maior estabilidade química durante a administração e biocompatibilidade ^{34,35}.

Dentro da engenharia tecidual, os polímeros de origem tanto natural quanto sintética são utilizados na fabricação de *scaffolds* ³⁶. Independentemente da sua origem, esses materiais de suporte destinam-se a apoiar a fixação, a manutenção, a proliferação e, ocasionalmente, a diferenciação das populações de células selecionadas ³⁷⁻³⁹. Além disso, o *scaffold* deve fornecer forma adequada suporte estrutural para o local anatômico pretendido ³⁷. Numerosos polímeros sintéticos têm sido utilizados na tentativa para produzir suportes incluindo poliestireno, ácido poli-L-lático (PLLA), ácido poliglicólico (PGA) e ácido poli-DL-lático-co-glicólico (PLGA) ^{40,41}.

2.2 - Nanopartículas de sílica

As nanopartículas de óxido de silício (SiO₂), também conhecido como sílica, são amplamente utilizadas e uma das primeiras a serem estudadas ⁴². Elas podem ser obtidas tanto por meio de extração do ambiente quanto por métodos sintéticos. Quando extraídas, as nanopartículas de sílica apresentam-se na forma de minerais cristalinos, como o quartzo, diferentemente das nanopartículas sintéticas,

que geralmente são amorfas. A vantagem de se sintetizar nanopartículas de sílica é a pureza do material final, uma vez que as nanopartículas extraídas geralmente contêm impurezas de outros metais ^{43,44}.

As nanopartículas de sílica são amplamente utilizadas devido a sua facilidade e baixo custo de síntese, bem como sua biocompatibilidade, inércia química e grande área superficial ^{20,45}. Entre as possíveis aplicações, destaca-se sua utilização em sistemas de liberação controlada, permitindo o carregamento de diferentes compostos, como fármacos, DNA, RNA, proteínas e pesticidas. Além de permitir a saída controlada dessas moléculas, sua utilização melhora a eficiência, especificidade, bioatividade e biocompatibilidade dos fármacos e biomoléculas ^{46,47}.

Recentes trabalhos também reportaram sua utilização na agricultura, com sua aplicação em solo junto com rizobactérias, resultando em aumento da viabilidade de sementes de plantas de milho e na produção de pesticidas inteligentes. Outras aplicações para essas nanopartículas incluem biorremediação, como em casos de derramamento de óleo, e seu uso em bioimagem ^{48,49}. As nanopartículas de sílica apresentam ainda propriedade antimicrobiana, o que as torna ainda mais interessantes para aplicações biomédicas ⁵⁰, especialmente quando aplicadas junto com polímeros para recuperação de tecidos, conferindo essa propriedade para os implantes ⁵¹.

Os principais métodos para a produção de nanopartículas de SiO₂ são a microemulsão reversa, a síntese em chama e a técnica sol-gel. A síntese de microemulsão reversa envolve a criação de micelas esféricas usando um surfactante dissolvido em um solvente orgânico ⁵². Quando em contato com a água, as cabeças polares se organizam para formar micelas reversas. As nanopartículas então crescem dentro desses micropoços após a adição de um precursor de silício ⁵³.

A síntese de chama, também chamada de condensação de vapor químico, depende da quebra de precursores orgânicos metálicos por meio da decomposição de chama. O processo mais comumente usado é a reação de oxigênio e hidrogênio com tetracloreto de silício (SiCl₄) como precursor ⁵⁴.

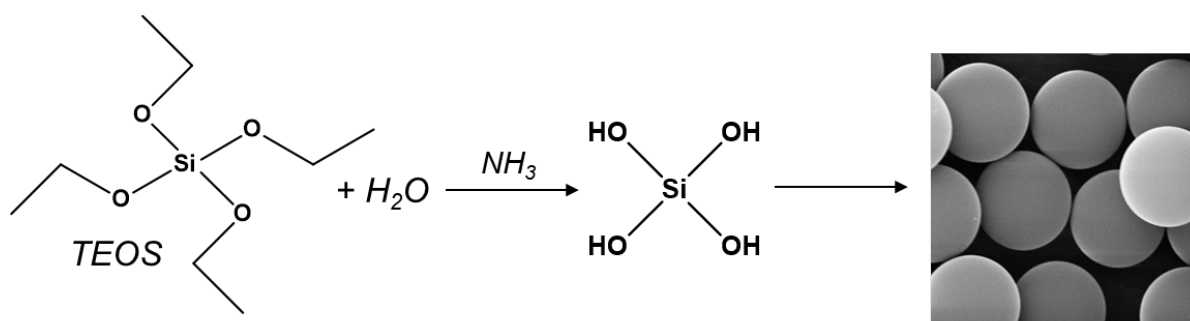


FIGURA 2.1 - Esquema do mecanismo que acontece na síntese das nanopartículas de sílica utilizando o método de Stöber.

Já o método sol-gel é uma técnica para a síntese de nanopartículas que se baseia na hidrólise e condensação de um precursor de silício, normalmente um alcóxido de silício, na presença de um catalisador ácido ou básico. O método sol-gel mais amplamente utilizado é o método de Stöber, que usa o tetraetilortosilicato (TEOS, Si(OC₂H₅)₄) como precursor. Este precursor é adicionado a uma solução contendo uma mistura de água e etanol, juntamente com um catalisador básico, tipicamente hidróxido de amônio. A hidrólise catalisada por base do hidróxido de amônio causa um ataque nucleofílico da água ao alcóxido, formando grupos silanol (Si(OH)₄). Esses grupos então se condensam para formar cadeias de Si-O-Si, que dão origem à estrutura tridimensional da sílica ⁴².

Uma das principais vantagens do método Stöber é que ele produz nanopartículas com morfologia esférica e tamanho controlado. No caso das nanopartículas de sílica, o tamanho final depende da razão molar TEOS/NH₃, sendo que uma razão maior resulta em nanopartículas menores ⁵⁵.

2.3 - Hidrogéis

Os hidrogéis são os materiais poliméricos mais utilizados como suporte para a formação de tecidos vivos (*scaffolds*). Estes materiais são formados por redes poliméricas tridimensionais que absorvem grandes quantidades de água (até milhares de vezes seu peso seco), permanecendo insolúveis em soluções aquosas devido à reticulação química ou física de cadeias poliméricas individuais ^{56,57}. Sua capacidade de absorver água é devido à presença de grupos hidrofílicos (amido,

amino, carboxila, hidroxila, etc.) nas cadeias poliméricas e o grau de intumescimento que pode ser modulado pela composição do polímero e pela densidade e natureza das ligações cruzadas na matriz do gel ⁵⁸. O teor de água de um hidrogel determina suas características físico-químicas únicas, que podem mimetizar os tecidos vivos, mais do que qualquer outra classe de biomateriais sintéticos ^{3,59}.

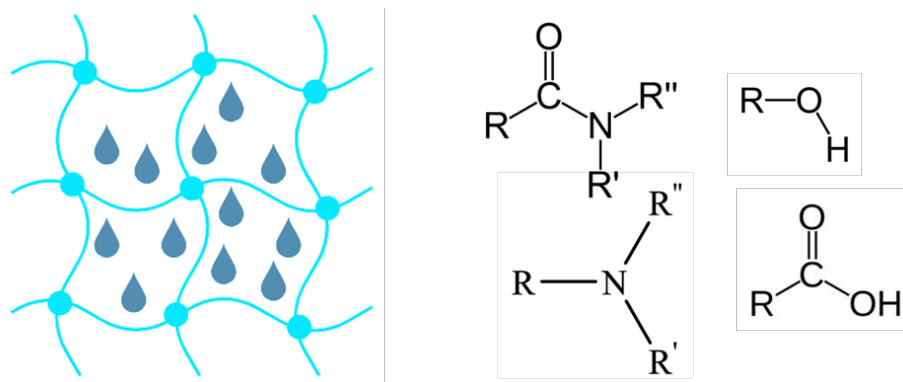


FIGURA 2.2 – Esquema representando a estrutura tridimensional dos hidrogéis e os grupos hidrofílicos das cadeias poliméricas que permitem a interação com as moléculas de água.

Os hidrogéis podem ser sintetizados a partir de muitos polímeros solúveis em água, abrangendo uma ampla gama de composições químicas e propriedades físicas, sendo estes polímeros naturais ou sintéticos ⁶⁰. Os hidrogéis produzidos a partir de polímeros naturais podem conter patógenos ou causar respostas inflamatórias, devido a dificuldade de serem esterilizados, contudo oferecem várias vantagens, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade e moléculas biologicamente reconhecíveis que suportam atividades celulares ⁶¹. Os hidrogéis sintéticos, por outro lado, não possuem essas propriedades bioativas inerentes, mas possuem estruturas bem definidas que podem ser modificadas para produzir biodegradabilidade e funcionalidade adaptáveis ⁵⁶.

Além disso, os hidrogéis podem ser formulados em uma variedade de formas físicas, resultando em sua utilização na prática clínica e medicina experimental para uma ampla gama de aplicações, incluindo engenharia de tecidos e medicina regenerativa, diagnósticos, imobilização celular, separação de biomoléculas ou células e materiais de barreira para regular aderências biológicas ⁶²⁻

As propriedades físicas dos hidrogéis despertaram particular interesse em seu uso em aplicações de entrega de medicamentos. Sua estrutura altamente porosa pode ser facilmente ajustada controlando-se a densidade de ligações cruzadas na matriz de gel e a afinidade dos hidrogéis pelo ambiente aquoso em que estão inchados^{65,66}. A sua porosidade permite também o carregamento de fármacos na matriz de gel e a subsequente liberação do fármaco a uma taxa dependente do coeficiente de difusão da molécula pequena ou macromolécula através da rede de gel^{6,67}.

Além disso, os hidrogéis podem controlar a liberação do fármaco devido a alterações (inchaço, dissolução ou degradação) na estrutura do gel em resposta a estímulos internos ou externos. Esses tipos de hidrogéis sensíveis ao meio ambiente são conhecidos como hidrogéis inteligentes^{3,68}.

Hidrogéis inteligentes ou *smart hydrogels* são polímeros que respondem com mudanças de propriedade a pequenas alterações em seu ambiente. Eles podem ser classificados de acordo com os estímulos aos quais respondem como: temperatura, pH, força iônica, luz, eletricidade e campo magnético. Alguns polímeros respondem a uma combinação de dois ou mais estímulos^{69,70}. Estes estímulos podem causar mudanças na forma, nas características da superfície, na solubilidade e resultar em uma transição sol-gel, permitindo várias novas aplicações no transporte de fármacos, engenharia de tecidos, cultura de células, bio-separações e sensores^{69,71,72}.

Hidrogéis sensíveis à temperatura e/ou ao pH têm sido utilizados na liberação controlada de fármacos. Especificamente, os hidrogéis sensíveis ao pH são frequentemente aplicados como sistemas de liberação controlada para administração oral de fármacos^{73,74}. No caso dos hidrogéis injetáveis, os hidrogéis mais estudados são os polímeros termossensíveis, normalmente constituídos por um sistema aquoso polimérico que forma um gel acima de uma dada temperatura, como a do corpo humano⁷.

Eles podem ser dissolvidos em água fria para enrijecerem durante seu aquecimento ao alcançar temperaturas acima da temperatura crítica inferior de solubilidade (LCST)⁷⁵. A sua sensibilidade ao ambiente térmico é útil uma vez que a temperatura é o único estímulo para a sua gelificação, o que permite que o processo

ocorra somente após aplicação no corpo, quando a temperatura é aumentada de ambiente para fisiológico ^{76,77}.

Esta gelificação é observada quando ocorre uma transição de um estado onde as cadeias se encontram abertas para um outro em que se tornam aglomeradas. Esta transição é acompanhada pela separação de fases e pode ser explicada pela formação ou quebra de ligações de hidrogênio ¹⁵. A LCST mostrada pelos polímeros sensíveis à temperatura evolui de um processo em duas etapas. Durante o aquecimento, as ligações de hidrogênio entre as cadeias poliméricas e as moléculas de água são quebradas. Em seguida, o material autoagrega a partir das interações hidrofóbicas do hidrogel, levando a uma separação de fase ^{15,16}. Em temperaturas abaixo da temperatura de transição, as moléculas de água estão presentes no interior das macromoléculas do polímero, porém durante o aquecimento, o sistema tende a privilegiar as forças intramoleculares das cadeias poliméricas, que se agregaram expulsando as moléculas de água ⁷⁸.

A LCST de copolímeros é influenciada pela natureza dos comonômeros. Os compostos hidrofóbicos diminuem a LCST enquanto os compostos hidrofílicos aumentam. Foi demonstrado que o fenômeno de LCST desaparece quando um copolímero possui muitos grupos de natureza hidrofílica ^{78,79}.

Estes sistemas aquosos exibem um equilíbrio entre interações hidrofílicas e hidrofóbicas. Abaixo da LCST, as interações hidrofílicas dominam e devido à estrutura especial da água, isso resulta em uma entropia de mistura positiva ($\Delta S_{\text{mix}} > 0$). Ao elevar a temperatura acima da LCST, a entropia de mistura começa a diminuir e passa a dominar o termo de entalpia ($\Delta H_{\text{mix}} < 0$). A mudança de energia livre ($\Delta G_{\text{mix}} = \Delta H_{\text{mix}} - T\Delta S_{\text{mix}}$) torna-se positiva na mistura, resultando na separação de fases ⁸⁰. Em outras palavras, acima da LCST as interações hidrofóbicas se tornam dominantes. Dessa forma, o polímero precipita da solução se a concentração for alta o suficiente.

2.4 - Poli(N-vinilcaprolactama)

O poli(N-vinilcaprolactama) (PNVCL) (Figura 2.1) é um dos polímeros sintéticos sensíveis à temperatura mais estudados, perdendo apenas para a poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm). Os dois polímeros mostram comportamento similar de LCST em água com transição entre 32 e 34 °C. Em ambos os casos, a LCST é totalmente reversível ⁸¹. A falta de popularidade do PNVCL entre os pesquisadores em comparação com o PNIPAAm deve-se provavelmente à dificuldade de polymerizar NVCL de maneira controlada ⁸². Apesar do PNIPAAm apresentar um bom controle de síntese, este polímero apresenta algumas desvantagens relacionadas à sua não biodegradabilidade e à produção de compostos tóxicos de amida em condições de forte acidez ⁸³.

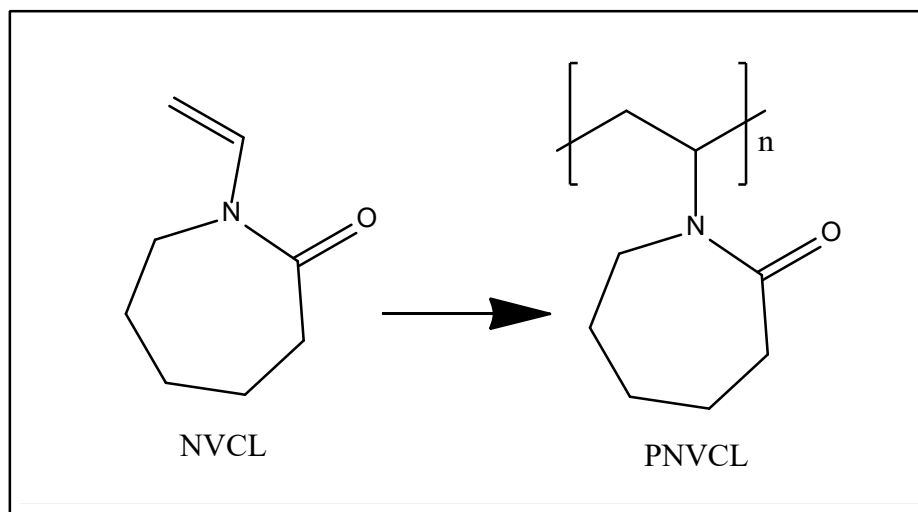


FIGURA 2.3 - Representação estrutural do monômero N-vinilcaprolactama (NVCL) e do polímero Poli(N-vinilcaprolactama) (PNVCL).

O PNVCL é sintetizado majoritariamente por polimerização radicalar. A sua primeira síntese foi publicada por SOLOMON (1968) ⁸⁴. Como o NVCL é um organo-solúvel anfifílico, pode ser solubilizado em solventes polares e apolares, isso permite que sua síntese por polimerização radicalar seja realizada em diferentes meios: tolueno, benzeno, isopropanol, dimetilsulfóxido (DMSO)/água ⁸⁵, água ⁸⁶, p-dioxano ⁸⁷ e N,N'-dimetilformamida (DMF) ⁸⁸. A taxa de propagação durante a polimerização é relativamente alta, uma vez que o monômero de N-vinilcaprolactama faz parte da família de monômeros não conjugados, que incluem

monômeros que não possuem estabilização por ressonância e que têm grupos de doação de elétrons pendurados na cadeia ⁸⁹.

TAGER (1990) ⁹⁰ publicou um estudo sobre a termodinâmica de soluções aquosas de PNVCL. Neste estudo, a LCST encontrada para o hidrogel foi no intervalo de 32-34°C e foi confirmado que a LCST é dependente da massa molar e da concentração da solução polimérica. Em 2000, foi realizado um novo estudo sobre o comportamento do PNVCL em água. Neste caso, foi feita uma comparação de sua transição com três tipos de comportamento crítico limitante. MEEUSSEN (2000) demonstrou que as soluções aquosas de PNVCL mostram um comportamento LCST tipo I ⁹¹. O tipo I representa o comportamento clássico de miscibilidade de Flory-Huggins em que aumentando o comprimento da cadeia do polímero, diminui-se a LCST e menor é a concentração de polímero necessária para que ocorra a transição.

No tipo II, o ponto crítico (LCST) é quase independente do comprimento da cadeia do polímero. Diferente do tipo III, em que quando o tamanho da cadeia é muito grande, a transição passa a ser independente da concentração. Por outro lado, se a concentração for muito alta, a transição passa ser independente da massa molar ⁸². LAUKKANEN (2004) sugeriu uma dependência da LCST com a massa molar (M_w) entre 21×10^3 a 1500×10^3 g/mol. Nesta faixa, a LCST variou de 31°C para a amostra com maior massa molar até 38 °C para a amostra com menor M_w ⁸⁶.

O PNVCL contém um grupo amida que fornece comportamento hidrofílico para o polímero. Ele tem uma unidade de repetição consistindo em uma amida cíclica onde o nitrogênio do grupo amida é diretamente ligado ao esqueleto do polímero hidrofóbico. Assim, ao contrário das poli (N-alquilacrilamidas) termossensíveis (como o PNIPAAm), não produz pequenos derivados de amida após a hidrólise ^{16,82}.

VIHOLA (2005) ¹⁶ estudaram a citotoxicidade *in vitro* de PNVCL com diferentes massas molares e na presença de enxertos de cadeias anfifílicas contendo segmentos de diferentes polímeros. A citotoxicidade foi determinada utilizando-se células intestinais e células pulmonares nas temperaturas abaixo e acima da LCST, em diferentes tempos de incubação e concentração dos polímeros. Foi observado que tanto o PNVCL puro, com massas molares entre 330×10^3 e

1500×10^3 g/mol, quanto o PNVCL com 300×10^3 g/mol e enxertado com PEO, foram bem tolerados. Além disso, as diferentes massas molares não resultaram em variação significativa da citotoxicidade. No entanto, o polímero mais hidrofóbico, PNIPAAm com 156×10^3 g/mol, produziu a maior citotoxicidade a 37°C .

2.5 - Sistemas de liberação controlada

Os sistemas convencionais de entrega de fármaco, como comprimidos e cápsulas de liberação imediata, têm várias limitações, como: a necessidade de dosagem frequente, baixa biodisponibilidade e possível baixa adesão do paciente por causa de efeitos colaterais. A liberação controlada de fármacos evoluiu como uma alternativa para superar esses problemas, através da liberação do fármaco sob uma taxa predeterminada por um período estipulado. Essas formulações são projetadas para que a concentração do fármaco sempre resida na janela terapêutica, evitando os efeitos tóxicos e nocivos que ocorrem devido à sobredosagem (Figura 2.2) ⁹².

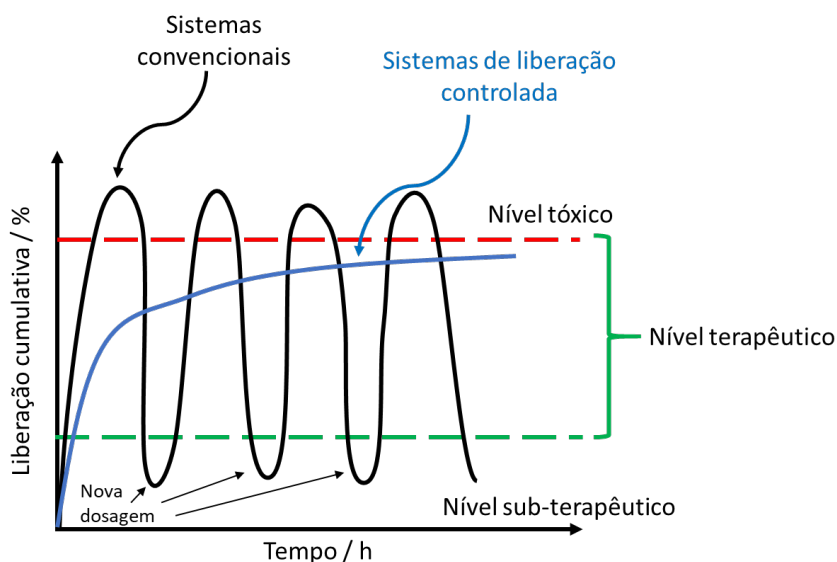


FIGURA 2.4 - Representação do padrão de liberação de fármaco por sistemas convencionais e sistemas de liberação controlada.

Os sistemas de liberação controlada de fármaco consistem de uma quantidade cumulativa total de fármaco que o paciente precisa, a qual é administrada de uma só vez, para obter o efeito desejado, juntamente com uma quantidade ideal de material polimérico, o qual controla a liberação do fármaco através do desenvolvimento de um sistema controlado por dissolução ou de um modelo baseado em difusão ^{93,94}.

Os sistemas de *drug delivery* começaram a ser estudados em 1950, e desde lá houve muitas mudanças antes de chegar à sua forma de aplicação atual. Com base em seu desenvolvimento, eles podem ser amplamente classificados em três categorias básicas. A primeira geração consistia em formas de dosagem convencionais para serem administradas uma ou duas vezes por dia e a liberação era baseada nos processos de dissolução, difusão e osmose ^{95,96}.

A segunda geração melhorou o controle sobre a velocidade de saída do fármaco conseguindo atingir cinéticas de primeira ordem e ordem zero. Essas formulações eram projetadas como depósitos de fármacos para atingir longos tempos de liberação. Nessa geração começou a utilização de *smart polymers* para facilitar a entrega localizada de bioativos ^{95,96}.

Por fim, na terceira geração, os sistemas começaram a ser projetados para liberar proteínas, peptídeos e biomoléculas de forma não invasiva. Um exemplo são hidrogéis injetáveis, que podem se modelar no espaço livre ao fazer a transição para o estado de gel ⁹⁷.

Os sistemas de liberação controlada de fármacos foram desenvolvidos principalmente para superar os problemas associados à dosagem convencional. Esses sistemas permitem uma frequência de dosagem reduzida pela administração da dose completa do fármaco em matriz polimérica de liberação controlada de tal forma que a matriz libera o fármaco por um tempo mais longo com taxa predeterminada. Isso elimina a chance de o paciente esquecer a dose específica e leva a uma melhor adesão ⁹⁸.

Outras vantagens são o aumento da biodisponibilidade, melhor estabilidade e diminuição ou eliminação do efeito tóxico do medicamento devido ao uso repetitivo e crônico. Ocorre também a redução da perda do medicamento devido

à eliminação contínua, o que pode fazer o uso total do medicamento ser reduzido em comparação com as formas de dosagem convencionais ⁹⁹.

A curta meia-vida, a baixa biodisponibilidade e a alta frequência de dosagem são algumas das principais deficiências de vários fármacos que são levadas em conta durante o processo de desenvolvimento de uma formulação. Outro fator considerado é a instabilidade química e física de um medicamento. Os polímeros são considerados uma alternativa melhor para lidar com as preocupações acima e a utilidade desses materiais está aumentando dia-a-dia, conforme a indústria farmacêutica se expande ¹⁰⁰. O propósito básico do polímero nesses sistemas é fornecer liberação controlada ou sustentada do medicamento de tal maneira que o medicamento seja liberado por um período de tempo mais longo, de modo que a frequência de dosagem desse medicamento possa ser minimizada ¹⁰¹.

Tem sido relatado na literatura que o controle de liberação de qualquer terapêutico com o auxílio de matrizes poliméricas depende do microambiente do local aplicado, além do pH do meio de dissolução, temperatura e volume do meio de dissolução. Nos últimos anos, os sistemas de liberação controlada e o uso de polímeros para o desenvolvimento de tais formulações passaram por uma grande mudança e se tornaram mais sofisticados ¹⁰². Vários estudos de pesquisa mostram que a formulação usando polímeros biocompatíveis, polímeros sensíveis a estímulos apresentam melhor comportamento de liberação para o local específico, levando a um decréscimo na toxicidade ¹⁰³.

Estudos mostram que um melhor controle sobre a liberação do medicamento pode aumentar sua segurança, eficácia e biodisponibilidade juntamente com uma maior adesão do paciente. O objetivo básico da formulação de tal sistema de entrega é alcançar uma melhor relação risco-benefício ^{104,105}. As duas principais formas pelas quais se pode obter um melhor controle sobre a liberação e um maior impacto é utilizando sistemas que se baseiam em mecanismos de controle temporal e de distribuição ¹⁰⁶. Um sistema de controle temporal concentra-se principalmente na entrega do medicamento de uma maneira controlada por um longo período de tempo, enquanto o sistema de controle de distribuição se concentra na entrega do medicamento no local específico ¹⁰⁷.

A liberação controlada de qualquer fármaco pode ser formulada através de sua mistura com uma concentração otimizada de polímero, o qual retarda a liberação no meio por meio de dois mecanismos básicos: difusão e dissolução. Em geral, a liberação do medicamento basicamente segue a teoria de difusão com base na primeira lei de difusão de Fick ¹⁰⁸. Com base nesse fenômeno, pode-se dizer que a liberação de qualquer medicamento pode ser regulada pelo controle da difusão (movimento das moléculas da região de maior para menor concentração), que é claramente dependente do movimento da água através da matriz de controle de liberação. Em outras palavras, a velocidade de intumescimento da matriz polimérica controla o processo de difusão ¹⁰⁹. A Figura 2.3 esquematiza a saída do fármaco da matriz polimérica por difusão.

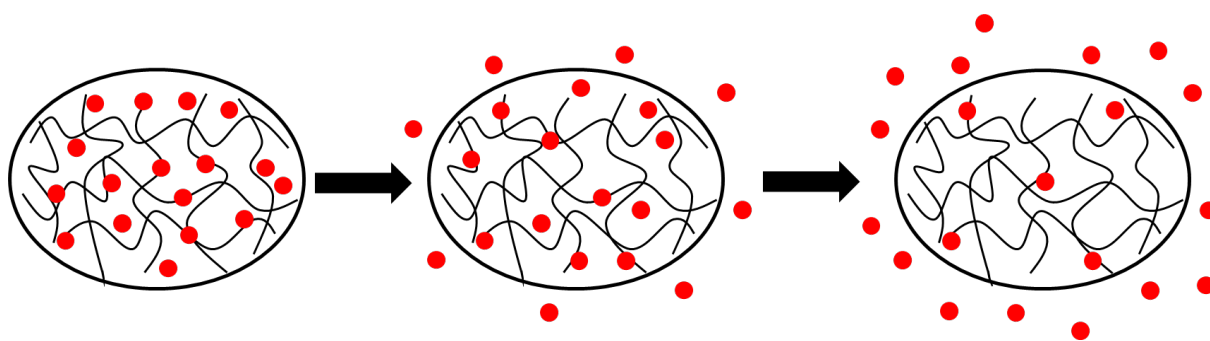


FIGURA 2.5 - Representação esquemática da saída de moléculas de fármaco da matriz polimérica por difusão.

No caso do sistema de erosão controlada, o material polimérico sofre erosão após desenvolver uma frente erodível ligeiramente dilatável e libera a droga emaranhada na matriz polimérica (Figura 2.4). Existem várias maneiras que podem levar ao processo de degradação polimérica final. Estes são fotoerosão, erosão térmica, erosão mecânica e erosão química. As três primeiras formas de erosão também podem ser consideradas erosão física ¹¹⁰.

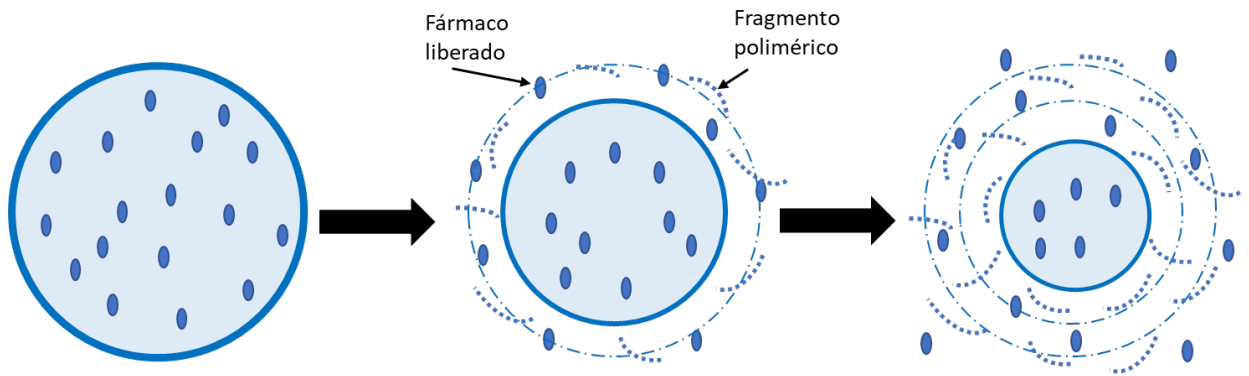


FIGURA 2.6 - Representação esquemática da liberação de fármaco controlada por erosão da matriz polimérica.

3 - OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo sintetizar nanocompósitos injetáveis através da polimerização de PNVCL na presença de nanoesferas de sílica para a obtenção de materiais biocompatíveis que possam ser empregados como sistemas de *drug delivery* para diferentes tipos de medicamentos. Para tanto, as principais metas desse estudo foram:

- i. Sintetizar nanopartículas de sílica de morfologia esférica de dois tamanhos diferentes pelo método de Stöber variando a quantidade de hidróxido de amônio.
- ii. Sintetizar hidrogéis de PNVCL que apresentem uma temperatura crítica inferior de solubilidade acima da temperatura ambiente (25 °C) e abaixo da temperatura fisiológica (37 °C) permitindo que sejam utilizados como sistemas injetáveis.
- iii. Funcionalizar as nanoesferas de sílica com MPS para permitir sua ligação covalente com o hidrogel durante a polimerização *in situ*, com a finalidade de melhorar a distribuição das nanopartículas na matriz polimérica e as propriedades reológicas dos nanocompósitos.
- iv. Caracterizar o comportamento termossensível, estrutural e térmico dos nanocompósitos e, principalmente, o efeito das nanoesferas sobre a transição sol-gel do PNVCL, sobre os parâmetros termodinâmicos da mesma e sobre as propriedades reológicas.
- v. Analisar a capacidade desses nanocompósitos em capturar e liberar de forma controlada os fármacos doxorrubicina (DOX) e naringina em temperatura fisiológica (37 °C) e em diferentes pH (4,0 e 7,4). Além da determinação do modelo e dos parâmetros cinéticos da curva de liberação.
- vi. Analisar a citotoxicidade dos polímeros utilizando células não tumorais (L929) e tumorais de carcinoma de bexiga (MB49), assim como o efeito da liberação de DOX sobre as duas linhas celulares utilizando um método indireto de determinação da viabilidade celular.

4 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1 - Materiais

4.1.1 - Síntese de nanopartículas de sílica

Para a síntese de nanopartículas de sílica, empregou-se o método de Stöber ⁴². Inicialmente, preparou-se uma solução com 35 mL e 6 mL de tetraetilortosilicato (TEOS) em um béquer e outra com 35 mL de etanol anidro, 25 mL de água destilada e duas quantidades diferente de hidróxido de amônio (1 e 2 mL). Como observado por ARANTES (2012) ¹¹¹, é possível controlar o tamanho das nanopartículas com a quantidade de NH_4OH adicionada. A mistura foi agitada por 4 h à temperatura ambiente. Em seguida, adicionaram-se 200 μL de 3-(trimetoxisilil)propil metacrilato (MPS) e a mistura foi agitada por mais 20 h à temperatura ambiente (Figura 4.1).

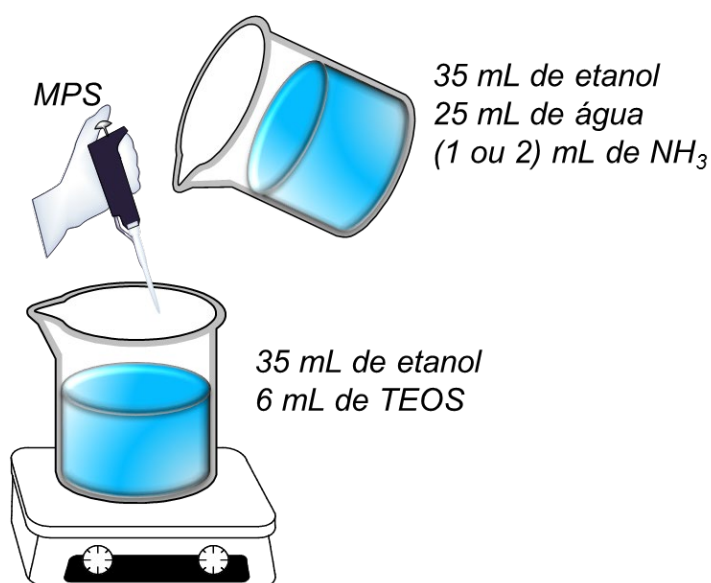


FIGURA 4.1 - Esquema representando a metodologia utilizada na síntese das nanopartículas de SiO_2 .

As nanopartículas de sílica foram purificadas por três etapas de lavagem em etanol anidro e centrifugação, e posteriormente as mesmas foram secas em estufa a 60 °C.

4.1.2 - Purificação do iniciador da polimerização

O iniciador 2,2'-azo-bis-isobutironitrila (AIBN) foi purificado por recristalização em metanol. Preparou-se uma solução de AIBN (0,152 mol/L) em metanol anidro e a solução resultante foi aquecida a 50 °C até sua completa dissolução. Posteriormente, a solução foi filtrada para a remoção de impurezas e o filtrado foi transferido para outro frasco de Erlenmeyer. A solução foi evaporada até metade do volume inicial, vedada e colocada no congelador por 3 dias para que o AIBN cristalizasse. Os cristais foram filtrados, secos com gás nitrogênio e armazenados no congelador a -5 °C.

4.1.3 - Síntese de Poli(N-vinilcaprolactama)

A síntese do polímero PNVCL foi realizada utilizando a metodologia desenvolvida pelo grupo de pesquisa ¹¹²⁻¹¹⁵. No início da polimerização radicalar, 5 g de monômero NVCL foram dissolvidos em 20 g de solvente dimetilsulfóxido (DMSO) e aquecidos a 70 °C em atmosfera de nitrogênio. Em seguida, 0,112 g do iniciador AIBN foi dissolvido em 8,33 g de DMSO e gotejado sobre a solução de monômero. O sistema reacional (Figura 4.2) foi mantido em agitação por 4 h e o polímero obtido foi purificado utilizando uma membrana de diálise em um béquer com água destilada para a remoção do solvente. A água do sistema de purificação foi trocada duas vezes por dia durante 4 dias. O polímero foi seco em estufa a 50 °C.

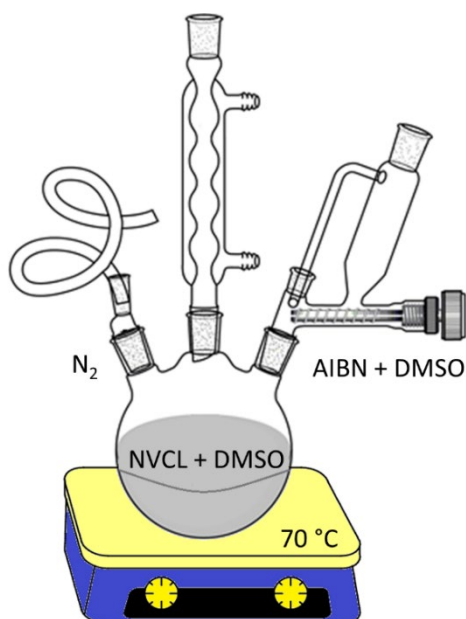


FIGURA 4.2 - Esquema do sistema reacional utilizado para a síntese do polímero poli-N(vinilcaprolactama).

4.1.4 - Síntese de nanocompósitos PNVCL/SiO₂

O nanocompósito de PNVCL com nanopartículas de sílica com tamanho de 80 e 330 nm modificadas com MPS nas concentrações mássicas de 1 e 5 % em relação a massa inicial de monômeros foram preparados similarmente ao polímero. As nanopartículas foram adicionadas ao meio reacional juntamente com os monômeros e o solvente DMSO. Para garantir uma boa dispersão, essa solução foi colocada em ultrassom por 15 min. Em seguida, o iniciador radicalar AIBN foi adicionado por gotejamento. O nanocompósito foi mantido sob aquecimento a 70 °C, atmosfera de nitrogênio, durante 4 h. O material foi purificado utilizando uma membrana de diálise em um béquer com água destilada para a remoção do solvente. A água do sistema de purificação foi trocada duas vezes por dia durante 4 dias e, posteriormente seco em estufa a 50 °C. Os materiais obtidos foram denominados NC-1%-80 (PNVCL com 1% de nanopartículas de SiO₂ com tamanho de 80 nm), NC-1%-330 (PNVCL com 1% de nanopartículas de SiO₂ com tamanho de 330 nm), NC-5%-80 (PNVCL com 5% de nanopartículas de SiO₂ com tamanho de 80 nm) e NC-5%-330 (PNVCL com 5% de nanopartículas de SiO₂ com tamanho de 330 nm).

Foram preparados nanocompósitos com mesmo teor de massa de nanopartículas, porém de diferentes tamanhos, já que isso permite a obtenção de materiais com diferentes áreas superficiais de sílica. Como as nanoesferas de 80 nm possuem uma área superficial maior do que as de 330 nm, os nanocompósitos NC-1%-80 nm e NC-1%-330 possuem uma área superficial de sílica maior do que os materiais NC-5%-80 e NC-5%-330, respectivamente.

4.2 - Caracterização dos polímeros e nanopartículas

4.2.1 - Espectrofotometria na região do ultravioleta e visível (UV-vis)

O polímero e os nanocompósitos foram analisados pela espectroscopia de UV-vis no modo transmitância entre 200-800 nm em um equipamento Multi-Spec-1501 UV-vis Spectrophotometer Shimadzu, utilizando um controlador de temperatura acoplado TCC-Controller Shimadzu 240, a fim de se investigar a temperatura de ponto de turvação (T_{cp}), temperatura na qual a solução polimérica muda de transparente para opaca. A transmitância das suspensões poliméricas preparadas em água destilada (1 % massa/volume) foi analisada a cada 0,5 °C e o sistema foi mantido por 3 min em cada temperatura para garantir sua estabilização. Para o ajuste da Equação 15 aos dados experimentais de densidade ótica em função da temperatura empregou-se o software *Mathematica 11* para o cálculo dos parâmetros termodinâmicos. As diferenças entre os resultados foram avaliadas por meio de análise de variância (ANOVA) seguida de pós-testes de Tukey.

4.2.2 - Espectroscopia vibracional na região de infravermelho (FTIR)

As nanopartículas de sílica e os polímeros foram analisados por meio da espectroscopia de infravermelho. Empregou-se um espectrômetro vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) Bruker modelo EQUIXOX 55 com um acessório de reflectância difusa (DRIFT) e de transmitância na região de 400-4000 cm^{-1} , com 32 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} . As amostras

foram maceradas para garantir a obtenção de um pó fino que foi então misturado com brometo de potássio também macerado.

4.2.3 - Microscopia eletrônica de varredura (FEG-MEV)

A morfologia e tamanho das nanopartículas de sílica foram analisados por microscopia eletrônica de varredura, por meio de um microscópio Zeiss Supra 35VP com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (FEG-MEV). Dispersões coloidais das nanopartículas em etanol foram depositadas em um substrato de silício para a análise e secas à temperatura ambiente.

4.2.4 - Termogravimetria (TG)

Para a análise da degradação térmica dos polímeros e do organosilano na superfície das nanopartículas de sílica utilizou-se um analisador termogravimétrico (TG) modelo TG 209 F3 (Netzch, Alemanha) com taxa de aquecimento de 10 °C / min entre 25 e 700 °C em uma atmosfera de gás nitrogênio.

4.2.5 - Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As medidas de calorimetria exploratória diferencial dos polímeros foram realizadas em um analisador termogravimétrico com varredura térmica diferencial (DSC) Netzch modelo DSC 204 Phoenix, com taxa de aquecimento de 20 °C / min, em uma atmosfera de N₂ e na faixa de temperatura de 0 a 300 °C.

4.2.6 - Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Medidas do diâmetro hidrodinâmico das esferas de sílica e dos polímeros em água destilada foram realizadas em um analisador de tamanho de

partículas Litesizer 500 (Anton Paar). No caso dos polímeros a temperatura foi variada na faixa de 33 a 34,6 °C em intervalos de 0,2 °C com intervalos de 1 min para a temperatura estabilizar.

4.2.7 - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance III operando em um campo magnético Oxford de 9,4 Tesla, que tem relacionada uma frequência de 400 MHz para o núcleo de hidrogênio-1. As análises em solução foram realizadas com o uso de uma sonda sintonizável para uma ampla faixa de frequências (40-160 MHz) utilizando tubos de 10 mm de diâmetro. As amostras de polímero foram solubilizadas adicionando 7 mg de material em aproximadamente 0,7 mL de água, utilizando deutério como padrão externo. Todos os experimentos de ^1H foram realizados à temperatura ambiente.

4.2.8 - Viscosimetria

A mudança na viscosidade com a temperatura dos polímeros foi analisada usando um microscópico automatizado AMVn (Anton Paar). As dispersões poliméricas com concentração de 10 mg/mL foram aquecidas de 33,0 a 36,0 °C e as viscosidades foram medidas a cada 0,5 °C nos ângulos 70° e -70°.

4.2.9 - Liberação de doxorrubicina (DOX) e naringina *in vitro*

As soluções de DOX e naringina com concentração de 100 ppm utilizada nos testes foram preparadas, respectivamente, pela diluição de cloridrato de doxorrubicina de concentração inicial de 2 mg/mL em água e pela diluição inicial de naringina em DMSO e posteriormente em água. Foi utilizada a temperatura de 37 °C e dois diferentes tampões preparados com concentração 1X para controlar o pH da liberação: tampão fosfato salino (pH 7,4) e tampão acetato (pH 4,0). As amostras

foram preparadas pela adição de 200 mg de polímero em 1 mL de solução de fármaco, depois essa mistura foi deixada na geladeira a 5 °C por 24 h. Para a realização do teste, 300 µL de amostra foram adicionados a um frasco e incubados por 5 min no banho termostático a 37 °C para a formação do hidrogel, seguido pela adição de 1,8 mL de tampão (Figura 4.3). Em tempos predeterminados, 1 mL de sobrenadante foi retirado e substituído por tampão fresco. Os testes foram realizados por um período total de sete dias dentro de um banho termostático a 37 °C e a temperatura dentro do banho foi checada em todas as retiradas das alíquotas para garantir que a temperatura estava correta. As alíquotas de DOX foram analisadas em um espectrômetro UV-vis no comprimento de onda de 480 nm e de naringina no comprimento de onda de 282 nm. Foi empregado o procedimento relatado por LI (2018) ¹¹⁶ para calcular a liberação cumulativa, o qual está representado das Equações 1 e 2:

$$M_n = V \cdot C_n + V_1 \cdot \sum_{n=1}^{n-1} C_{n-1} \quad (1)$$

$$W = \frac{M_n}{M} \cdot 100\% \quad (2)$$

M_n e C_n são a massa cumulativa liberada e a concentração em cada alíquota, V e V_1 são o volume do meio de liberação e o volume das alíquotas, M é a massa inicial de fármaco adicionada no frasco e W a porcentagem de liberação cumulativa. Todos os testes foram realizados em triplicata para melhor avaliação estatística e os resultados estão na forma de média \pm DP.

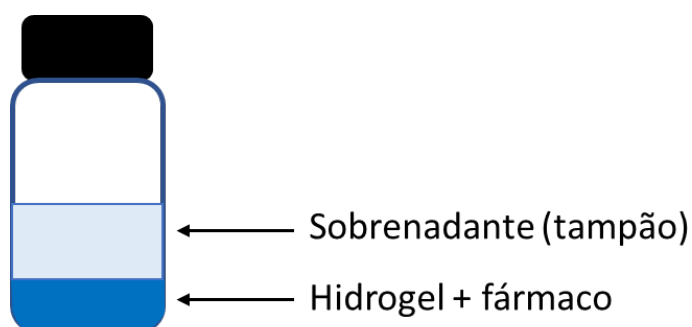


FIGURA 4.3 - Representação esquemática do frasco utilizado para o teste de liberação controlada de fármacos a partir de matrizes de hidrogel.

4.2.10 - Teste de erosão dos hidrogéis

Com o intuito de determinar se durante o teste de liberação controlada o polímero estava sofrendo um processo de dissolução e/ou de degradação foi realizado um teste de erosão. 300 μ L de uma solução polimérica de PNVCL com concentração 20% m/v foi adicionado em um frasco e deixado em um banho termostático a 37 °C por 5 min para a formação do gel. Em seguida, foi adicionado 1,8 mL de tampão fosfato salino para o teste em pH neutro e 1,8 mL de tampão acetato para o teste em pH ácido. Assim como no teste de liberação, em tempos pré-determinados 1 mL de sobrenadante foi retirado e substituído por tampão fresco durante um período de sete dias. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.2.11 - Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)

Para avaliar a variação de massa molar do polímero antes e após os testes de erosão, foi utilizada a técnica de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). A análise de 200 μ L de solução PNVCL (0,05 g / mL) foi realizada utilizando tetraidrofurano (THF) como eluente a 50 °C, taxa de fluxo de 1 mL/min, em um Viscotek HT-GPC (Malvern) com três colunas H-806 M (mistas) e detector de índice de refração. A calibração foi feita usando padrões de poliestireno estreitamente distribuídos (500 a 2500000 g/mol). Os valores encontrados de M_n e M_w para o PNVCL antes e após os testes foram 25451 g/mol e 153671 g/mol, respectivamente e um PDI de 6,04.

4.2.12 - Viabilidade celular

Células tumorais de carcinoma de bexiga (MB49) e fibroblastos (L929) de camundongos foram mantidos em incubadora a 37 °C, 5% de CO₂, 95% de umidade e em Meio Eagle modificado por Dulbecco - DMEM (Gibco, Life Technologies, EUA) com altos níveis de glicose, suplementado com soro bovino fetal a 10% (Gibco, Life Technologies, EUA), glicose 4,5 g/L, L-glutamina 2 mM, NaHCO₃

1,5 g/L, antibiótico penicilina 1% (100 U/L ml) e estreptomicina (100 µg /ml) (meio de cultura completo). As passagens celulares foram realizadas por tripsinização a cada dois dias. As células foram mantidas em cultura até atingir 90% de confluência.

A viabilidade celular foi avaliada por método indireto baseado no trabalho de PEREIRA (2018) ¹¹⁷, que também testaram um hidrogel compósito. As linhagens celulares MB49 e L929 foram semeadas em placas de cultura de 96 poços (Corning Incorporated, NY, EUA) na concentração de 1×10^5 células/poço em Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) completo e mantidas pelo período de 24 h para adesão celular em uma incubadora a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Para avaliar o efeito da liberação de DOX pelos polímeros, 300 µL de amostras de hidrogéis a 20% em peso (em PBS) contendo 0,345 µM de DOX foram incubados em banho-maria a 37 °C por 15 min com subsequente adição de 1,8 mL de meio de cultura DMEM. Após 24 h, 100 µL do sobrenadante foram adicionados às células em poços de 350 µL. Diferentemente do teste anterior em que o meio de liberação era o PBS, neste caso o teste foi realizado em meio de cultura para permitir a adição da alíquota do fármaco liberado nas células. Não realizamos um teste utilizando apenas DOX livre, pois esta metodologia não mimetizaria as condições de liberação controlada e toda a dosagem da droga seria aplicada de uma só vez nas células. Após 24 h, as células foram lavadas cuidadosamente com tampão PBS (1X) e o teste de viabilidade celular foi realizado adicionando 200 µL/poço de uma solução de Resazurina 70 mM (Sigma-Aldrich, EUA). As células foram mantidas por 4 horas nesta solução e as leituras de absorvância foram feitas em um espectrofotômetro entre os comprimentos de onda de 570 a 600 nm.

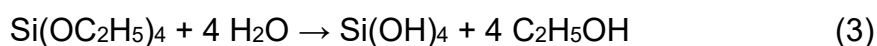
4.2.13 - Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Califórnia, EUA). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão de experimentos com pelo menos três ensaios independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas análise de variância (ANOVA) de uma via, usando o teste de Tukey para avaliações post hoc das diferenças entre as amostras. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 - Nanopartículas de SiO₂

O método Stöber é conhecido por permitir a obtenção em larga escala de nanopartículas de sílica monodispersas ⁴². Nesta reação, o alcóxido de silício solubilizado em etanol é hidrolisado pela água, sendo um processo catalisado pela amônia (Equação. 3). Como resultado, o tetraedro de sílica formado na reação anterior se condensa em uma rede tridimensional de ligações Si-O-Si, gerando a estrutura SiO₂ (Equação 4).



ARANTES (2012) ¹¹¹ mostrou que é possível controlar o tamanho das nanopartículas de SiO₂, modificando a quantidade de cada reagente adicionado na mistura reacional. Em todos os experimentos em que a quantidade de amônia em solução foi reduzida de 0,06 para 0,03 mol, houve uma diminuição no diâmetro das esferas de sílica. Uma possível explicação para esse efeito é que a amônia favorece a formação de mais grupos silanóis, sendo que a formação desses grupos pela reação de hidrólise é a etapa determinante ¹¹⁸. No presente estudo, foram utilizadas essas mesmas quantidades de hidróxido de amônio para controlar o tamanho das nanopartículas.

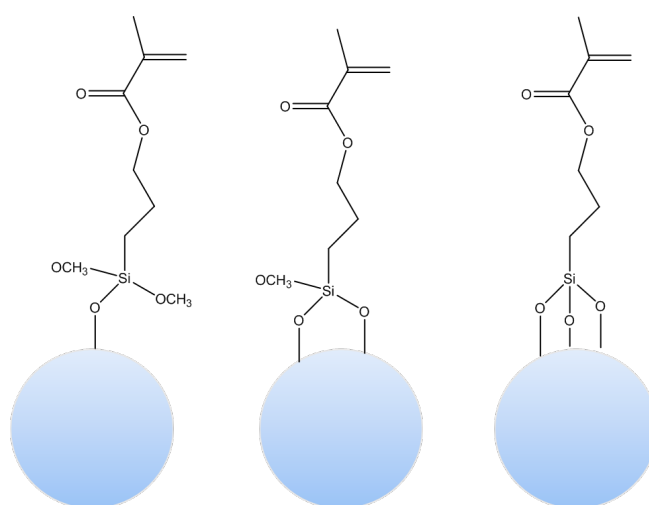


FIGURA 5.1 - Esquema do ancoramento do agente organossilano MPS na superfície das esferas de sílica de forma monodentada, bidentada e tridentada.

Após 4 h de reação, o MPS foi adicionado à solução para funcionalizar a superfície das nanopartículas visando a formação de ligações covalentes entre as nanopartículas de SiO₂ e a matriz polimérica. As moléculas de MPS se ligam à superfície das esferas de sílica através de uma reação de condensação entre o grupo -OCH₃ do MPS e o grupo silanol da sílica ^{119,120}. BORSACCHI (2006) ¹²¹ mostrou que esse ancoramento pode ocorrer de três formas: monodentada, bidentada e tridentada, como mostrado na Figura 5.1. A funcionalização dessas nanopartículas garante um sistema disperso, visto que o organosilano cria um impedimento estérico, assim como a polimerização radicalar das nanopartículas com o PNVCL através da ligação covalente dos grupos metacrilato do MPS com os grupos vinil do monômero NVCL.

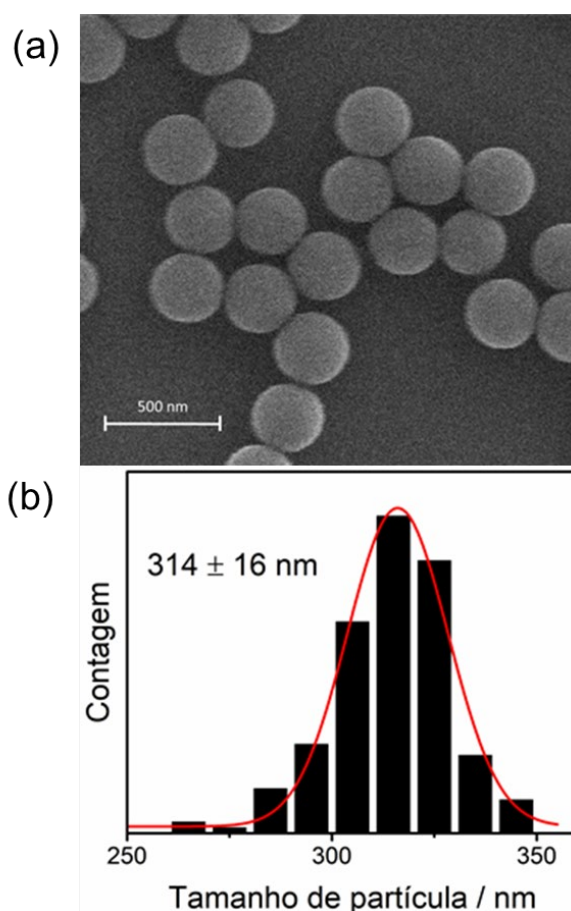


FIGURA 5.2 - Imagem de MEV (a) e distribuição de tamanho (b) de nanopartículas de SiO₂ sintetizadas com 2 mL de NH₃ não funcionalizadas.

Neste estudo foi variada a quantidade de amônia adicionada no início da reação (1 e 2 mL) para obter nanopartículas de sílica de dois tamanhos diferentes. É possível ver nas Figuras 5.2 e 5.3, respectivamente, as imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das nanopartículas sintetizadas com 2 mL de amônia sem MPS (denominada SiO₂-Sem MPS) e com MPS (denominada SiO₂-330 nm). As nanopartículas sem MPS apresentaram diâmetro médio de 314 ± 16 nm, enquanto as nanopartículas funcionalizadas apresentaram diâmetro médio de 330 ± 21 nm.

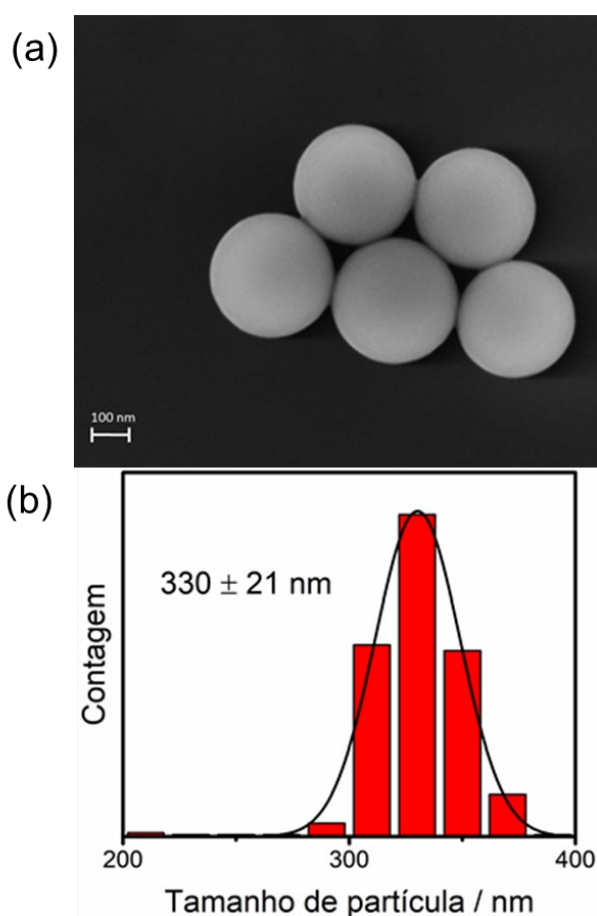


FIGURA 5.3 - Imagem de MEV (a) e distribuição de tamanho (b) de nanopartículas de SiO₂ sintetizadas com 2 mL de NH₃ funcionalizadas.

A Figura 5.4 mostra as nanopartículas funcionalizadas sintetizadas com 1 mL de amônia (denominadas SiO₂-80 nm). É possível ver que as nanopartículas mantiveram a morfologia esférica e o diâmetro médio encontrado foi de 80 ± 13 nm. Este resultado está em acordo com o observado por ARANTES (2012)¹¹¹ que

também obteve nanopartículas menores quando usaram menores quantidades de NH_3 .

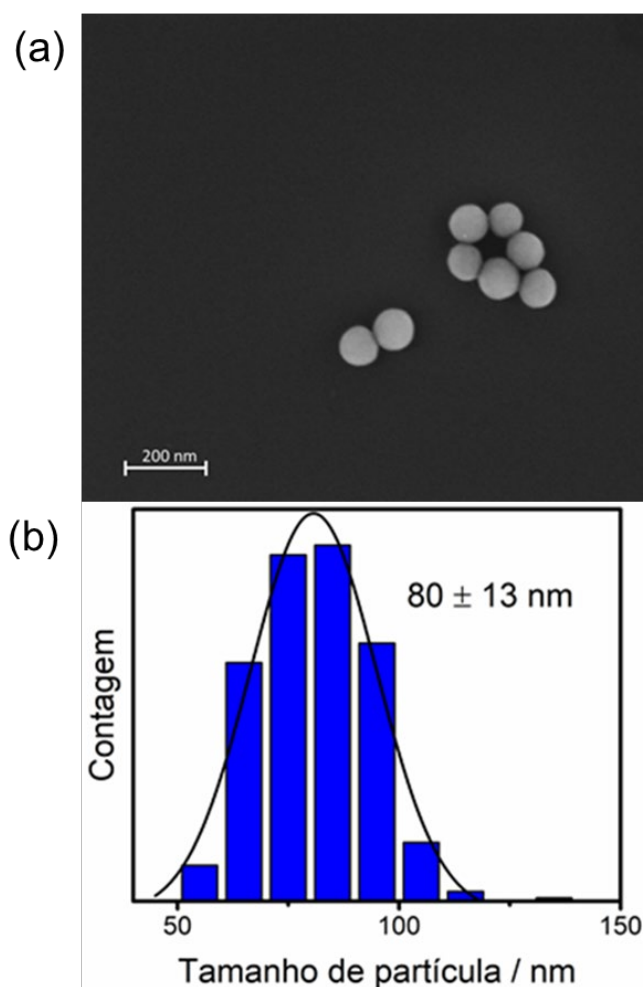


FIGURA 5.4 - Imagem de MEV (a) e distribuição de tamanho (b) de nanopartículas de SiO_2 sintetizadas com 1 mL de NH_3 funcionalizadas.

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi utilizada para estimar o diâmetro hidrodinâmico (D_h) das nanopartículas de sílica funcionalizadas. Na Figura 5.5 estão representadas as distribuições dos diâmetros hidrodinâmicos em função da porcentagem numérica. Assim como na medida de MEV, as nanopartículas sintetizadas com 2 mL de amônia (Figura 5.5a) apresentaram um maior diâmetro médio de 375 ± 66 nm, em comparação com as nanopartículas sintetizadas com 1 mL de amônia que apresentaram 98 ± 15 nm (Figura 5.5b).

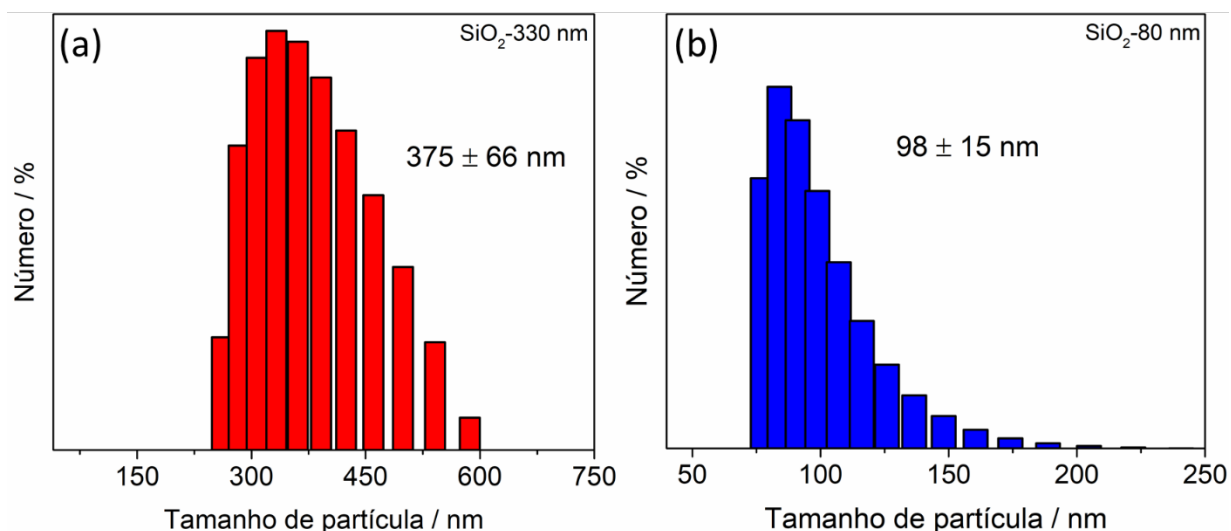


FIGURA 5.5 - Distribuições de diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas SiO₂-330 nm (a) e SiO₂-80 nm (b).

Apesar de os dados das medidas de MEV e DLS serem coerentes, é possível notar que os valores de diâmetro obtidos pela técnica de DLS foram maiores para ambas as nanopartículas. Isso ocorre porque a técnica de MEV avalia o diâmetro das nanopartículas secas, enquanto que a técnica de DLS avalia o diâmetro hidrodinâmico ¹²². A importância de medir o diâmetro das nanopartículas utilizando estas duas técnicas é pelo fato de elas se complementarem. Apesar de o DLS avaliar um outro tipo de diâmetro, o número de nanopartículas analisadas é maior do que na medida de MEV, gerando um dado estatístico mais representativo.

Para avaliar se o processo de modificação das nanopartículas de sílica com MPS foi bem-sucedido, utilizou-se a técnica de FTIR. Na Figura 5.6 é possível ver os espectros das três nanopartículas sintetizadas: SiO₂-Sem MPS, SiO₂-80 nm e SiO₂-330 nm. O espectro do material não modificado apresenta apenas bandas relacionadas à sílica, sendo as principais as vibrações do grupo -OH na região de 3700-3200 cm⁻¹ e do grupo Si-O na região de 1320-1000 cm⁻¹ ¹²³.

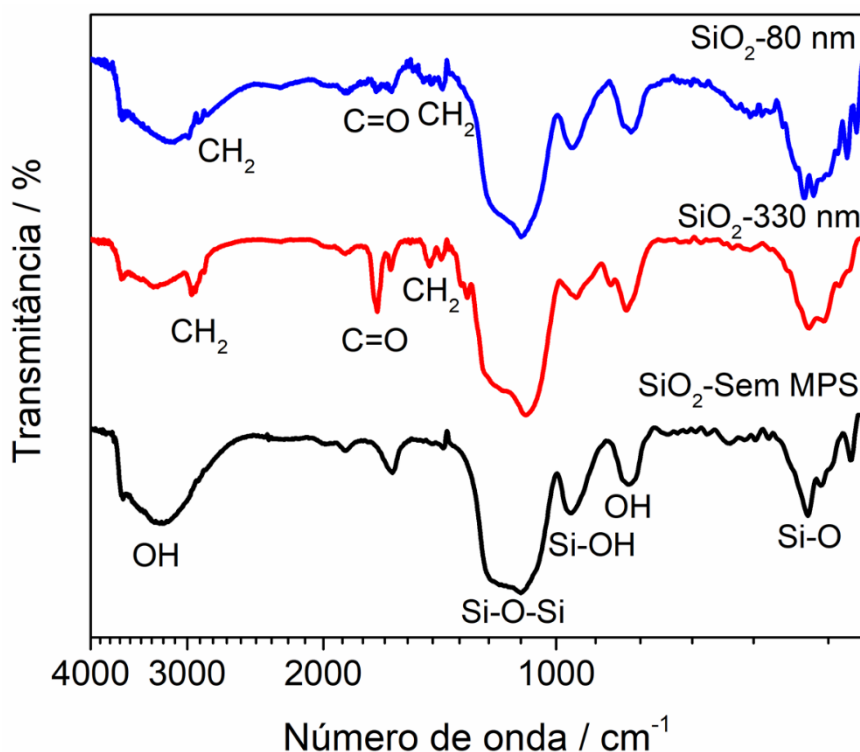


FIGURA 5.6 - Espectros de FTIR das nanopartículas de SiO₂ sintetizadas pelo método de Stöber.

Nos espectros dos materiais funcionalizados é possível ver as bandas relacionadas aos estiramentos assimétrico e simétrico e à deformação no plano de H ligado a carbono com hibridização sp^3 (H-C sp^3) do grupo CH₂ em 2930, 2845 e 1452 cm^{-1} , respectivamente ¹²⁴. Além disso, é possível ver o estiramento do grupo C=O em 1713 cm^{-1} . Uma outra diferença em relação ao espectro do material não funcionalizado, é a mudança da banda relacionada ao grupo –OH. Nos espectros dos materiais com MPS, essa banda é menos intensa na região de 3700-3200 cm^{-1} , mostrando que parte desses grupos reagiu com o agente organossilano por condensação. Estes resultados mostram que o MPS foi capaz de ser ancorado na superfície das nanopartículas com a metodologia utilizada. Na Tabela 5.1 estão resumidos os modos vibracionais.

TABELA 5.1 - Modos vibracionais identificados nos espectros de FTIR das nanopartículas de SiO₂.

Número de onda / cm ⁻¹	Modos vibracionais
3260	Estiramento -OH
1111	Estiramento assimétrico Si-O-Si
957	Estiramento Si-OH
806	Deformação no plano -OH
473	Deformação no plano Si-O
2930	Estiramento assimétrico -CH ₂ -
2845	Estiramento simétrico -CH ₂ -
1709	Estiramento C=O
1458	Deformação no plano -CH ₂ -

Para quantificar a quantidade de MPS nas nanopartículas esféricas de sílica, foi utilizada a técnica de análise termogravimétrica. Na Figura 5.7 é possível ver que todas as nanopartículas apresentaram uma perda inicial de massa até a temperatura de 190 °C relacionada com a eliminação de água adsorvida. Para os materiais SiO₂-330 nm e SiO₂-80 nm a massa de água evaporada foi de 8,4 e 8,0 %, respectivamente. Para o material não funcionalizado, a perda foi de 10,3 %.

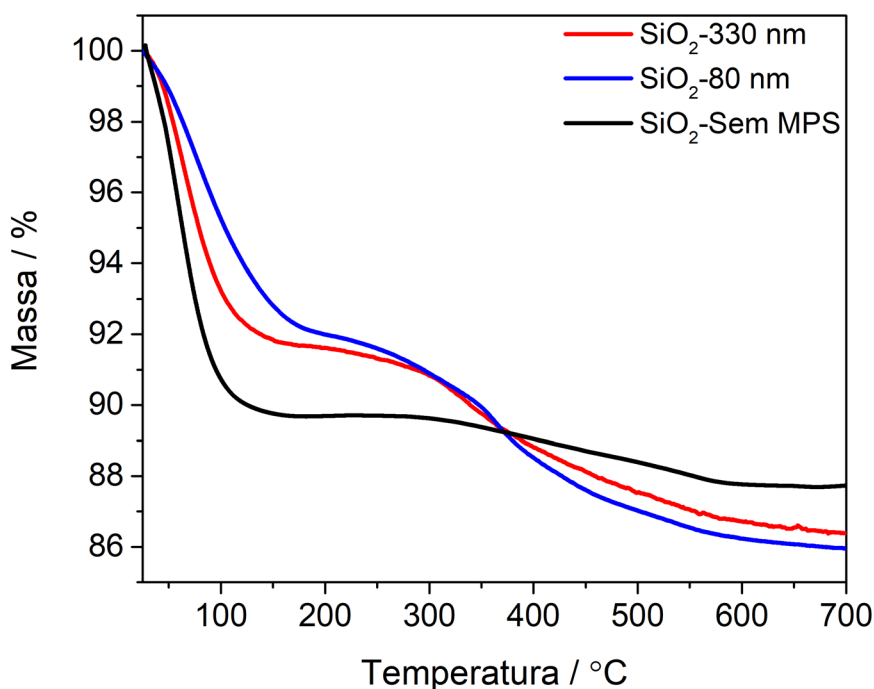


FIGURA 5.7 - Curvas de análises termogravimétricas das nanopartículas de SiO₂.

Para calcular a quantidade de MPS nas nanopartículas, foi feita uma normalização das curvas, representada na Figura 5.8a, a partir de 190 °C para excluir a massa de água evaporada. Ambos os materiais apresentaram uma perda de massa intensa entre 250 e 450 °C e uma menos intensa entre 450 e 650 °C, representadas pela primeira derivada na Figura 5.8b. Elas estão relacionadas com a degradação e a evaporação das moléculas de MPS ligadas à superfície das nanopartículas ¹²⁵. A nanopartícula de 80 nm apresentou ainda um evento a mais em relação à nanopartícula de 330 nm próximo de 270 °C, podendo ser moléculas de MPS que estavam ligadas mais fracamente com a superfície, o que permitiu sua saída em menores temperaturas.

Vale ressaltar que a degradação ocorre em uma faixa de temperatura e não em um valor específico porque a matéria orgânica se degrada lentamente, resultando em uma faixa de perda de massa. Em relação à determinação de fração mássica de organosilano, a amostra SiO₂-330 nm apresentou uma perda de massa total de 5,7 %, enquanto as nanopartículas SiO₂-80 nm uma perda de 6,0 %. Estes resultados também confirmam que o MPS está ligado covalentemente às nanopartículas, visto que sua temperatura de ebulição é de 190 °C e não há nenhum evento de perda de massa nessa temperatura.

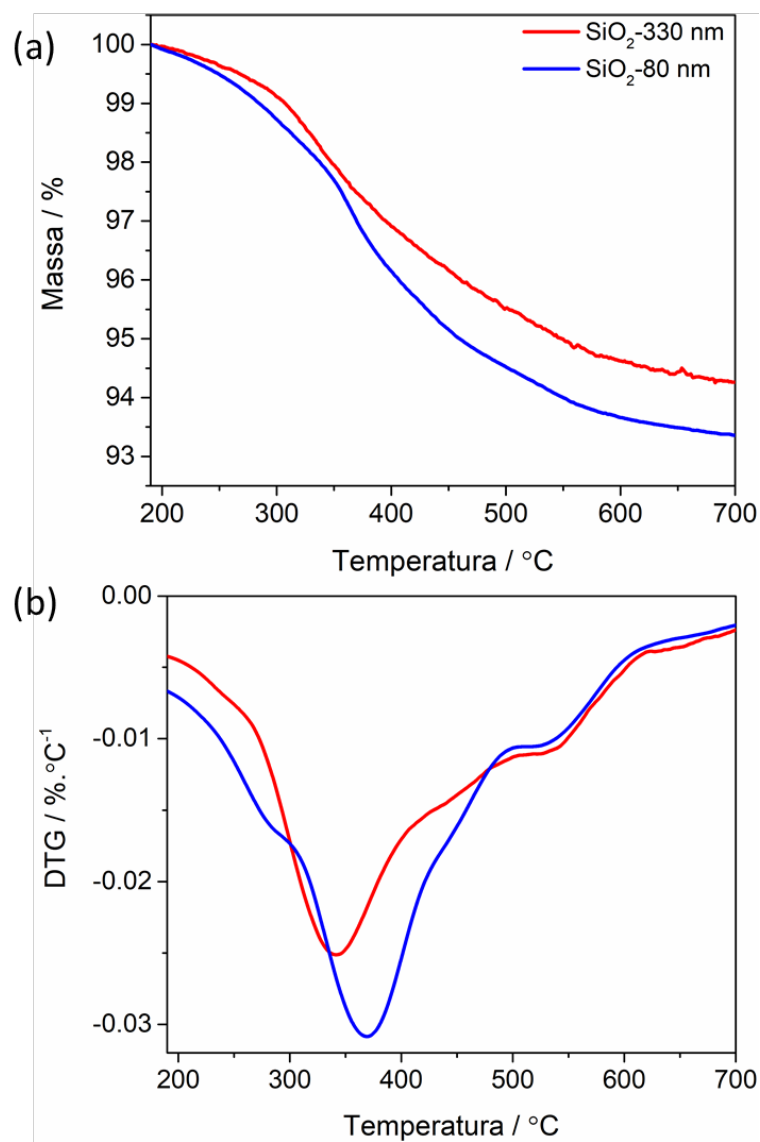


FIGURA 5.8 - Curvas termogravimétricas normalizadas em 190 °C das nanopartículas funcionalizadas (a) e sua primeira derivada (dTG) (b).

5.2 - Poli(N-vinilcaprolactama) (PNVCL)

A metodologia utilizada para a síntese dos polímeros foi baseada no procedimento utilizado anteriormente pelo grupo ^{113,115}. O iniciador AIBN é um iniciador térmico e libera radicais no meio reacional ao ser aquecido a 70 °C, os quais quebram as ligações duplas do grupo vinílico do monômero NVCL dando início à polimerização. No caso dos nanocompósitos, além da dupla ligação do monômero, há também a dupla ligação do grupo metacrilato do MPS. Com isso, as nanopartículas se ligam covalentemente à cadeia polimérica, como mostrado na Figura 5.9. Para garantir a purificação do material sintetizado, ao final da reação foi adicionado água destilada no reator e a solução foi transferida para uma membrana de diálise para permitir saída do solvente DMSO.

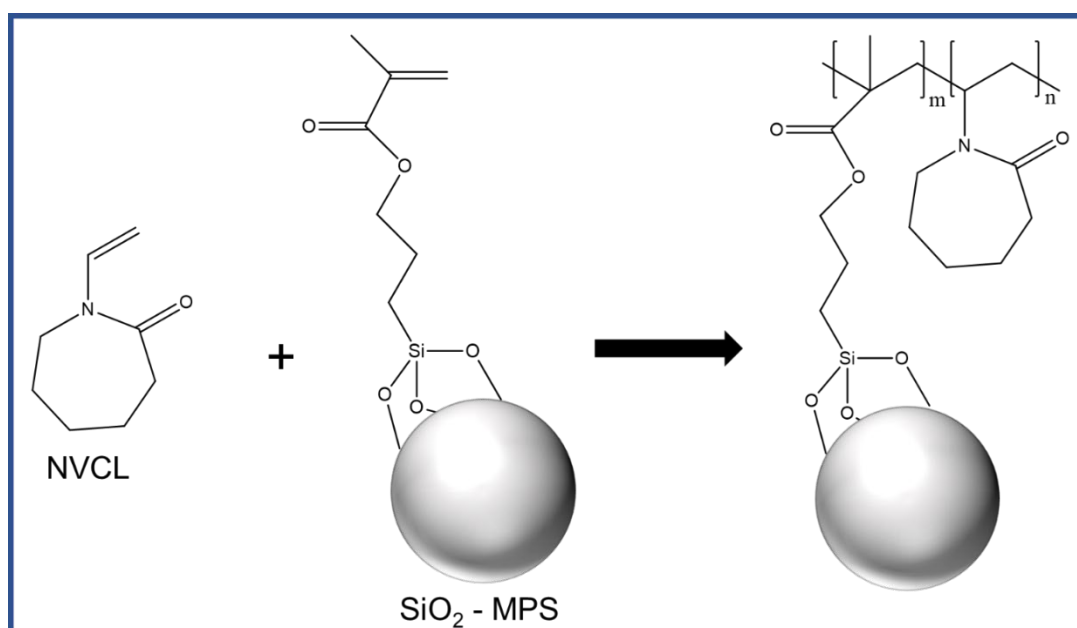


FIGURA 5.9 - Esquema representando a polimerização entre o monômero NVCL e as nanopartículas de sílica funcionalizadas para formar os nanocompósitos com 1 e 5% de SiO₂.

Para determinar se o PNVCL e os nanocompósitos foram formados ou se ainda havia a presença de monômeros que não reagiram, foi utilizada a técnica de RMN de núcleo ¹H em solução. Na Figura 5.10 é possível ver os espectros de PNVCL e dos nanocompósitos na presença de 1 e 5% de SiO₂-80 nm (NC-1%-80,

NC-5%-80) e SiO₂-330 nm (NC-1%-330, NC-5%-330) dispersos em água deuterada (D₂O). Pela elucidação dos espectros, observa-se que não há a presença de monômero residual, visto que o espectro do monômero de NVCL apresenta um pico com deslocamento perto de 7 ppm¹²⁶. Isso indica que o processo de purificação foi eficaz na retirada de possíveis monômeros residuais. Todos os picos foram identificados como sendo de poli(N-vinilcaprolactama)¹²⁷ e sua correlação com a estrutura do polímero pode ser vista na Figura 5.10. Além disso, os espectros dos nanocompósitos são idênticos ao do polímero puro, indicando que a adição de nanopartículas não afetou o processo de polimerização.

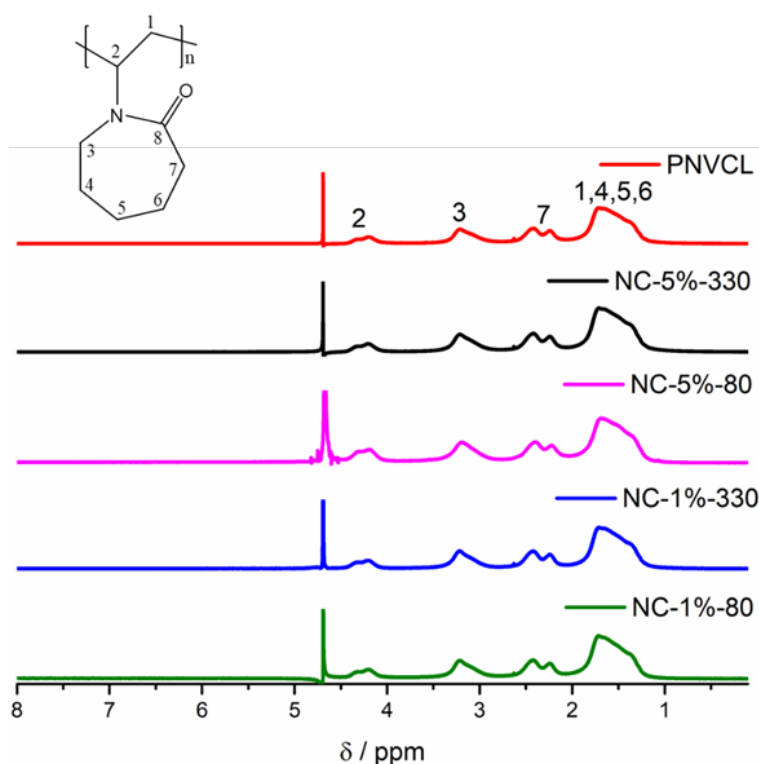


FIGURA 5.10 - Espectro de RMN em núcleo de ¹H do polímero PNVCL.

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho foi utilizada como técnica complementar para determinar a formação dos polímeros. A Figura 5.11 mostra os espectros do polímero puro e dos nanocompósitos, sendo possível ver que todos os espectros são semelhantes ao do PNVCL. Esse resultado corrobora com o de RMN indicando que a inserção de nanopartículas não afetou a formação das cadeias poliméricas. As bandas principais são: o estiramento das

ligações C=O e C-N em, respectivamente, 1649 e 1460 cm^{-1} , vibrações do grupo CH_2 fora do plano em 1350-1150 cm^{-1} e estiramentos simétrico e assimétrico do grupo CH_2 em 2856 e 2924 cm^{-1} , respectivamente ¹²⁸. Na Tabela 5.2 estão resumidos os modos vibracionais identificados nos espectros.

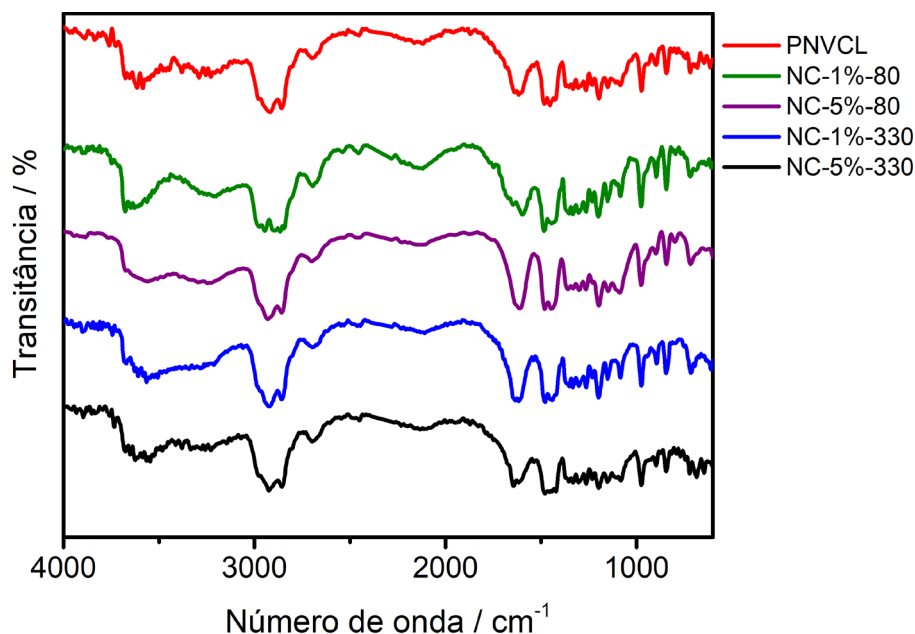


FIGURA 5.11 - Espectros de infravermelho do polímero puro e dos nanocompósitos obtidos em KBr.

TABELA 5.2 - Modos vibracionais identificados nos espectros do polímero puro e dos nanocompósitos.

Número de onda / cm^{-1}	Modos vibracionais
2924	Estiramento assimétrico $-\text{CH}_2-$
2856	Estiramento simétrico $-\text{CH}_2-$
1649	Estiramento C=O
1460	Estiramento C-N
1350 – 1150	Deformação fora do plano $-\text{CH}_2-$
721	Deformação C-N

A análise termogravimétrica foi utilizada para determinar a quantidade de sílica ancorada em cada nanocompósito após a polimerização. Na Figura 5.12 estão representadas as curvas de perda de massa dos polímeros sintetizados. Assim como nas nanopartículas funcionalizadas, é possível ver uma perda de massa inicial até a temperatura de 200 °C relacionada à eliminação de água adsorvida, sendo neste caso próxima a 11% para todos os materiais.

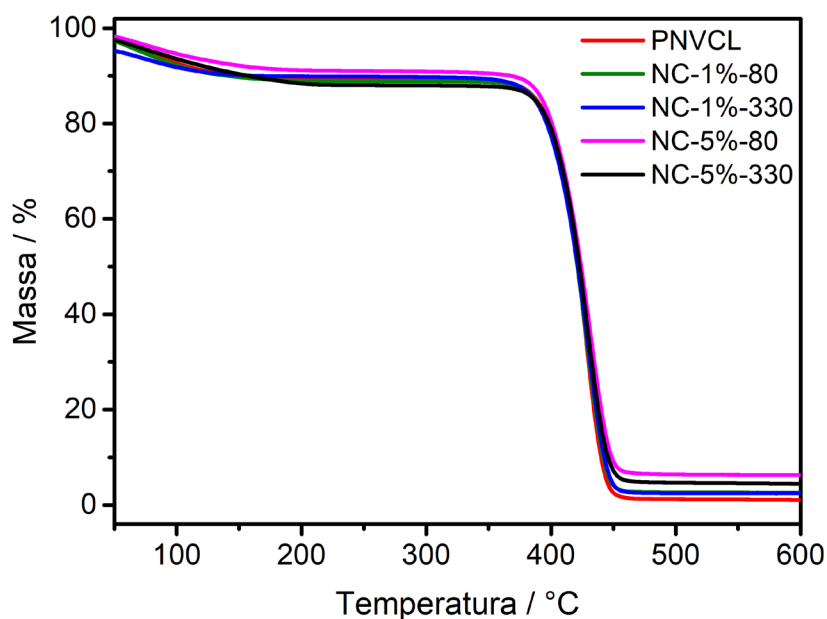


FIGURA 5.12 - Curvas termogravimétricas dos polímeros aquecidos até 600 °C em atmosfera de gás oxigênio.

Para o cálculo do teor real de nanopartícula, foi feita a normalização das curvas termogravimétricas em 200 °C (Figura 5.13a) e a massa residual de PNVCL em 600 °C foi subtraída da massa residual de cada material. Os valores encontrados podem ser vistos na Tabela 5.3 e apresentam desvio padrão já que os testes foram feitos em duplicatas. Os valores são diferentes do esperado, sendo acima e abaixo dos valores teóricos de 1 % 5 %, respectivamente. Os valores mais altos podem ser explicados pela determinação indireta da quantidade de sílica nos nanocompósitos, que traz um erro maior para a medida de uma pequena quantidade de massa. Já os valores menores podem ser explicados pela saída de nanopartículas de sílica não ligadas covalentemente às cadeias poliméricas pelos poros da membrana de celulose durante o processo de purificação por diálise.

Analisando o perfil de degradação, PNVCL e seus nanocompósitos atingiram 5% de perda de massa quase na mesma temperatura (T_i), conforme mostrado na Tabela 5.3. Por outro lado, a T_{max} (temperatura de perda de massa máxima determinada pelo valor máximo da primeira derivada) aumentou 4-5 °C para os nanocompósitos, indicando uma melhora na estabilidade térmica. A perda de massa com um máximo em 427,5 °C observada para o PNVCL puro, identificada pela primeira derivada da curva TG na Figura 5.13b, foi semelhante ao valor relatado por REJINOLD (2011) ¹²⁹. Além disso, a diferença entre T_{max} e T_i (ΔT) fornece informações sobre a cinética de perda de massa e as interações entre o polímero e a nanopartícula ¹³⁰. Um aumento nos valores de ΔT de 4-7 °C para os nanocompósitos sugere que a cinética de decomposição passou a ser mais lenta quando as nanopartículas de sílica foram adicionadas. Isso pode indicar fortes interações entre as cadeias poliméricas e as nanopartículas.

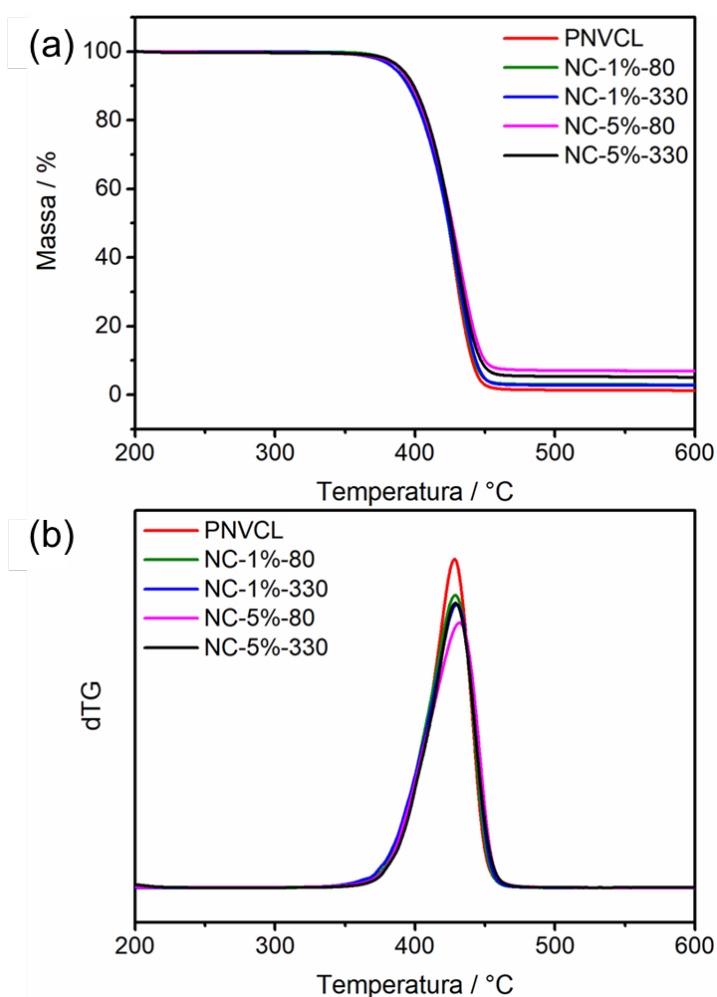


FIGURA 5.13 - Curvas termogravimétricas dos polímeros normalizadas em 200 °C (a) e a primeira derivada de todas as curvas (b).

TABELA 5.3 - Porcentagem real de nanopartícula de sílica ancorada em cada nanocompósito calculada por medidas de TG.

Material	Massa de SiO ₂ / %	T _i (°C)	T _{max} (°C)	ΔT (°C)
PNVCL	0.0	389,0 ± 0,0	427,5 ± 0,5	38,5 ± 0,5
NC-1%-80	1,8 ± 0,2	388,7 ± 0,3	432,0 ± 3,5	43,3 ± 2,9
NC-1%-330	1,5 ± 0,1	387,0 ± 2,0	432,5 ± 2,5	45,5 ± 0,5
NC-5%-80	4,5 ± 0,2	389,0 ± 0,0	432,0 ± 0,0	43,0 ± 0,0
NC-5%-330	4,6 ± 0,1	389,0 ± 1,0	431,0 ± 2,0	42,0 ± 3,0

As temperaturas de transição vítrea (T_g) do polímero puro e dos nanocompósitos foram obtidas por análise de DSC. Essa temperatura pode ser definida como a temperatura média da faixa na qual ocorre uma transição do estado vítreo da fase amorfa do polímero para o estado couráceo. Foram feitas duas rampas de aquecimento sendo a primeira para a eliminação de água adsorvida e a segunda para o cálculo de T_g. É importante eliminar as moléculas de água antes da análise pois elas atuam como plastificantes das cadeias de PNVCL. É possível ver na Figura 5.14 que as curvas dos nanocompósitos são bem parecidas com a curva apresentada pelo polímero puro. Os valores de T_g foram obtidos utilizando o software do próprio equipamento através da função que calcula o ponto de inflexão na mudança de linha de base utilizando a primeira derivada dessas curvas. Os valores encontrados estão na Tabela 5.4 e é possível ver que todos estão próximos de 197 °C. Esse resultado indica que a inserção das nanopartículas não afetou a mobilidade das cadeias poliméricas, o que é evidenciado pelos valores próximos de T_g.

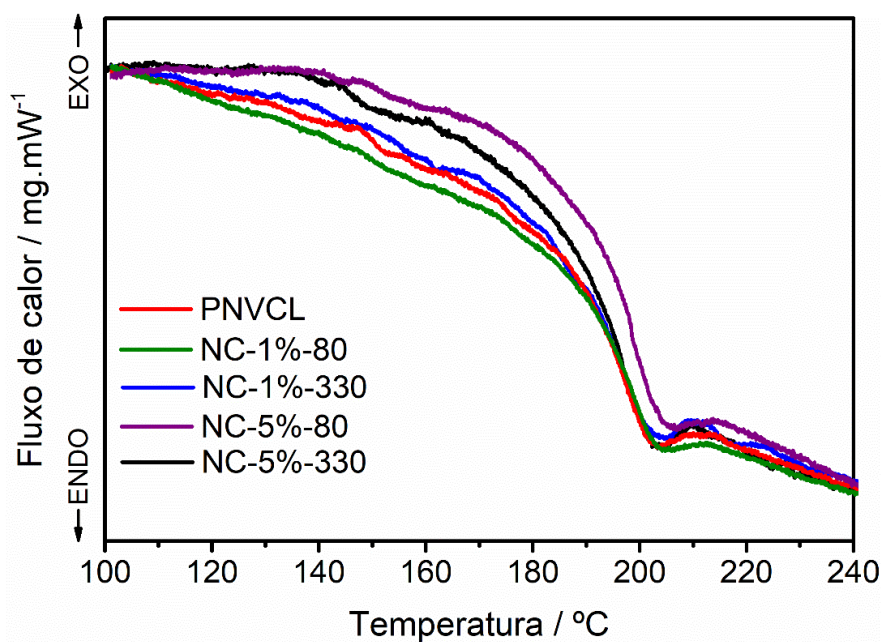


FIGURA 5.14 – Curvas de DSC do polímero puro e dos nanocompósitos utilizadas para calcular o valor da temperatura de transição vítrea.

TABELA 5.4 - Valores de temperatura de transição vítrea encontrados para os polímeros sintetizados calculados pelo ponto de inflexão.

Material	Temperatura de transição vítrea (T_g) / °C
PNVCL	197
NC-1%-80	198
NC-1%-330	198
NC-5%-80	196
NC-5%-330	197

5.3 - Transição sol-gel

Como mencionado anteriormente, polímeros termossensíveis quando solubilizados em água à temperatura ambiente estão em um estado de cadeias solvatadas. O sistema neste caso é transparente e as interações entre o polímero e as moléculas de água ocorrem através de ligações de hidrogênio. Com o aquecimento acima da temperatura crítica inferior de solubilização (LCST), ocorre a separação de fases e o polímero aglomera-se através de interações dipolo-dipolo entre os grupos amida e forças de van der Waals entre as cadeias poliméricas (Figura 5.15). Nesse caso, o sistema perde sua transparência, tornando-se opaco e mais viscoso devido à formação do estado globular. Como consequência, ocorre a expulsão das moléculas de água e uma separação de fases formando o hidrogel. A LCST reportada do PNVCCL é abaixo da temperatura fisiológica, o que permite sua aplicação como hidrogel injetável para sistemas de liberação controlada.

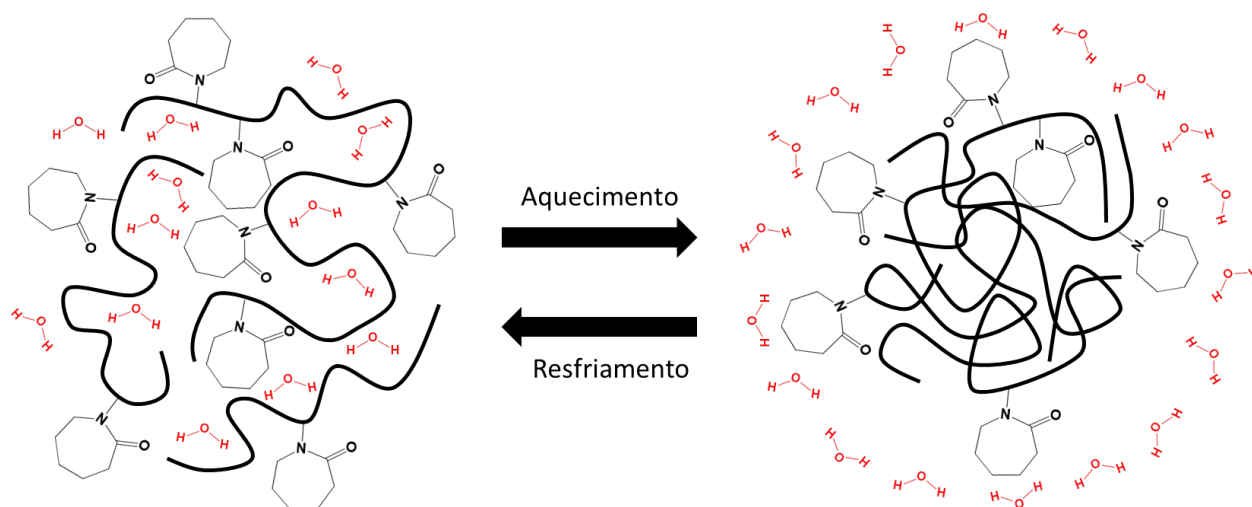


FIGURA 5.15 - Esquema representando uma solução de PNVCCL em uma temperatura abaixo da LCST e após ser aquecida a uma temperatura acima da LCST, ocorrendo a transição sol-gel com formação de glóbulos e separação de fases.

Em um trabalho anterior do nosso grupo ¹¹⁴, nanocompósitos de PNVCCL com 1 e 5 % m/m de nanofibras de sílica mesoporosa foram estudados. A presença de sílica alterou o padrão de transição sol-gel, que ocorreu de forma difusa devido à formação de estados intermediários entre os sistemas sílica e PNVCCL. Isso

foi confirmado pela investigação dos movimentos da molécula de água e do segmento de polímero com RMN de relaxamento. Ele mostrou que a presença de nanofibras alterou as interações inter e intramoleculares e limitou o processo de hidratação/desidratação durante a transição.

O comportamento do polímero e de seus nanocompósitos em solução foi caracterizado pela medição da transmitância da solução polimérica em diferentes temperaturas em um espectrofotômetro UV-vis. A Figura 5.16 mostra os espectros de UV-vis de uma solução de PNVCL em função da temperatura. Até a temperatura de 33,5 °C, é possível ver que a solução é transparente, já que as transmitâncias estão próximas a 100%. A 34,0 °C, a transmitância decaiu devido ao início da transição do estado solúvel para o estado aglomerado, que se completa a 34,5 °C. Após a transição, a solução bloqueia a passagem da luz e sua transmitância é próxima de zero.

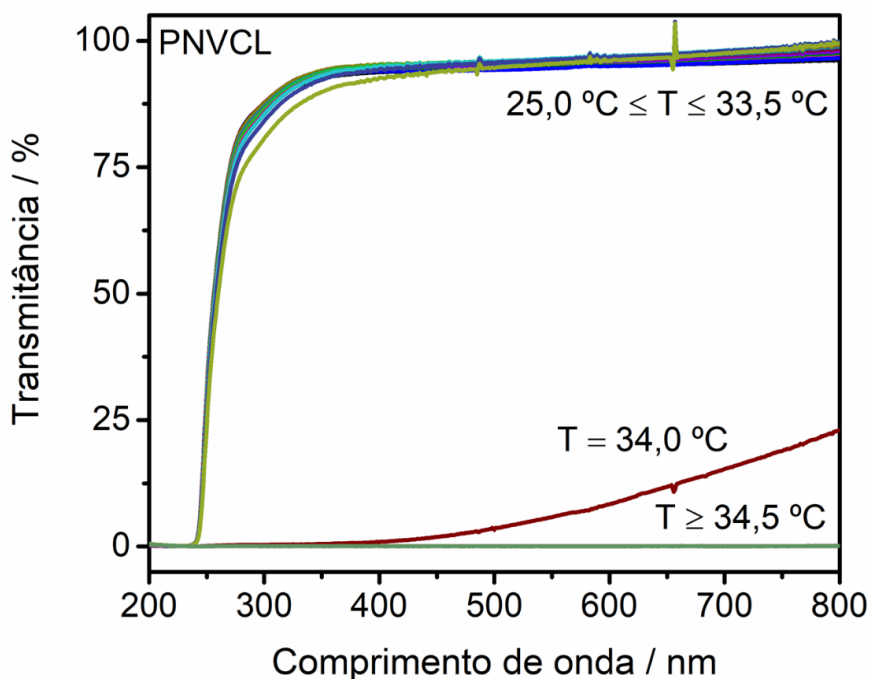


FIGURA 5.16 - Espectros de UV-vis do polímero PNVCL em diferentes temperaturas.

O mesmo procedimento foi aplicado às soluções dos nanocompósitos de PNVCL com esferas de sílica de 80 nm (Figura 5.17) e de 330 nm (Figura 5.18). É possível observar que todos os materiais apresentaram um decaimento difuso da transmitância com o aumento da temperatura, diferentemente do polímero puro, que apresentou curvas semelhantes antes da transição. A transmitância dos nanocompósitos diminuiu lentamente antes da T_{cp} , temperatura na qual ocorre uma queda brusca, confirmando a formação da fase aglomerada. O valor de T_{cp} de todos os polímeros foi considerado como a temperatura na qual ocorreu uma grande queda no valor de transmitância e os valores encontrados estão na Tabela 5.5.

É possível ver que a inserção de nanopartículas de sílica não alterou o valor de T_{cp} para a maioria dos nanocompósitos em relação ao polímero puro. Em um outro estudo sobre nanocompósitos de PNVCL com tetrametoxisilano, também baseado em sílica, LOOS (2003) ¹³¹ reportou que não houve mudança da temperatura de transição, mostrando que o resultado da Tabela 5.5 está de acordo. Porém, dentre os nanocompósitos, o material NC-1%-330 apresentou uma temperatura de transição 0,5 °C maior do que a dos outros. Isso pode indicar que esse polímero apresenta massa molar menor, já que MEDEIROS (2010) ⁸⁷ observou que a LCST do PNVCL aumenta com a diminuição da massa molar. Cadeias menores exigem mais energia para serem separadas das moléculas de água, o que dificulta a aglomeração e, por fim, a separação de fases.

Outra diferença em relação ao polímero puro, é a menor transmitância desde a temperatura inicial encontrada nos nanocompósitos. Nos espectros apenas das nanopartículas nas concentrações teóricas utilizadas nos nanocompósitos e no fator de diluição utilizado para as análises (0,01 e 0,05 %) as transmitâncias encontradas foram maiores do que as dos nanocompósitos (resultado não mostrado), porém menores do que do polímero puro. Esse resultado mostra que a redução da transmitância com a temperatura não é causada apenas pela presença das nanopartículas, mas sim pela interação das mesmas com as cadeias poliméricas, a qual cria uma nova estrutura.

A análise destes espectros mostra também que na temperatura fisiológica (37,0 °C), todos os polímeros sintetizados já não estão mais solúveis, o que permite sua utilização em sistemas de liberação controlada. Uma rápida liberação da dose do medicamento pode ocorrer caso uma fração do polímero

permaneça solúvel após a aplicação. Para evitar este problema, é recomendado que a temperatura de transição seja menor do que $37,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo neste caso próximo a $34,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Além disso, como o intuito deste estudo é utilizar o nanocompósito em sistemas de liberação controlada, é importante que a adição de nanopartículas na matriz polimérica não altere o valor da T_{cp} .

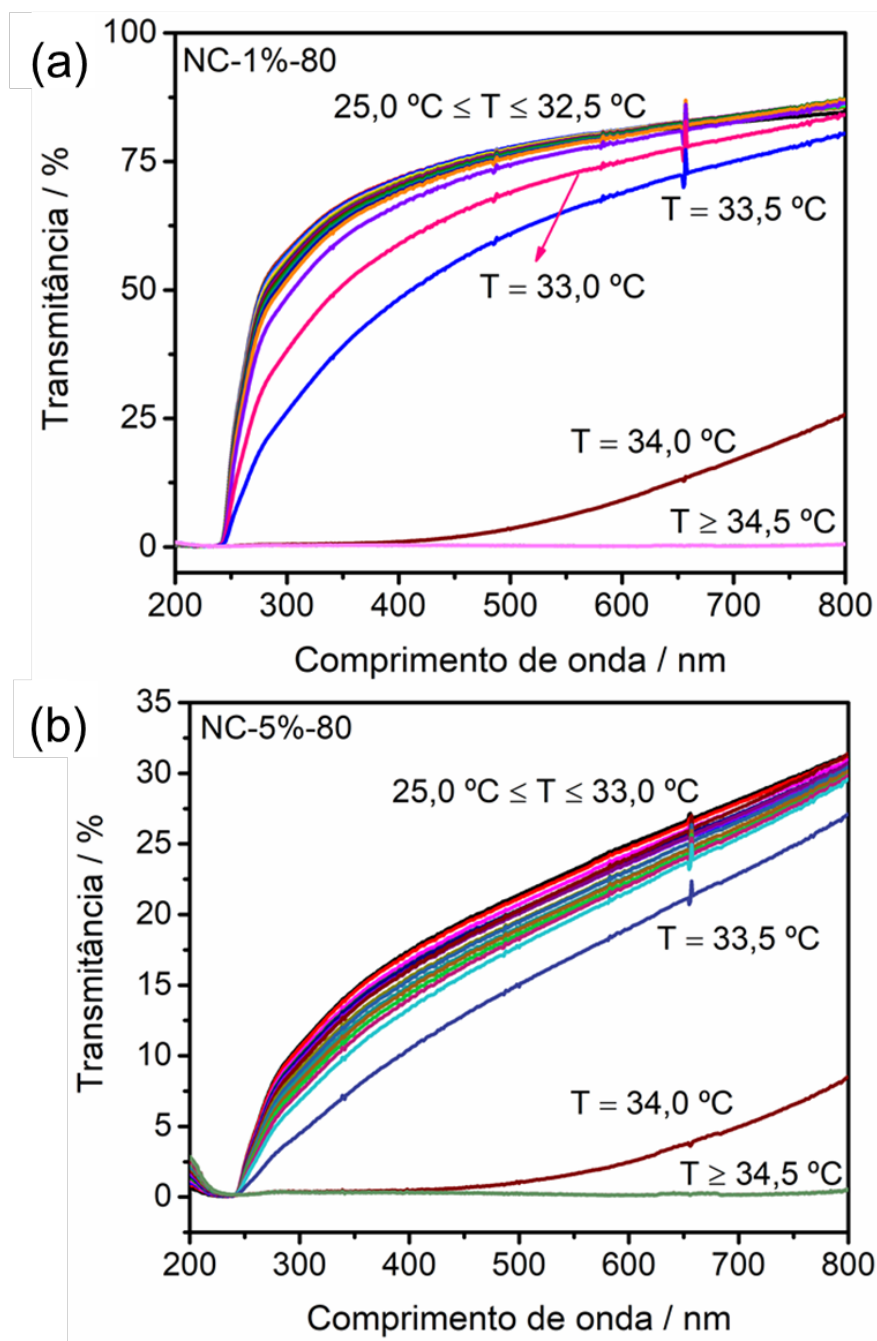


FIGURA 5.17 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos com esferas de 80 nm em diferentes temperaturas.

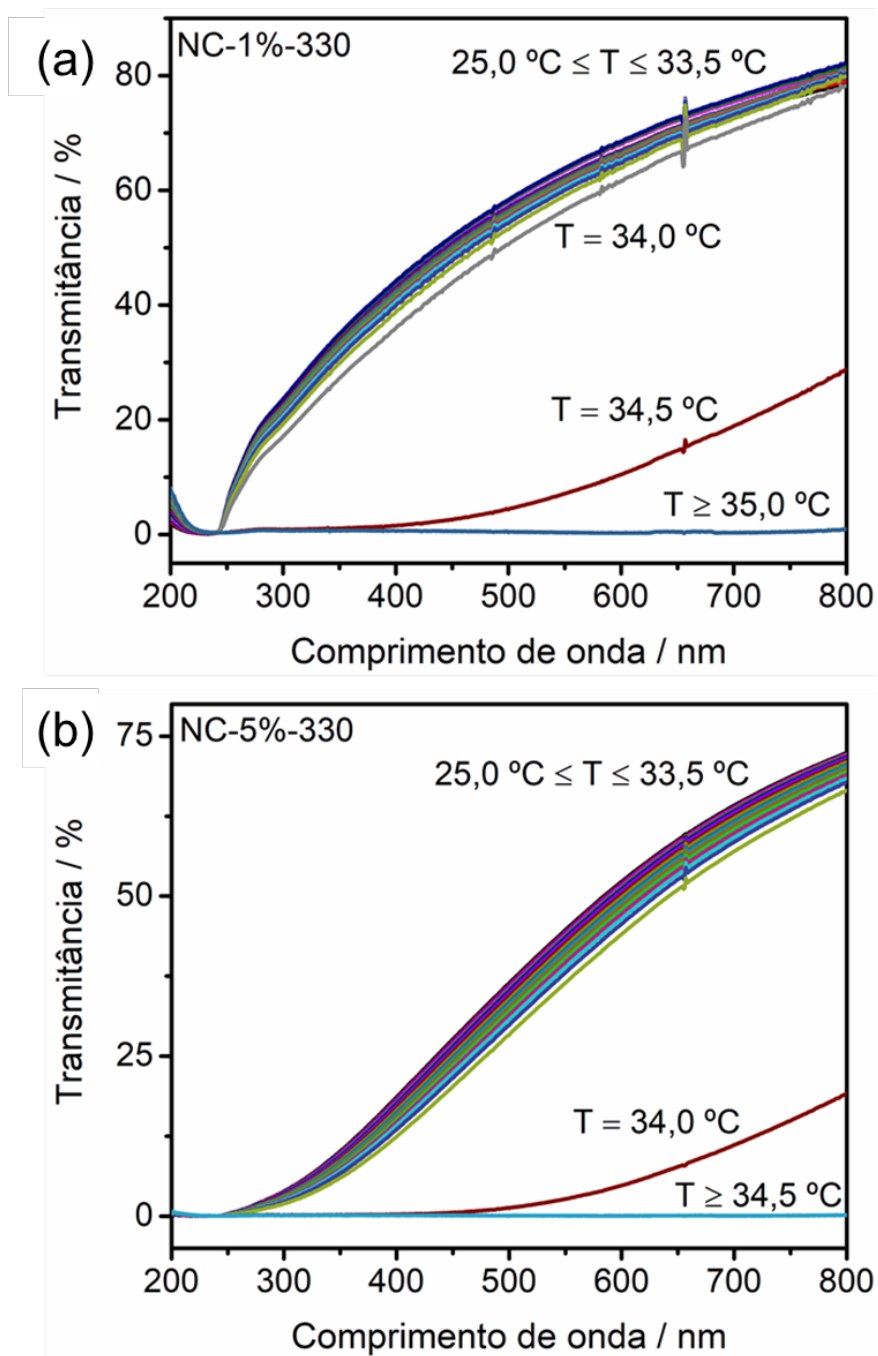


FIGURA 5.18 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos com esferas de 330 nm em diferentes temperaturas.

TABELA 5.5 - Valores de T_{cp} encontrados avaliando a variação da transmitância das soluções poliméricas com o aumento de temperatura.

Material	Temperatura de ponto de turvação (T_{cp}) / °C
PNVCL	34,0
NC-1%-80	34,0
NC-1%-330	34,5
NC-5%-80	34,0
NC-5%-330	34,0

Uma possível explicação para o diferente comportamento em solução dos nanocompósitos em comparação ao polímero puro é que as nanopartículas estão alterando a solvatação das cadeias do polímero e, como consequência, as interações hidrofílicas/hidrofóbicas durante a transição sol-gel. A entropia de mistura da solução de PNVCL em água diminui com o aumento da temperatura, o que faz com que as cadeias poliméricas comecem a se aglomerar, levando à separação de fases e à formação de hidrogel. A presença de nanopartículas na matriz polimérica pode estar interferindo na interação das moléculas de água com as cadeias poliméricas, fazendo com que os glóbulos comecem a se aglomerar em temperaturas abaixo da T_{cp} , diminuindo a transmitância de forma difusa.

Esse perfil de transição difusa também foi relatado por LIN (2006) ¹³² para microgéis de PNIPAAm-co-AA sintetizados por diferentes métodos. Esses materiais mostraram uma transição de volume em uma ampla faixa de temperatura, semelhante aos nanocompósitos no presente estudo. Os autores explicaram a transição difusa pela presença de transições de volume microscópicas e macroscópicas ^{133,134}. À medida que a temperatura aumentou, os segmentos de NIPAM começaram a expulsar as moléculas de água da rede polimérica devido ao aumento de hidrofobicidade, iniciando as transições microscópicas. Em seguida, a transição macroscópica ocorreu com a formação de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares entre as cadeias poliméricas.

Desta forma, a queda inicial na transmitância dos nanocompósitos de PNVCL com sílica é devido às transições microscópicas que ocorrem através do auto-enovelamento de cadeias poliméricas na superfície das nanopartículas. Isso indica que além das nanopartículas afetarem a solvatação das cadeias, elas aumentam também a área superficial para a aglomeração dessas cadeias. Depois, a transição macroscópica ocorre na temperatura de transição e leva à formação do hidrogel através de grandes aglomerações de cadeias.

A técnica de DLS foi usada para entender melhor a formação do estado globular desses materiais. As soluções de PNVCL, NC-5%-80 e NC-5%-330 da medida anterior foram diluídas (0,01% m/v) e aquecidas de 33,0 a 34,6 °C com 1 minuto de intervalo para o sistema estabilizar a cada 0,2 °C. Essa faixa de temperatura foi escolhida porque está localizada abaixo da T_{cp} , onde os nanocompósitos agiram de maneira diferente do polímero puro.

A Figura 5.19 mostra a aglomeração inicial de cadeias poliméricas e a formação de glóbulos com aquecimento pela técnica de DLS. Como as soluções para essa medida foram diluídas, houve um deslocamento da T_{cp} para uma temperatura mais alta, explicando porque o diâmetro hidrodinâmico do polímero puro permaneceu constante durante todo o intervalo. O polímero PNVCL possui uma LCST do tipo I, com comportamento clássico de Flory-Huggins, no qual tanto o aumento da massa molar quanto o aumento na concentração da solução polimérica levam a um valor menor de LCST. Vale ressaltar também que foram analisadas as distribuições numéricas de tamanho, já que as distribuições de volume e intensidade dão um peso maior ao diâmetro.

O nanocompósito NC-5%-80 apresentou nanoestruturas com tamanho médio inicial de 95 nm devido à presença de nanopartículas de sílica com diâmetro de 80 nm. À medida que a temperatura aumentou, os glóbulos atingiram um tamanho médio de 263 nm. NC-5%-330 também apresentou estruturas maiores devido à presença de nanopartículas de sílica (330 nm), além de um aumento no tamanho de seus glóbulos de 350 nm para 588 nm. Este resultado está de acordo com o obtido nas Figuras 5.16, 5.17 e 5.18, confirmando que os glóbulos nos nanocompósitos começam a crescer em temperaturas mais baixas que a T_{cp} , sendo responsável pela queda na transmitância.

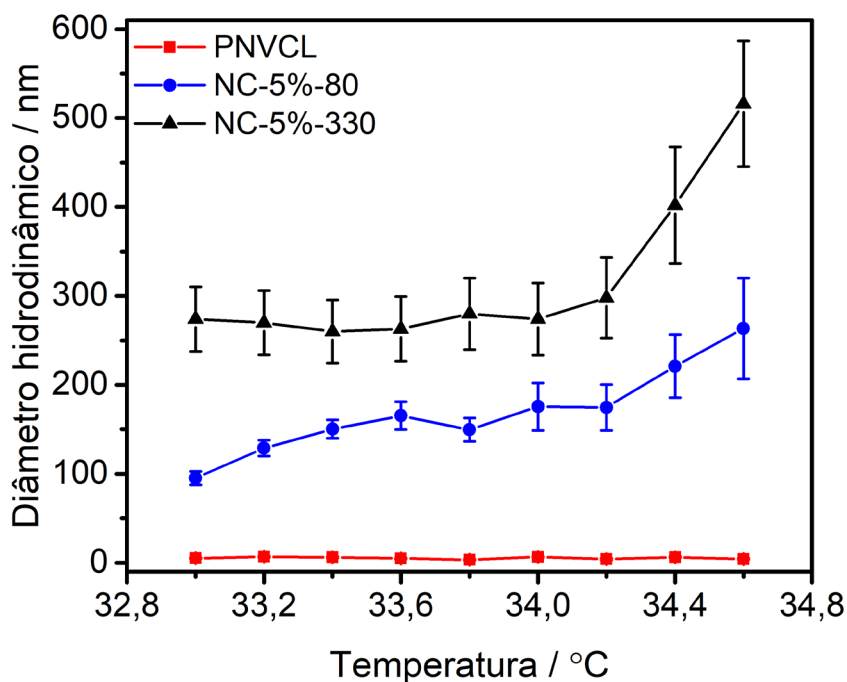


FIGURA 5.19 - Análise da distribuição numérica do diâmetro hidrodinâmico dos glóbulos poliméricos com temperatura para PNVCL, NC-5%-80 e NC-5%-330 medidos no DLS.

A variação na viscosidade com a temperatura também fornece informações importantes sobre o comportamento desses materiais em solução. Quando o PNVCL transita da fase solvatada para a aglomerada, há um aumento na viscosidade da solução. Isso é explicado pela aglomeração de cadeias poliméricas em solução e a formação do hidrogel por interações físicas, que neste caso ocorreram a 36,0 °C para todos os materiais (Figura 5.20). Com a adição de nanopartículas de SiO₂ na matriz polimérica, não houve alteração no valor da viscosidade a 33,0 °C. No entanto, os materiais NC-5%-80 e NC-5%-330 mostraram um aumento na viscosidade a 35,5 °C, o qual não está presente no PNVCL. Esse aumento pode estar relacionado ao crescimento dos glóbulos antes da temperatura de transição, como mostrado anteriormente.

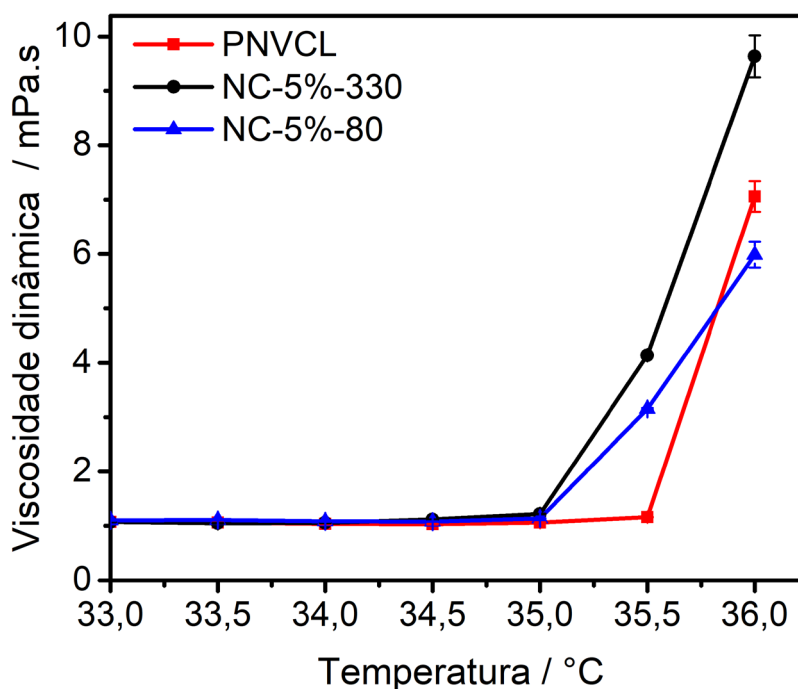


FIGURA 5.20 - Viscosidade dinâmica das soluções aquosas de PNVCL, NC-5%-80 e NC-5%-330 com concentração de 1% m/v em diferentes temperaturas.

A inserção de nanopartículas no PNVCL pode afetar não apenas o perfil da transição sol-gel, mas também a sua termodinâmica. Para calcular as variações na entalpia e na entropia, pode-se usar uma analogia do trabalho de van't Hoff ^{135,136} sobre o desdobramento de proteínas globulares. Isso é possível devido a simplicidade da transição e sua reversibilidade. No caso de proteínas, é utilizado um modelo que consiste em dois estados: nativo (N) e desdobrado (D), os quais estão em equilíbrio. É possível usar essa metodologia mesmo para os casos em que a proteína apresenta uma transição por múltiplos passos com intermediários estáveis, porém os valores obtidos são subestimados, sendo necessário o uso de cálculos mais avançados. Esse mesmo modelo já foi utilizado com sucesso por ALF (2011) ¹³⁷ e FUCIÑOS (2014) ¹³⁸ para calcular, respectivamente, os parâmetros termodinâmicos da transição de homopolímeros e copolímeros reticulados de PNIPAAm e de nanohidrogeis com diferentes graus de reticulação.

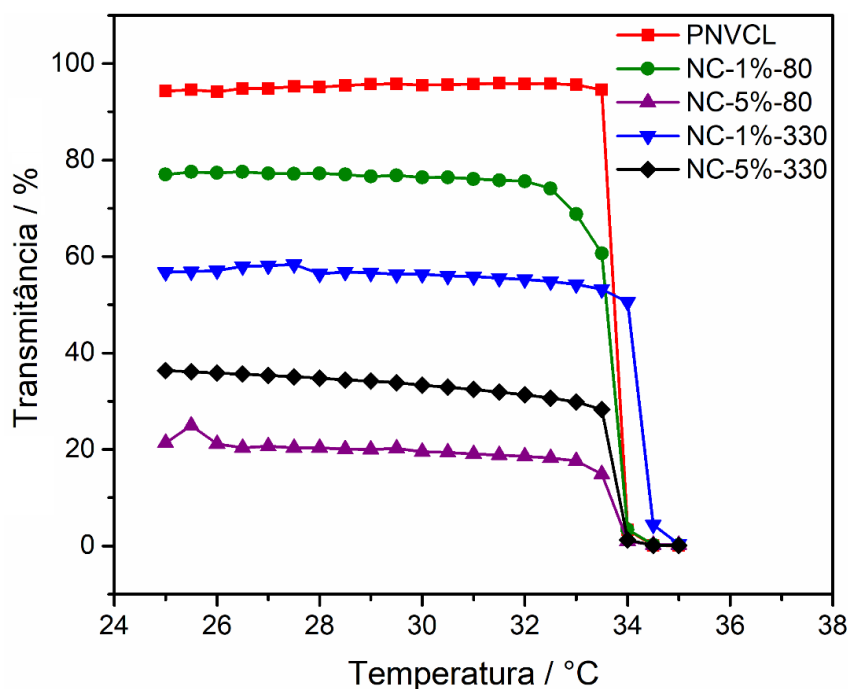


FIGURA 5.21 - Variação da transmitância a 500 nm das soluções dos polímeros PNVCL, NC-1%-80, NC-1%-330, NC-5%-80 e NC-5%-330 com o aumento da temperatura.

No caso dos polímeros termossensíveis, considera-se que o sistema é formado por um equilíbrio simples entre dois estados (Equação 5): uma fase solvatada (FS) e uma fase colapsada (FC) e que, em qualquer temperatura entre esses estados, o polímero estaria parcialmente colapsado (Equação 6). Para determinar as frações de polímero solúvel (f_s) e polímero colapsado (f_c), um parâmetro espectroscópico pode ser usado. Um exemplo é a densidade ótica (OD) que pode ser calculada a partir da transmitância em um comprimento de onda específico (Equação 7). Neste trabalho, os comprimentos de onda escolhidos para converter as transmitâncias das Figuras 5.16, 5.17 e 5.18 foram de 400-600 nm e a média deles pode ser vista na Figura 5.21. Esses valores de transmitância foram convertidos em densidade ótica e o resultado pode ser visto nas Figuras 5.22, 5.23 e 5.24.

$$FS \rightleftharpoons FC \quad (5)$$

$$f_s + f_c = 1 \quad (6)$$

$$OD = 2 - \log(T\%) \quad (7)$$

FUCIÑOS (2014) ¹³⁸ estudou a transição do polímero termossensível PNIPAAm avaliando a variação de OD da solução de polímero com a temperatura. Os valores de OD do platô inferior foram definidos como característicos da fase solvatada (OD_s) e os valores de platô superior como sendo da fase colapsada (OD_c). Considerando que o sistema é formado apenas pelas frações f_s e f_c , a qualquer momento da transição:

$$OD = OD_s \cdot f_s + OD_c \cdot f_c \quad (8)$$

A partir da Equação 8, é possível calcular a constante de equilíbrio aparente de aglomeração (K_a) (Equação 9). Considerando que a variação da energia de Gibbs (ΔG) é zero no equilíbrio, sabe-se que a relação entre a energia de Gibbs padrão de transição em uma temperatura T e a constante K_a é dada pela Equação 10, na qual R é a constante dos gases ideais ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$).

$$K_a = \frac{f_c}{1-f_c} \quad (9)$$

$$\Delta G^\circ_T = -R \cdot T \cdot \ln K_a \quad (10)$$

Quando ocorre a transição do estado solúvel para o colapsado, observa-se uma variação da capacidade calorífica molar (ΔC_P) do hidrogel. Considerando que essa variação é independente da temperatura, a dependência de ΔS°_T e ΔH°_T em função da temperatura pode ser estimada pelas Equações 11 e 12:

$$\Delta S^\circ_T = \Delta S^\circ_{cp} + \Delta C_P \cdot \ln\left(\frac{T}{T_{cp}}\right) \quad (11)$$

$$\Delta H^\circ_T = \Delta H^\circ_{cp} + \Delta C_P \cdot (T - T_{cp}) \quad (12)$$

Nestas equações, T_{cp} , ΔS°_{cp} e ΔH°_{cp} representam, respectivamente, a temperatura e as variações padrões de entropia e entalpia no ponto médio de transição. Quando $T = T_{cp}$, as concentrações da fase solúvel e da fase aglomerada são iguais, e, portanto, $K_a = 1$. Ao substituir essas relações na Equação 13, encontra-se a Equação 14.

$$\Delta G^\circ_T = \Delta H^\circ_T - (T \cdot \Delta S^\circ_T) \quad (13)$$

$$\Delta G^\circ_T = \Delta H^\circ_{cp} \left(1 - \frac{T}{T_{cp}}\right) + \Delta C_P \left[(T - T_{cp}) - T \cdot \ln\left(\frac{T}{T_{cp}}\right) \right] \quad (14)$$

Reordenando essas equações, FUCIÑOS (2014) ¹³⁸ obteve a Equação 15, a qual pode ser ajustada em uma curva de OD em função da temperatura para determinar os parâmetros T_m , ΔH_m° e ΔC_p .

$$OD = OD_c - \frac{OD_c - OD_s}{1 + e^{-\left(\frac{(T - T_{cp})(T_{cp} \Delta C_p \Delta H_{cp}^\circ)}{R T T_{cp}}\right) \cdot \left(\frac{T}{T_{cp}}\right)^{\frac{\Delta C_p}{R}}}} \quad (15)$$

As Figuras 5.22, 5.23 e 5.24 e a Tabela 5.6 mostram, respectivamente, o ajuste da Equação 15 aos dados experimentais e os parâmetros termodinâmicos calculados. Como relatado por FUCIÑOS (2014) ¹³⁸, os valores de variação da capacidade calorífica obtidos não são significativos devido aos valores negativos e ao alto desvio padrão, provavelmente devido à aproximação de que ΔC_p é independente da temperatura, e por isso não estão representados na Tabela 5.6. Como o sistema está em equilíbrio na temperatura de transição, é possível calcular ΔS_{cp}° usando a Equação 16:

$$\Delta S_{cp}^\circ = \frac{\Delta H_{cp}^\circ}{T_{cp}} \quad (16)$$

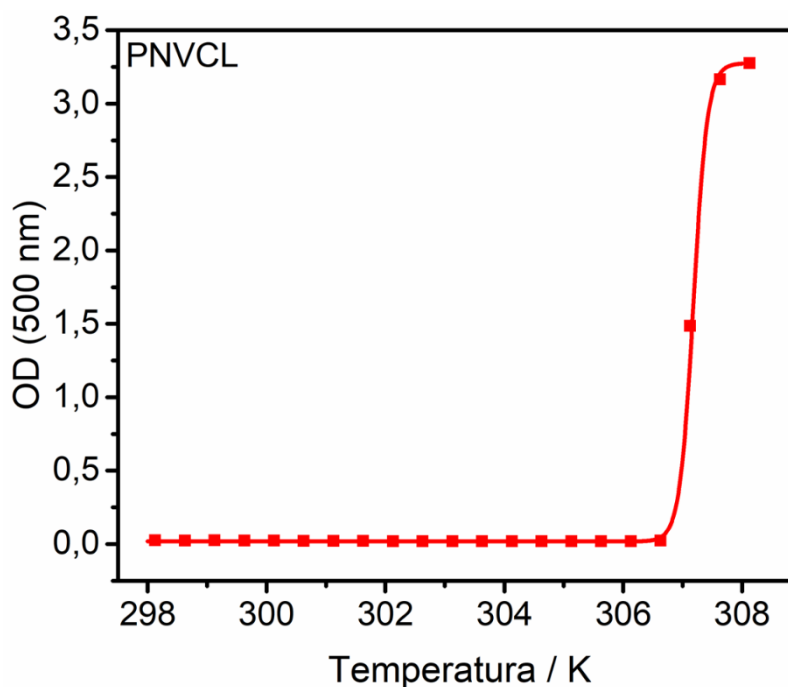


FIGURA 5.22 - Valores de OD a 500 nm para solução (1% m/v) de PNVCL em diferentes temperaturas e ajuste da Equação 15 aos dados experimentais.

Como é possível ver na Figura 5.22, a curva de variação de OD do PNVCL possui apenas um ponto na inflexão. Isso indica que a transição entre as fases solvatada e aglomerada do PNVCL ocorre em uma faixa estreita de temperatura, menor do que 1 °C. Já nos estudos mencionados sobre PNIPAAm, foi possível obter até 6 pontos na inflexão, indicando que a transição desse outro polímero termossensível ocorre em uma faixa bem maior de temperatura.

A Equação 15 considera que os valores de densidade ótica são constantes antes (ODs) e após (ODc) a transição, assim como é possível ver na Figura 5.22 para o polímero puro. Entretanto, como os nanocompósitos apresentam uma transição difusa, os valores de OD nas temperaturas inferiores à transição começam a aumentar gradualmente, desviando-se do ajuste. Desta forma, a inserção das nanopartículas pode ter acarretado na criação de um terceiro estado, além dos estados solvatado e aglomerado, previstos na equação. Como consequência, os nanocompósitos apresentaram erros maiores quando comparados com o polímero puro. Os valores de energia obtidos são referentes ao número de mols de unidades cooperativas, consideradas domínios da cadeia polimérica envolvidos na transição sol-gel. A Figura 5.23 mostra o ajuste para os nanocompósitos sintetizados com as nanopartículas de 80 nm e a Figura 5.24 para os materiais sintetizados com as de 330 nm.

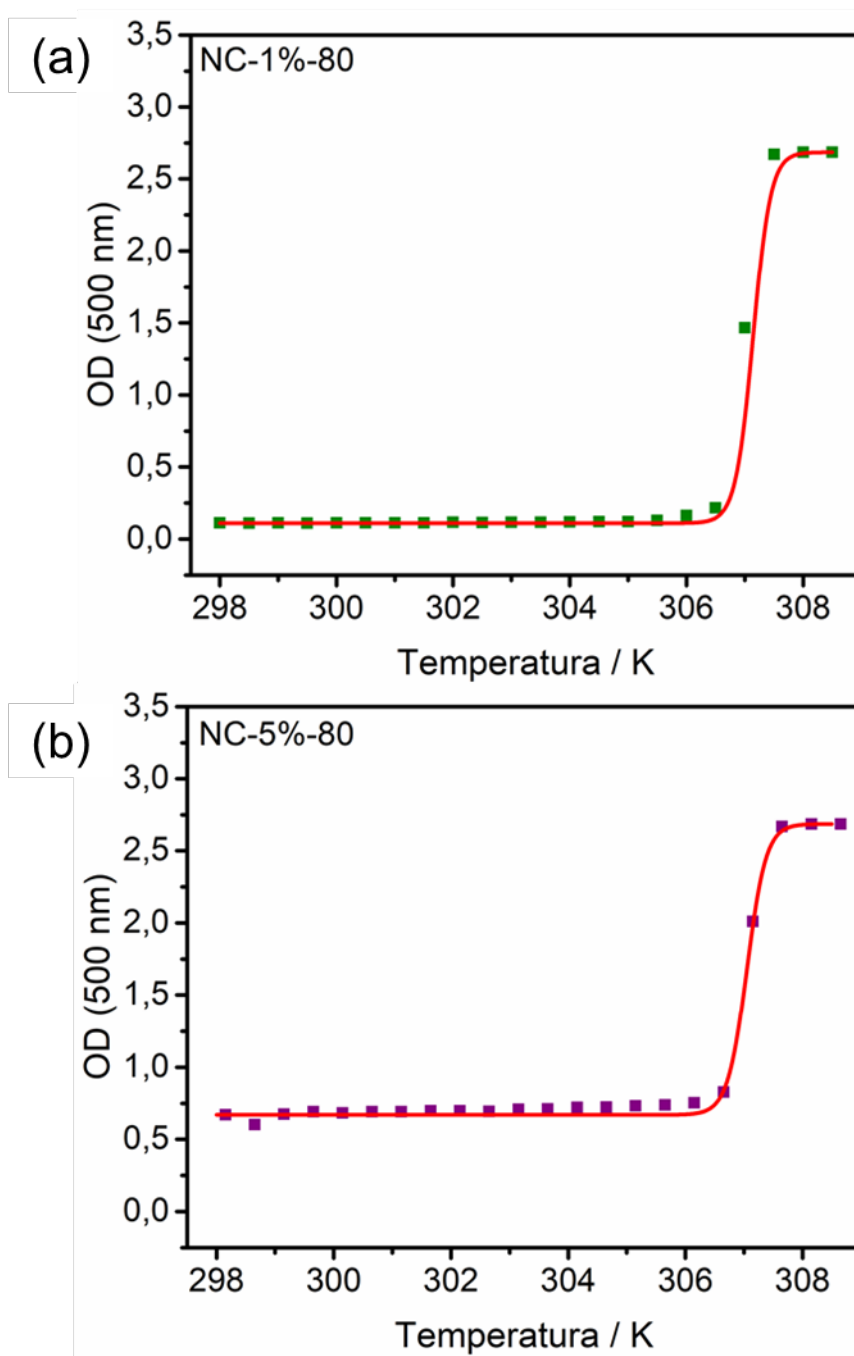


FIGURA 5.23 - Valores de OD a 500 nm para soluções (1% m/v) de NC-1%-80 (a) e NC-5%-80 (b) em diferentes temperaturas e ajuste da Equação 15 aos dados experimentais.

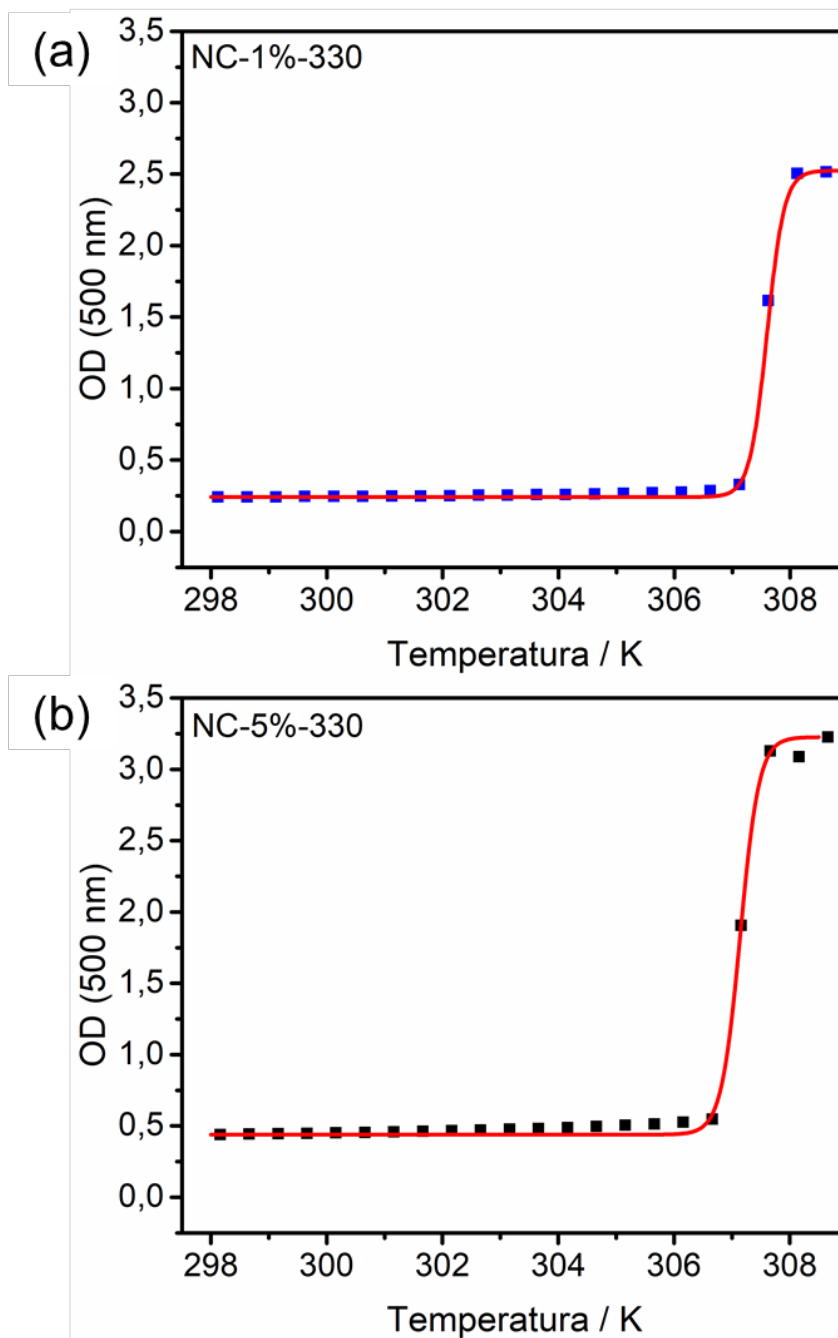


FIGURA 5.24 - Valores de OD a 500 nm para soluções (1% m/v) de NC-1%-330 (a) e NC-5%-330 (b) em diferentes temperaturas e ajuste da Equação 15 aos dados experimentais.

TABELA 5.6 - Parâmetros termodinâmicos obtidos da montagem da Equação 15 a dados experimentais de variação da densidade ótica (OD) com a temperatura das soluções PNVCL e nanocompósitos.

Material	$T_{cp} / ^\circ\text{C}$	$\Delta H^\circ_{cp} / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta S^\circ_{cp} / \text{kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$
PNVCL	$34,10 \pm 0,01^a$	9752 ± 78^a	$31,7 \pm 0,3^a$
NC-1%-330	$34,50 \pm 0,02^b$	6412 ± 306^b	$20,8 \pm 1,0^b$
NC-5%-330	$33,60 \pm 0,10^a$	6312 ± 640^b	$20,6 \pm 2,1^b$
NC-1%-80	$34,00 \pm 0,01^a$	5944 ± 187^b	$19,4 \pm 0,6^b$
NC-5%-80	$34,00 \pm 0,07^a$	5774 ± 636^b	$18,8 \pm 2,1^b$

Os valores relatados são as médias \pm desvio padrão ($n = 2$).

a, b Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os hidrogéis com diferentes quantidades de nanopartículas de sílica.

Analisando a Tabela 5.6, é possível ver que todos os nanocompósitos possuem entalpias de transição mais baixas que o polímero puro. Essa mesma redução foi observada por ALF (2011) ¹³⁷ para a transição de polímeros de PNIPAAm reticulados com éter dietinilenoglicol-divinílico (DE). Isso pode indicar que as nanopartículas esféricas estão dificultando a solvatação de cadeias poliméricas e atuando como agentes de reticulação, criando um sistema interligado com unidades cooperativas menores e com menor mobilidade, o que reduziu a contribuição entálpica por unidade monomérica. Na Figura 5.25 é possível ver uma representação do modelo descrito acima.

SALA (2021) ¹¹⁴ também relatou uma diminuição na entalpia de transição com a inserção de nanofibras de sílica. Além disso, o aumento da quantidade de sílica na matriz polimérica levou a uma diminuição da entalpia. Porém, é possível observar na Tabela 5.6 que não há diferença estatística entre os nanocompósitos sintetizados com nanoesferas, indicando que o aumento da sílica não resultou em alteração dos parâmetros termodinâmicos. A variação no diâmetro das esferas também não apresentou efeito já que os nanocompósitos com esferas de 80 nm apresentaram a mesma energia de transição que os nanocompósitos com esferas de 330 nm. Isso indica que a redução do raio das esferas e,

consequentemente, o aumento da área de superfície não altera a entalpia e a entropia de transição.

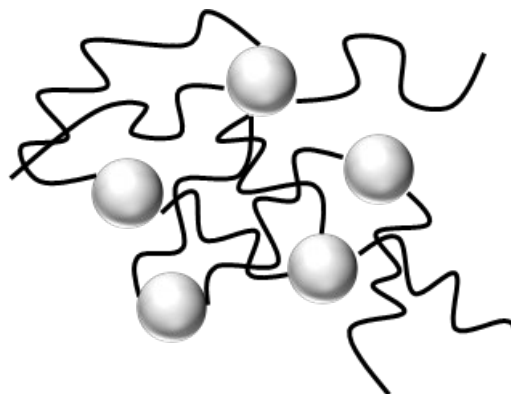


FIGURA 5.25 - Representação da estrutura dos nanocompósitos na qual as nanopartículas de sílica interligam cadeias poliméricas agindo como agentes reticulantes.

A análise reológica foi utilizada para avaliar as propriedades viscoelásticas dos polímeros antes e após a transição sol-gel. A vantagem de se utilizar a reologia no caso dos polímeros termossensíveis é que esses materiais em temperatura ambiente estão no estado líquido e não possuem resistência mecânica suficiente para serem testados pelas técnicas tradicionais de análise mecânica ¹³⁹. Neste estudo, foi utilizado o cisalhamento oscilatório de pequena amplitude, empregando-se taxas de deformação e frequência de baixa intensidade como recomendado para amostras de hidrogel.

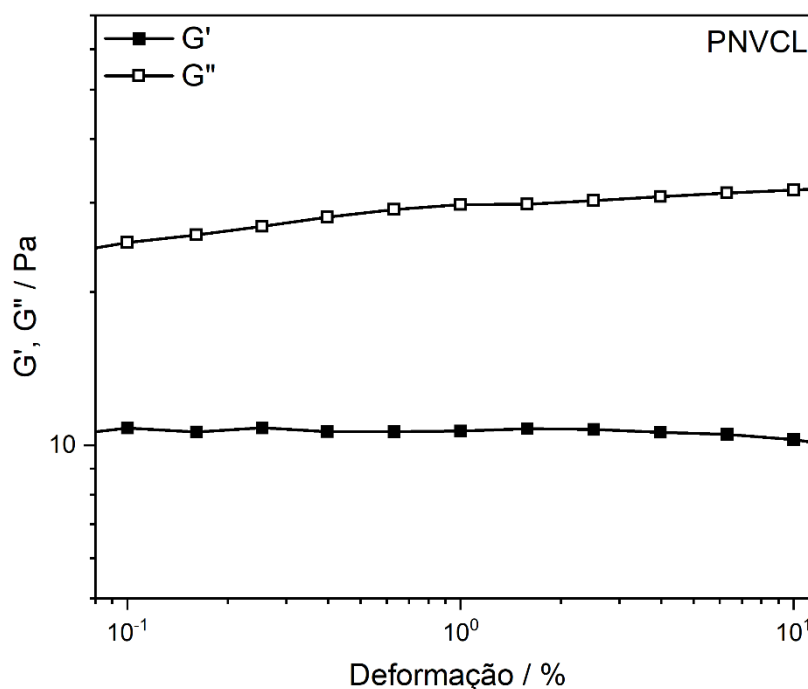


FIGURA 5.26 - Teste de varredura dos módulos de armazenamento e perda em função da deformação de uma solução 20 % m/v de PNVCCL a 1 Hz e 37 °C para determinar o regime linear viscoelástico (RLV).

Para avaliar o efeito nas propriedades reológicas do PNVCCL e sua injetabilidade após a adição de nanoesferas de sílica, os módulos de armazenamento (G') e perda (G'') e a viscosidade complexa (η^*) foram analisados nas temperaturas de 25 °C e 37 °C. Todos os testes foram realizados na região viscoelástica linear (LVR) determinada por um teste de varredura de amplitude (Figura 5.26). Uma concentração de 20 % m/v foi escolhida para os testes reológicos com base no trabalho de SALA (2017) sobre a aplicação de PNVCCL para a recuperação de tecidos de cartilagem ¹¹⁵. Essa concentração permitiu a administração *in vivo* do polímero por meio de uma seringa, além de permitir que o material permanecesse estável no local da aplicação após a transição.

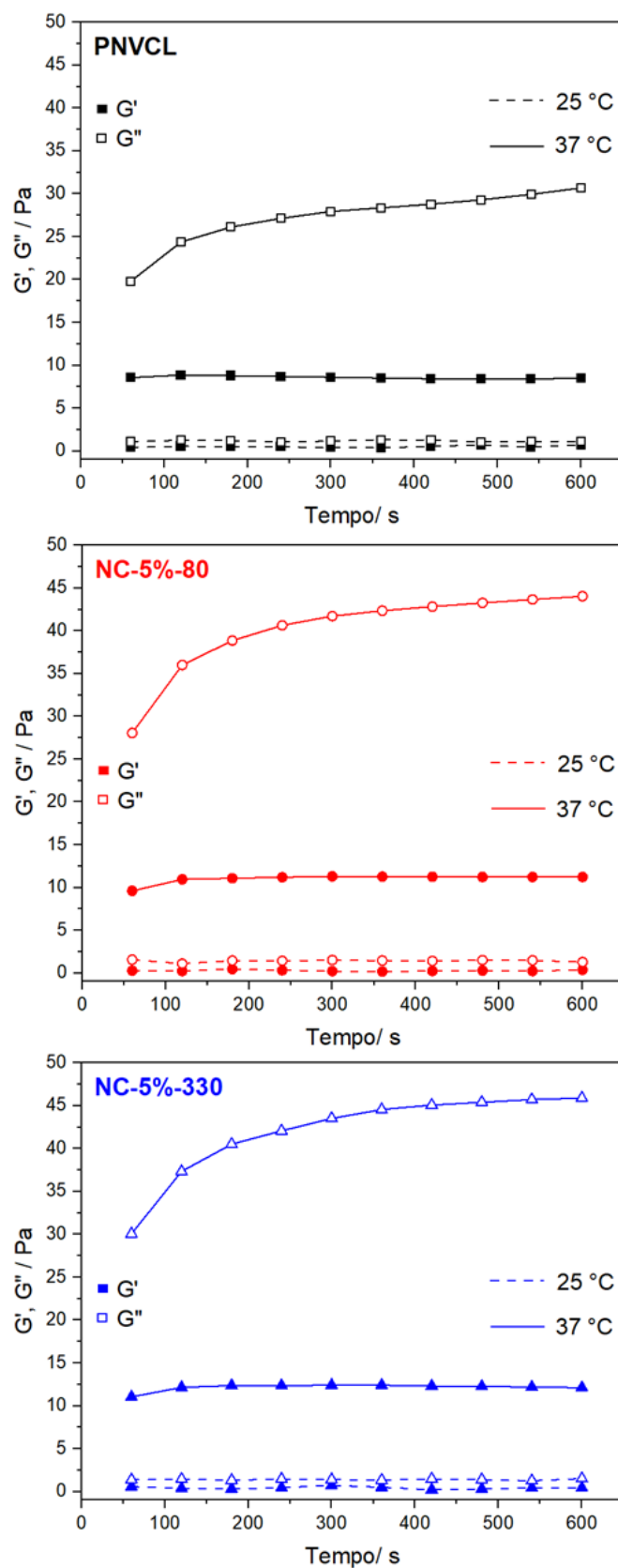


FIGURA 5.27 – Módulos de armazenamento (G') e perda (G'') de soluções 20% m/v de PNVCL, NC-5%-80 e NC-5%-330 a 25 °C e 37 °C.

A Figura 5.27 mostra que após o aumento da temperatura de 25 °C para 37 °C, a solução de PNVCL apresentou um aumento nos módulos de perda e armazenamento. Este aumento está relacionado com a transição do material de um estado solvatado para um estado aglomerado quando aquecido acima de seu LCST. A transição do polímero termossensível pode ser acompanhada pela formação de um hidrogel e cruzamento dos módulos ($G' > G''$), uma vez que as cadeias PNVCL são capazes de formar uma estrutura com reticulação reversível. No entanto, mesmo após o aquecimento na temperatura fisiológica, os valores de G'' permaneceram superiores aos valores de G' , indicando um aumento nas propriedades reológicas do material sem a formação de um hidrogel. HALLIGAN (2017) também relatou $G'' > G'$ para soluções de PNVCL a 37 °C com o módulo de armazenamento superando o módulo de perda apenas a 47 °C, mostrando que nosso sistema pode resultar em um hidrogel se aquecido a temperaturas mais altas ¹²⁸.

Os mesmos resultados foram observados para os nanocompósitos em ambas as temperaturas, conforme mostrado na Figura 5.27. Mesmo não tendo sido obtido um hidrogel, a presença de nanopartículas de sílica na matriz polimérica resultou em maiores valores de G' e G'' após a transição a 37 °C. A Figura 5.28 mostra os valores dos módulos de armazenamento e perda de todos os polímeros antes e depois da transição. A adição das nanoesferas na porcentagem de 5% aumentou G' e G'' em 35% e 50%, respectivamente, em comparação ao polímero puro. Essa melhora pode ser explicada pela criação de uma rede interligada de cadeias poliméricas e sílica, o que contribuiu para o aumento da porção elástica do nanocompósito.

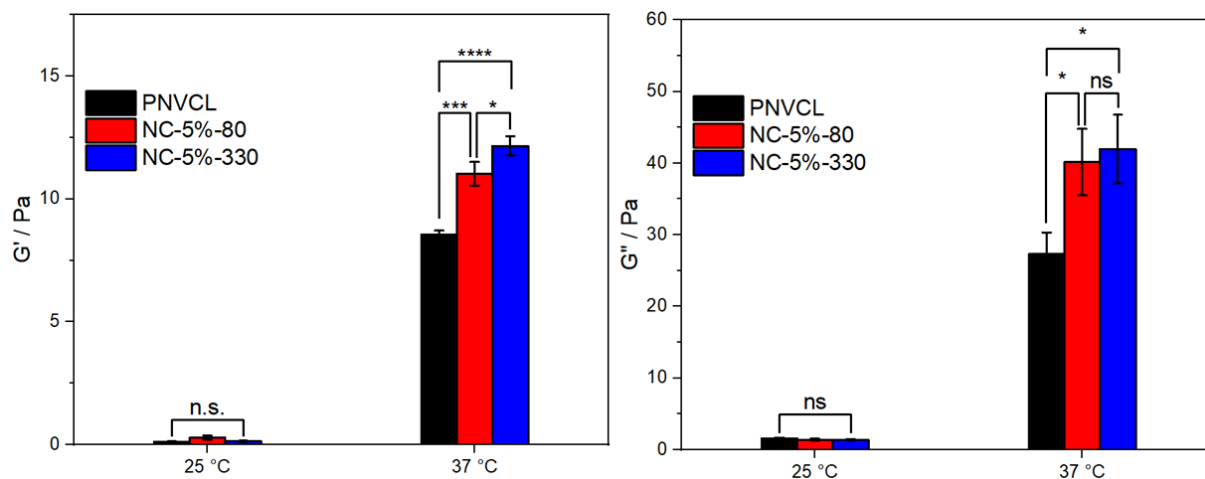


FIGURA 5.28 – Comparação de G' e G'' obtidos em testes em função do tempo usando uma frequência de 1 Hz, 5% de deformação e em diferentes temperaturas. A análise estatística foi realizada usando o software Graph Pad Prism 9 e o teste ANOVA de uma via. A significância estatística foi assumida para valores de $p < 0,05$: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$.

Analisando a Figura 5.29, é possível perceber que não há diferença nos valores de viscosidade complexa após a adição das nanopartículas à temperatura ambiente. Os baixos valores de viscosidade indicam que essas soluções na concentração de 20 % m/v podem ser utilizadas como sistemas injetáveis, já que os materiais utilizados para aplicações injetáveis precisam apresentar baixa viscosidade para permitir sua administração por uma seringa.

Quando a temperatura das soluções poliméricas é aumentada para 37 °C, a transição de fase induzida pela temperatura é confirmada por um aumento pronunciado em η^* . Na temperatura fisiológica, os nanocompósitos apresentaram maiores valores de viscosidade complexa do que o polímero puro, indicando que a sílica foi capaz de aumentar as propriedades viscoelásticas do PNVCL. Esse aumento pode ser vantajoso, pois materiais de baixa viscosidade podem resultar na dissolução prematura do sistema, levando à rápida liberação do fármaco e eventual deslocamento do material do local alvo ¹⁴⁰. Como demonstrado anteriormente, as nanopartículas de sílica funcionalizadas atuam como um agente de reticulação no estado de gel, o que também poderia explicar o aumento de η^* acima da transição de fase.

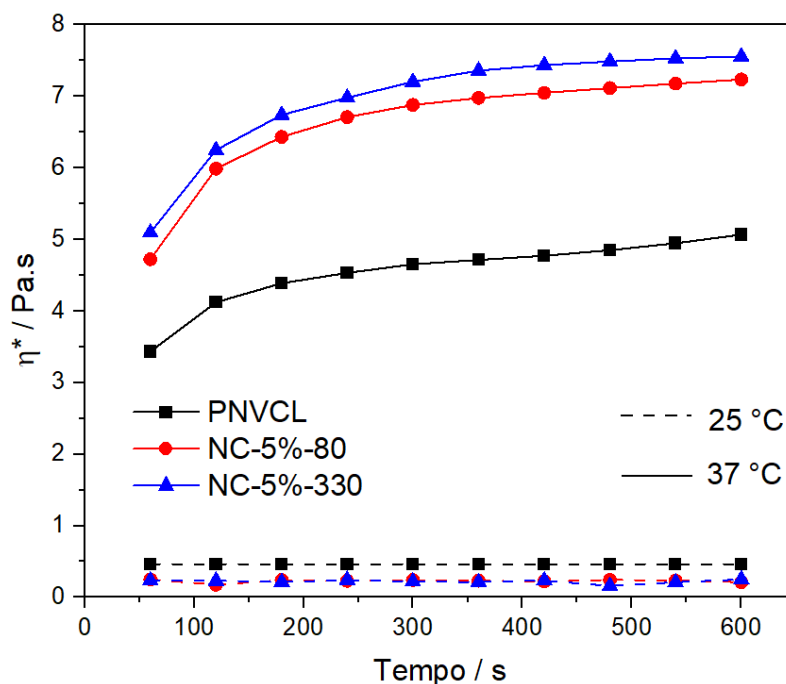


FIGURA 5.29 - A viscosidade complexa do PNVCL e seus nanocompósitos em função do tempo medida na temperatura ambiente e na temperatura fisiológica.

5.4 - Liberação controlada de medicamentos

As propriedades físicas dos hidrogéis despertaram interesse particular em seu uso em aplicações de administração de medicamentos. Parte disso é por causa da sua porosidade que permite o carregamento de fármacos na matriz polimérica e sua subsequente liberação a uma taxa que depende do coeficiente de difusão da molécula através da rede do gel. Os benefícios que os hidrogéis trazem para os sistemas de *drug delivery* estão relacionados com a cinética de saída do fármaco. Busca-se que os medicamentos sejam eluídos lentamente, mantendo uma alta concentração local nos tecidos próximos por um período prolongado. Os hidrogéis termossensíveis, em específico, também apresentam a vantagem de serem deformáveis e poderem se adaptar ao volume disponível no organismo quando injetados. Diferente de alguns hidrogéis que precisam ser inseridos como peças por cirurgia^{3,6}.

Os hidrogéis também oferecem uma importante característica "furtiva" em aplicações *in vivo* devido à sua hidrofiliabilidade, a qual aumenta o tempo de administração e evita a resposta imune do hospedeiro, diminuindo as atividades

fagocíticas. Além disso, a biodegradabilidade ou dissolução dos hidrogéis no corpo pode ser projetada por meio de vias enzimáticas, hidrolíticas ou ambientais (por exemplo, pH, temperatura ou campo elétrico). No entanto, a degradação nem sempre é desejável, dependendo da escala de tempo e da localização da administração do medicamento ^{141,142}.

A doxorubicina (DOX) é um fármaco anticâncer utilizado em tratamentos quimioterápicos para o tratamento de cânceres em diferentes regiões do corpo, como: ovário, mama, pulmão e bexiga. A molécula de DOX possui uma região hidrofílica devido aos grupos hidroxila e uma região hidrofóbica devido aos seus anéis aromáticos, indicando que ela pode interagir com o hidrogel ¹⁴³. O problema de seu uso é que sua aplicação prolongada causa problemas sistêmicos em alguns órgãos, como a cardiomiopatia irreversível. Além destes efeitos colaterais, a aplicação de DOX sozinha no organismo possui uma eficiência reduzida devido sua baixa absorção celular e resistência do organismo ao fármaco. Por este motivo, buscam-se formas alternativas de aplicação no organismo que possam reduzir seus efeitos colaterais ¹⁴⁴. Os hidrogéis termossensíveis injetáveis permitem uma liberação controlada localizada de fármacos e, portanto, podem ser usados como uma formulação alternativa para a liberação de DOX, diminuindo sua toxicidade sistêmica ¹⁴⁵.

Além do pH fisiológico, foi escolhido também o pH ácido por ser encontrado em regiões próximas a tumores, o que permite uma avaliação preliminar de como seria a liberação de um fármaco para esse tipo de tratamento. A vasculatura funcional dos tumores costuma ser inadequada para suprir as necessidades nutricionais da população de células tumorais em crescimento, resultando em deficiência de oxigênio e de outros nutrientes. A produção de ácido lático em condições anaeróbias e a hidrólise de ATP em um ambiente com falta de energia contribuem para a formação de um microambiente ácido ¹⁴⁶.

ZHANG (2018) ¹⁴⁷ também estudou a liberação controlada de DOX utilizando um hidrogel termossensível para o tratamento de células de câncer cervical humano (Hela). Nesse estudo, os materiais eram baseados em quitosana e ácido hialurônico (HA) e além de apresentarem sensibilidade à temperatura, eram também responsivos a pH devido à presença da quitosana. Esses hidrogéis se mostraram capazes de serem utilizados como um sistema injetável, já que a solução

polimérica gelificou após sua aplicação na temperatura fisiológica. Os testes de liberação foram realizados tanto em pH neutro como ácido. A liberação de DOX foi maior em pH 4,0 para todos os materiais sintetizados. O mecanismo de saída do fármaco da matriz polimérica foi determinado como de difusão pelo modelo de Korsmeyer-Peppas. A quantidade de ácido hialurônico também interferiu na liberação, já que seu aumento de 0 para 3% acarretou em uma diminuição de 43% de liberação.

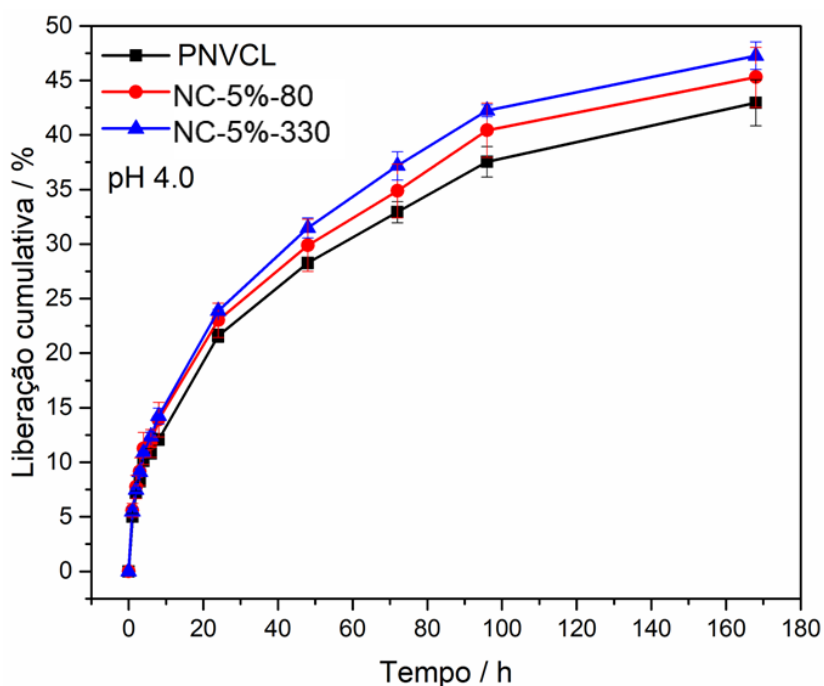


FIGURA 5.30 - Curvas de liberação de doxorrubicina (DOX) em pH 4 a partir de diferentes hidrogéis.

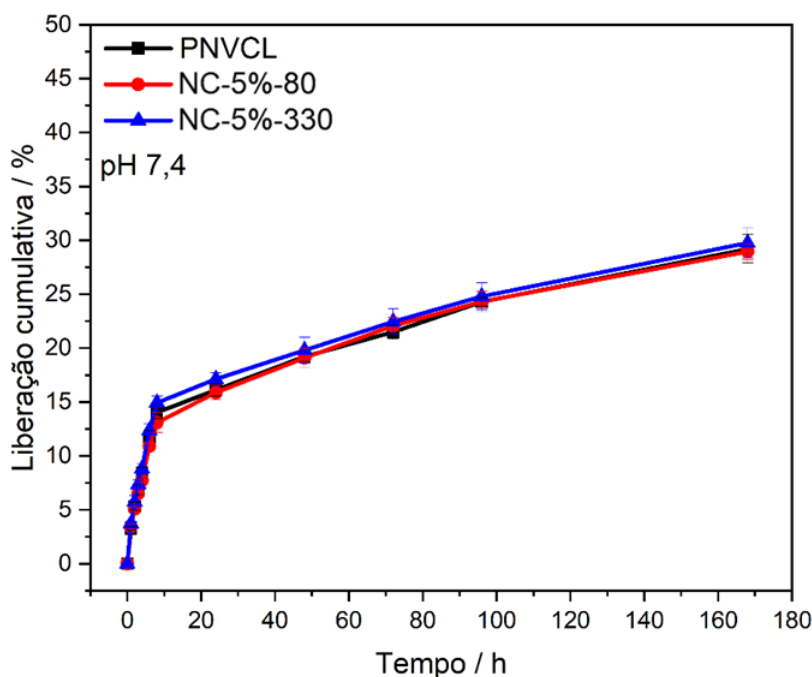


FIGURA 5.31 - Curvas de liberação de doxorrubicina (DOX) em pH 7 a partir de diferentes hidrogéis.

Os testes de liberação controlada utilizando matrizes de PNVCL foram realizados em temperatura fisiológica de 37 °C e em pH ácido e pH neutro. As Figuras 5.30 e 5.31 mostram a liberação cumulativa de DOX usando os hidrogéis PNVCL, NC-5%-80 e NC-5%-330. Nessas figuras é possível ver que todos os materiais, durante os primeiros 15 min após a adição do sobrenadante, liberaram uma grande quantidade inicial de fármaco antes de estabilizar. Este fenômeno é chamado de *burst release* e leva a uma maior liberação inicial do medicamento. Além disso, uma maior quantidade de DOX foi liberada quando utilizado o tampão de acetato como sobrenadante. Após 7 dias, a quantidade liberada pelos três hidrogéis foi aproximadamente 20% em pH 7,4, enquanto em pH 4,0 foi aproximadamente 45%.

Uma possível explicação é a combinação do aumento da solubilidade da DOX com diminuição do pH, aliado ao fato de que o tampão de pH ácido pode estar facilitando a diluição do gel para o sobrenadante, o que acarretaria na saída de uma maior quantidade de fármaco. Para confirmar essa hipótese, foi feito um teste de erosão com o polímero puro PNVCL nas mesmas condições utilizadas para o teste de liberação, porém sem fármaco. Para confirmar essa diferença de comportamento, foi determinada a massa final de polímero após o teste. A Tabela

5.7 mostra os valores de perda de massa para cada polímero. Analisando os valores, percebe-se que uma maior erosão ocorreu em pH ácido, tanto para o polímero puro quanto para os nanocompósitos, o que explica uma maior liberação de DOX em condições ácidas. Esse resultado mostra também que em caso de aplicação do polímero em regiões ácidas, como nos tratamentos de tumor e câncer, a liberação do fármaco seria mais rápida, enquanto em regiões de pH neutro, como em aplicações dentárias, a liberação seria mantida por mais tempo.

TABELA 5.7 – Valores de perda de massa dos polímeros em pH ácido e neutro sob as mesmas condições do teste de liberação.

Material	Perda de massa / %	
	pH 4	pH 7
PNVCL	17,8 ± 3,0	4,7 ± 0,4
NC-5%-80	12,0 ± 2,0	7,2 ± 0,2
NC-5%-330	12,8 ± 1,9	6,0 ± 0,0

Porém, apesar de saber que o polímero está sendo erodido, ainda não é possível determinar se o mecanismo é de simples dissolução do hidrogel para o sobrenadante ou se as cadeias do polímero estão sendo quebradas. A dissolução pode estar ocorrendo devido a diminuição da interação entre as cadeias poliméricas causada pelos íons presentes no tampão, a qual ocorre de forma mais intensa no tampão ácido. No caso da quebra das cadeias, a degradação estaria ocorrendo por mecanismo de hidrólise das cadeias poliméricas catalisada pelo íon hidrônio (H_3O^+), mais presente no tampão acetato.

ZHANG (2011) ¹⁴⁸ também estudou a degradação in vitro de hidrogéis termossensíveis. No estudo, foi avaliada a degradação do polímero PCLA-PEG-PCLA por um período de 12 semanas. Para determinar se o polímero estava sendo degradado foi feita uma análise da massa molar por SEC em períodos determinados. No estudo foi confirmado a degradação com o deslocamento do pico para maiores tempos de retenção e a diminuição do valor de massa molar no pico

da distribuição. Além disso, com o passar do tempo de degradação, apareceu um segundo pico de distribuição, confirmando a hidrólise das cadeias poliméricas.

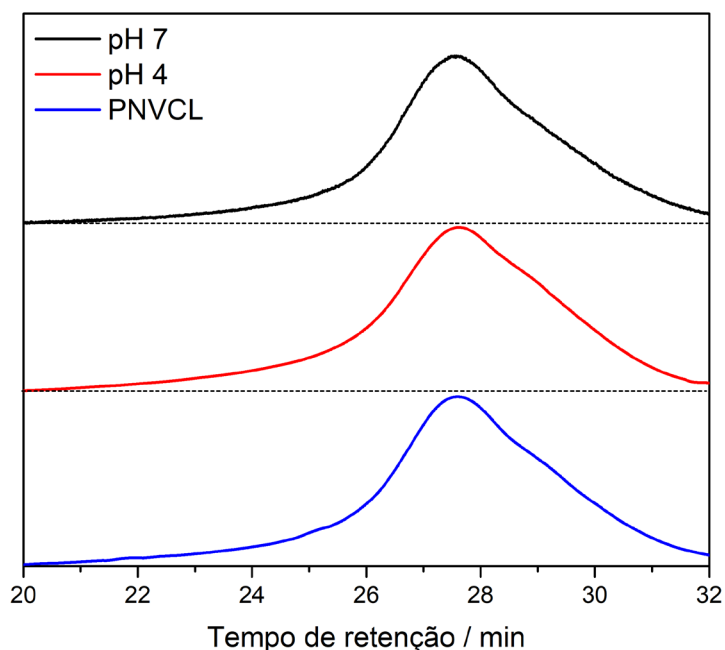


FIGURA 5.32 - Gráfico do índice de retenção em função do tempo de retenção dos polímeros utilizados no teste de erosão e do polímero sem sofrer tratamento.

Baseado nesse estudo, foi feita a mesma análise nas amostras utilizadas no último teste e no polímero puro sem tratamento. Como é possível ver na Figura 5.32 e na Tabela 5.8, o PNVCL apresentou o mesmo valor de tempo de retenção das amostras após o teste. O mesmo foi visto para a massa molar no pico. Analisando esses fatos, pode-se considerar que não há diferença entre as amostras antes e após o teste de erosão e, como o tamanho médio da cadeia polimérica não foi alterado após sete dias em contato com os diferentes tampões, as cadeias não estão sofrendo processo de hidrólise. Dessa forma, a erosão do hidrogel durante a liberação controlada ocorre por dissolução do polímero para o sobrenadante.

Tabela 5.8 – Valores de tempo de retenção e massa molar no pico da distribuição de índice de retenção obtidos na análise de SEC.

Material	Tempo de retenção / min	M_w pico / kDa
PNVCL	27,5 ± 0,0	63,1 ± 0,0
7 dias – pH 7	27,6 ± 0,1	63,1 ± 0,0
7 dias – pH 4	27,7 ± 0,1	63,1 ± 0,0

Foi realizada também a análise de ¹H RMN do polímero restante após o teste de erosão em pH ácido, assim como do sobrenadante que continha as cadeias que se soltaram do hidrogel. Uma outra possibilidade para estar havendo erosão sem alteração na massa molar seria a abertura do anel de caprolactama por hidrólise, a qual levaria à perda da termossensibilidade do polímero. Como é possível ver na Figura 5.33, o primeiro pico com deslocamento químico entre 1 e 2 ppm, referente aos três grupos -CH₂ do anel que não estão em posição α em relação aos átomos de N e O, se manteve junto tanto na amostra retirada do sobrenadante quanto na amostra retirada do hidrogel. Quando ocorre a abertura do anel de caprolactama, esse pico se divide em três, sendo o grupo -CH₂ do meio com menor δ e os outros dois com valores bem próximos. Esse evento ocorre, por exemplo, na abertura do monômero ε-Caprolactama utilizado na produção de Nylon 6^{149,150}. Considerando que o pico nesse estudo se manteve, pode-se concluir que não houve abertura de anel e que as cadeias poliméricas estão sofrendo um processo de dissolução.

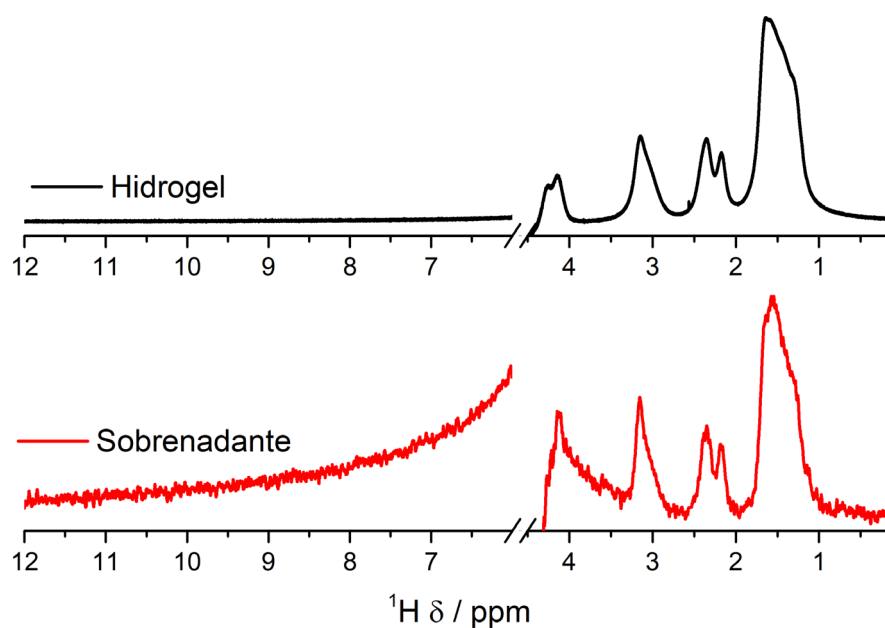


FIGURA 5.33 – Espectros ¹H RMN do hidrogel após o teste de erosão e do sobrenadante contendo as cadeias liberadas.

Diferente da água destilada, as soluções tampão possuem uma grande quantidade de íons que resultam em uma maior força iônica. SHTANKO (2003)¹⁵¹ mostrou que ao adicionar o PNVCL em uma solução tampão, sua LCST passava a variar com o pH. Em água pura a transição ocorreu em 35 °C, porém em soluções tampão, independente do pH, a transição passou a ocorrer em temperaturas mais baixas. Isso acontece porque a força iônica do tampão diminui a LCST⁷⁸. Além disso, a temperatura de transição diminuiu com o aumento do pH, variando de 31 °C em pH 5 até 26 °C em pH 12. Isso indica que o pH ácido de fato atrapalha a interação entre as cadeias poliméricas, dificultando a formação e manutenção do hidrogel.

Apesar de o hidrogel de PNVCL ter mostrado capacidade para aprisionar a DOX e liberá-la de forma controlada, a inserção de nanopartículas não afetou a liberação. A quantidade liberada em 7 dias foi igual para os três materiais, tanto em pH neutro quanto em pH ácido. Além disso, os materiais NC-5%-80 e NC-5%-330 apresentaram o mesmo perfil. Esse fato indica que a presença de nanopartículas de sílica com tamanhos e áreas de superfície distintos não afeta a liberação de DOX a partir dos nanocompósitos. O mesmo resultado foi encontrado

para o cálculo dos parâmetros termodinâmicos de transição, no qual os nanocompósitos apresentaram o mesmo valor de ΔH°_{cp} . A Tabela 5.9 mostra de forma resumida os valores de DOX liberado após 7 dias para todos os testes realizados. Os valores apresentam desvio padrão já que os experimentos foram realizados em triplicata.

TABELA 5.9 - Valores cumulativos de DOX liberado pelo polímero e nanocompósitos após 168 h de teste.

Materiais	Condições	
	pH 4,0	pH 7,4
PNVCL	43 ± 2 %	29 ± 1 %
NC-5%-330	45 ± 3 %	30 ± 1 %
NC-5%-80	47 ± 1 %	29 ± 1 %

Os modelos matemáticos são uma ferramenta importante para a avaliação de processos de liberação de medicamentos *in vitro* e *in vivo*, por permitir a interpretação quantitativa dos valores obtidos em um ensaio de liberação de fármaco. Desta forma, os modelos são utilizados principalmente para prever a liberação da molécula encapsulada em função do tempo e a avaliação matemática da cinética permite a compreensão do mecanismo de liberação¹⁵². Além disso, ajuda a prever a quantidade e o tipo de agente ativo e de polímero, bem como o tamanho e a forma que o sistema precisa ser projetado, para atingir um determinado perfil de liberação do medicamento^{109,153}.

Para entender melhor a saída do fármaco da matriz polimérica, aplicou-se diferentes modelos cinéticos nas curvas de liberação obtidas. Os modelos utilizados foram: ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas. Eles apresentam funções matemáticas diferentes que tentam descrever a liberação do fármaco. O modelo de Korsmeyer-Peppas apesar de ser o mais utilizado para liberações a partir de hidrogéis, ele foi adaptado para esses sistemas, sendo inicialmente utilizado para sistemas polímeros com diferentes morfologias (placas, esferas, cilindros e discos). Para determinar o modelo cinético de liberação

adequado que descreve o perfil de liberação para cada hidrogel, nas diferentes condições, utilizou-se o método de regressão linear no OriginLab 9.2.

Os modelos foram aplicados às curvas mostradas nas Figuras 5.30 e 5.31, sendo que o modelo de Korsmeyer-Peppas foi aplicado até o ponto em que $\frac{M_t}{M_\infty} < 0,6$. Os parâmetros calculados são mostrados na Tabela 5.10. É possível ver que os melhores modelos foram de Higuchi e de Korsmeyer-Peppas, apresentando valores de R^2 próximos a um. Uma possível explicação é o fato de ambos modelos serem exponenciais, sendo o modelo de Higuchi com um expoente fixo em 0,5 e o modelo de Korsmeyer-Peppas com um expoente variável. Os valores de n encontrados no segundo modelo estão próximos de 0,5, entre 0,437 e 0,614, o que explicaria esse resultado. ZHANG (2018) e KHAN (2013) também aplicaram os modelos de Higuchi e Korsmeyer-Peppas em suas curvas de liberação e obtiveram altos valores de R^2 para ambos modelos nos casos em que o valor de n ficou entre 0,466 e 0,582, valores bem próximos aos valores encontrados na Tabela 5.10 ^{147,154}.

O modelo de Korsmeyer-Peppas consegue relacionar a superposição de dois mecanismos de transporte: relaxação das cadeias poliméricas e difusão da molécula de fármaco. Dependendo do valor de n que melhor se ajusta ao perfil de liberação, é possível estabelecer uma classificação, de acordo com o tipo de comportamento observado. Quando $n \leq 0,50$, a difusão da molécula de fármaco é o principal fator que controla a liberação; no intervalo $0,50 < n < 1,00$, o transporte anômalo se torna dominante, uma vez que difusão do fármaco e erosão das cadeias poliméricas são os principais fatores que controlam a liberação; quando $n = 1,00$, o modelo é chamado de Caso I, no qual o mecanismo que controla a saída do medicamento da matriz é o relaxamento das cadeias poliméricas ^{109,155}. Os testes em pH 4,0 apresentaram valores de $n \leq 0,50$, indicando que a liberação de DOX depende apenas de sua difusão para fora da matriz de PNVCL. Porém, para os testes em pH 7,4, todos os valores de n encontrados ficaram na faixa de $0,50 < n < 1,00$, indicando que a liberação de DOX depende não apenas da difusão da molécula do fármaco, mas também da erosão do hidrogel.

Esse resultado se difere do reportado por ZHANG (2018) ¹⁴⁷, que obtiveram valores de n abaixo de 0,5, tanto para condições com pH ácido, quanto pH neutro. Isso indica que a saída de DOX a partir de uma matriz de quitosana com ácido hialurônico (HA) depende apenas da difusão da molécula para fora da matriz,

independente do pH, diferente da matriz de PNVCL que altera o mecanismo dependendo do pH.

TABELA 5.10 - Parâmetros obtidos após a aplicação dos modelos cinéticos em todas as curvas de liberação de DOX.

Materiais	Modelo	pH 4			pH 7		
		K	n	R ²	K	n	R ²
PNVCL	Ordem Zero	0,0034	-	0,824	0,0022	-	0,753
	Primeira Ordem	0,0042	-	0,870	0,0026	-	0,786
	Higuchi	0,0871	-	0,987	0,0886	-	0,954
	Korsmeyer-Peppas	0,119	0,444	0,987	0,111	0,703	0,998
NC-5%-330	Ordem Zero	0,0037	-	0,820	0,0023	-	0,739
	Primeira Ordem	0,0048	-	0,871	0,0026	-	0,773
	Higuchi	0,0882	-	0,986	0,0898	-	0,947
	Korsmeyer-Peppas	0,116	0,462	0,99	0,122	0,669	0,996
NC-5%-80	Ordem Zero	0,0035	-	0,816	0,0022	-	0,766
	Primeira Ordem	0,0046	-	0,866	0,0026	-	0,799
	Higuchi	0,0880	-	0,985	0,0888	-	0,962
	Korsmeyer-Peppas	0,125	0,437	0,990	0,114	0,650	0,993

Um problema comum na área de liberação controlada é a liberação de fármacos hidrofóbicos devido a sua baixa solubilidade, o que resulta em baixa biodisponibilidade quando aplicados por via oral.¹⁵⁶ A utilização de um polímero termossensível como sistema de liberação pode evitar a necessidade de modificação do fármaco para sua aplicação. Muitas drogas são descartadas mesmo sendo altamente eficazes no tratamento de doenças por não serem bem absorvidas pelos tecidos humanos.¹⁵⁷ Assim, após a aplicação no corpo via injeção no local desejado, o PNVCL seria capaz de encapsular o fármaco hidrofóbico devido à sua transição de fase induzida pela temperatura e controlar sua liberação. Desta forma, foi feita a liberação de um fármaco hidrofóbico para comprovar que o PNVCL consegue controlar a liberação de fármacos de diferentes hidrofilicidades e para comparar com a liberação de DOX, um fármaco hidrofílico na sua forma hidroclorada. A naringina (flavanona-7-O-glicósido) é um flavonoide que se destaca

entre as moléculas usadas para o tratamento de doenças ósseas.¹⁵⁸ Esse flavonoide natural pode ser encontrado em frutas do gênero Citrus. Sucos comerciais de toranja (*Citrus paradisi*) e de tangerina (*Citrus bergamia*) são fontes ricas em naringina.¹⁵⁹ A naringina tem sido estudada devido ao seu efeito pro-osteogênico na terapia óssea no tratamento da osteoporose, ou como mediador na diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais.^{160,161}

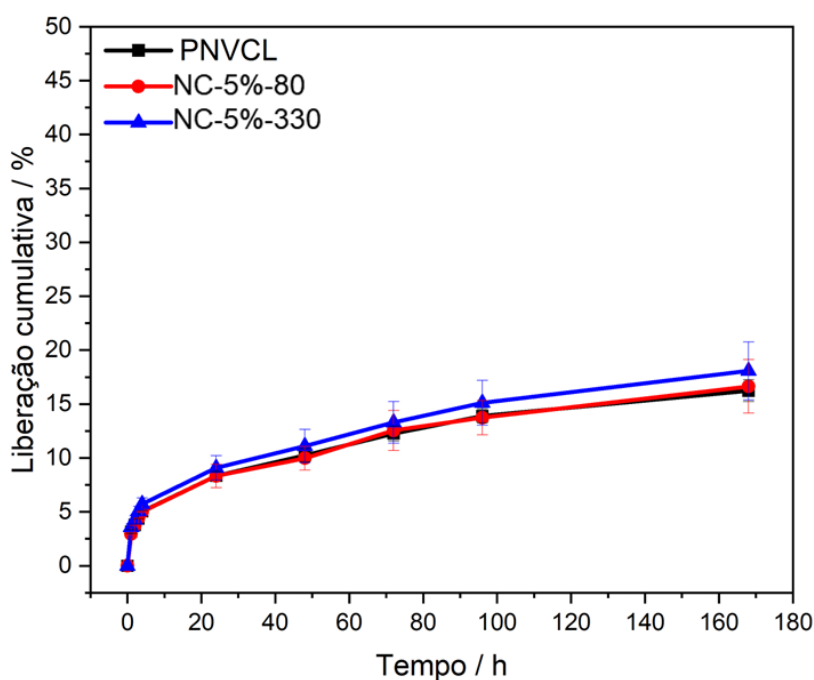


FIGURA 5.34 - Curvas de liberação de naringina em pH 7,4 durante sete dias a partir de diferentes polímeros.

Diferente da liberação de DOX, o ensaio com naringina foi feito apenas em condições fisiológicas, uma vez que sua principal aplicação é na recuperação de tecidos ósseos. A Figura 5.34 apresenta as curvas de liberação cumulativa do flavonoide utilizando PNVCL, NC-5%-80 e NC-5%-330. Assim como na liberação do anticancerígeno, os três materiais apresentaram valores muito próximos durante todo o período, atingindo um valor final de 17 % após sete dias (Tabela 5.11). Essa diferença de liberação em relação à liberação de DOX nas mesmas condições pode ser explicada pela melhor interação entre a matriz de PNVCL e a naringina. As cadeias poliméricas começam a se aglomerar quando aquecidas à temperatura fisiológica e formam predominantemente interações hidrofóbicas. Desta forma, o fármaco experimenta um ambiente hidrofóbico dentro do polímero, o que permite um melhor controle sobre a liberação de naringina. Por outro lado, como a interação

molécula-polímero é mais forte, pode ser que esteja acontecendo também uma menor dissolução da matriz, contribuindo para uma menor liberação.

Comparando com a naringina, o cloridrato de doxorrubicina, o qual é uma molécula hidrofílica, resultou em uma liberação cumulativa maior no mesmo intervalo de tempo, sendo quase duas vezes maior. Além disso, a inserção de nanopartículas não afetou a liberação de ambas as drogas. Este resultado mostra que apesar do aumento da viscosidade e mudanças gerais na estrutura do polímero e perfil termorresponsivo pela inserção de nanopartículas de sílica, a liberação foi a mesma usando PNVCL e seus nanocompósitos.

TABELA 5.11 - Valores cumulativos de naringina liberada pelo polímero e nanocompósitos após 168 h de teste.

Materiais	pH 7,4
PNVCL	15 ± 1 %
NC-5%-330	18 ± 1 %
NC-5%-80	16 ± 1 %

CHANG (2017) ¹⁶² também estudaram a liberação de naringina usando um polímero termossensível, sendo neste caso feito de carboximetil-hexanoil quitosana (CHC), fosfato de β -glicerol (β -GP) e glicerol. Em pH fisiológico, a liberação foi acima de 40% após as primeiras 24 horas e quase 100% após 5 dias de teste. Quando comparado ao nosso estudo, fica claro que o uso de PNVCL promove maior controle sobre a liberação de naringina, chegando a 17% após uma semana, e assim permite a criação de um sistema para tratamentos que requerem maior duração.

A cinética e o mecanismo de liberação foram estudados pela aplicação de modelos matemáticos nas curvas de liberação cumulativa de naringina (Tabela 5.12). Os modelos utilizados foram os mesmos utilizados para a doxorrubicina. Novamente, o melhor modelo com valores maiores de R^2 foi o modelo de Korsmeyer-Peppas. Porém, diferente do fármaco hidrofílico, os valores de n calculados para a naringina ficaram abaixo de 0,5, indicando que o mecanismo que

controla a liberação do flavonoide é sua difusão para o sobrenadante, provavelmente devido a sua maior interação com a matriz polimérica.

Estes ensaios de liberação mostraram que de fato o PNVCL consegue controlar a liberação de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos. Além disso, devido à maior interação do fármaco hidrofóbico com a matriz polimérica, uma vez que o PNVCL após a transição sol-gel apresenta um interior hidrofóbico e um exterior hidrofílico, sua saída para o sobrenadante é mais controlada. Por fim, a presença das nanopartículas de sílica não afetou a liberação de nenhum dos fármacos testados ¹⁴⁰.

TABELA 5.12 – Parâmetros obtidos após a aplicação dos modelos cinéticos em todas as curvas de liberação de naringina.

Materiais	Modelo	pH 7		
		K	n	R ²
PNVCL	Ordem Zero	0,0018	-	0,778
	Primeira Ordem	0,0021	-	0,804
	Higuchi	0,888	-	0,952
	Korsmeyer-Peppas	0,228	0,333	0,969
NC-5%-330	Ordem Zero	0,0017	-	0,766
	Primeira Ordem	0,0020	-	0,791
	Higuchi	0,087	-	0,944
	Korsmeyer-Peppas	0,232	0,376	0,992
NC-5%-80	Ordem Zero	0,0017	-	0,905
	Primeira Ordem	0,0019	-	0,913
	Higuchi	0,908	-	0,918
	Korsmeyer-Peppas	0,279	0,335	0,968

5.5 - Estudo da atividade biológica dos polímeros

A fim de avaliar a liberação do fármaco anticancerígeno DOX, um teste preliminar foi realizado em dois tipos diferentes de linhas celulares: células tumorais de bexiga (MB49) e fibroblastos (L929), ambos de camundongos. A viabilidade dessas células foi avaliada por testes indiretos, onde o sobrenadante contendo o conteúdo liberado dos polímeros após 24 horas foi adicionado às células, que foram então cultivadas nesta solução por mais 24 horas.

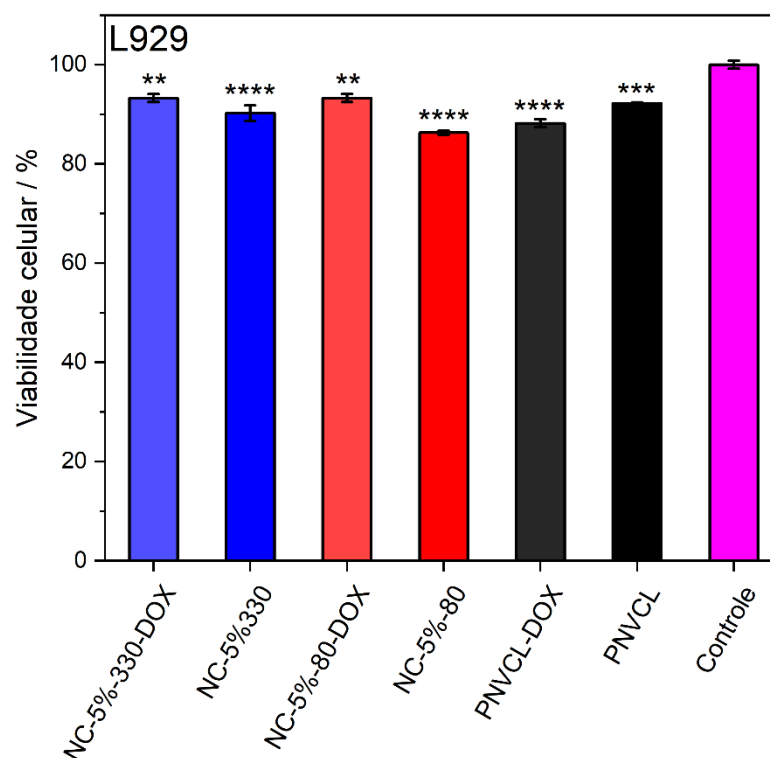


FIGURA 5.35 - Determinação da viabilidade celular realizada de forma indireta em células L929 (1×10^5 células/poço) tratadas com alíquotas de 24 h do teste de liberação de DOX. A análise estatística foi realizada usando o software Graph Pad Prism 9 e o teste ANOVA de uma via. A significância estatística foi assumida para valores de $p < 0,05$: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$.

A Figura 5.35 ilustra a viabilidade das células L929 após 24 horas de cultura na solução liberada dos polímeros. Conforme observado anteriormente, os polímeros sofrem um processo de erosão em condições fisiológicas, resultando na liberação de cadeias poliméricas para PNVCL puro e cadeias com nanopartículas de sílica para nanocompósitos. Isso foi confirmado pela análise de espalhamento de luz

dinâmico (DLS), que mostrou uma única curva de distribuição de tamanho para PNVCL e duas curvas de distribuição para o nanocompósito, correspondendo às cadeias poliméricas e às nanopartículas de sílica (Figura 5.36). Quando esses materiais são carregados com DOX, as moléculas de fármaco também são liberadas da matriz de PNVCL. Assim, a composição das alíquotas adicionadas às células variou dependendo da formulação utilizada. Quando os polímeros sem o fármaco foram testados, a viabilidade ficou em torno de 90% em relação ao grupo controle. Este resultado confirma que tanto o PNVCL puro quanto seus nanocompósitos com nanoesferas de sílica são biocompatíveis com células fibroblásticas saudáveis. Resultados semelhantes foram obtidos para sistemas poliméricos carregados com DOX, indicando que a dose do anticancerígeno liberada em 24 horas não foi suficiente para causar toxicidade às células L929. Esta observação é consistente com um estudo anterior de Lanks e Lehman, que mostrou que as concentrações terapêuticas de DOX não induzem a morte em células L929 ¹⁶³.

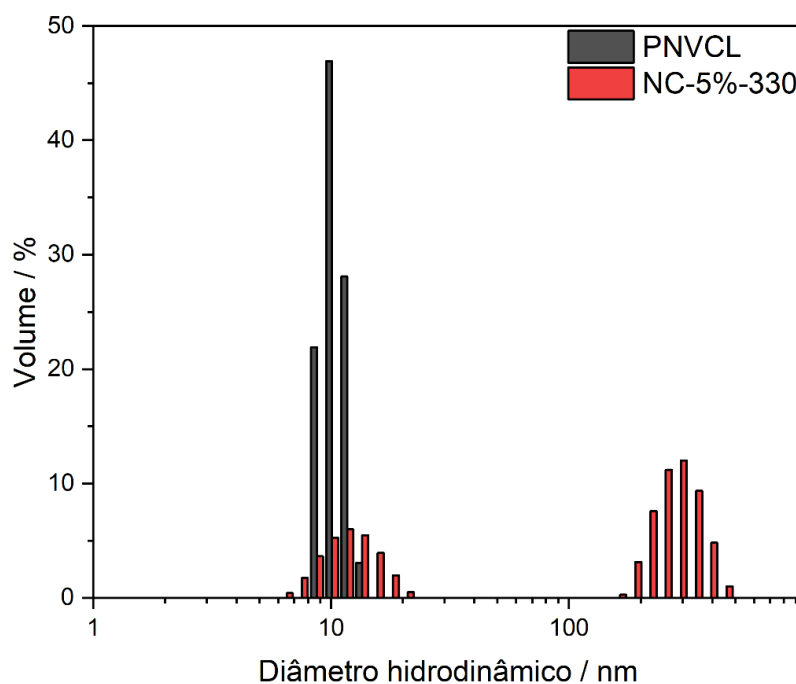


FIGURA 5.36 – Análise do diâmetro hidrodinâmico dos polímeros PNVCL e NC-5%-330 medido por DLS após os testes de erosão.

A mesma metodologia foi aplicada às células cancerígenas MB49, e os resultados após 24 horas estão apresentados na Figura 5.37. Da mesma forma, os materiais PNVCL e NC-5%-80 exibiram uma viabilidade próxima a 90% em células MB49, indicando ausência de toxicidade para esta linha celular. No entanto, o

conteúdo liberado do nanocompósito NC-5%-330 resultou em viabilidade reduzida (70%). Em contraste com as células L929, a adição do fármaco aos sistemas poliméricos diminuiu a viabilidade das células tumorais para 70% utilizando PNVCL e NC-5%-80 e 50% utilizando NC-5%-330 após 24 horas. Esta diminuição significativa sugere um efeito sinérgico entre NC-5%-330 e doxorrubicina, com o nanocompósito aumentando a eficácia do fármaco anticancerígeno. Considerando que a única diferença entre os nanocompósitos é o tamanho das nanoesferas de sílica, é possível que a maior toxicidade seja atribuída ao maior tamanho das nanopartículas. Observações semelhantes foram reportadas para THP-1 e células endoteliais (EC) usando nanopartículas de sílica amorfa de diferentes tamanhos^{164,165}. Quando essas células foram tratadas com nanopartículas com diâmetros entre 16 e 1000 nm, as partículas de sílica menores que 80 nm não apresentaram citotoxicidade e resultaram em viabilidades semelhantes ao grupo controle. No entanto, ao usar nanopartículas de 300 nm, ambas as linhagens celulares exibiram uma diminuição de 40% na atividade metabólica e um aumento na liberação de lactato desidrogenase (LDH), indicando morte celular e dano à membrana. Outros experimentos foram conduzidos para elucidar o mecanismo de morte celular causado por essas nanopartículas maiores. Após 24 horas, nenhum aumento na atividade da caspase foi observado em células THP-1 ou EC, sugerindo o envolvimento de mecanismos necróticos no efeito tóxico de nanopartículas de sílica maiores. Esses resultados justificam a evidência de maior toxicidade no nanocompósito NC-5%-330. Além disso, estudos anteriores sobre a liberação controlada de DOX em células MB49 usando sistemas de liberação também relataram a alta toxicidade dessa droga nesse tipo específico de célula¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Os resultados apresentados na Figura 5.37 confirmam a toxicidade da DOX em células de carcinoma, pois sua presença resultou em menor viabilidade em comparação com formulações contendo apenas polímeros termossensíveis.

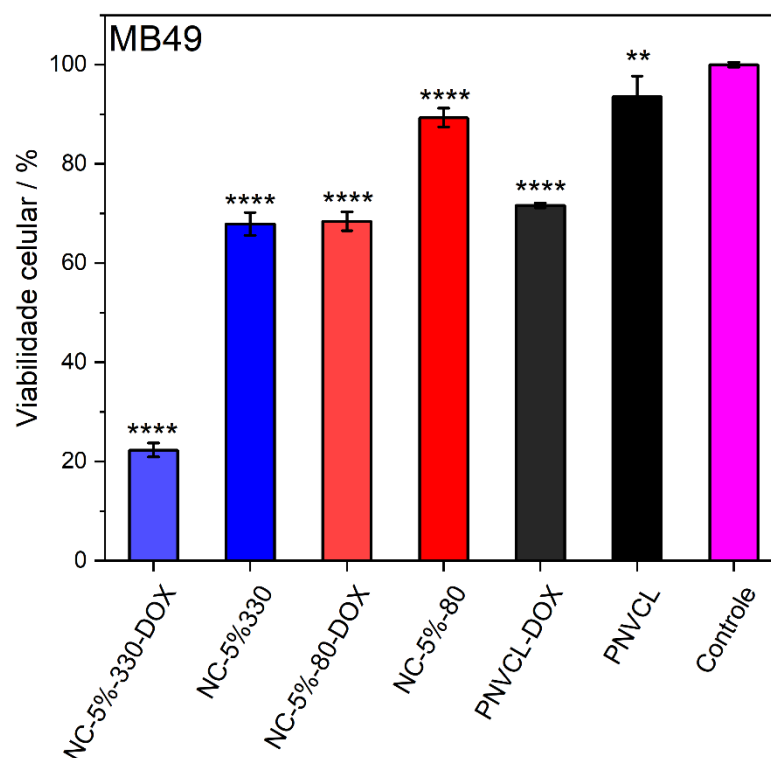


FIGURA 5.37 - Determinação da viabilidade celular realizada de forma indireta em células MB49 (1×10^5 células/poço) tratadas com alíquotas de 24 h do teste de liberação de DOX. A análise estatística foi realizada usando o software Graph Pad Prism 9 e o teste ANOVA de uma via. A significância estatística foi assumida para valores de $p < 0,05$: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$.

6 - CONCLUSÕES

A introdução de nanopartículas de sílica de tamanhos diferentes (80 e 330 nm) e em quantidades variadas (1 e 5% em massa) na matriz de PNVCL resultou em uma alteração no perfil de transição sol-gel do polímero. Os nanocompósitos apresentaram a formação de glóbulos em temperaturas abaixo da temperatura de transição, ao contrário do polímero puro, provavelmente devido à menor solvatação das cadeias poliméricas. Como consequência, as cadeias se auto-enovelaram na superfície das nanopartículas, conforme mostrado pela técnica DLS, reduzindo difusamente a transmitância.

Além disso, os valores das variações de entalpia da transição sol-gel dos nanocompósitos foram menores do que os do polímero puro. Esse comportamento indica que as nanopartículas estão atuando como agentes reticulantes, criando um sistema interligado. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores dos diferentes nanocompósitos, indicando que a variação da área superficial usando nanopartículas de 80 e 330 nm pode não ter sido suficiente para visualizar esse fator. Uma possível solução poderia envolver o uso de nanopartículas muito menores, em torno de 5 nm, resultando em uma área superficial significativamente maior em comparação com as partículas de 330 nm.

A rede interconectada criada pela inserção de nanopartículas também resultou em um aumento nos módulos de armazenamento e perda (G' e G'' , respectivamente) nos nanocompósitos. Esse aumento é crucial, pois permite que o polímero injetável apresente uma maior resistência à deformação e limite a expansão ou ruptura do sistema, o que poderia afetar o controle sobre a liberação do medicamento.

No entanto, a criação de um sistema interconectado não afetou a liberação dos medicamentos DOX e naringina, pois a liberação cumulativa dos nanocompósitos foi a mesma do polímero puro após sete dias. Os testes mostraram que, em condições ácidas, houve uma maior dissolução da matriz polimérica no sobrenadante, resultando em maior liberação. Além disso, a liberação de naringina foi menor devido às interações entre a molécula e as cadeias poliméricas.

Por fim, o teste preliminar de determinação indireta de citotoxicidade usando células não tumorais (L929) e células tumorais de carcinoma de bexiga (MB49) mostrou que o PNVCL puro e os nanocompósitos sem DOX não reduziram a viabilidade das duas linhas celulares após 24 horas, confirmando a biocompatibilidade dos materiais. Por outro lado, a aplicação dos materiais carregados com o agente anticancerígeno resultou em uma diminuição na viabilidade apenas nas células MB49, sendo esse efeito mais pronunciado no nanocompósito NC-5%-330 devido ao maior tamanho das nanopartículas, que exibiram um efeito sinérgico com o agente anticancerígeno.

Esses resultados sugerem que nanocompósitos termossensíveis injetáveis à base de PNVCL com nanoesferas de sílica têm potencial para serem utilizados no tratamento de doenças por meio de inserção minimamente invasiva, como na superfície de tumores. Testes preliminares indicaram que um possível tratamento para o câncer de bexiga utilizando PNVCL modificado com nanoesferas de sílica poderia controlar a liberação de DOX, minimizando potencialmente os efeitos colaterais ao exercer um impacto reduzido nas células saudáveis e aumentando a eficácia do medicamento. No entanto, são necessários mais testes para avaliar o efeito prolongado desses materiais sobre a viabilidade das células saudáveis e compreender verdadeiramente como as nanoesferas de 330 nm aumentam a toxicidade da doxorubicina nas células tumorais.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. TIBBITT, M. W.; DAHLMAN, J. E. & LANGER, R. "Emerging Frontiers in Drug Delivery". *Journal of the American Chemical Society*, **138** (3): 704, 2016.
2. MITCHELL, M. J.; BILLINGSLEY, M. M.; HALEY, R. M.; WECHSLER, M. E.; PEPPAS, N. A. & LANGER, R. "Engineering precision nanoparticles for drug delivery". *Nature Reviews Drug Discovery*, **20** (2): 101, 2021.
3. MERINO, S.; MARTÍN, C.; KOSTARELOS, K.; PRATO, M. & VÁZQUEZ, E. "Nanocomposite Hydrogels: 3D Polymer–Nanoparticle Synergies for On-Demand Drug Delivery". *ACS Nano*, **9** (5): 4686, 2015.
4. FANG, X.; CAO, J. & SHEN, A. "Advances in anti-breast cancer drugs and the application of nano-drug delivery systems in breast cancer therapy". *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **57**: 101662, 2020.
5. CANCINO, J.; MARANGONI, V. S. & ZUCOLOTTO, V. "Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações". *Química Nova*, **37**: 521, 2014.
6. HOARE, T. R. & KOHANE, D. S. "Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges". *Polymer*, **49** (8): 1993, 2008.
7. MACAYA, D. & SPECTOR, M. "Injectable hydrogel materials for spinal cord regeneration: a review". *Biomedical Materials*, **7** (1): 012001, 2012.
8. PERALE, G.; ROSSI, F.; SUNDSTROM, E.; BACCHIEGA, S.; MASI, M.; FORLONI, G. & VEGLIANESE, P. "Hydrogels in Spinal Cord Injury Repair Strategies". *ACS Chemical Neuroscience*, **2** (7): 336, 2011.
9. SONG, F.; LI, X.; WANG, Q.; LIAO, L. & ZHANG, C. "Nanocomposite Hydrogels and Their Applications in Drug Delivery and Tissue Engineering". *Journal of Biomedical Nanotechnology*, **11** (1): 40, 2015.
10. ENGEL, E.; MICHIARDI, A.; NAVARRO, M.; LACROIX, D. & PLANELL, J. A. "Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side". *Trends in Biotechnology*, **26** (1): 39, 2008.
11. LIU, L.; BAI, S.; YANG, H.; LI, S.; QUAN, J.; ZHU, L. & NIE, H. "Controlled release from thermo-sensitive PNVCL-co-MAA electrospun nanofibers: The effects of hydrophilicity/hydrophobicity of a drug". *Materials Science and Engineering: C*, **67**: 581, 2016.
12. CHATTERJEE, S. & HUI, P. C. "Review of Applications and Future Prospects of Stimuli-Responsive Hydrogel Based on Thermo-Responsive Biopolymers in Drug Delivery Systems". *Polymers*, 2021.
13. FARRUGIA, M.; MORGAN, S. P.; ALEXANDER, C. & MATHER, M. L. "Ultrasonic monitoring of drug loaded Pluronic F127 micellular hydrogel phase behaviour". *Materials Science and Engineering: C*, **34**: 280, 2014.
14. CHEN, F.; LU, G.; YUAN, H.; LI, R.; NIE, J.; ZHAO, Y.; SHU, X. & ZHU, X. "Mechanism and regulation of LCST behavior in poly(hydroxypropyl acrylate)-based temperature-sensitive hydrogels". *Journal of Materials Chemistry A*, **10** (35): 18235, 2022.

15. PONCE-VARGAS, S. M.; CORTEZ-LEMUS, N. A. & LICEA-CLAVERÍE, A. "Preparation of Poly(N-Vinylcaprolactam) (NVCL) and Statistical Copolymers of NVCL with Variable Cloud Point Temperature by Using A Trithiocarbonate RAFT Agent". *Macromolecular Symposia*, **325-326** (1): 56, 2013.
16. VIHOLA, H.; LAUKKANEN, A.; VALTOLA, L.; TENHU, H. & HIRVONEN, J. "Cytotoxicity of thermosensitive polymers poly(N-isopropylacrylamide), poly(N-vinylcaprolactam) and amphiphilically modified poly(N-vinylcaprolactam)". *Biomaterials*, **26** (16): 3055, 2005.
17. RAMOS, J.; IMAZ, A. & FORCADA, J. "Temperature-sensitive nanogels: poly(N-vinylcaprolactam) versus poly(N-isopropylacrylamide)". *Polymer Chemistry*, **3** (4): 852, 2012.
18. SALEH, T. A.; PARTHASARATHY, P. & IRFAN, M. "Advanced functional polymer nanocomposites and their use in water ultra-purification". *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, **24**: e00067, 2019.
19. OMANOVIĆ-MIKLIČANIN, E.; BADNJEVIĆ, A.; KAZLAGIĆ, A. & HAJLOVAC, M. "Nanocomposites: a brief review". *Health and Technology*, **10** (1): 51, 2020.
20. JEELANI, P. G.; MULAY, P.; VENKAT, R. & RAMALINGAM, C. "Multifaceted Application of Silica Nanoparticles. A Review". *Silicon*, **12** (6): 1337, 2020.
21. GAWARE, S. A.; ROKADE, K. A. & KALE, S. N. "Silica-chitosan nanocomposite mediated pH-sensitive drug delivery". *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **49**: 345, 2019.
22. LV, Y.; DU, Y.; QIU, W.-Z. & XU, Z.-K. "Nanocomposite Membranes via the Codeposition of Polydopamine/Polyethylenimine with Silica Nanoparticles for Enhanced Mechanical Strength and High Water Permeability". *ACS Applied Materials & Interfaces*, **9** (3): 2966, 2017.
23. BISWAL, T.; BADJENA, S. K. & PRADHAN, D. "Sustainable biomaterials and their applications: A short review". *Materials Today: Proceedings*, **30**: 274, 2020.
24. RAMAKRISHNA, S.; MAYER, J.; WINTERMANTEL, E. & LEONG, K. W. "Biomedical applications of polymer-composite materials: a review". *Composites Science and Technology*, **61** (9): 1189, 2001.
25. KLEE, J. E. & KÄSE, R. "Concise encyclopedia of medical and dental materials. Edited by David Williams, Pergamon Press, Oxford 1990, 412 pp., hardcover, £ 100, ISBN 0-08-036194-3". *Advanced Materials*, **5** (4): 310, 1993.
26. FESTAS, A. J.; RAMOS, A. & DAVIM, J. P. "Medical devices biomaterials – A review". *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part L: Journal of Materials: Design and Applications*, **234** (1): 218, 2019.
27. JEBAKUMAR, A. Z.; IDREES, M. & NONDO, H. S. "A Review on Application of Biomaterial in Medical Sciences". *Journal of Science Health Sciences*, **4** (6): 390, 2014.
28. LOPES, N. I. D. A.; SILVA, L. Á. D. O.; SANTOS, L. D. A. & BUONO, V. T. L. "Surface Characterization of NiTi Superelastic and Shape Memory Alloys After Electrolytic Polishing". *Materials Research*, **20**: 572, 2017.
29. NARUSHIMA, T.; UEDA, K. & ALFIRANO "Co-Cr Alloys as Effective Metallic Biomaterials". IN: *Advances in Metallic Biomaterials: Tissues, Materials and Biological Reactions*. NIINOMI, M.; NARUSHIMA, T. & NAKAI, M. (Eds.). Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2015. p. 157.

30. VARANKO, A.; SAHA, S. & CHILKOTI, A. "Recent trends in protein and peptide-based biomaterials for advanced drug delivery". *Advanced Drug Delivery Reviews*, **156**: 133, 2020.
31. HAN, X.; ALU, A.; LIU, H.; SHI, Y.; WEI, X.; CAI, L. & WEI, Y. "Biomaterial-assisted biotherapy: A brief review of biomaterials used in drug delivery, vaccine development, gene therapy, and stem cell therapy". *Bioactive Materials*, **17**: 29, 2022.
32. INSUASTI-CRUZ, E.; SUÁREZ-JARAMILLO, V.; MENA URRESTA, K. A.; PILA-VARELA, K. O.; FIALLOS-AYALA, X.; DAHOUMANE, S. A. & ALEXIS, F. "Natural Biomaterials from Biodiversity for Healthcare Applications". *Advanced Healthcare Materials*, **11** (1): 2101389, 2022.
33. HAGGERTY, A. E. & OUDEGA, M. "Biomaterials for spinal cord repair". *Neuroscience Bulletin*, **29** (4): 445, 2013.
34. MONDAL ROY, S. & SAHOO, S. "Controlled Drug Delivery: Polymeric Biomaterials for". IN: *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials*. (Eds.). 2016. p. 2135.
35. NAIR, L. S. & LAURENCIN, C. T. "Biodegradable polymers as biomaterials". *Progress in Polymer Science*, **32** (8): 762, 2007.
36. DOBLADO, L. R.; MARTÍNEZ-RAMOS, C. & PRADAS, M. M. "Biomaterials for Neural Tissue Engineering". *Frontiers in Nanotechnology*, **3** 2021.
37. KEANE, T. J. & BADYLAK, S. F. "Biomaterials for tissue engineering applications". *Seminars in Pediatric Surgery*, **23** (3): 112, 2014.
38. PLACE, E. S.; GEORGE, J. H.; WILLIAMS, C. K. & STEVENS, M. M. "Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering". *Chemical Society Reviews*, **38** (4): 1139, 2009.
39. DHANDAYUTHAPANI, B.; YOSHIDA, Y.; MAEKAWA, T. & KUMAR, D. S. "Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review". *International Journal of Polymer Science*, **2011** 2011.
40. O'BRIEN, F. J. "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering". *Materials Today*, **14** (3): 88, 2011.
41. LU, L.; PETER, S. J.; D. LYMAN, M.; LAI, H.-L.; LEITE, S. M.; TAMADA, J. A.; UYAMA, S.; VACANTI, J. P.; ROBERT, L. & MIKOS, A. G. "In vitro and in vivo degradation of porous poly(dl-lactic-co-glycolic acid) foams". *Biomaterials*, **21** (18): 1837, 2000.
42. STÖBER, W.; FINK, A. & BOHN, E. "Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range". *Journal of Colloid and Interface Science*, **26** (1): 62, 1968.
43. RAHMAN, I. A. & PADAVETTAN, V. "Synthesis of Silica Nanoparticles by Sol-Gel: Size-Dependent Properties, Surface Modification, and Applications in Silica-Polymer Nanocomposites—A Review". *Journal of Nanomaterials*, **2012**: 132424, 2012.
44. MANZANO, M. & VALLET-REGÍ, M. "Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery". *Advanced Functional Materials*, **30** (2): 1902634, 2020.
45. RAO, K. S.; EL-HAMI, K.; KODAKI, T.; MATSUSHIGE, K. & MAKINO, K. "A novel method for synthesis of silica nanoparticles". *Journal of Colloid and Interface Science*, **289** (1): 125, 2005.
46. HOM, C.; LU, J. & TAMANOI, F. "Silica nanoparticles as a delivery system for nucleic acid-based reagents". *Journal of materials chemistry*, **19** (35): 6308, 2009.

47. XU, C.; LEI, C. & YU, C. "Mesoporous Silica Nanoparticles for Protein Protection and Delivery". *Frontiers in Chemistry*, **7**: 290, 2019.
48. YOO, J.; HAN, S.; PARK, W.; LEE, T.; PARK, Y.; CHANG, H.; HAHN, S. K. & KWON, W. "Defect-Induced Fluorescence of Silica Nanoparticles for Bioimaging Applications". *ACS Applied Materials & Interfaces*, **10** (51): 44247, 2018.
49. KUMARI, B. & SINGH, D. P. "A review on multifaceted application of nanoparticles in the field of bioremediation of petroleum hydrocarbons". *Ecological Engineering*, **97**: 98, 2016.
50. SONG, H.; AHMAD NOR, Y.; YU, M.; YANG, Y.; ZHANG, J.; ZHANG, H.; XU, C.; MITTER, N. & YU, C. "Silica Nanoparticles Enhance Adhesion for Long-Term Bacterial Inhibition". *Journal of the American Chemical Society*, **138** (20): 6455, 2016.
51. PARK, I.-S.; CHOI, Y. J.; KIM, H.-S.; PARK, S.-H.; CHOI, B. H.; KIM, J.-H.; SONG, B. R. & MIN, B.-H. "Development of three-dimensional articular cartilage construct using silica nanopatterned substrate". *PLOS ONE*, **14** (5): e0208291, 2019.
52. KANG, H.; LEE, J.; O'KEEFE, T.; TUGA, B.; HOGAN JR, C. J. & HAYNES, C. L. "Effect of (3-aminopropyl)triethoxysilane on dissolution of silica nanoparticles synthesized via reverse micro emulsion". *Nanoscale*, **14** (25): 9021, 2022.
53. YOO, H. & PAK, J. "Synthesis of highly fluorescent silica nanoparticles in a reverse microemulsion through double-layered doping of organic fluorophores". *Journal of Nanoparticle Research*, **15** (5): 1609, 2013.
54. SHEKAR, S.; SANDER, M.; RIEHL, R. C.; SMITH, A. J.; BRAUMANN, A. & KRAFT, M. "Modelling the flame synthesis of silica nanoparticles from tetraethoxysilane". *Chemical Engineering Science*, **70**: 54, 2012.
55. BAILEY, J. K. & MECARTNEY, M. L. "Formation of colloidal silica particles from alkoxides". *Colloids and Surfaces*, **63** (1): 151, 1992.
56. LIN, C.-C. & METTERS, A. T. "Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling". *Advanced Drug Delivery Reviews*, **58** (12): 1379, 2006.
57. AHMED, E. M. "Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review". *Journal of Advanced Research*, **6** (2): 105, 2015.
58. ZHAN, Y.; FU, W.; XING, Y.; MA, X. & CHEN, C. "Advances in versatile anti-swelling polymer hydrogels". *Materials Science and Engineering: C*, **127**: 112208, 2021.
59. CHAI, Q.; JIAO, Y. & YU, X. "Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them". *Gels*, **3** (1): 6, 2017.
60. DAVIS, K. A. & ANSETH, K. "Controlled Release from Crosslinked Degradable Networks". *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, **19** (4-5): 385, 2002.
61. PUERTAS-BARTOLOMÉ, M.; MORA-BOZA, A. & GARCÍA-FERNÁNDEZ, L. "Emerging Biofabrication Techniques: A Review on Natural Polymers for Biomedical Applications". *Polymers*, 2021.
62. LEE, K. Y. & MOONEY, D. J. "Hydrogels for Tissue Engineering". *Chemical Reviews*, **101** (7): 1869, 2001.

63. JEN, A. C.; WAKE, M. C. & MIKOS, A. G. "Review: Hydrogels for cell immobilization". *Biotechnology and Bioengineering*, **50** (4): 357, 1996.
64. WANG, K. L.; BURBAN, J. H. & CUSSLER, E. L. "Hydrogels as separation agents". IN: *Responsive Gels: Volume Transitions II*. DUŠEK, K. (Eds.). Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 1993. p. 67.
65. BERNHARD, S. & TIBBITT, M. W. "Supramolecular engineering of hydrogels for drug delivery". *Advanced Drug Delivery Reviews*, **171**: 240, 2021.
66. KESHARWANI, P.; BISHT, A.; ALEXANDER, A.; DAVE, V. & SHARMA, S. "Biomedical applications of hydrogels in drug delivery system: An update". *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **66**: 102914, 2021.
67. DREISS, C. A. "Hydrogel design strategies for drug delivery". *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **48**: 1, 2020.
68. QIU, Y. & PARK, K. "Environment-sensitive hydrogels for drug delivery". *Advanced Drug Delivery Reviews*, **53** (3): 321, 2001.
69. JEONG, B. & GUTOWSKA, A. "Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications". *Trends in Biotechnology*, **20** (7): 305, 2002.
70. LIU, Z.; FARAJ, Y.; JU, X.-J.; WANG, W.; XIE, R. & CHU, L.-Y. "Nanocomposite smart hydrogels with improved responsiveness and mechanical properties: A mini review". *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, **56** (19): 1306, 2018.
71. GALAEV, I. Y. & MATTIASSON, B. "Smart polymers and what they could do in biotechnology and medicine". *Trends in Biotechnology*, **17** (8): 335, 1999.
72. HOFFMAN, A. S.; STAYTON, P. S.; BULMUS, V.; CHEN, G.; CHEN, J.; CHEUNG, C.; CHILKOTI, A.; DING, Z.; DONG, L.; FONG, R.; LACKEY, C. A.; LONG, C. J.; MIURA, M.; MORRIS, J. E.; MURTHY, N.; NABESHIMA, Y.; PARK, T. G.; PRESS, O. W.; SHIMOBOJI, T.; SHOEMAKER, S.; YANG, H. J.; MONJI, N.; NOWINSKI, R. C.; COLE, C. A.; PRIEST, J. H.; HARRIS, J. M.; NAKAMAE, K.; NISHINO, T. & MIYATA, T. "Really smart bioconjugates of smart polymers and receptor proteins". *Journal of Biomedical Materials Research*, **52** (4): 577, 2000.
73. HOFFMAN, A. S. "Stimuli-responsive polymers: Biomedical applications and challenges for clinical translation". *Advanced Drug Delivery Reviews*, **65** (1): 10, 2013.
74. SUHAIL, M.; SHAO, Y.-F.; VU, Q. L. & WU, P.-C. "Designing of pH-Sensitive Hydrogels for Colon Targeted Drug Delivery; Characterization and In Vitro Evaluation". *Gels*, 2022.
75. KLOUDA, L. & MIKOS, A. G. "Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **68** (1): 34, 2008.
76. PEPPAS, N. A. "Physiologically Responsive Hydrogels". *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, **6** (3): 241, 1991.
77. YU, Y.; CHENG, Y.; TONG, J.; ZHANG, L.; WEI, Y. & TIAN, M. "Recent advances in thermo-sensitive hydrogels for drug delivery". *Journal of Materials Chemistry B*, **9** (13): 2979, 2021.
78. KUCKLING, D.; ADLER, H.-J. P.; ARNDT, K.-F.; LING, L. & HABICHER, W. D. "Temperature and pH dependent solubility of novel poly(N-isopropylacrylamide)-copolymers". *Macromolecular Chemistry and Physics*, **201** (2): 273, 2000.

79. CHEN, G. & HOFFMAN, A. S. "A new temperature- and pH-responsive copolymer for possible use in protein conjugation". *Macromolecular Chemistry and Physics*, **196** (4): 1251, 1995.
80. SCHILD, H. G. "Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application". *Progress in Polymer Science*, **17** (2): 163, 1992.
81. ZHANG, J.-T.; BHAT, R. & JANDT, K. D. "Temperature-sensitive PVA/PNIPAAm semi-IPN hydrogels with enhanced responsive properties". *Acta Biomaterialia*, **5** (1): 488, 2009.
82. CORTEZ-LEMUS, N. A. & LICEA-CLAVERIE, A. "Poly(N-vinylcaprolactam), a comprehensive review on a thermoresponsive polymer becoming popular". *Progress in Polymer Science*, **53**: 1, 2016.
83. LIANG, X.; KOZLOVSKAYA, V.; CHEN, Y.; ZAVGORODNYA, O. & KHARLAMPIEVA, E. "Thermosensitive Multilayer Hydrogels of Poly(N-vinylcaprolactam) as Nanothin Films and Shaped Capsules". *Chemistry of Materials*, **24** (19): 3707, 2012.
84. SOLOMON, O. F.; CORCIOVEI, M.; CIUTĂ, I. & BOGHINĂ, C. "Properties of solutions of poly-N-vinylcaprolactam". *Journal of Applied Polymer Science*, **12** (8): 1835, 1968.
85. LOZINSKY, V. I.; SIMENEL, I. A.; KURSKAYA, E. A.; KULAKOVA, V. K.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B.; GRINBERG, V. Y.; GRINBERG, N. V. & KHOKHLOV, A. R. "Synthesis of N-vinylcaprolactam polymers in water-containing media". *Polymer*, **41** (17): 6507, 2000.
86. LAUKKANEN, A.; VALTOLA, L.; WINNIK, F. M. & TENHU, H. "Formation of Colloidally Stable Phase Separated Poly(N-vinylcaprolactam) in Water: A Study by Dynamic Light Scattering, Microcalorimetry, and Pressure Perturbation Calorimetry". *Macromolecules*, **37** (6): 2268, 2004.
87. MEDEIROS, S. F.; BARBOZA, J. C. S.; RÉ, M. I.; GIUDICI, R. & SANTOS, A. M. "Solution polymerization of N-vinylcaprolactam in 1,4-dioxane. Kinetic dependence on temperature, monomer, and initiator concentrations". *Journal of Applied Polymer Science*, **118** (1): 229, 2010.
88. ZHANG, L.; LIANG, Y. & MENG, L. "Thermo-sensitive amphiphilic poly(N-vinylcaprolactam) copolymers: synthesis and solution properties". *Polymers for Advanced Technologies*, **21** (10): 720, 2010.
89. KALUGIN, D. I.; TALYZENKOV, Y. A. & LACHINOV, M. B. "Radical polymerization of N-vinylcaprolactam in benzene solutions in a wide conversion range". *Polymer Science Series B*, **50** (11): 299, 2008.
90. TAGER, A. A.; SAFRONOV, A. P.; SHARINA, S. V. & GALAYEV, I. Y. "Thermodynamics of aqueous solutions of polyvinylcaprolactam". *Polymer Science U.S.S.R.*, **32** (3): 469, 1990.
91. MEEUSSEN, F.; NIES, E.; BERGHMANS, H.; VERBRUGGHE, S.; GOETHALS, E. & DU PREZ, F. "Phase behaviour of poly(N-vinyl caprolactam) in water". *Polymer*, **41** (24): 8597, 2000.
92. WEISER, J. R. & SALTZMAN, W. M. "Controlled release for local delivery of drugs: barriers and models". *Journal of Controlled Release*, **190**: 664, 2014.
93. DU, L.; YANG, S.; LI, W.; LI, H.; FENG, S.; ZENG, R.; YU, B.; XIAO, L.; NIE, H.-Y. & TU, M. "Scaffold composed of porous vancomycin-loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres: A

controlled-release drug delivery system with shape-memory effect". *Materials Science and Engineering: C*, **78**: 1172, 2017.

94. SUNG, Y. K. & KIM, S. W. "Recent advances in polymeric drug delivery systems". *Biomaterials Research*, **24** (1): 12, 2020.

95. RAMADON, D.; MCCRUDDEN, M. T. C.; COURTENAY, A. J. & DONNELLY, R. F. "Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications". *Drug Delivery and Translational Research*, **12** (4): 758, 2022.

96. ADEPU, S. & RAMAKRISHNA, S. "Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions". *Molecules*, 2021.

97. PANDEY, S. P.; SHUKLA, T.; DHOTE, V. K.; K. MISHRA, D.; MAHESHWARI, R. & TEKADE, R. K. "Chapter 4 - Use of Polymers in Controlled Release of Active Agents". IN: *Basic Fundamentals of Drug Delivery*. TEKADE, R.K. (Eds.). Academic Press, 2019. p. 113.

98. MU, W.; CHU, Q.; LIU, Y. & ZHANG, N. "A Review on Nano-Based Drug Delivery System for Cancer Chemoimmunotherapy". *Nano-Micro Letters*, **12** (1): 142, 2020.

99. MITRAGOTRI, S.; BURKE, P. A. & LANGER, R. "Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies". *Nature Reviews Drug Discovery*, **13** (9): 655, 2014.

100. SHIT, S. C. & SHAH, P. M. J. J. O. P. "Edible polymers: challenges and opportunities". **2014** 2014.

101. HUH, Y.; CHO, H.-J.; YOON, I.-S.; CHOI, M.-K.; KIM, J. S.; OH, E.; CHUNG, S.-J.; SHIM, C.-K. & KIM, D.-D. "Preparation and evaluation of spray-dried hyaluronic acid microspheres for intranasal delivery of fexofenadine hydrochloride". *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **40** (1): 9, 2010.

102. PARK, K. "Controlled drug delivery systems: Past forward and future back". *Journal of Controlled Release*, **190**: 3, 2014.

103. TEKADE, R. K. & CHOUGULE, M. B. J. B. R. I. "Formulation development and evaluation of hybrid nanocarrier for cancer therapy: Taguchi orthogonal array based design". **2013** 2013.

104. LAFFLEUR, F. & KECKEIS, V. "Advances in drug delivery systems: Work in progress still needed?". *International Journal of Pharmaceutics*, **590**: 119912, 2020.

105. LIU, J.; LI, S.; WANG, J.; LI, N.; ZHOU, J. & CHEN, H. "Application of Nano Drug Delivery System (NDDS) in Cancer Therapy: A Perspective". *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, **18** (2): 125, 2023.

106. MORADI KASHKOOLI, F.; SOLTANI, M. & SOURI, M. "Controlled anti-cancer drug release through advanced nano-drug delivery systems: Static and dynamic targeting strategies". *Journal of Controlled Release*, **327**: 316, 2020.

107. ALLEN, T. M. & CULLIS, P. R. "Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications". *Advanced Drug Delivery Reviews*, **65** (1): 36, 2013.

108. CHUDE-OKONKWO, U. A.; MALEKIAN, R. & MAHARAJ, B. T. J. E. J. O. A. I. S. P. "Diffusion-controlled interface kinetics-inclusive system-theoretic propagation models for molecular communication systems". **2015** (1): 1, 2015.
109. PEPPAS, N. A. & NARASIMHAN, B. "Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems". *Journal of Controlled Release*, **190**: 75, 2014.
110. KAMALY, N.; YAMEEN, B.; WU, J. & FAROKHZAD, O. C. "Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release". *Chemical Reviews*, **116** (4): 2602, 2016.
111. ARANTES, T. M.; PINTO, A. H.; LEITE, E. R.; LONGO, E. & CAMARGO, E. R. "Synthesis and optimization of colloidal silica nanoparticles and their functionalization with methacrylic acid". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **415**: 209, 2012.
112. RIBEIRO, L. S.; SALA, R. L.; DE JESUS, L. A. O.; CRUZ, S. A. & CAMARGO, E. R. "Analyzing the Effects of Silica Nanospheres on the Sol–Gel Transition Profile of Thermosensitive Hydrogels". *Langmuir*, **37** (24): 7373, 2021.
113. SALA, R. L.; GONÇALVES, R. H.; CAMARGO, E. R. & LEITE, E. R. "Thermosensitive poly(N-vinylcaprolactam) as a transmission light regulator in smart windows". *Solar Energy Materials and Solar Cells*, **186**: 266, 2018.
114. SALA, R. L.; VENÂNCIO, T. & CAMARGO, E. R. "Probing the Structural Dynamics of the Coil–Globule Transition of Thermosensitive Nanocomposite Hydrogels". *Langmuir*, **37** (4): 1531, 2021.
115. SALA, R. L.; KWON, M. Y.; KIM, M.; GULLBRAND, S. E.; HENNING, E. A.; MAUCK, R. L.; CAMARGO, E. R. & BURDICK, J. A. "Thermosensitive Poly(N-vinylcaprolactam) Injectable Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering". *Tissue Engineering Part A*, **23** (17-18): 935, 2017.
116. LI, H.; LIU, K.; WILLIAMS, G. R.; WU, J.; WU, J.; WANG, H.; NIU, S. & ZHU, L.-M. "Dual temperature and pH responsive nanofiber formulations prepared by electrospinning". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **171**: 142, 2018.
117. PEREIRA, D. R.; CANADAS, R. F.; SILVA-CORREIA, J.; DA SILVA MORAIS, A.; OLIVEIRA, M. B.; DIAS, I. R.; MANO, J. F.; MARQUES, A. P.; REIS, R. L. & OLIVEIRA, J. M. "Injectable gellan-gum/hydroxyapatite-based bilayered hydrogel composites for osteochondral tissue regeneration". *Applied Materials Today*, **12**: 309, 2018.
118. ZENG, D.; ZHANG, H.; WANG, B.; SANG, K. & YANG, J. "Effect of Ammonia Concentration on Silica Spheres Morphology and Solution Hydroxyl Concentration in Stober Process". *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **15** (9): 7407, 2015.
119. WU, Z.; CHEN, R.; GAN, Q.; LI, J.; ZHANG, T. & YE, M. "Mesoporous Na+SiO₂ spheres for efficient removal of Cr³⁺ from aqueous solution". *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **6** (2): 1774, 2018.
120. SALA, R. L.; OLIVEIRA XAVIER, T. P.; VENÂNCIO, T.; ARANTES, T. M.; PARANHOS, C. M. & CAMARGO, E. R. "Dynamic and structural correlations in nanocomposites of silica with modified surface and carboxylated nitrile rubber". *Journal of Colloid and Interface Science*, **466**: 247, 2016.

121. BORSACCHI, S.; GEPPI, M.; VERACINI, C. A.; FALLANI, F.; RICCI, L. & RUGGERI, G. "Improving compatibility in LDPE–silica dispersions by photo-grafting reaction. Preparation and solid state NMR investigation". *Journal of Materials Chemistry*, **16** (47): 4581, 2006.
122. BHATTACHARJEE, S. "DLS and zeta potential – What they are and what they are not?". *Journal of Controlled Release*, **235**: 337, 2016.
123. MILY, E.; GONZÁLEZ, A.; IRUIN, J. J.; IRUSTA, L. & FERNÁNDEZ-BERRIDI, M. J. "Silica nanoparticles obtained by microwave assisted sol–gel process: multivariate analysis of the size and conversion dependence". *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, **53** (3): 667, 2010.
124. SHAHBAZI, M.; BAHARI, A. & GHASEMI, S. "Studying saturation mobility, threshold voltage, and stability of PMMA-SiO₂-TMSPM nano-hybrid as OFET gate dielectric". *Synthetic Metals*, **221**: 332, 2016.
125. BRACHO, D.; DOUGNAC, V. N.; PALZA, H.; QUIJADA, R. & #XFA "Functionalization of Silica Nanoparticles for Polypropylene Nanocomposite Applications %J *Journal of Nanomaterials*". **2012**: 8, 2012.
126. KOZANOĞLU, S.; ÖZDEMİR, T. & USANMAZ, A. "Polymerization of N-Vinylcaprolactam and Characterization of Poly(N-Vinylcaprolactam)". *Journal of Macromolecular Science, Part A*, **48** (6): 467, 2011.
127. KUMAR, A.; DEEPAK; SHARMA, S.; AFGAN, S.; KUMAR, R.; KESHARI, A. K. & SRIVASTAVA, R. "Development of graft copolymer of carboxymethylcellulose and N-vinylcaprolactam towards strong antioxidant and antibacterial polymeric materials". *International Journal of Biological Macromolecules*, **112**: 780, 2018.
128. HALLIGAN, S. C.; DALTON, M. B.; MURRAY, K. A.; DONG, Y.; WANG, W.; LYONS, J. G. & GEEVER, L. M. "Synthesis, characterisation and phase transition behaviour of temperature-responsive physically crosslinked poly (N-vinylcaprolactam) based polymers for biomedical applications". *Materials Science and Engineering: C*, **79**: 130, 2017.
129. REJINOLD, N. S.; CHENNAZHI, K. P.; NAIR, S. V.; TAMURA, H. & JAYAKUMAR, R. "Biodegradable and thermo-sensitive chitosan-g-poly(N-vinylcaprolactam) nanoparticles as a 5-fluorouracil carrier". *Carbohydrate Polymers*, **83** (2): 776, 2011.
130. FITARONI, L. B.; DE LIMA, J. A.; CRUZ, S. A. & WALDMAN, W. R. "Effect of compatibilizer and Irganox MD 1024 on the thermo-oxidative stability of PP/PP-g-MA/OMMT nanocomposites". *Polymer Testing*, **53**: 165, 2016.
131. LOOS, W.; VERBRUGGHE, S.; GOETHALS, E. J.; DU PREZ, F. E.; BAKEEVA, I. V. & ZUBOV, V. P. "Thermo-Responsive Organic/Inorganic Hybrid Hydrogels based on Poly(N-vinylcaprolactam)". *Macromolecular Chemistry and Physics*, **204** (1): 98, 2003.
132. LIN, C.-L.; CHIU, W.-Y. & LEE, C.-F. "Preparation, morphology, and thermoresponsive properties of poly(N-isopropylacrylamide)-based copolymer microgels". *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **44** (1): 356, 2006.
133. SHIBAYAMA, M.; MIZUTANI, S.-Y. & NOMURA, S. "Thermal Properties of Copolymer Gels Containing N-Isopropylacrylamide". *Macromolecules*, **29** (6): 2019, 1996.

134. KRATZ, K.; HELLWEG, T. & EIMER, W. "Influence of charge density on the swelling of colloidal poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) microgels". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **170** (2): 137, 2000.
135. JANARDHANANPILLAI KIZHAKKEDATHU, A. K.; NAZEERUNNISA, M. & BEHERE, D. V. "Thermal Unfolding of Soybean Peroxidase: APPROPRIATE HIGH DENATURANT CONCENTRATIONS INDUCE COOPERATIVITY ALLOWING THE CORRECT MEASUREMENT OF THERMODYNAMIC PARAMETERS". *Journal of Biological Chemistry*, **277** (43): 40717, 2002.
136. PACE, C. N. & HERMANS, J. "The Stability of Globular Protein". *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, **3** (1): 1, 1975.
137. ALF, M. E.; HATTON, T. A. & GLEASON, K. K. "Insights into Thin, Thermally Responsive Polymer Layers Through Quartz Crystal Microbalance with Dissipation". *Langmuir*, **27** (17): 10691, 2011.
138. FUCIÑOS, C.; FUCIÑOS, P.; MÍGUEZ, M.; KATIME, I.; PASTRANA, L. M. & RÚA, M. L. "Temperature- and pH-Sensitive Nanohydrogels of Poly(N-Isopropylacrylamide) for Food Packaging Applications: Modelling the Swelling-Collapse Behaviour". *PLOS ONE*, **9** (2): e87190, 2014.
139. ZUIDEMA, J. M.; RIVET, C. J.; GILBERT, R. J. & MORRISON, F. A. "A protocol for rheological characterization of hydrogels for tissue engineering strategies". *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **102** (5): 1063, 2014.
140. RIBEIRO, L. S.; SALA, R. L.; ROBELDO, T. A.; BORRA, R. C. & CAMARGO, E. R. "Injectable Thermosensitive Nanocomposites Based on Poly(N-vinylcaprolactam) and Silica Particles for Localized Release of Hydrophilic and Hydrophobic Drugs". *Langmuir*, **39** (6): 2380, 2023.
141. VERONESE, F. M.; MAMMUCARI, C.; CALICETI, P.; SCHIAVON, O. & LORA, S. "Influence of PEGylation on the Release of Low and High Molecular-Weight Proteins from PVA Matrices". *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, **14** (4): 315, 1999.
142. FROKJAER, S. & OTZEN, D. E. "Protein drug stability: a formulation challenge". *Nature Reviews Drug Discovery*, **4** (4): 298, 2005.
143. ZHAO, N.; WOODLE, M. C. & MIXSON, A. J. "Advances in delivery systems for doxorubicin". *J Nanomed Nanotechnol*, **9** (5): 519, 2018.
144. YAGHOUBI, A. & RAMAZANI, A. "Anticancer DOX delivery system based on CNTs: Functionalization, targeting and novel technologies". *Journal of Controlled Release*, **327**: 198, 2020.
145. HARIHARAN, A. & TRAN, S. D. "Localized Drug Delivery Systems: An Update on Treatment Options for Head and Neck Squamous Cell Carcinomas". *Pharmaceutics*, 2023.
146. TANNOCK, I. F. & ROTIN, D. "Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation". *Cancer Research*, **49** (16): 4373, 1989.
147. ZHANG, W.; JIN, X.; LI, H.; ZHANG, R.-R. & WU, C.-W. "Injectable and body temperature sensitive hydrogels based on chitosan and hyaluronic acid for pH sensitive drug release". *Carbohydrate Polymers*, **186**: 82, 2018.

148. ZHANG, Z.; NI, J.; CHEN, L.; YU, L.; XU, J. & DING, J. "Biodegradable and thermoreversible PCLA–PEG–PCLA hydrogel as a barrier for prevention of post-operative adhesion". *Biomaterials*, **32** (21): 4725, 2011.
149. - BMRB entry bmse000394 - p. Disponível em: <https://bmr.io/metabolomics/mol_summary/show_data.php?id=bmse000394>, acessado em 28/01/2022.
150. SCHNEIDER, B.; DOSKOČILOVÁ, D.; SCHMIDT, P.; ŠTOKR, J. & ČEFELÍN, P. "Conformational structure of ϵ -caprolactam and its methyl derivatives". *Journal of Molecular Structure*, **35** (2): 161, 1976.
151. SHTANKO, N. I.; LEQUIEU, W.; GOETHALS, E. J. & DU PREZ, F. E. "pH- and thermo-responsive properties of poly(N-vinylcaprolactam-co-acrylic acid) copolymers". *Polymer International*, **52** (10): 1605, 2003.
152. LANGER, R. & PEPPAS, N. "Chemical and Physical Structure of Polymers as Carriers for Controlled Release of Bioactive Agents: A Review". *Journal of Macromolecular Science, Part C*, **23** (1): 61, 2006.
153. SIEPMANN, J. & PEPPAS, N. A. "Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)". *Advanced Drug Delivery Reviews*, **64**: 163, 2012.
154. KHAN, S.; BATCHELOR, H.; HANSON, P.; SALEEM, I. Y.; PERRIE, Y. & MOHAMMED, A. R. "Dissolution rate enhancement, in vitro evaluation and investigation of drug release kinetics of chloramphenicol and sulphamethoxazole solid dispersions". *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **39** (5): 704, 2013.
155. PEPPAS, N. A. "Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers". *Pharm Acta Helv*, **60** (4): 110, 1985.
156. HSU, M. N.; LUO, R.; KWEK, K. Z.; POR, Y. C.; ZHANG, Y. & CHEN, C.-H. "Sustained release of hydrophobic drugs by the microfluidic assembly of multistage microgel/poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticle composites". *Biomicrofluidics*, **9** (5): 052601, 2015.
157. HYWEL, D. W.; NATALIE, L. T.; SUSAN, A. C.; RAVI, M. S.; WILLIAM, N. C.; COLIN, W. P. & CHRISTOPHER, J. H. P. "Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development". *Pharmacological Reviews*, **65** (1): 315, 2013.
158. SALEHI, B.; FOKOU, P. V.; SHARIFI-RAD, M.; ZUCCA, P.; PEZZANI, R.; MARTINS, N. & SHARIFI-RAD, J. "The Therapeutic Potential of Naringenin: A Review of Clinical Trials". *Pharmaceuticals*, 2019.
159. GATTUSO, G.; BARRECA, D.; GARGIULLI, C.; LEUZZI, U. & CARISTI, C. "Flavonoid Composition of Citrus Juices". *Molecules*, 2007.
160. SAUD, B.; MALLA, R. & SHRESTHA, K. "A Review on the Effect of Plant Extract on Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation". *Stem Cells International*, **2019**: 7513404, 2019.
161. CHEN, R.; QI, Q.-L.; WANG, M.-T. & LI, Q.-Y. "Therapeutic potential of naringin: an overview". *Pharmaceutical Biology*, **54** (12): 3203, 2016.

162. CHANG, P.-C.; CHAO, Y.-C.; HSIAO, M.-H.; CHOU, H.-S.; JHENG, Y.-H.; YU, X.-H.; LEE, N.; YANG, C. & LIU, D.-M. "Inhibition of Periodontitis Induction Using a Stimuli-Responsive Hydrogel Carrying Naringin". *Journal of Periodontology*, **88** (2): 190, 2017.
163. LANKS, K. W. & LEHMAN, J. M. "DNA Synthesis by L929 Cells following Doxorubicin Exposure¹". *Cancer research*, **50** (15): 4776, 1990.
164. MORISHIGE, T.; YOSHIOKA, Y.; INAKURA, H.; TANABE, A.; YAO, X.; TSUNODA, S.; TSUTSUMI, Y.; MUKAI, Y.; OKADA, N. & NAKAGAWA, S. "Cytotoxicity of amorphous silica particles against macrophage-like THP-1 cells depends on particle-size and surface properties". *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, **65** (8): 596, 2010.
165. BAUER, A. T.; STROZYK, E. A.; GORZELANNY, C.; WESTERHAUSEN, C.; DESCH, A.; SCHNEIDER, M. F. & SCHNEIDER, S. W. "Cytotoxicity of silica nanoparticles through exocytosis of von Willebrand factor and necrotic cell death in primary human endothelial cells". *Biomaterials*, **32** (33): 8385, 2011.
166. SAHATSAPAN, N.; ROJANARATA, T.; NGAWHIRUNPAT, T.; OPANASOPIT, P. & PATROJANASOPHON, P. "Doxorubicin-loaded chitosan-alginate nanoparticles with dual mucoadhesive functionalities for intravesical chemotherapy". *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **63**: 102481, 2021.
167. KAWANO, H.; KOMABA, S.; YAMASAKI, T.; MAEDA, M.; KIMURA, Y.; MAEDA, A. & KANEDA, Y. "New potential therapy for orthotopic bladder carcinoma by combining HVJ envelope with doxorubicin". *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **61** (6): 973, 2008.
168. JIN, X.; ZHANG, P.; LUO, L.; CHENG, H.; LI, Y.; DU, T.; ZOU, B. & GOU, M. "Efficient intravesical therapy of bladder cancer with cationic doxorubicin nanoassemblies". *Int J Nanomedicine*, **11**: 4535, 2016.



pubs.acs.org/Langmuir

Article

Injectable Thermosensitive Nanocomposites Based on Poly(*N*-vinylcaprolactam) and Silica Particles for Localized Release of Hydrophilic and Hydrophobic Drugs

Lucas S. Ribeiro, Renata L. Sala,* Thaiane A. Robeldo, Ricardo C. Borra, and Emerson R. Camargo*



Cite This: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c03160>



Read Online

ACCESS |

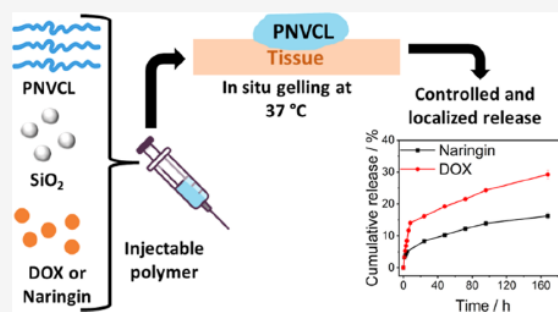
Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: The systemic delivery of drugs employed by conventional methods has shown to be less effective than a localized delivery system. Many drugs have the effectiveness reduced by fast clearance, increasing the amount required for an efficient treatment. One way to overcome this drawback is through the use of thermoresponsive polymers that undergo a sol–gel transition at physiological temperature, allowing their injection directly in the desired site. In this work, thermosensitive nanocomposites based on poly(*N*-vinylcaprolactam) and silica particles with 80 and 330 nm were synthesized to be employed as delivery systems for hydrophobic (naringin) and hydrophilic (doxorubicin hydrochloride) drugs. The insertion of SiO₂ increased the rheological properties of the nanocomposite at 37

°C, which helps to prevent its diffusion away from the site of injection. The synthesized materials were also able to control the drug release for a period of 7 days under physiological conditions. Due to its higher hydrophobicity and better interaction with the PNVC matrix, naringin presented a more controlled release. The Korsmeyer–Peppas model indicated different release mechanisms for each drug. At last, a preliminary *in vitro* study of DOX-loaded nanocomposites cultured with L929 and MB49 cells showed negligible toxic effects on healthy cells and better efficient inhibition of carcinoma cells.



Analyzing the Effects of Silica Nanospheres on the Sol–Gel Transition Profile of Thermosensitive Hydrogels

Lucas S. Ribeiro,* Renata L. Sala, Leticia A. O. de Jesus, Sandra A. Cruz, and Emerson R. Camargo*



Cite This: *Langmuir* 2021, 37, 7373–7379



Read Online

ACCESS |



Metrics & More



Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: The insertion of nanoparticles into smart hydrogels can diversify their functionalities by a synergistic combination of the components properties within the hydrogels. While these hybrid systems are attractive to the biomaterials field, careful design and control of their properties are required since the new interactions between the polymer and the nanoparticles can result in changes or the loss of hydrogels stimuli response. In order to understand the physicochemical aspects of the thermoresponsive systems, nanocomposites of poly(*N*-vinylcaprolactam) (PNVCL) and silica nanoparticles with different sizes and concentrations were synthesized. The UV–vis and DLS techniques showed that the PNVCL has a sharp phase transition at 34 °C, while the nanocomposites have a diffuse transition. The nanocomposites showed an initial coil–globule transition before the phase transition takes place. This was identified by the evolution of the hydrodynamic diameter of the nanocomposite globules before the cloud point temperature (T_{cp}), which remained constant for PNVCL. This new transition profile can be described by two stages in which microscopic volume transitions occur first, followed by the macroscopic transition that forms the hydrogel. These results show that the proposed nanocomposites can be designed to have tunable stimuli response to smaller temperature variations with the formation of intermediate globule states.

