

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

**“Formulação e Estudo da Citocompatibilidade de Hidrogéis
Termossensíveis contendo Partículas Bioativas para aplicação em
Regeneração Óssea”**

Sara Novak*

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

Orientador: Emerson Rodrigues de Camargo

*** Bolsista CAPES**

**São Carlos - SP
2022**



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 da candidata Sara Novak, realizada em 29/07/2022.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo (UFSCar)

Profa. Dra. Cristiane Vila (BSI Technical)

Profa. Dra. Gizilene Maria de Carvalho (UEL)

Profa. Dra. Thaiane Alcarde Robeldo (Katléia)

Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

A seed knows how to wait. Most seeds wait for at least a year before starting to grow; a cherry seed can wait for a hundred years with no problem.

– Hope Jahren

Em dedicação aos meus pais,
Roselei e Wilson

Ao meu namorado Fábio Plotegher por todo o amor;

Aos meus amigos Alice e Felipe, Andressa Trentin, Diovanina e Dyrney, Israel Rosalino, Jhony Silva, Josiane Carneiro, Kaline Nascimento, Marcela Piassi, Maria Laurinda, Michelle Fonseca, Raquel Machado, Rodrigo Schneider, e Sonia e Matteo, por se fazerem presentes nos momentos difíceis;

A todos os meus colegas de laboratório no Brasil e no exterior pela parceria diária;

A todos os Professores do Departamento de Química da UFSCar, em especial ao Joaquim Nobrega e Romeu Rocha Filho pelos excelentes cursos de Escrita Científica e Ética na Pesquisa, ao José Mario e Manoel Petrucelli pelos cursos de Cinética Química e Quântica, à Lucia Mascaro pelas conversas enriquecedoras;

Aos Professores Dulce Helena, Fillipe Vieira e Gizilene Maria, e às pesquisadoras Cristiane Vila, Tassia Joi e Thaianne Robeldo pela disponibilidade em participar da avaliação final deste trabalho;

Minha gratidão a todos.

Agradecimentos

Ao Prof. Emerson Rodrigues de Camargo pela oportunidade e orientação.

Ao Prof. Aldo R. Boccaccini pela oportunidade e co-orientação no exterior.

À Profa Sandra A. Cruz pelas discussões enriquecedoras e pelas análises de Reologia.

Ao Prof. Marcelo Nalin e à Pesquisadora Juliane Orives pela paciência e discussões enriquecedoras.

Ao Prof. Tiago Venâncio pelas discussões enriquecedoras e pelas análises de RMN.

Ao Prof. Edenir Pereira e à Dra. Lucimar pelas análises de ICP OES.

Ao Prof. Cauê Ribeiro e equipe técnica da Embrapa Instrumentação pelas análises de Potencial Zeta, DLS, Fisissorção de N₂ e TGA.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Química e da UFSCar.

Ao Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ-UFSCar) e equipe.

À CAPES, ao PPGQ e aos Professores André Farias e Marcio Paixão, coordenador e vice coordenador do PPGQ pelo deferimento do pedido de extensão dos prazos de defesa e de bolsa que foram essenciais para a finalização deste trabalho em função Pandemia da Covid19.

Às agências de fomento envolvidas neste trabalho:

O presente trabalho foi realizado com o Apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao CNPq. Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) – Processo 309711/2019-3.

À FAPESP. Processo nº 2013/07296-2, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Ao Serviço Alemão de Intercâmbio Acadêmico (DAAD) (Co-financed Short-Term Research Grant 57552395).

Lista de Tabelas

TABELA 1.1 - Principais hidrogéis termossensíveis estudados em engenharia de tecidos 45–47.....	12
TABELA 5.1 – Principais eventos térmicos identificados nas análises de TGA-DTA do material tal como sintetizado pelo método sol-gel (Gel seco).....	34
TABELA 5.2 – Composição química por análise de XRF dos materiais em pó preparados por diferentes rotas de síntese: fusão (nBG) e sol-gel (nBGC).....	37
TABELA 5.3 – Área de superfície empregando a equação BET e potencial zeta dos materiais em pó preparados por diferentes rotas de síntese: fusão (nBG) e sol-gel (nBGC).	38
TABELA 5.4 – Concentração em ppm (mg L^{-1}) de cálcio, fósforo e sódio determinados por ICP OES para soluções de SBF expostas aos materiais em pó preparados por diferentes rotas de síntese: fusão (nBG), e sol-gel (nBGC).....	44
TABELA 5.5 – Respectiva composição das amostras avaliadas nos ensaios de citotoxicidade utilizando células de osteosarcoma humano MG-63.	72
TABELA 5.6 – Valores de pH medidos para os extratos do meio de cultura expostos a diferentes partículas nas concentrações $10\text{-}30 \text{ mg mL}^{-1}$ a 37°C por 1 e 3 dias ($n = 3$).....	81
TABELA 5.7 - Valores de pH medidos para os extratos do meio de cultura expostos aos hidrogéis de PNVCL (20% m/v) preparados com diferentes quantidades de partículas de 5-15% m/m (em relação a massa de PNVCL, correspondendo a $10\text{-}30 \text{ mg mL}^{-1}$ no sistema, respectivamente) a 37°C por 1 e 3 dias ($n = 3$).....	85

Lista de Figuras

- FIGURA 1.1 - Representação esquemática do intervalo de valores de elasticidade (em kPa) de alguns tecidos no corpo humano. Fonte: adaptado referência ³. 2
- FIGURA 1.2 - Esquema ilustrativo das etapas de formação de hidroxicarbonatoapatita (HCA) e a regeneração tecidual a partir de um vidro ou vitrocerâmica bioativa. Fonte: próprio autor..... 5
- FIGURA 1.3 - Representação esquemática das classes mais comuns de hidrogéis. Fonte: adaptado referência ⁴⁵ 10
- FIGURA 1.4 - Estrutura química: (A) monômero N-vinilcaprolactama (NVCL), (B) polímero poli(N-vinilcaprolactama) (PNVCL). Fonte: próprio autor..... 13
- FIGURA 1.5 - Representação desenvolvida por SALA et al. ⁵⁴ demonstrando a dispersão polimérica aquosa do PNVCL em temperatura ambiente (transparente e solúvel) e quando aquecida acima da LCST, adquirindo uma coloração opaca devido a separação de fase e formação de agregados poliméricos. 14
- FIGURA 4.1 - Representação esquemática das etapas de síntese do material vítreo preparado pelo método de fusão. 20
- FIGURA 4.2 – Representação esquemática das etapas de síntese do material vítreo preparado pelo método sol-gel em meio ácido. 20
- FIGURA 4.3 – Etapas do mecanismo proposto para a polimerização via radical livre de N-vinilcaprolactama utilizando o iniciador AIBN. Fonte: adaptado referência ⁵¹. 22
- FIGURA 5.1 – Difrátogramas do material tal como sintetizado pelo método sol-gel (Gel seco) e submetido a diferentes temperaturas por 3 h. 33
- FIGURA 5.2 – Análise térmica diferencial (TGA-DTA) do material tal como sintetizado (Gel seco) preparado pelo método sol-gel. 33
- FIGURA 5.3 – Difrátogramas dos materiais em pó preparados por diferentes rotas de síntese: fusão (nBG) e sol-gel (nBGC). 35
- FIGURA 5.4 – Espectros de IR dos materiais em pó preparados por diferentes rotas de síntese: fusão (nBG) e sol-gel (nBGC). 36
- FIGURA 5.5 – Micrografias de MEV e distribuição do tamanho de partículas dos materiais em pó preparados por diferentes rotas de síntese: fusão (nBG, micrografia A) e sol-gel (nBGC, micrografia B). 39

- FIGURA 5.6 – Micrografias de MEV dos materiais em pó (corpos de prova) preparados por diferentes rotas de síntese e expostos a solução de SBF por 5 dias a 37 °C: fusão (nBG, micrografias A-C) e sol-gel (nBGC, micrografias D-F).. 41
- FIGURA 5.7 – Espectros de IR dos materiais em pó (corpos de prova) preparados por diferentes rotas de síntese e expostos a solução de SBF por 0, 1 e 5 dias a 37 °C: fusão (nBG), e sol-gel (nBGC)..... 42
- FIGURA 5.8 – Valores de pH das soluções de SBF expostas aos corpos de prova dos materiais em pó preparados por diferentes rotas de síntese: fusão (nBG) e sol-gel (nBGC). 44
- FIGURA 5.9 – Diferentes concentrações de cálcio (a), fósforo (b) e sódio (c) foram determinadas por ICP OES para soluções de SBF expostas aos materiais em pós preparados por diferentes rotas de síntese: fusão (nBG), e sol-gel (nBGC). 45
- FIGURA 5.10 – Densidade óptica após 24 h para cultura de *S. aureus* inoculada em de meio de cultivo LB previamente exposto por 24 h a diferentes concentrações dos materiais em pó preparados por diferentes rotas de síntese: fusão (nBG), e sol-gel (nBGC). * Indica significância estatística ($p < 0,05$) com relação ao controle, e # significância ($p < 0,01$) entre diferentes concentrações. 46
- FIGURA 5.11 – Curva de DSC para o PNVCL sintetizado utilizando DMSO como solvente..... 50
- FIGURA 5.12 – Curva de DSC do PNVCL sintetizado utilizando etanol como solvente..... 51
- FIGURA 5.13 – Curva de DSC do PNVCL sintetizado utilizando acetato de etila como solvente..... 51
- FIGURA 5.14 – Espectro de transmitância no UV-Vis (A), e intensidade da transmitância (em %) medida a 500 nm em função da temperatura (B), para a solução polimérica a 1% (m/v) do PNVCL sintetizado utilizando DMSO como solvente..... 53
- FIGURA 5.15 – Espectro de transmitância no UV-Vis (A) e intensidade da transmitância (em %) medida a 500 nm em função da temperatura (B), para a solução polimérica a 1% (m/v) do PNVCL sintetizado utilizando acetato de etila como solvente..... 54
- FIGURA 5.16 - Espectro de transmitância no UV-Vis (A) e intensidade da transmitância (em %) medida a 500 nm em função da temperatura (B), para a

solução polimérica a 1% (<i>m/v</i>) do PNVCL sintetizado utilizando etanol como solvente.....	55
FIGURA 5.17 – Distribuição de diâmetro hidrodinâmico a 25 °C para soluções a 1% (<i>m/v</i>) dos polímeros sintetizados utilizando diferentes solventes: etanol (PNVCL-EtOH), dimetilsulfóxido (PNVCL-DMSO) e acetato de etila (PNVCL-Ac).....	57
FIGURA 5.18 – Espectro de ¹³ C-RMN do PNVCL sintetizado utilizando DMSO como solvente.....	58
FIGURA 5.19 – Curvas de TG (A) e DTG (B) do PNVCL sintetizado utilizando DMSO.	59
FIGURA 5.20 – Curva de DSC isotérmica a 37 °C da solução de PNVCL (20% <i>m/v</i>) sintetizado em DMSO.....	61
FIGURA 5.21 - Espectros de IR dos filmes poliméricos obtidos pela secagem dos hidrogéis de PNVCL (20% <i>m/v</i>) preparados com diferentes quantidades de partículas vítreas nBG (5-15% <i>m/m</i> em relação a massa de PNVCL).....	62
FIGURA 5.22 – Espectros de IR dos filmes poliméricos obtidos pela secagem dos hidrogéis de PNVCL (20% <i>m/v</i>) preparados com diferentes quantidades de partículas vitrocerâmicas nBGC (5-15% <i>m/m</i> em relação a massa de PNVCL).63	
FIGURA 5.23 – Ensaio reológico a 37 °C em regime oscilatório para determinação da região de viscoelasticidade linear dos hidrogéis preparados com diferentes quantidades de partículas vítreas de nBG (5-15% <i>m/m</i> em relação a massa de PNVCL) e concentração fixa de PNVCL em PBS (20% <i>m/v</i>).	65
FIGURA 5.24 - Ensaio reológico a 37 °C em regime oscilatório para determinação da região de viscoelasticidade linear dos hidrogéis preparados com diferentes quantidades de partículas vitrocerâmicas nBGC (5-15% <i>m/m</i> em relação a massa de PNVCL) e concentração fixa de PNVCL em PBS (20% <i>m/v</i>).	66
FIGURA 5.25 - Ensaio reológico de varredura de tempo a 37 °C para os hidrogéis formulados: (A) PNVCL em PBS (20% <i>m/v</i>), (B) hidrogel de PNVCL preparado com 5% de partículas vítreas nBG (<i>m/m</i> em relação a massa de PNVCL), e (C) formulado com 5% de partículas vitrocerâmicas nBGC.	69
FIGURA 5.26 - Ensaio reológico de varredura de frequência angular a 37 °C para os hidrogéis formulados: (A) hidrogéis de PNVCL puro em PBS (20% <i>m/v</i>) e preparados com diferentes quantidades de partículas vítreas nBG (5-15% <i>m/m</i> em relação a massa de PNVCL), e (B) com (5-15%) de partículas vitrocerâmicas nBGC.....	70

- FIGURA 5.27 – Representação esquemática da preparação dos hidrogéis e dos extratos utilizados nos ensaios de citotoxicidade..... 73
- FIGURA 5.28 – Hidrogéis de PNVCL a diferentes concentrações (% *m/v*) em meio de cultura em temperaturas acima (direita) e abaixo (esquerda) da LCST. 74
- FIGURA 5.29 – (A) Viabilidade de células MG-63 cultivadas por 24 h na presença dos extratos obtidos pela incubação do meio de cultura por 1 e 3 dias com diferentes concentrações de PNVCL (10-30% *m/v*). Os resultados expressam a média entre dois experimentos independentes com $n = 4$ para cada experimento individual. * Indica significância estatística ($p < 0.05$) entre as viabilidades para um mesmo dia de extração. Não foi encontrada diferença estatística ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) para mesmas concentrações em diferentes dias de extração. (B) Micrografias de fluorescência para células MG-63 fixas coradas com DAPI (em azul), e células vivas coradas com calceína (em verde) cultivadas por 24 h com os extratos coletados ao terceiro dia de incubação na presença de diferentes concentrações de PNVCL (% *m/v*). 76
- FIGURA 5.30 – Massa residual do hidrogel de PNVCL a 20% *m/v* liofilizado após incubação por diferentes intervalos de tempo em meio de cultura. A porcentagem de massa seca é expressa relativo à massa inicial de polímero puro liofilizado empregado na preparação do hidrogel..... 77
- FIGURA 5.31 - Viabilidade de células MG-63 cultivadas por 24 h na presença dos extratos obtidos pela incubação do meio de cultura por 1 e 3 dias com diferentes concentrações de partículas (10-30 mg mL⁻¹): (A) partículas do vidro nBG, (B) partículas da vitrocerâmica nBGC, e (C) partículas do vidro comercial Bioglass 45S5. Os resultados expressam a média entre dois experimentos independentes com $n = 4$ para cada experimento individual: * Indica significância estatística ($p < 0.05$) entre as viabilidades para diferentes concentrações no mesmo dia de extração, ** indica diferença entre mesmas concentrações em dias diferentes de extração, # indica significância ($p < 0.01$) para o mesmo dia de extração. 79
- FIGURA 5.32 – Micrografias de fluorescência para células MG-63 fixas coradas com DAPI (em azul), e células vivas coradas com calceína (em verde) cultivadas por 24 h com os extratos coletados ao terceiro dia de incubação na presença de diferentes partículas a 10 mg mL⁻¹: vidro (nBG), vitrocerâmica (nBGC), e Bioglass 45S5 (BG)..... 80
- FIGURA 5.33 - Hidrogéis de PNVCL a 20% *m/v* preparados com diferentes quantidades de partículas nBG e nBGC (5-15% *m/m*) em meio de cultura em temperaturas acima (direita) e abaixo (esquerda) da LCST..... 82

FIGURA 5.34 - Viabilidade de células MG-63 cultivadas por 24 h na presença dos extratos obtidos pela incubação do meio de cultura por 1 e 3 dias com hidrogéis de PNVCL (20% *m/v*) preparados com diferentes quantidades de partículas de 5-15% *m/m* (em relação a massa de PNVCL, correspondendo a 10-30 mg mL⁻¹ no sistema, respectivamente): (A) com partículas do vidro nBG, (B) com partículas da vitrocerâmica nBGC, e (C) com partículas do vidro comercial Bioglass 45S5. Os resultados expressam a média entre dois experimentos independentes com $n = 4$ para cada experimento individual. * e # Indicam significância estatística entre o mesmo dia de extração, $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectivamente. ** e ## Indicam diferença estatística entre mesma concentração de partículas em diferentes dias de extração ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectivamente)..... 83

FIGURA 5.35 – Médias dos valores de pH ($n = 3$) medidos para os extratos expostos a diferentes tipos e quantidades de partículas (5-15% *m/m*) e das partículas em hidrogel de PNVCL a 20% (*m/v*): (A) vidro nBG, (B) vitrocerâmica nBGC, e (C) vidro Bioglass 45S5..... 86

FIGURA 5.36 - Micrografias de fluorescência para células MG-63 fixas coradas com DAPI (em azul), e células vivas coradas com calceína (em verde) cultivadas por 24 h com os extratos coletados ao terceiro dia de incubação na presença dos hidrogéis preparados com diferentes partículas a 5% (*m/m*): vidro (nBG), vitrocerâmica (nBGC), e Bioglass 45S5 (BG)..... 87

Resumo

FORMULAÇÃO E ESTUDO DA CITOCOMPATIBILIDADE DE HIDROGÉIS TERMOSENSÍVEIS CONTENDO PARTÍCULAS BIOATIVAS PARA APLICAÇÃO EM REGENERAÇÃO ÓSSEA. A excelente propriedade osteogênica de vidros bioativos (BG) contrasta com importantes limitações no uso dessa classe de materiais, das quais se destaca o potencial de citotoxicidade e a dificuldade em controlar a morfologia das partículas para uma efetiva inserção em matrizes poliméricas. Aliado a isto, há uma demanda por novos materiais que possam ser empregados na prevenção e tratamento locais da osteoporose. Neste trabalho, um novo biomaterial à base do hidrogel termossensível de poli(N-vinilcaprolactama) (PNVCL) e partículas BG foi desenvolvido como potencial candidato em regeneração óssea. Partículas de vidro e vitrocerâmica sintetizadas por diferentes rotas e com composição $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$ foram moídas permitindo a obtenção de partículas submicrométricas. Esses materiais apresentaram resposta bactericida contra *Staphylococcus aureus* e foram capazes de induzir rapidamente a formação *in vitro* de hidroxicarbonato-apatita (HCA). Diferentes quantidades dessas partículas foram empregadas na formulação dos hidrogéis de PNVCL e a caracterização das propriedades viscoelásticas e a investigação da citocompatibilidade para células ósseas foram conduzidos. A síntese do PNVCL foi feita pela polimerização via radical livre do monômero NVCL e diferentes solventes foram avaliados na síntese e nas propriedades físico-químicas dos polímeros obtidos, são eles etanol, acetato de etila e DMSO. Os diferentes polímeros exibiram uma transição termossensível próxima a temperatura fisiológica humana oferecendo a possibilidade de serem injetados no corpo. A combinação das diferentes partículas com os hidrogéis mostrou ser benéfica para as células reduzindo a citotoxicidade dos materiais vítreos e resultando na obtenção de hidrogéis citocompatíveis. Além disso, os resultados mostraram que o comportamento viscoelástico pode ser ajustado pelo tipo e pela quantidade de partículas empregadas nas formulações. Esses hidrogéis

compósitos apresentam potencial como biomaterial injetável para remineralização óssea local.

Abstract

PREPARATION AND CYTOCOMPATIBILITY OF THERMOSENSITIVE HYDROGELS CONTAINING BIOACTIVE PARTICLES FOR BONE TISSUE REGENERATION. Although the osteogenic properties, there are still some limitations to employing bioactive glasses (BG) in the human body, such as potential cytotoxicity and a lack of controlling the morphology of BG particles. Furthermore, particles presenting smaller sizes can be helpful for the preparation of organic-inorganic composites with improved properties. These composites have gained attention in the last years due to the possibility of employing them in bone regeneration. However, osteoporosis remains one of the most embracing pathologies in the world. In this research, a new material based on the thermosensitive Poly(N-vinylcaprolactam) (PNVCL) hydrogel and BG particles was developed as a candidate for bone regeneration. For that, BG-based particles were synthesized by melt-quenching and sol-gel methods, and milled to achieve submicron particles. These BG-based particles showed a bactericidal effect against *Staphylococcus aureus* and a relatively fast *in vitro* hydroxycarbonate apatite formation. Different amounts of these particles were then employed in the formulation of PNVCL hydrogels. The viscoelastic properties and cytocompatibility of the hydrogels were widely investigated. PNVCL syntheses were performed using ethanol, ethyl acetate, and DMSO to evaluate the effect of the solvent on the final characteristics of the polymers. The hydrogels exhibited a sol-gel thermosensitive transition close to the human body temperature offering the possibility of being injected. The entrapment of the BG-based particles in the PNVCL hydrogel showed to be beneficial for osteoblastic cells decreasing the cytotoxicity and resulting in cytocompatible composites. Furthermore, the rheological behavior of the composites could be adjusted by the type and amount of particles. These hydrogels have shown potential as an injectable biomaterial for a site bone remineralization.

Sumário

1 - Introdução	1
1.1 - Vidros bioativos.....	3
1.1.1 - Métodos de preparação.....	7
1.1.2 - Principais desafios	8
1.2 - Biomateriais a base de hidrogéis	9
1.2.1 - Hidrogeis injetáveis de poli(N-vinilcaprolactama) (PNVCL)	12
2 - Hipótese e motivação	18
3 - Objetivo.....	18
4 - Métodos e procedimentos	19
4.1 - Obtenção dos materiais.....	19
4.1.1 - Síntese das partículas vítreas	19
4.1.2 - Síntese do PNVCL	21
4.1.3 - Preparação dos hidrogéis contendo as partículas vítreas	23
4.2 - Caracterizações	23
4.2.1 - Difração de Raios X (DRX)	23
4.2.2 - Fluorescência de Raios X (XRF).....	24
4.2.3 - Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	24
4.2.4 - Espectroscopia na Região do UV-Vis.....	24
4.2.5 - Fisissorção de Nitrogênio	24
4.2.6 - Medidas de Potencial Zeta (ζ).....	25
4.2.7 - Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	25
4.2.8 - Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES)	25
4.2.9 - Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução (MEV-FEG)	26
4.2.10 - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (^{13}C -RMN)	26
4.2.11 - Análise Térmica Diferencial simultânea (DTA-TGA)	26

4.2.12 - Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)	27
4.2.13 - Termogravimetria (TGA)	27
4.2.14 - Reologia.....	27
4.3 - Ensaio <i>in vitro</i>	28
4.3.1 - Mineralização <i>in vitro</i>	28
4.3.2 - Atividade bactericida contra <i>Staphylococcus aureus</i>	28
4.3.3 - Estudos de citocompatibilidade por ensaio indireto.....	29
4.3.4 - Cultivo das células.....	29
4.3.5 - Preparação dos extratos	29
4.3.6 - Avaliação da citotoxicidade	30
4.3.7 - Análise estatística	31
5 - Discussão dos resultados	32
5.1 - Materiais vítreos	32
5.1.1 - Mineralização <i>in vitro</i>	40
5.1.2 - Atividade bactericida.....	45
5.2 - Hidrogéis de PNVCL.....	48
5.3 - Hidrogéis de PNVCL contendo partículas bioativas.....	61
5.4 - Estudos de citocompatibilidade	71
5.4.1 - Investigação de diferentes concentrações do hidrogel	74
5.4.2 - Investigação do tipo e da quantidade de partículas	78
5.4.3 - Investigação dos hidrogéis contendo partículas	82
6 - Conclusões	88
7 - Referências bibliográficas	90

1 - Introdução

O desenvolvimento de novos materiais tem possibilitado o avanço no tratamento de diferentes patologias nos segmentos da medicina ¹. Dispositivos médicos projetados para serem aplicados em contato com tecidos vivos são classificados como biomateriais e constituem uma área de estudo interdisciplinar que compreende desde aspectos fundamentais, tais como a formulação dos dispositivos e investigação das propriedades químicas, físicas e biológicas desses materiais, até implicações práticas da terapia clínica e aplicação *in vivo* ². A engenharia tecidual, em particular, se dedica ao desenvolvimento de tecidos artificiais que mimetizam o microambiente das células oferecendo a possibilidade de atuarem como substratos (*scaffolds* no inglês) para o crescimento e reparação dos tecidos, ou para atuarem como sistemas de liberação lenta de substâncias bioativas em um tecido alvo (*drug-delivery systems*) ³. A escolha da composição físico-química de um biomaterial, por outro lado, dependerá das características do tecido nativo e das etapas de processamento antecedentes a sua aplicação, como impressão em 3D ou eletrofição que estão entre os exemplos de processos empregados em engenharia tecidual ³⁻⁵.

No corpo humano, os tecidos possuem diferentes características mecânicas a depender de sua função e localização ³. A Figura 1.1 apresenta uma escala dos valores aproximados de módulo elástico (E) de alguns tecidos. Na escala desta imagem, o cérebro e os ossos correspondem, respectivamente, aos órgãos mais deformável e mais rígido. A diferença nos valores dos módulos entre o cérebro e os ossos é da ordem de dezenas de milhares de Pascals (Pa), enquanto pele, músculo e cartilagem se encontram entre esses extremos com valores de E crescentes. O tecido ósseo pode ser distinguido dos demais pela presença de uma matriz extracelular mineralizada que confere elevada dureza ao órgão, e por esse motivo é referido como “tecido duro”, enquanto os demais, em contraste, são chamados de “tecidos moles”. A fase mineral nos ossos corresponde a

aproximadamente 60% em massa, sendo o restante fase orgânica que é composta principalmente por fibras de colágeno ⁶. A estrutura hierárquica existente entre as fases orgânica e inorgânica fazem do osso um nanocompósito ideal para o suporte estrutural do nosso corpo ⁷. Além disso, as células ósseas são responsáveis por mediar as reações químicas envolvidas na formação da estrutura nanocompósita e no grau de mineralização, gerando uma constante atividade de remodelação neste tecido ⁸. A revisão detalhada da estrutura hierárquica dos ossos pode ser encontrada no trabalho de JAMES et al.⁶.

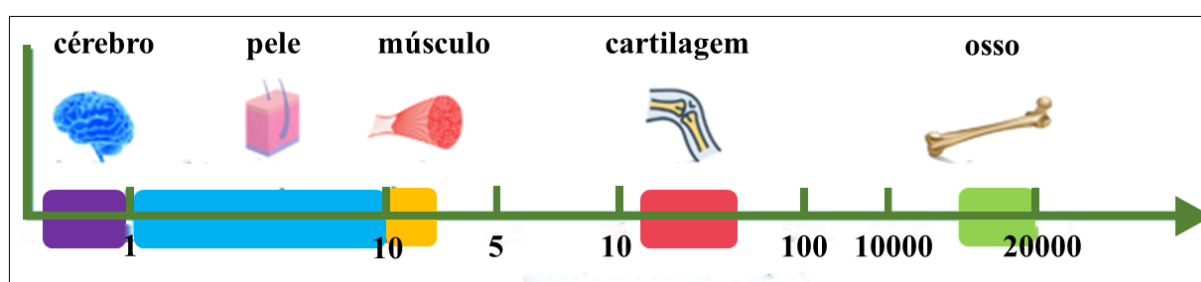


FIGURA 1.1 - Representação esquemática do intervalo de valores de elasticidade (em kPa) de alguns tecidos no corpo humano. Fonte: adaptado referência ³.

O envelhecimento do nosso organismo gera, naturalmente, alterações no processo de remodelagem reduzindo a densidade óssea com o passar dos anos ⁹. Entre os mecanismos que levam a este efeito, pode-se citar o desequilíbrio nas taxas de reabsorção e produção do novo tecido pelos osteoclastos e osteoblastos, células responsáveis por este processo ¹⁰. A principal implicação prática dessa desordem, conhecida como osteoporose, reflete-se na fragilização da estrutura mineral com um relevante aumento no risco à fraturas ¹¹. Por ser inerente ao envelhecimento, essa desordem pode afetar qualquer pessoa a partir dos 50 anos ocorrendo em maior ou menor grau a depender de alguns fatores, tais como genéticos, nutricionais, hormonais e ambientais ^{9,10}. Segundo a fundação internacional de osteoporose, *International Osteoporosis Foundation* (IOF), a osteoporose causa aproximadamente 9 milhões de fraturas anualmente, o que representa mundialmente cerca de uma fratura a cada três segundos ¹². Ainda, de

acordo com KLOTZBUECHER et al. ¹³, uma redução de 10% na massa óssea pode mais do que dobrar o risco de fratura. Além disso, a patologia gera grandes custos pessoais, econômicos e reduz a qualidade de vida de seus portadores ¹². Neste sentido, o estudo de biomateriais e de novas abordagens terapêuticas em engenharia óssea são tópicos com um relevante impacto social. Na prática, essa área de pesquisa vem crescendo consideravelmente nos últimos 50 anos com o desenvolvimento de materiais bioativos capazes de induzir a produção e reparação dos tecidos *in vivo* ¹⁴. Uma revisão bibliográfica dos principais biomateriais atualmente estudados para ossos e os desafios existentes são apresentados nos tópicos subsequentes.

1.1 - Vidros bioativos

As cerâmicas bioativas começaram a ser investigadas a pouco mais de 100 anos e manufaturadas para comercialização apenas a cerca de 30 anos atrás ¹⁵. Esses biomateriais consistem em fosfatos de cálcio (CaPs) e diferiram-se das até então empregadas cerâmicas bio-inertes, tais como alumina e zircônia, pela formação de uma forte interface entre o biomaterial e o tecido nativo ¹⁵. Esse comportamento é explicado pela similaridade em composição química e estrutural dos CaPs com os tecidos duros. Exemplos dessas biocerâmicas são o beta fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (β -TCP) e a hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{HPO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HA), ambos minerais de ocorrência natural que apresentam o arranjo cristalino dos átomos, sendo a HA a estrutura presente na matriz extracelular de ossos e dentes ¹⁵.

Mais recentemente na história, no início da década de 70, um experiente pesquisador na área de vidros semicondutores, Larry Hench, se propôs a estudar materiais que pudessem substituir polímeros e ligas metálicas bio-inertes até então utilizadas como próteses a fim de atender a alta demanda por implantes que não resultassem na rejeição pelo organismo ¹⁶. Partindo-se da hipótese de que materiais possuindo composição química similar ao osso pudessem ser aceitos pelo corpo, Hench e colaboradores desenvolveram um vidro quaternário com 45%

SiO_2 -24.5% Na_2O -24.5% CaO -6% P_2O_5 (m/m). Essa composição foi projetada para oferecer P_2O_5 e uma grade quantidade de CaO como precursores da hidroxiapatita em uma matriz vítrea de Na_2O - SiO_2 . A escolha dessa matriz, por outro lado, teve como objetivo facilitar a manufatura dos implantes pela redução da temperatura de fusão do vidro. Após a obtenção dos primeiros implantes para testes *in vitro* e *in vivo*, a hipótese de Hench e colaboradores foi confirmada. Os implantes desenvolvidos apresentaram a formação de uma camada de HA em testes *in vitro*, sendo observada também nos testes *in vivo* constatam-se que os cristais de HA gerados se ligaram quimicamente as fibras de colágeno produzidas por osteoblastos na interface do implante ¹⁶. Essa descoberta resultou na classe de *vidros bioativos*, a partir da qual diversas outras composições passaram a ser desenvolvidas com diferentes propósitos, tal como melhorar as características de processamento, entre outros ^{17,18}.

Do ponto de vista da microestrutura, os vidros são materiais não-cristalinos e, portanto, não exibem a simetria translacional no arranjo de seus átomos constituintes tal como ocorre nas cerâmicas cristalinas ¹⁹. Ao invés, os vidros inorgânicos exibem uma rede de óxido polimérica, que no caso dos vidros bioativos são divididos em três classes de acordo com o óxido formador de rede: (i) a base de silicato (SiO_2), de borato (B_2O_3) ou de fosfato (P_2O_5). Outros óxidos presentes em menores quantidades, como CaO , Na_2O , MgO e K_2O , são denominados de modificadores de rede. A proporção entre os óxidos formadores e modificadores de rede na estrutura desses vidros se relaciona com a capacidade de ligação ao tecido ósseo ^{16,18}.

Mesmo com o passar dos anos, a composição proposta por HENCH et al.¹⁶ é até hoje considerada “padrão ouro” em engenharia óssea devido sua excelente bioatividade, e ficou conhecida pelo nome Bioglass 45S5 ^{17,18}. O início da regeneração do osso a partir de vidros quaternários do sistema SiO_2 - Na_2O - CaO - P_2O_5 ocorre quando o material bioativo entra em contato com os fluídos biológicos, levando à lixiviação de cátions dos modificadores de rede (Na^+ e Ca^{2+}) e à

substituição de H^+ presente no meio, como mostrado na Figura 1.2, (estágio 1)^{18,20}. Isto causa um aumento do pH local provocando a ruptura das ligações Si-O-Si e a liberação do $Si(OH)_4$, resultando na dissolução do vidro. Se o pH local for menor que 9,5 ocorre condensação do $Si(OH)_4$ sobre a superfície do vidro, formando uma camada de sílica-gel (estágio 2) que permite a troca iônica entre o material e o meio biológico. Assim, íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} difundem do interior do vidro através da sílica-gel, formando uma camada adicional de fosfato de cálcio amorfa sobre a superfície (estágio 3). Em seguida, o fosfato de cálcio passa a incorporar a hidroxila e o carbonato do microambiente biológico, iniciando a cristalização de hidroxicarbonato apatita (HCA) (estágio 4)^{16,18,20}.

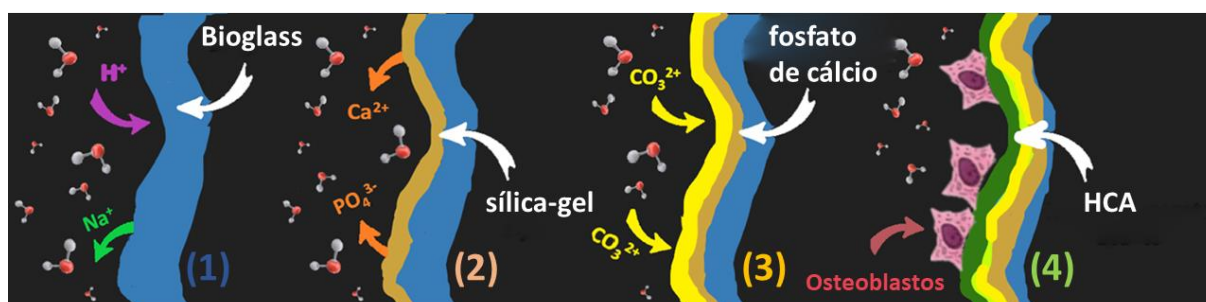


FIGURA 1.2 - Esquema ilustrativo das etapas de formação de hidroxicarbonato-apatita (HCA) e a regeneração tecidual a partir de um vidro ou vitrocerâmica bioativa. Fonte: próprio autor.

A formação da camada de HCA permite a adesão de células osteoprogenitoras sobre a superfície do implante de vidro, que passam por um processo de diferenciação e promovem o crescimento do tecido¹⁶⁻¹⁸. A liberação dos íons Ca^{2+} , PO_4^{3-} e do ácido ortossilícico ($Si(OH)_4$) durante o processo de dissolução são responsáveis por estimular a diferenciação e proliferação de osteoblastos por meio da ativação de diferentes vias intracelulares²¹. O ácido ortossilícico, por exemplo, tem demonstrado atuação na diferenciação osteoblástica e na formação de colágeno Tipo 1 pelos osteoblastos, enquanto o fosfato e o cálcio demonstraram regulação do metabolismo ósseo, além de serem íons precursores de HCA²¹. A presença de sódio na composição tem sido discutida mais recentemente

como não essencial para a bioatividade ²². Entretanto, o Na₂O modifica a rede dos vidros mais fortemente do que o CaO, aumentando a reatividade e a dissolução o que pode ser desejado ou não dependendo da aplicação ^{22,23}.

Diferenças na composição química, como porcentagem de SiO₂ ou a natureza e proporção dos modificadores de rede, alteram as taxas de formação da camada de HCA na superfície dos biovidros. Quanto maior for a taxa de formação de HCA, mais rápida será a ligação do biomaterial ao tecido lesionado, acelerando a recuperação do paciente ^{16,24}. Em geral, composições com SiO₂ ≥ 60% possuem baixa reatividade nas condições fisiológicas e, dessa forma, podem não oferecer bioatividade. Por outro lado, vidros com porcentagem inferior a 35% em SiO₂ ou superior a este valor em Na₂O apresentam uma taxa de dissolução incompatível com o microambiente das células devido a elevada reatividade, o que pode resultar em toxicidade ¹⁸. Outros fatores tais como área de superfície e cristalização da matriz também influenciam as taxas de formação de HCA e, portanto, podem ampliar o intervalo de composições bioativas acima mencionado. Por exemplo, enquanto a área de superfície aumenta a reatividade dos vidros pela maior área disponível para reação, a cristalização e formação de uma vitrocerâmica, que consiste na nucleação e crescimento de cristais distribuídos na matriz vítrea, reduz as taxas de dissolução e formação de HCA ^{16,20,25,26}. Em ambos os casos, o histórico de processamento dos vidros irão influenciar a estrutura e as propriedades de textura finais desses materiais. No caso das vitrocerâmicas, elas são obtidas pelo tratamento térmico dos vidros em temperaturas próximas a de cristalização o que tende a reduzir a bioatividade com o aumento da fração cristalizada ^{18,20,25}. Apesar disso, as vitrocerâmicas exibem maior tenacidade a fratura o que é uma característica desejada até que os implantes ósseos sejam completamente dissolvidos e substituídos pelo novo tecido formado ^{20,25}. Nos subtópicos a seguir, são apresentadas as duas principais rotas de obtenção e alguns dos desafios existentes na aplicação dos vidros bioativos.

1.1.1 - Métodos de preparação

Os vidros são materiais amorfos que exibem uma temperatura de transição vítrea (T_g), na qual o material passa de um estado rígido para um outro estado em que há maior mobilidade molecular sem, no entanto, estarem fundidos ¹⁹. Partindo-se desse princípio, vidros podem ser de diferentes naturezas, incluindo alguns polímeros e ligas metálicas. Por outro lado, o termo historicamente é associado aos óxidos inorgânicos que podem ser fundidos e resfriados a um estado rígido sem cristalizar ¹⁹. Os vidros bioativos podem ser fabricados pelo tradicional método de fusão seguido de têmpera. Esse método é amplamente utilizado na indústria e consiste na mistura de quantidades estequiométricas dos óxidos ou carbonatos precursores para fusão a temperaturas a partir de 1400 °C ²⁰. O produto fundido é então vertido no molde desejado rapidamente para promover o resfriamento sem ocorrência de cristalização, sendo esta rota útil na obtenção de implantes com formatos específicos ¹⁶. Outro método, que é particularmente atrativo para obtenção dos vidros na forma de pós é feita pela síntese sol-gel que apresenta algumas vantagens como materiais com área específica ($m^2 g^{-1}$) mais elevada e temperaturas de trabalho inferiores (< 1000 °C) em relação ao método convencional de fusão ^{20,27,28}. Existem duas abordagens distintas via síntese sol-gel, são elas (i) derivada do método de Stöber e (ii) assistida por ácido ²⁹.

A abordagem (i) tem como base o procedimento para a fabricação de esferas de sílica em escala nanométrica ²⁹. Nesse método, esferas são formadas pela hidrólise do alcóxido tetraetilortosilicato (TEOS), catalisada por amônia seguido de condensação dos silanóis em partículas coloidais de siloxano ³⁰. Esferas densas de sílica monodispersas com tamanhos na faixa de 10-500 nm e com área específica $> 200 m^2 g^{-1}$ podem ser obtidas por meio do ajuste dos parâmetros de síntese, tais como concentração de amônia e adição de agentes de funcionalização da superfície dos colóides ^{29,30}. Entretanto, silicatos bioativos requerem a presença de Ca^{2+} no meio reacional o que favorece a agregação dos colóides siloxano resultando em partículas irregulares e sistemas agregados ^{26,31}. Além disso,

composições possuindo fósforo podem resultar na precipitação de HA durante a síntese via essa abordagem ²⁷.

Na abordagem (ii), a hidrólise e condensação do TEOS é catalisada por um ácido formando uma rede de sílica 3D interconectada que ao passar por um procedimento de secagem resulta em uma estrutura porosa devido a saída do solvente ²⁹. No entanto, a estabilização da rede e a entrada de Ca^{2+} na estrutura vítrea requerem o tratamento do gel seco a temperaturas ~ 600 °C o que resulta na perda de poros e na redução da área de superfície em comparação ao gel seco ^{27,29}. Nessa abordagem de síntese, o ácido nítrico (HNO_3) normalmente é empregado como agente catalisador, mas diversos outros ácidos também podem ser utilizados, tais como acético (CH_3COOH) ³², cítrico ($\text{HOC}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$) ³³ e ácido láctico ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$) ³⁴, que possuem a vantagem de serem livres de nitrato oferecendo um procedimento mais seguro e ambientalmente amigável.

1.1.2 - Principais desafios

Apesar dos esforços, alguns desafios permanecem presentes na área dos vidros, entre eles o controle da morfologia e da textura das partículas via síntese química quando o interesse são os materiais na forma de pós, e a fragilidade mecânica de implantes de vidro e de vitrocerâmicas. No caso do controle da morfologia, estudos estão propondo o uso de surfactantes para mediar a formação de partículas esféricas com composição bioativa ³¹, enquanto substituir precursores de síntese tem se mostrado uma alternativa para reduzir as temperaturas de tratamento térmico melhorando as propriedades finais de textura ^{31,34}. Aumentar a área de superfície pode ser útil, por exemplo, na formulação de compósitos com matriz polimérica em que se requer uma boa dispersão entre as fases orgânica e inorgânica para obter materiais com propriedades reprodutíveis e melhoradas. No contexto do risco à fratura, por exemplo, a combinação dos vidros bioativos com polímeros pode resultar em materiais com maior tenacidade à fratura e que mimetizam as propriedades biológicas e mecânicas do tecido ósseo

³⁵. Entre os polímeros mais estudados para este fim pode-se citar o ácido polilático, ácido poliglicólico, policaprolactona, celulose, gelatina, quitosana, alginato, dextrans, dentre outros ³⁵⁻⁴⁰.

Além disso, outro importante aspecto é a inserção dos implantes em pacientes portadores de osteoporose ⁴¹. Nessas pessoas, a estrutura óssea vizinha ao implante normalmente encontra-se fragilizada o que pode, potencialmente, tornar o processo de integração da prótese e de regeneração mais lentos, revelando a necessidade do estudo também de biomateriais como estratégias de prevenção e remediação desta patologia.

1.2 - Biomateriais a base de hidrogéis

Os hidrogéis são materiais atrativos para a engenharia de tecidos devido as suas propriedades físico-químicas e funcionalidade biológica. São polímeros que apresentam redes hidrofílicas tridimensionais (3D) interligadas por ligações que podem ser de natureza covalente, forças de Van der Waals e/ou ligações de hidrogênio ⁴²⁻⁴⁴. Essa rede 3D nos hidrogéis promove a retenção de grandes quantidades de água ou fluídos fisiológicos permitindo a troca de nutrientes entre o material e o microambiente celular ⁴²⁻⁴⁴. Esses polímeros podem ser de origem natural, entre os quais se destacam polipetídios e polissacarídeos, ou de origem sintética sendo geralmente poliésteres ³. Do ponto de vista da aplicação *in vivo*, os hidrogéis sintéticos oferecem um maior controle da composição química e das propriedades finais reduzindo a possibilidade de alergias e inflamações ^{3,42-44}.

A classificação dos hidrogéis pode ser feita sob diferentes aspectos, tal como sumarizado na Figura 1.3. Além da origem, eles podem ter longa ou curta duração no organismo, a estrutura pode ser amorfa ou semi-cristalina, podendo apresentar cargas ou não, e formar um homo ou copolímero ⁴⁵.

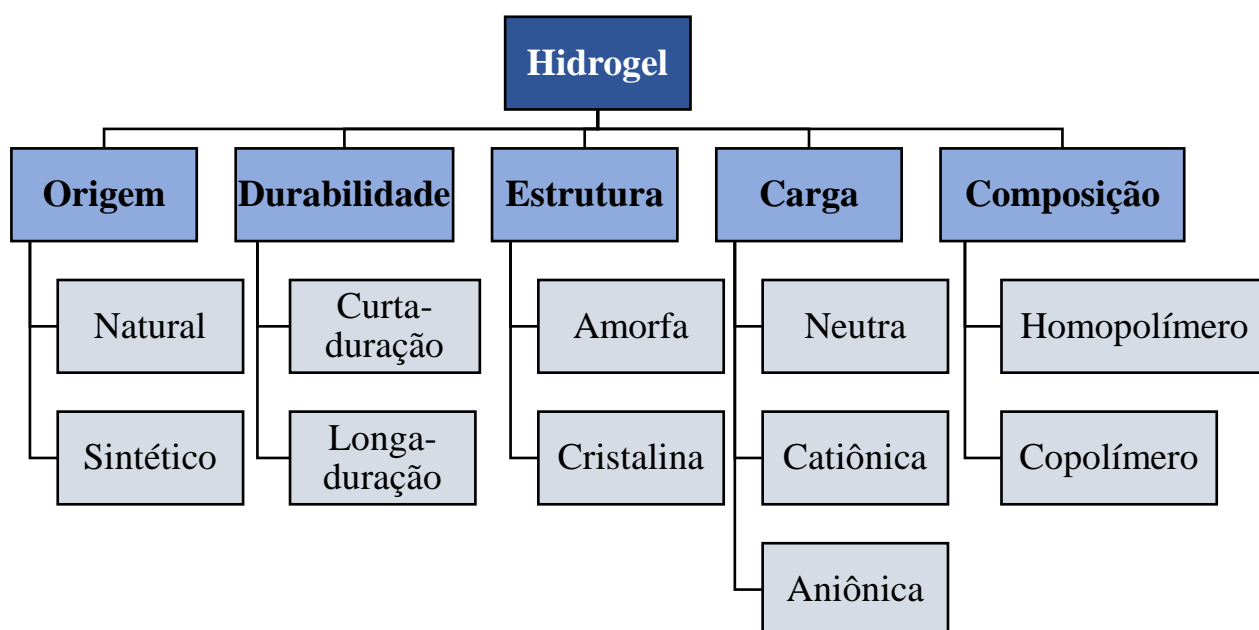


FIGURA 1.3 - Representação esquemática das classes mais comuns de hidrogéis. Fonte: adaptado referência ⁴⁵.

A biocompatibilidade dos hidrogéis está associada a ausência na produção ou liberação de substâncias nocivas desde o momento de implantação até a sua completa degradação no corpo ³. Existem diferentes mecanismos para a biodegradação desses materiais, são eles a hidrólise (químico), erosão (físico) e enzimático (biológico) ³. Os polímeros naturais são mais suscetíveis a ação enzimática e podem ser rapidamente degradados pelo corpo, enquanto os sintéticos geralmente sofrem hidrólise seguida de erosão e tendem a apresentar maior durabilidade ³. Os hidrogéis podem resistir horas, semanas, meses e até anos a depender de sua estrutura química, sendo que quanto maior o grau de hidrofiliidade maiores serão as taxas de degradação. ³ Além disso, tanto os polímeros naturais como os sintéticos podem ser modificados pela introdução de diferentes grupos funcionais na estrutura possibilitando o ajuste do perfil de degradação de acordo com a aplicação desejada³.

Alguns polímeros exibem uma resposta a estímulos externos, tais como pH, temperatura, força iônica ou campo elétrico, resultando em uma alteração de comportamento mecânico, grau de hidratação, ou permeabilidade, dentre outros ^{42,43,45,46}. O interesse nessa classe de biomateriais conhecida como *polímeros inteligentes* vem crescendo devido a versatilidade para aplicações de *drug-delivery* e terapias não invasivas ⁴⁶. Uma das vantagens em utilizá-los é a possibilidade de injetá-los com uma simples seringa sendo que a estruturação do hidrogel ocorrerá dentro do organismo por meio de algum dos estímulos anteriormente mencionados ^{46,47}. Além disso, a principal vantagem dos hidrogéis injetáveis está na sua capacidade de se moldar de maneira pouco invasiva ao organismo durante sua aplicação *in vivo* ^{42,43}.

Quando a resposta se dá pela variação de temperatura, os polímeros são classificados como termossensíveis ⁴⁶⁻⁴⁸. A estrutura desses hidrogéis é formada por monômeros contendo grupos hidrofóbicos (e. g. metil, etil, propil) e hidrofílicos (e. g. carboxílico) que formam soluções em meio aquoso apresentando uma temperatura crítica inferior de solubilidade (LCST) ^{46,47}. Quando essas soluções estão em temperaturas abaixo da LCST, o polímero encontra-se em um estado solvatado denominado “sol”, mas em temperaturas igual ou superior a LCST, encontra-se precipitado em um estado “gel” ^{46,47}. A mudança de temperatura provoca alterações no balanço entre as interações hidrofílicas e hidrofóbicas nas cadeias poliméricas em meio aquoso promovendo a transição de estados ^{46,47}. Os principais hidrogéis termossensíveis atualmente estudados estão listados na Tabela 1.1 ⁴⁷⁻⁴⁹.

A poli(N-vinilcaprolactama) (PNVCL) é um polímero sintético que tem adquirido destaque em engenharia tecidual nos últimos anos devido a sua biocompatibilidade e transição sol-gel próxima a temperatura fisiológica do corpo humano ⁵⁰. Em comparação com a poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAm), o hidrogel sintético termossensível mais estudado, o PNVCL tem exibido maior biocompatibilidade o que é uma característica atrativa para a sua aplicação em

engenharia tecidual ⁵⁰. Por esta e outras características, o PNVCL vem sendo estudado como biomaterial em nosso grupo de pesquisas e tem apresentado resultados promissores ⁵¹⁻⁵⁴. Outras propriedades demonstradas pelos hidrogéis de PNVCL são detalhadas no subtópico a seguir.

TABELA 1.1 - Principais hidrogéis termossensíveis estudados em engenharia de tecidos ⁴⁵⁻⁴⁷.

Hidrogéis termossensíveis	
Sintéticos	Naturais
Poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm)	Gelatina
Poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) (PEO)	Xiloglucano
Polietilenoglicol modificado (PEG): -PEG-polilactídeo (PEG-PLA) -PEG-policaprolactona (PEG-PCL)	Derivados da celulose

1.2.1 - Hidrogeis injetáveis de poli(N-vinilcaprolactama) (PNVCL)

Devido a sua estrutura química composta de um grupo amida hidrofílico ligado a uma cadeia alifática hidrofóbica (Figura 1.4), o PNVCL exibe solubilidade em solventes polares e não-polares, entre os quais a água, álcoois, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), entre outros. A primeira síntese de PNVCL data de 1952, enquanto estudos sobre a sua precipitação em água pelo aquecimento do sistema ~35 °C foi reportada pela primeira vez em 1968 ⁵⁰.

aplicações em sistemas de *drug-delivery*. Entretanto, essa transição é reversível e o sistema retorna ao estado solvatado se resfriado abaixo da LCST ^{50,52}.

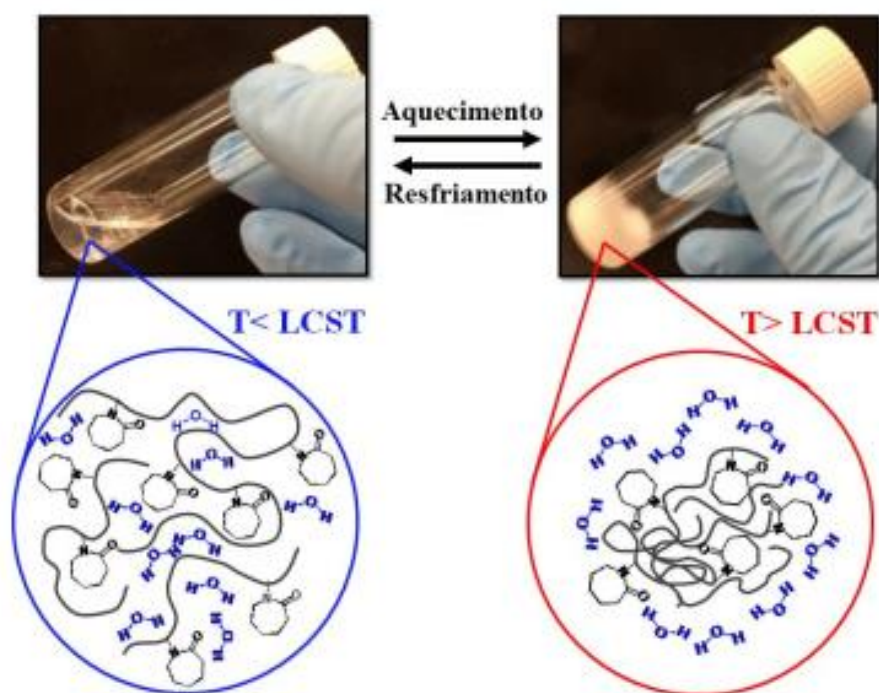


FIGURA 1.5 - Representação desenvolvida por SALA et al. ⁵⁴ demonstrando a dispersão polimérica aquosa do PNVCCL em temperatura ambiente (transparente e solúvel) e quando aquecida acima da LCST, adquirindo uma coloração opaca devido a separação de fase e formação de agregados poliméricos.

A razão pela qual o PNVCCL recebeu menor popularidade no passado se deve a maior dificuldade em controlar a polimerização da N-vinilcaprolactama (NVCL) por ser um monômero sem conjugação e, dessa forma, sem estabilização por ressonância resultando em um polímero com larga distribuição de massa molar ⁵⁰. A obtenção do PNVCCL é mais comumente feita pelo método de polimerização via radical livre na presença de solvente empregando o radical 2,2'-azo-bis-isobutironitrila (AIBN) ⁵⁰. Diferentes solventes tem sido empregados na síntese, tais como água, etanol, isopropanol, tolueno, benzeno, dioxano e DMSO, sendo possível a obtenção do polímero com diferentes características a partir da escolha do solvente ^{50,55-58}. A síntese em água, por exemplo, tem demonstrado resultar em polímeros com maior e mais larga distribuição de massa molar em

comparação aos solventes orgânicos ⁵⁰. Essas diferenças podem ser explicadas pela influência do tipo de solvente nas taxas de propagação da polimerização e na viscosidade do meio reacional ^{50,54,57,58}.

Em termos de degradação, o PNVCL tem-se mostrado resistente a hidrólise sob diferentes temperaturas e valores de pH, incluindo condições fisiológicas e na presença de enzimas ^{50,59}. Por outro lado, sugere-se que a degradação no corpo ocorra pela dissolução e erosão do hidrogel ⁵⁴. Em relação a sua aplicação, tanto homo e copolímeros de PNVCL vem sendo amplamente estudados como biomateriais para a imobilização de enzimas a fim de proteger e preservar a atividade enzimática em certos tipos de processamento ⁶⁰, imobilização de células bacterianas e fúngicas para aplicações em biocatálise ⁶¹ e sistemas de *drug-delivery* para a liberação de fármacos (e.g. antibióticos, anti-inflamatórios, drogas anticâncer) ⁵⁰. Na regeneração de tecidos, *scaffolds* de criogéis de PNVCL demonstraram biocompatibilidade *in vivo* e propriedades de suporte para a proliferação de células e formação de vascularização do novo tecido ⁶². SALA et al. ⁵⁴ explorou as propriedades de géis de PNVCL com diferentes massas molares na viabilidade e encapsulamento de células tronco mesenquimais humanas (CTMs), condrócitos bovinos (CDs) e na produção de tecido cartilaginoso *in vivo* verificando a formação de componentes da matriz extracelular pelos CDs nos *scaffolds*. Além disso, esses autores constataram melhores resultados para o PNVCL de menor massa molar ($M_n = 12.9$ kDa), em comparação ao PNVCL de maior massa ($M_n = 142.7$ kDa) possivelmente devido a uma superior difusão de nutrientes em hidrogéis com menor massa molar.

Apesar dos estudos que envolvem hidrogéis de PNVCL apresentarem resultados promissores, a formulação do polímero contendo partículas para aplicação em engenharia tecidual é ainda pouco explorado. No trabalho de revisão de CORTEZ-LEMUS e LICEA-CLAVERIE ⁵⁰, os autores abordaram a literatura disponível de hidrogéis termossensíveis a base de PNVCL reunindo diferentes estudos que empregaram partículas na composição dos materiais. Grande parte

desses trabalhos envolvem a preparação do PNVCL modificado com a introdução de grupos funcionais na cadeia principal, tais como o poli(N-vinilcaprolactama-co-acetoacetoxietil metacrilato) (PNVCL-AAEM) e o poli(N-vinilcaprolactama-co-glicidil metacrilato) (PNVCL-PGMA) ^{50,63-65}. PICH et al. ⁶⁶, desenvolveram hidrogéis híbridos contendo nanopartículas de ZnS pela adição de PNVCL-AAEM ao meio reacional da síntese de ZnS obtendo-se partículas de microgéis compósitas. BERGER et al.⁶⁷, encapsulou nanopartículas de laponita pela polimerização de PNVCL-AAEM na presença das nanopartículas da argila obtendo-se microgéis compósitos. Outro exemplo de géis contendo cerâmicas foi preparado por SCHACHSCHAL et al.⁶⁶, utilizando PNVCL-AAEM modificados com vinilimidazol (VIm) como *containers* para a síntese *in situ* de HA possibilitando a integração de nanocristais de HA nas micropartículas de gel. Outra maneira de incorporar partículas a matriz pode ser feita pela funcionalização da superfície de nanopartículas com grupos vinílicos reativos para serem polimerizados junto a cadeia do PNVCL via ligação covalente. SALA ⁵¹, funcionalizou nanofibras mesoporosas de sílica (SiO₂-MPS) com o organossilano 3-(trimetoxisilil)propil metacrilato (MPS) para permitir a ligação covalente da sílica, por meio do grupo vinílico presente no organossilano, aos monômeros poliméricos durante a polimerização de copolímeros de PNVCL e acetato de vinila (Vac) resultando em hidrogéis poliméricos interconectados por nanofibras de sílica.

Até o presente momento poucos trabalhos investigando o potencial de aplicação do PNVCL em engenharia óssea foram publicados, todos a partir de 2013 ⁶⁸⁻⁷⁰. MOSHAVERINIA et al. ⁶⁸ sintetizaram terpolímeros de ácido acrílico (AA), ácido itacônico (AI) e vinilcaprolactama (NVCL) pela polimerização via radical livre para subsequente preparação de soluções contendo o terpolímero e cimentos de ionômero de vidro convencional disponível comercialmente (GIG). Esses autores investigaram o efeito da combinação de GIG com o terpolímero contendo o monômero NVCL na microdureza, liberação de flúor e hidratação das

amostras para fins de restauração dentária. Os resultados evidenciaram um aumento da absorção de água e uma redução na quantidade inicial de flúor liberada pelos ionômeros de vidro sem modificação significativa na dureza, concluindo-se que polímeros a base de AA contendo monômeros de NVCL apresentaram a capacidade de alterar características de restauradores dentários. Em outro estudo, GARCÍA-SOBRINO et al.⁶⁹ sintetizaram hidrogéis termosensíveis de PNVCL funcionalizados com grupos carboxílicos pela incorporação de ácido metacrílico (MAA) no polímero. Os resultados evidenciaram que hidrogéis com maiores teores de MAA melhoraram a secreção de colágeno e a mineralização da matriz em linhagens de células pré-osteoblásticas, demonstrando a capacidade desses hidrogéis em induzir a proliferação de células ósseas. No trabalho de PARAMESWARAN-THANKAM et al.⁷⁰ foram sintetizados hidrogéis injetáveis de copolímeros de guar (HGP) e NVCL modificados com nanohidroxiapatita pela reticulação *in situ* utilizando o agente reticulante divinil sulfona (DVS). Os compósitos de HPG-g-PNVCL/n-HA/DVS demonstraram bioatividade e biocompatibilidade em testes *in vitro* com linhagens de osteoblastos. Sendo assim, este panorama revela que apesar do potencial de aplicação do PNVCL como biomaterial, a formulação de seus hidrogéis voltados ao tecido ósseo é um campo de estudos ainda incipiente.

2 - Hipótese e motivação

A principal motivação desta pesquisa consistiu em combinar a característica injetável de hidrogéis termossensíveis de PNVCL com a bioatividade de vidros e vitrocerâmicas. Este novo biomaterial apresentaria potencial para ser utilizado em regeneração óssea pela inserção das partículas vítreas na rede do hidrogel.

3 - Objetivo

Este estudo teve como objetivo o desenvolvimento de um novo biomaterial termossensível a base do hidrogel de PNVCL e partículas bioativas. A fim de alcançar este propósito estabeleceu-se o seguinte conjunto de metas:

- a) Obter partículas vítreas com base no sistema quaternário $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$ e avaliar a influência das condições de processamento nas propriedades físico-químicas e biológicas desses materiais;
- b) Sintetizar polímeros de PNVCL termossensíveis;
- c) Formular os hidrogéis de PNVCL adicionando diferentes quantidades de partículas bioativas e avaliar as propriedades reológicas e a citocompatibilidade dos materiais.

4 - Métodos e procedimentos

4.1 - Obtenção dos materiais

4.1.1 - Síntese das partículas vítreas

A obtenção dos vidros foi feita por dois diferentes métodos a fim de comparar as propriedades finais entre materiais sintetizados por diferentes rotas. A composição química escolhida teve como base o sistema quaternário SiO_2 - Na_2O - CaO - P_2O_5 , um dos sistemas vítreos bioativos mais amplamente estudados, incluindo o padrão ouro Bioglass 45S5 comercial, o qual foi utilizado como referência para comparação com os materiais desenvolvidos.

A síntese por fusão e têmpera é o método mais tradicional de obtenção de vidros, e foi feita neste trabalho pela mistura de quantidades estequiométricas dos seguintes precursores: sílica (SiO_2 99,9%, Alfa Aesar), carbonato de cálcio ($\text{CaCO}_3 \geq 99,0\%$ Sigma-Aldrich), carbonato de sódio ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich), e fosfato de amônio monobásico ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 \geq 98\%$, Sigma-Aldrich) obedecendo a relação (% *m/m*) 45 SiO_2 : 24,5 Na_2O : 24,5 CaO : 6 P_2O_5 (composição do Bioglass 45S5). Após misturar os reagentes, o pó precursor foi aquecido de 300 a 500 °C em intervalos de 1 h seguido de tratamento 900 °C por 2 h para a descarbonatação dos sais. O pó resultante foi fundido a 1400 °C em um cadinho de platina e então vertido rapidamente para evitar cristalização. As etapas dessa síntese estão esquematizadas na Figura 4.1.

A síntese pela rota sol-gel em meio ácido, cujo método consiste na hidrólise de um alcóxido precursor de silício seguido de condensação em SiO_2 na presença de cátions precursores foi feita utilizando o tetraetilortosilicato (TEOS, 98%, Sigma-Aldrich), trietil fosfato (TEP, $\geq 99,8\%$, Sigma-Aldrich), nitrato de sódio (NaNO_3 ACS grade, Synth), e o nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{CO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 99%, Sigma-Aldrich). Os reagentes foram adicionados a uma solução de ácido cítrico na concentração de 0,005 mol L^{-1} (pH ~3) sob agitação, resultando em uma *solução precursora* límpida de composição (% *m/m*) 11,4 SiO_2 : 6,2 Na_2O : 6 CaO : 1,4

P_2O_5 : 75 H_2O . Após a adição de todos os reagentes, a solução precursora foi mantida em condição estática por 4 dias para geleificação e envelhecimento. O gel resultante foi então secado a 60 e 200 °C por 24 h, sequencialmente. Como última etapa, a amostra de gel seco foi tratada a 700 °C por 20 h (Figura 4.2).

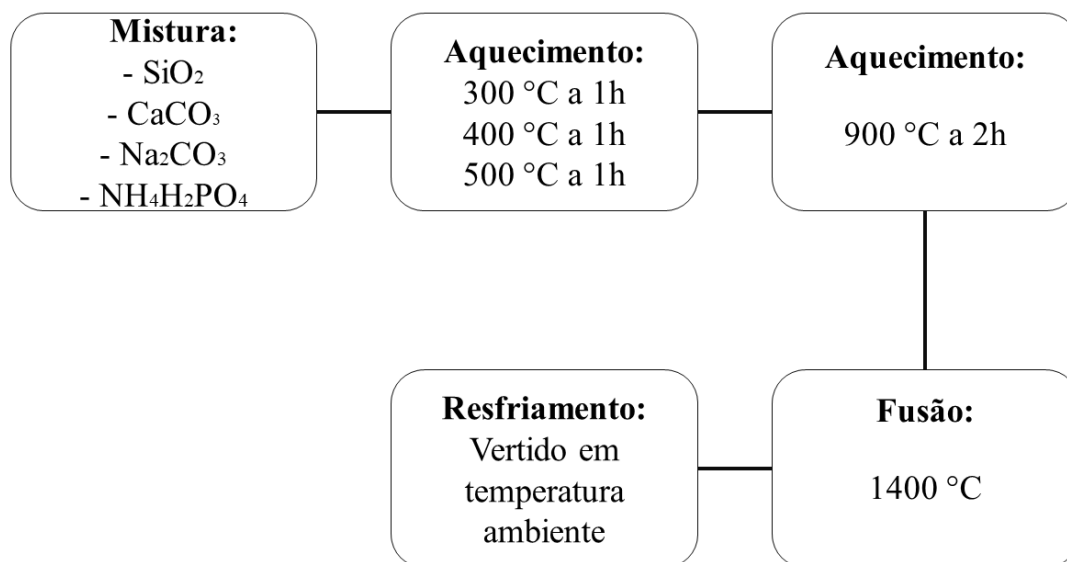


FIGURA 4.1 - Representação esquemática das etapas de síntese do material vítreo preparado pelo método de fusão.

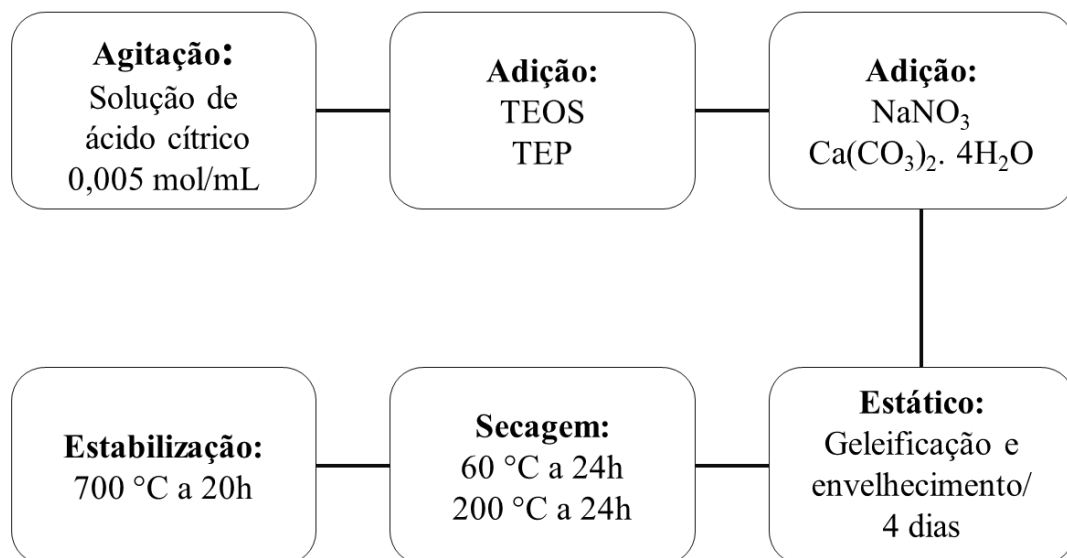


FIGURA 4.2 – Representação esquemática das etapas de síntese do material vítreo preparado pelo método sol-gel em meio ácido.

Após sintetizados, os materiais foram processados em um moinho de bolas a 30 rpm na presença de isopropanol por 48 h. Após este período, as suspensões resultantes foram centrifugadas, o sobrenadante foi retirado e os materiais foram secados a 60 °C. Na sequência foram desaglomerados utilizando um almofariz e pistilo e passados através de uma peneira ($\leq 300 \mu\text{m}$, Tylor mesh 48). Os pós moídos foram então nomeados como “nBG” e “nBGC” para as amostras sintetizadas por fusão e por sol-gel, respectivamente.

4.1.2 - Síntese do PNVCL

A síntese dos polímeros de PNVCL foi feita com base nos procedimentos descritos por SALA et al.⁵¹ via polimerização do monômero N-vinilcaprolactama (NVCL $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich) utilizando o iniciador 2,2'-azobisisobutironitrila (AIBN) na presença de solvente. O mecanismo proposto para essa reação encontra-se na Figura 4.3.

Antes de sua utilização, o iniciador foi recristalizado em metanol anidro (Synth) a 60 °C, filtrado a quente através de um papel de filtro de lenta filtração. Em seguida, a solução resultante foi estocada em freezer a -6 °C por 4 dias para precipitação dos cristais de AIBN. Ao final deste tempo, os cristais foram separados da solução por filtração a frio, secados com N₂ e estocados em um recipiente fechado dentro de um freezer até sua utilização. As sínteses foram realizadas em um sistema fechado sob atmosfera de N₂ e agitação magnética a 70 °C por 4 h. O iniciador solubilizado no solvente a uma concentração de 1,4% (m/m) foi adicionado por gotejamento à solução contendo o monômero a 25% (m/m) dentro do sistema durante os primeiros 10 minutos de reação. Três diferentes solventes foram empregados nas sínteses de PNVCL: álcool etílico (99,8%, Synth), acetato de etila (P.A. grande ACS, Synth) e dimetilsulfóxido (DMSO, P.A. grade ACS, Synth). Ao final de 4 h de reação, as soluções resultantes foram resfriadas até a temperatura ambiente e submetidas a diálise em água ultrapura por 5 dias para a retirada de monômeros e iniciador residuais

utilizando membranas de celulose (MWCO 3,500D, Fisherbrand®). Após purificados, os polímeros foram secos em estufa a 60 °C.

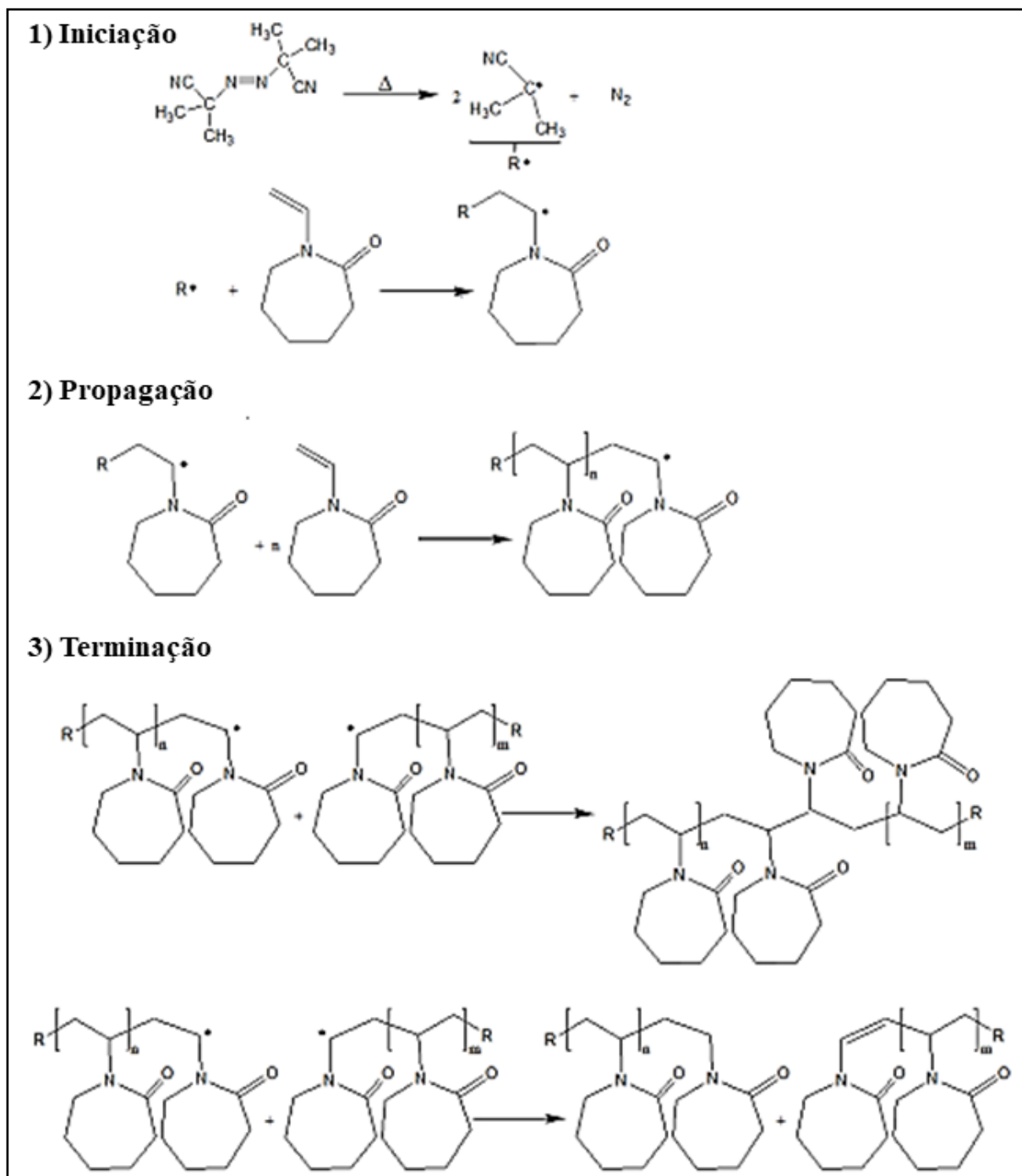


FIGURA 4.3 – Etapas do mecanismo proposto para a polimerização via radical livre de N-vinilcaprolactama utilizando o iniciador AIBN. Fonte: adaptado referência ⁵¹.

4.1.3 - Preparação dos hidrogéis contendo as partículas vítreas

Os hidrogéis de PNVCL foram preparados pela adição do polímero a 20% (*m/v*) em água, tampão fosfato-salino (PBS) ou meio de cultura celular dependendo do experimento realizado. Após a adição, as soluções foram estocadas *overnight* a 4 °C para a formação dos hidrogéis. No dia seguinte, os hidrogéis resultantes foram homogeneizados com o auxílio de um agitador do tipo vórtex e em seguida caracterizados por diferentes técnicas a 37 °C.

Os hidrogéis a 20% (*m/v*) contendo os vidros sintetizados tal como descrito anteriormente (Item 4.1.1) foram obtidos pela simples mistura física das partículas ao hidrogel. Para tanto, os materiais vítreos em pó foram adicionados junto ao polímero nas soluções, estocados, homogeneizados e caracterizados tal como foi feito para o PNVCL puro. Os vidros foram empregados nas concentrações de 5, 10 e 15% *m/m* em relação a massa de PNVCL, correspondendo, respectivamente, a 10, 20 e 30 mg mL⁻¹ dos materiais vítreos em pó nas formulações. As amostras de hidrogéis compósitos foram nomeadas com as siglas “PN-nBG-x” e PN-nBGC-x”, para as formulações com os materiais nBG e nBGC, respectivamente. Nessas siglas o “x” representa a porcentagem de partículas adicionadas (5, 10 ou 15%).

4.2 - Caracterizações

4.2.1 - Difração de Raios X (DRX)

A microestrutura dos materiais vítreos foi analisada por DRX a fim de confirmar a natureza amorfa e/ou verificar a presença de possíveis fases cristalinas. As análises foram feitas para os materiais na forma de pó utilizando um difratômetro Rigaku DMax 2500 PC (Japan) operando a 40 kV e 150 mA, com radiação K α do elemento Cu no intervalo de 2θ entre 10-70° e na velocidade de 2° min⁻¹.

4.2.2 - Fluorescência de Raios X (XRF)

A análise da composição elementar dos materiais vítreos na forma de pó foi determinada por espectroscopia de XRF utilizando um espectrofotômetro MiniPaI4 PANalytical. Os resultados em % atômica foram empregados para o cálculo da composição química no sistema quaternário $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$.

4.2.3 - Espectroscopia na Região do Infravermelho

As análises de espectroscopia na região do infravermelho foram obtidos por um espectrofotômetro de Infravermelho Médio com Transformada de Fourier modelo Vertex 70, Bruker (Germany). Os materiais vítreos na forma de pó e em corpos de prova foram analisados com 48 scans, resolução de 4 cm^{-1} e com o eixo y em transmitância (%). Os polímeros de PNVCL contendo os materiais vítreos na forma de filmes foram analisados com 32 scans, resolução de 4 cm^{-1} e com o eixo y em reflectância (%). Ambas as análises foram obtidas empregando o acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR) com cristal de diamante.

4.2.4 - Espectroscopia na Região do UV-Vis

Para verificar a transição sol-gel termossensível dos hidrogéis de PNVCL puros, soluções em água (1% *m/v*) foram analisadas quanto a transmitância (%) na região de 200-800 nm em um espectrofotômetro Shimadzu com controle de temperatura. As análises foram feitas coletando espectros a cada $0,5\text{ }^\circ\text{C}$ no intervalo de temperaturas de 30 a $37\text{ }^\circ\text{C}$ e com 3 min de estabilização para cada temperatura. A LCST foi então definida como a temperatura em que a transmitância de cada solução atingiu 50% do seu valor inicial⁵⁷.

4.2.5 - Fisissorção de Nitrogênio

A área específica ($\text{m}^2\text{ g}^{-1}$) dos materiais vítreos na forma de pó foi determinada por meio da técnica de fisissorção de N_2 aplicando-se o modelo de

BET^{71,72}. As isotermas de adsorção foram obtidas a 77 K utilizando um equipamento ASAP 2020 para as amostras previamente mantidas por 24 h sob vácuo a 150 °C para remoção de gases fisissorvidos.

4.2.6 - Medidas de Potencial Zeta (ζ)

As medidas de Potencial Zeta foram realizadas para os materiais vítreos na forma de pó a fim de avaliar a magnitude de atração ou repulsão entre as partículas em suspensão a um pH próximo ao fisiológico. Para isso, as suspensões foram preparadas adicionando os pós em tampão fosfato salino (PBS, pH = 7,40) na concentração de 100 mg mL⁻¹. Essas suspensões foram então diluídas 100 vezes em água ultrapura resultando em valores de pH ~7,00. Na sequência, três medidas consecutivas foram obtidas a temperatura de 37 °C para cada amostra ($n = 3$) utilizando um equipamento Zetasizer Malvern NanoZS Zen3600.

4.2.7 - Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

A distribuição numérica (%) do diâmetro hidrodinâmico das cadeias de PNVCL em PBS na concentração de 1% (m/v) e a 25 °C foram feitas utilizando um equipamento Zetasizer Malvern NanoZS Zen3600. O diâmetro hidrodinâmico médio foi obtido para $n = 3$.

4.2.8 - Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES)

A determinação dos elementos Na, K, Mg, Ca, P e S nas soluções de SBF (acrônimo do inglês para Solução Simuladora do Fluido Corpóreo) preparadas de acordo com o Protocolo de Kokubo²⁴ foi feita pela técnica de ICP OES para as soluções antes e após o testes *in vitro*. Utilizou-se um espectrômetro iCAP 6000 (Thermo Fisher, USA) aplicando os modos axial e radial, e argônio (99,996%, White Martins-Praxair, Sertãozinho, SP, Brasil).

4.2.9 - Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução (MEV-FEG)

As imagens de microscopia dos materiais vítreos em pó e dos corpos de prova após a imersão em SBF foram feitas utilizando um microscópio Philips XL 30 FEG para as amostras previamente recobertas com uma fina camada de ouro. Essas análises foram feitas para a observação da morfologias dos pós moídos e para a obtenção de uma distribuição de tamanhos de partículas que foi feita com o auxílio do software ImageJ ⁷³. A análises dos corpos de prova teve como objetivo investigar a formação de HCA na superfície das amostras após os testes de mineralização *in vitro*.

4.2.10 - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (¹³C-RMN)

Análises de RMN de ¹³C qualitativo no estado líquido foram feitas utilizando um Espectrômetro Bruker Avance III 9,4 T (Oxford). Para a obtenção dos espectros, o polímero foi dispersado em 2,5 mL de clorofórmio. Usou-se um tempo de aquisição de 0,1 s e de relaxação de 0,55 s, no modo acoplado e com transferência de NOE (Efeito Overhauser Nuclear). As análises foram conduzidas a temperatura ambiente e clorofórmio deuterado (CDCl₃) como substância de referência.

4.2.11 - Análise Térmica Diferencial simultânea (DTA-TGA)

Análises de DTA-TGA foram conduzidas para amostra na forma tal como sintetizada (gel seco) pela rota sol-gel para investigar os eventos térmicos relacionados a eliminação de resíduos e estabilização da matriz vítrea. Utilizou-se um equipamento Netzsch STA-409 Cell, cadinho de óxido de alumínio e atmosfera oxidante com fluxo de 50 mL min⁻¹. As amostras foram aquecidas da temperatura ambiente até 1300 °C a uma taxa de 5 °C min⁻¹.

4.2.12 - Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

As análises de DSC foram feitas para o PNVCL. Para a determinação da temperatura de transição vítrea dos polímeros (T_g), utilizou-se um equipamento NETZSCH modelo DSC 204 Phoenix, cadinho de alumínio e atmosfera inerte de N_2 com fluxo de 20 mL min^{-1} . As análises foram conduzidas em dois ciclos consecutivos entre 10 e $250 \text{ }^\circ\text{C}$ com taxa de aquecimento/resfriamento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ para a retirada de moléculas de água retidas no polímero e que possuem um efeito plastificante alterando o valor da T_g ⁵⁰. Sendo assim, levou-se em conta o segundo ciclo de medida para a determinação da T_g que foi definida como a temperatura no ponto de interseção da extrapolação da curva de DSC nas temperaturas inicial e final do evento de transição vítrea. A análise isotérmica a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ do hidrogel de PNVCL a 20% (m/v) foi feita em um equipamento DSC 203 F3–Maia (Netzsch) em cadinho de alumínio e sob atmosfera de ar sintético com fluxo de 50 mL min^{-1} por um período de 30 minutos.

4.2.13 - Termogravimetria (TGA)

A análise da degradação térmica do PNVCL foi acompanhada por termogravimetria utilizando um analisador termogravimétrico simultâneo TGA-DSC (SDT 650, TA Instruments) operando a $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ da temperatura ambiente até $800 \text{ }^\circ\text{C}$, utilizando um cadinho de óxido de alumínio e atmosfera de ar sintético a 50 mL min^{-1} . As temperaturas inicial e final do principal evento de degradação foram obtidas pela interseção da extrapolação da curva da massa inicial com a tangente da inclinação máxima da curva de TGA e desta com a extrapolação da curva ao final do evento.

4.2.14 - Reologia

O estudo do comportamento viscoelástico dos hidrogéis de PNVCL com e sem partículas foi feito em regime oscilatório utilizando um Reômetro de Placas Paralelas (MCR 305, Anton Paar). As análises foram conduzidas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ na

frequência de 1 Hz e distanciamento de 1 mm entre as placas paralelas. Os ensaios de varredura de tempo e de frequência angular foram feitos com 10% de deformação.

4.3 - Ensaios *in vitro*

4.3.1 - Mineralização *in vitro*

A investigação da bioatividade *in vitro* foi feita para os materiais vítreos em pó compactados em corpos de prova seguindo as diretrizes do Protocolo de Kokubo. Os corpos de prova foram imersos na solução de SBF a 37 °C por até cinco dias. Para verificar a formação de HCA, micrografias dos corpos de prova e espectros de IR foram obtidos de acordo com os Itens 4.2.9 e 4.2.3, respectivamente. O pH das soluções de SBF foi monitorado em intervalos de 24 h, e a troca dessa solução foi feita a cada 48 h.

4.3.2 - Atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus*

A propriedade antimicrobiana dos materiais vítreos foi avaliada para a bactéria gram-positiva *S. aureus*. Extratos do meio de cultivo foram obtidos pela incubação do meio com diferentes concentrações dos pós (12,5 – 100 mg mL⁻¹). Para isso, o meio estéril LB (meio Luria/Miller, Carl Roth, Germany) contendo os pós foi incubado a 37 °C por 24 h. Ao final, os extratos resultantes foram centrifugados e o sobrenadante coletado. Paralelamente, a inoculação da bactéria no meio de cultura foi feita *overnight* e, em seguida, a densidade óptica da suspensão resultante foi ajustada para o valor de 0,015. Alíquotas da suspensão bacteriana foram então adicionadas aos extratos coletados e ao meio LB puro como grupo de controle. Após incubação a 37 °C por 24 h, os extratos foram homogeneizados e alíquotas de 100 µL foram adicionadas a placa de 96 poços ($n = 4$) para medidas de densidade óptica a 600 nm utilizando um microleitor de placas (PHOmo, anthos Mikrosysteme GmbH, Germany). Os resultados

apresentados representam os valores médios obtidos entre dois experimentos independentes.

4.3.3 - Estudos de citocompatibilidade por ensaio indireto

4.3.4 - Cultivo das células

Os ensaios de citotoxicidade foram feitos empregando a linhagem celular de osteosarcoma humano MG-63, um carcinoma maligno. Essa escolha foi feita com base na taxa de crescimento e na facilidade de manuseio oferecida pela linhagem em comparação a outras células ósseas e, dessa forma, permitindo a investigação de um grande número de amostras. O crescimento em monocamada das células foi feito em frascos de cultura de 75 cm² com pescoço inclinado (Greiner-Bio One) em meio de cultura (DMEM Gibco) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS, Sigma-Aldrich) e 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina (Pen Strep, Sigma Aldrich). As células foram incubadas no meio a 37 °C e atmosfera controlada com 5% de CO₂ para atingirem confluência entre 70-90% (~48 h). Na sequência, o meio de cultura foi descartado, as células foram lavadas com PBS (Gibco), seguido da adição de tripsina/EDTA (Life Technology) para promover o desprendimento das células da parede do frasco de cultura. A contagem do número de células foi feita em um hemocítmetro pela adição de azul de tripan (Sigma-Aldrich) em PBS (1:1). Suspensões de células com concentração de 1,0 ×10⁵ ml⁻¹ foram obtidas pela diluição com meio de cultura, e alíquotas de 100 µL das suspensões foram em seguida adicionadas a placas de 96 poços seguido de incubação *overnight* a 37 °C para a formação de uma monocamada de células nas placas de poços.

4.3.5 - Preparação dos extratos

A citocompatibilidade com as células foi avaliada pelo ensaio indireto seguindo as diretrizes da ISO 10993-5 de 2009 (Parte 5, testes de citotoxicidade *in vitro*) da qual trata da avaliação biológica de dispositivos biomédicos. Com

base nesta normativa foram feitas as seguintes adaptações: (i) a extração foi feita a 72 h de incubação dos extratos a 37 °C a fim de investigar o efeito da dissolução das partículas vítreas nas condições fisiológicas e compará-las com os resultados da extração a 24 h (item 4.2.3.2 da normativa), e (ii) o grupo controle consistiu em meio DMEM completo submetido as mesmas condições dos extratos do meio de cultura porém sem exposição aos biomateriais (itens 3.2 e 3.4 da normativa). Para tal, os extratos do meio de cultura DMEM completo foram obtidos pela incubação com os materiais por 24 e 72 h para a investigação da liberação de substâncias em diferentes tempos. A razão entre a área dos hidrogéis e o volume dos extratos foi mantida constante e igual a 1 cm² mL⁻¹. Para a preparação dos extratos, o PNVCL puro ou com partículas vítreas foi adicionado ao meio de cultura nas concentrações de 20% (m/v) e 10-30 mg mL⁻¹, respectivamente, e estocado a 4 °C *overnight* para promover a hidratação do polímero. Na sequência, os hidrogéis foram homogeneizados com o auxílio de um agitador do tipo vórtex, em seguida aquecidos a 37 °C para induzir a transição sol-gel nos hidrogéis, e consecutiva adição de meio de cultura. Após a incubação por cada período de tempo, o meio de cultura sobrenadante foi extraído e adicionado as placas de poços contendo as células previamente cultivadas de acordo com o Item 4.3.4 e incubadas por 24 h. Para o grupo controle as células foram incubadas apenas com meio de cultura DMEM completo. Todas as amostras foram previamente esterilizadas em luz ultravioleta por 30 min antes da preparação dos materiais para os ensaios.

4.3.6 - Avaliação da citotoxicidade

A atividade celular foi detectada utilizando o kit WST-8. Subsequente a incubação, os extratos foram removidos, as células lavadas em PBS e 100 µL da solução de WST-8 1% v/v (em meio de cultura DMEM completo e livre de vermelho de fenol) foi adicionado. Após incubação por 3 h, a absorbância (Abs) de cada grupo ($n = 4$) foi medida em um microleitor de placas a 450 nm. Os

resultados apresentados representam a média obtida entre dois experimentos independentes. A absorbância do grupo controle foi considerada como viabilidade de 100%, enquanto a solução de WST-8 foi medida como branco. Assim, a viabilidade celular relativa (V_{RELATIVA}) foi calculada da seguinte forma:

$$V_{\text{RELATIVA}} = \frac{\text{Abs}(\text{amostra}) - \text{Abs}(\text{branco})}{\text{Abs}(\text{controle}) - \text{Abs}(\text{branco})}$$

A morfologia celular foi observada para as células vivas coradas com calceína (éster acetoximetílico, Calcein-AM Invitrogen) e para as células fixas coradas com DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol, Invitrogen). Após incubação das células com os extratos, os extratos foram removidos, os poços lavados em PBS e, em seguida, foi adicionada a solução de calceína a qual foi preparada de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, as soluções foram removidas, os poços novamente lavados com PBS e, na sequência, uma solução fixadora a base de paraformaldeído foi adicionada aos poços por um período de 15 min e, na sequência, descartada. Os poços foram então lavados mais uma vez em PBS, e uma solução de DAPI preparada de acordo com as instruções do fabricante foi adicionada aos poços por 10 min. Ao final, essa solução foi removida e os poços mantidos em PBS para a obtenção de imagens utilizando um microscópio de fluorescência Axio Scope A.1 (Carl Zeiss Microimaging, GmbH Germany).

4.3.7 - Análise estatística

A análise estatística dos resultados dos ensaios de bactéria e de citocompatibilidade foi feita pela análise de variância ANOVA com teste de Tukey utilizando o software Origin. As significâncias estatísticas foram determinadas para $p < 0,05$ e $p < 0,01$, e as barras de erro representam o desvio padrão do valor médio.

5 - Discussão dos resultados

5.1 - Materiais vítreos

O material inorgânico na forma tal como sintetizado pelo método sol-gel consiste em um gel seco cujo difratograma é apresentado na Figura 5.1. Este gel exibiu uma fase residual de NaNO_3 (JCPDS 89-2828), a qual foi identificada em outros trabalhos e é observada em sínteses que empregam precursores contendo nitratos⁷⁴⁻⁷⁶. Uma possível explicação para a formação desta fase pode ser feita a partir da menor solubilidade exibida pelo nitrato de sódio no meio reacional em comparação ao de cálcio promovendo a precipitação preferencial de NaNO_3 após a secagem do gel. A fim de acompanhar o processo de degradação com entrada de Na^+ na estrutura e eliminação do nitrato, o gel seco foi tratado em temperaturas no intervalo de 600-700 °C por 3 h e os difratogramas destas amostras estão na Figura 5.1. Como pode ser observado, a fase de NaNO_3 passa a ser eliminada a partir do tratamento a 650 °C, valor acima da temperatura de cristalização deste vidro tal como evidenciado pela presença de vários sinais de difração nas amostras 650-3h e 700-3h. As fases identificadas nessas amostras correspondem a silicatos de cálcio e sódio, nomeadas $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_2\text{O}_7$ (JCPDS 10-0016), $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ (JCPDS 79-1087), $\text{Na}_2\text{CaSi}_3\text{O}_8$ (JCPDS 12-0671), e uma fase de fosfato de cálcio e sódio (NaCaPO_4) (JCPDS 76-1456). Estas estruturas foram encontradas por diversos outros autores pela cristalização de vidros do sistema quaternário SiO_2 - CaO - Na_2O - P_2O_5 em tratamentos térmicos sob temperaturas ≥ 600 °C⁷⁴⁻⁷⁸. É importante mencionar que o tratamento térmico em temperaturas a partir de 600 °C é necessário para promover a estabilização da rede de sílica no vidro bioativo. Sendo assim, a fim de complementar o entendimento deste processo, as transformações do gel em função da temperatura foram acompanhadas por análises de TGA-DTA e os resultados são apresentados na Figura 5.2 e na Tabela 5.1.

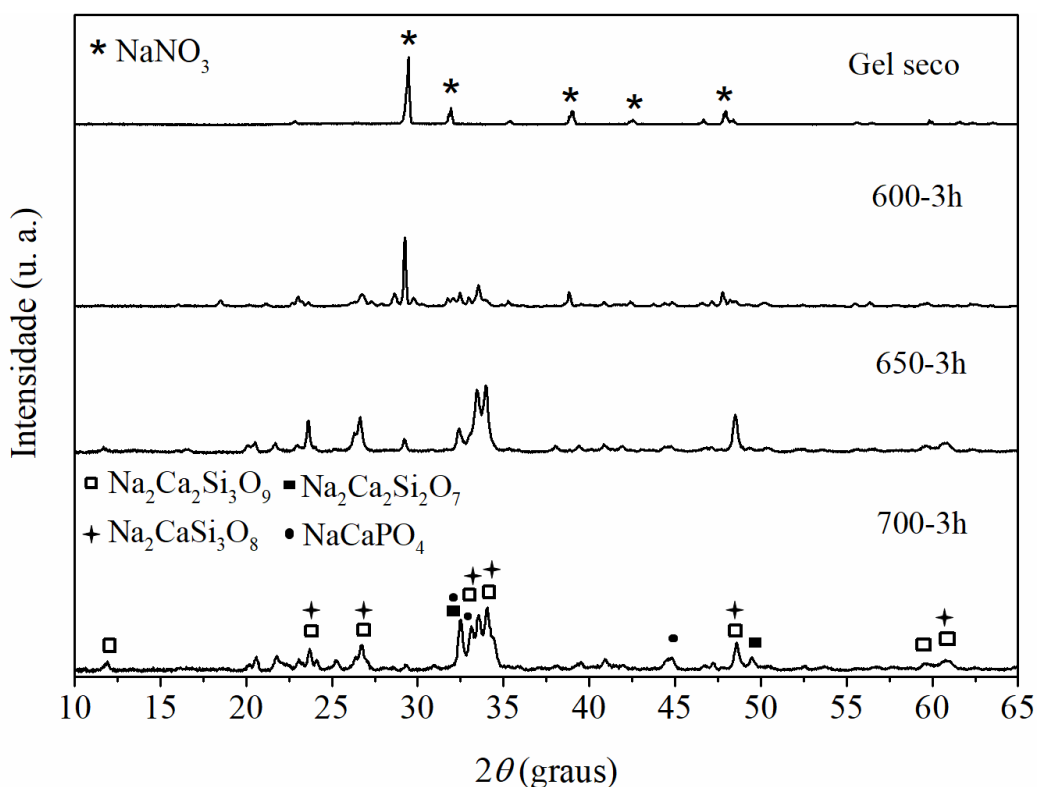


FIGURA 5.1 – Difractogramas do material tal como sintetizado pelo método sol-gel (Gel seco) e submetido a diferentes temperaturas por 3 h.

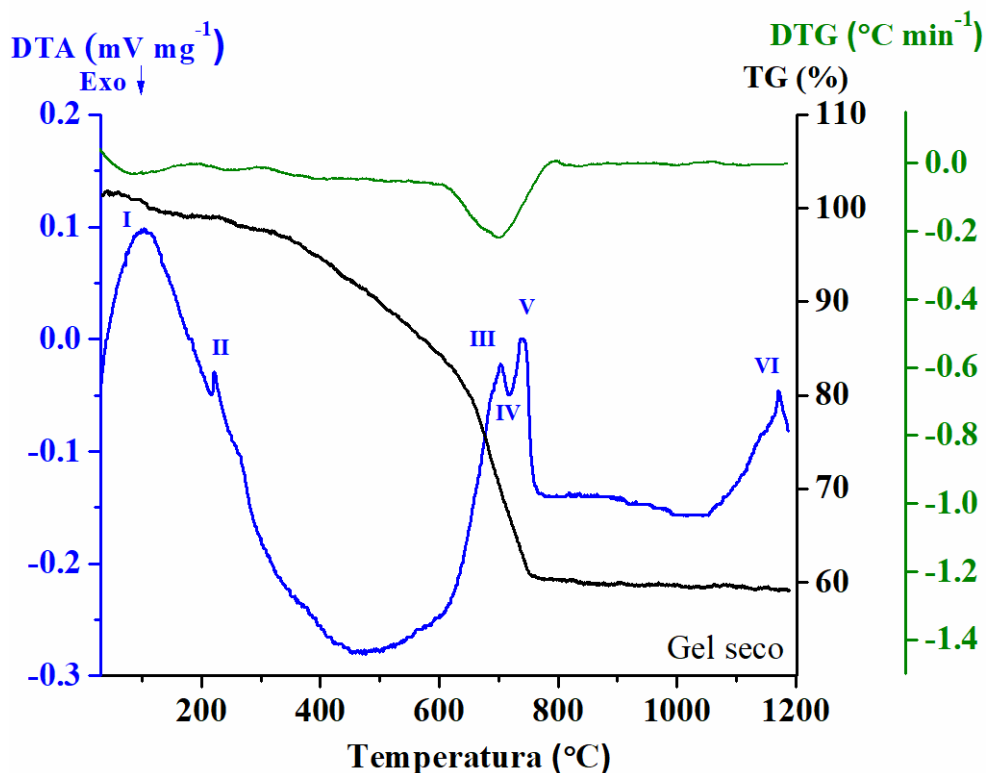


FIGURA 5.2 – Análise térmica diferencial (TGA-DTA) do material tal como sintetizado (Gel seco) preparado pelo método sol-gel.

A partir da curva de DTA (Figura 5.2), é possível observar cinco eventos endotérmicos, são eles (I) relacionado a saída de água e etanol dos poros da rede de sílica, (II) evento invariante em massa ~ 220 °C atribuído a fusão de citrato de cálcio ⁷⁹, uma vez que o ácido cítrico foi empregado na síntese e possivelmente encontra-se na forma de citrato. Os eventos III e V no intervalo de 600-780 °C representam uma perda de 25% em massa e estão associados a remoção dos resíduos de nitrato e de citrato, e o evento em VI relacionado a fusão das fases cristalizadas no único evento exotérmico identificado (IV). Este evento apresenta um máximo em 719 °C o que evidencia um intenso processo de cristalização nesta temperatura. Resultado similar a este foi verificado por MASSERA et al. ⁸⁰ no qual os autores constataram a cristalização de um vidro sol-gel de composição 45S5 ocorrendo no intervalo de 600 a 715 °C. Os valores de temperatura de cada evento térmico do vidro sol-gel sintetizado neste trabalho estão dispostos na Tabela 5.1.

TABELA 5.1 – Principais eventos térmicos identificados nas análises de TGA-DTA do material tal como sintetizado pelo método sol-gel (Gel seco).

Evento	T_{max} (°C)^a ± SD	Tipo de processo
I	102 ± 3	Endotérmico
II	222 ± 1	Endotérmico
III	706 ± 0	Endotérmico
IV	720 ± 1	Exotérmico
V	739 ± 1	Endotérmico
VI	1175 ± 5	Endotérmico

^a Corresponde a temperatura no ponto máximo do evento térmico. O desvio padrão (SD) foi obtido para $n = 2$ a partir da análise da síntese reproduzida.

Com base nos dados de DTA apresentados e considerando outros trabalhos presentes na literatura, foi estabelecido o tratamento a 700 °C por 20 h como processo padrão no material obtido na síntese sol-gel a fim de garantir a eliminação das fases residuais⁷⁴⁻⁷⁶. É importante ressaltar que embora a análise térmica diferencial evidenciou a presença de citrato, esta fase não foi constatada nos difratogramas.

Após o protocolo da síntese sol-gel estar estabelecido, como também a obtenção do vidro pelo método de fusão, os materiais foram então submetidos a moagem para redução do tamanho de partículas. Essas amostras moídas e na forma de pó foram, respectivamente, nomeadas de “nBG” e “nBGC” para a amostra derivada de fusão e derivada sol-gel. Esses materiais foram utilizados na formulação dos hidrogéis desenvolvidos neste trabalho. A Figura 5.3 apresenta a análise de DRX das amostras nBG e nBGC e confirmam que o resfriamento do material obtido pelo método de fusão foi rápido o suficiente para evitar a cristalização, e que a amostra derivada sol-gel exibe as mesmas fases cristalinas de silicatos e fosfato de cálcio e sódio anteriormente mencionadas.

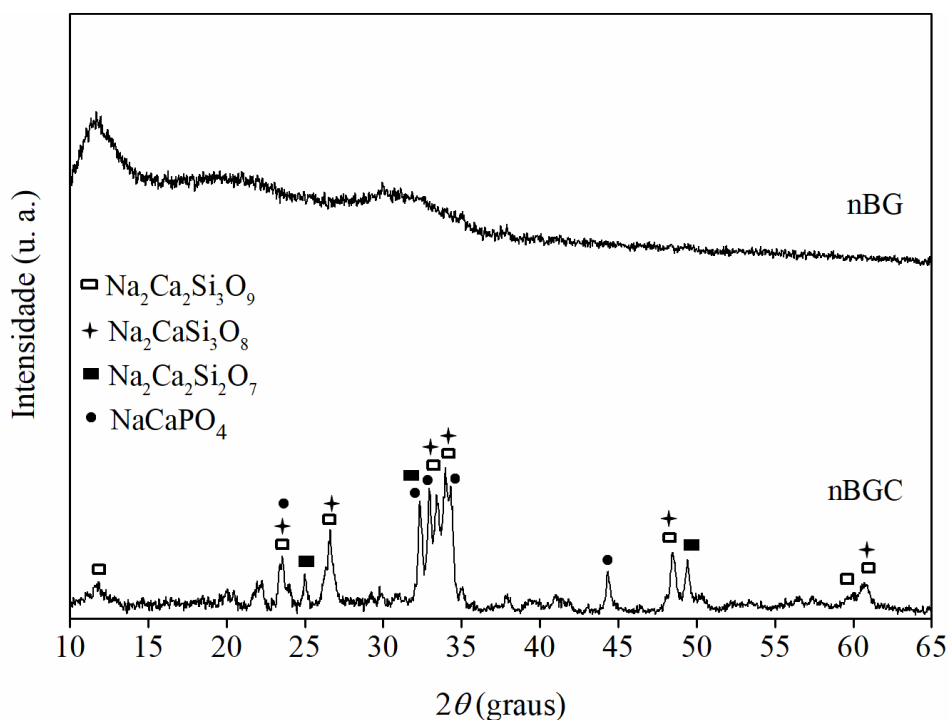


FIGURA 5.3 – Difratogramas dos materiais em pó preparados por diferentes rotas de síntese: fusão (nBG) e sol-gel (nBGC).

Os difratogramas das amostras nBG e nBGC se correlacionam com os espectros de infravermelho (Figura 5.4). A amostra nBGC exibe sinais bem definidos na região de 620-575 cm^{-1} associado aos modos de deformação da ligação P-O em fases de fosfato cristalino ^{81,82}, reforçando a presença de NaCaPO_4 identificada na difração de raios X. Por outro lado, nessa região a amostra nBG exibe apenas uma banda pouco intensa relacionada ao fosfato não-cristalino ^{81,82}. Outra observação neste espectro pode ser feita na região entre 550-400 cm^{-1} , onde a divisão da banda na amostra nBGC indica a presença de silicato cristalino em 520 cm^{-1} , e em 460 cm^{-1} vibrações da ligação Si-O na rede de sílica remanescente nesta amostra ^{76,83}. Outros sinais no intervalo de 1000-880 cm^{-1} estão associados ao estiramento simétrico, a deformação das ligações de Si-O com oxigênios não-ligado (NBO), e ao estiramento assimétrico de NBO, respectivamente ⁷⁶. O estiramento assimétrico de ligações C-O em grupos CO_3^{2-} ~1460 cm^{-1} está relacionado a carbonatação espontânea da superfície das amostras pelo contato com o ar atmosférico ^{84,85}.

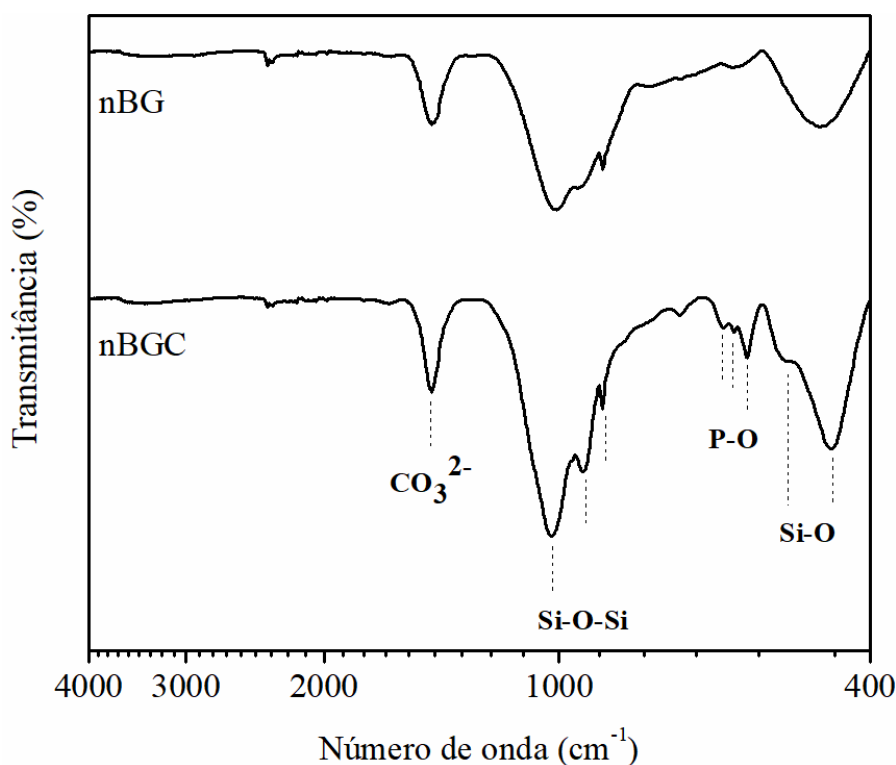


FIGURA 5.4 – Espectros de IR dos materiais em pó preparados por diferentes rotas de síntese: fusão (nBG) e sol-gel (nBGC).

A composição química dos materiais em pó determinada por XRF revela uma composição similar mas não idêntica ao Bioglass 45S5 (Tabela 5.2). A principal diferença observada está na quantidade de sódio com aproximadamente 30 e 35% mais Na₂O nas composições nBG e nBGC, respectivamente. A principal implicação dessa maior quantidade constatada no vidro e na vitrocerâmica preparadas neste trabalho estaria associada a maiores taxas de dissolução em relação ao Bioglass 45S5.

TABELA 5.2 – Composição química por análise de XRF dos materiais em pó preparados por diferentes rotas de síntese: fusão (nBG) e sol-gel (nBGC).

Composição química (% m/m)				
	SiO₂	Na₂O	CaO	P₂O₅
nBG	40,2	34,7	18	7,1
nBGC	39,3	37,3	21,4	2
45S5*	45	24,5	24,5	6

(*) Composição Bioglass 45S5.

Os valores de área específica (m² g⁻¹) obtidas por fisissorção de N₂ para os materiais preparados estão na Tabela 5.3. Esta análise também foi realizada para as amostras antes de serem moídas para fins de comparação. A partir do resultado, é possível notar que ambos os pós vítreos preparados por fusão e por sol-gel exibiram um aumento de área de superfície de cerca de ~95% e ~82%, para as amostras nBG e nBGC, respectivamente, após serem moídos evidenciando que esses materiais apresentaram resposta similar ao procedimento de moagem. Por outro lado, o material derivado do sol-gel (nBGC) apresentou área de superfície mais elevada antes e após o processamento, indicando que este material manteve uma área superior ao preparado por fusão mesmo com a sua cristalização durante o tratamento térmico, processo acompanhado de intensa densificação da estrutura com redução de área^{29,86}. Além disso, comparando os valores entre as amostras

moídas, a nBGC exibiu área específica cerca de 30% superior a nBG. Estes resultados estão em concordância com a literatura de síntese dos vidros bioativos em que o método sol-gel resulta em materiais com características texturais melhoradas^{20,29}.

Medidas de potencial zeta de dispersões em PBS diluído (pH ~7,00) foram realizadas para os pós vítreos preparados neste trabalho (Tabela 5.3). Nota-se que ambas as amostras exibiram um potencial negativo cujo valor relativamente baixo em módulo indica que formam dispersões pouco estáveis. Ao comparar os valores das amostras antes e após a moagem, é possível perceber que houve uma variação significativa para o preparado por sol-gel apresentando maior estabilidade antes da moagem, o que sugere que o material tende a aglomerar após o seu processamento. Além disso, é importante destacar que vidros bioativos com potencial negativo demonstraram acelerar o processo de proliferação de células ósseas em implantes⁸⁷. Isto ocorre pela superfície carregada negativamente favorecer uma rápida fixação de proteínas carregadas positivamente melhorando a adesão de células mesenquimais e osteoblastos⁸⁸.

TABELA 5.3 – Área de superfície empregando a equação BET e potencial zeta dos materiais em pó preparados por diferentes rotas de síntese: fusão (nBG) e sol-gel (nBGC).

Amostra	Área específica (m² g⁻¹)^a	Potencial zeta (mV)^b
nBG		
Sem moagem	0,42	-5,05 ± 0,30
Após moagem	7,8	-3,06 ± 1,6
nBGC		
Sem moagem	2,0	-20,3 ± 1,5
Após moagem	11	-4,93 ± 0,60

As micrografias obtidas por análise de MEV (Figura 5.5) mostram que os materiais vítreos são compostos por agregados de partículas submicrométricas de tamanhos similares e exibem uma distribuição de tamanho médio em relação ao comprimento de 392 e 321 nm para nBG e nBGC, respectivamente. É possível notar também que a amostra nBGC apresenta partículas semelhantes a bastonetes e uma distribuição mais fina de tamanho, enquanto a amostra nBG exhibe partículas arredondadas. Em um estudo anterior, foi demonstrado a formação de cristais em forma de bastonetes ocorreu pela cristalização do vidro 45S5 preparado pelo método sol-gel e foram atribuídos aos silicatos de sódio e cálcio cristalizados, tais como a Combeita ($\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$), uma das fases cristalinas identificadas no difratograma da amostra nBGC ⁷⁵. Adicionalmente, a Combeita apresentou excelente osseointegração em estudos *in vivo* em um estudo de PLEWINSKI et al. ⁸⁹

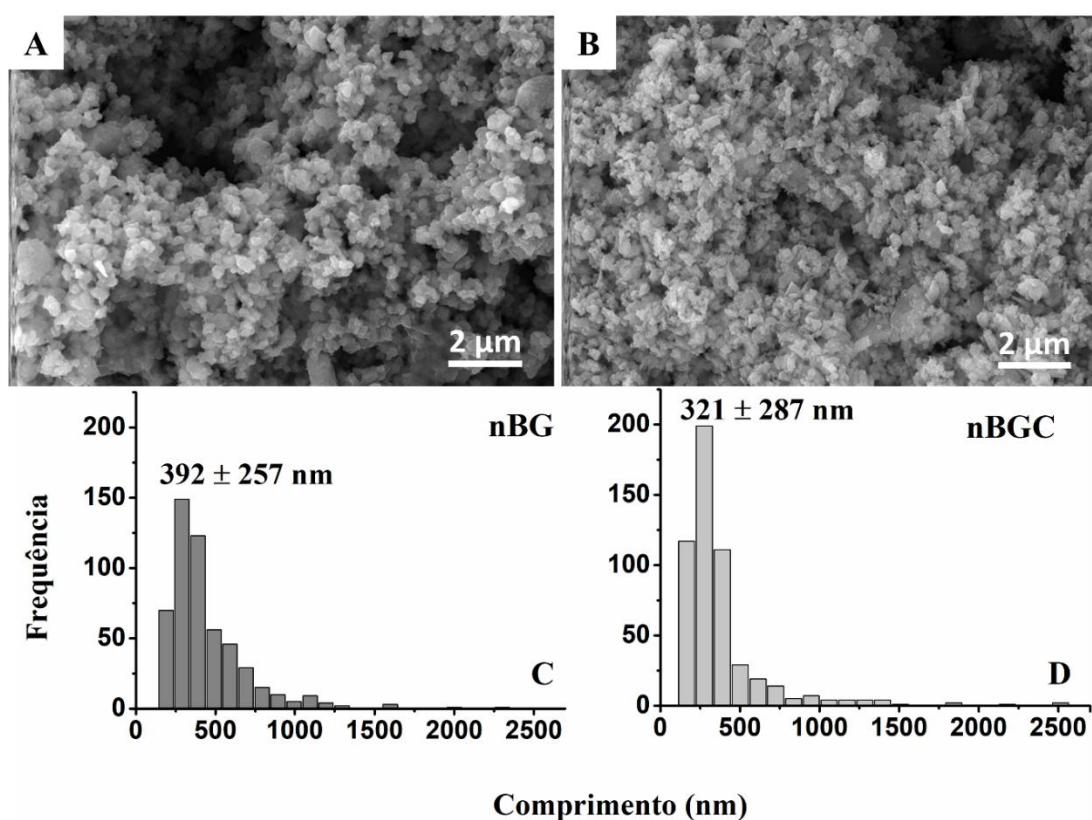


FIGURA 5.5 – Micrografias de MEV e distribuição do tamanho de partículas dos materiais em pó preparados por diferentes rotas de síntese: fusão (nBG, micrografia A) e sol-gel (nBGC, micrografia B).

5.1.1 - Mineralização *in vitro*

Após a investigação das principais características físico-químicas, os materiais vítreos desenvolvidos foram avaliados quanto a atividade de mineralização *in vitro* e propriedade bactericida. Para avaliação da capacidade de mineralização, corpos de prova dos materiais em pó foram preparados seguindo o protocolo de Kokubo e expostos a solução de SBF a 37 °C por até cinco dias ²⁴. As micrografias presentes na Figura 5.6 foram feitas para os corpos de prova após cinco dias de imersão, sendo possível notar a presença de HA em ambas as amostras. Este resultado revela que os materiais desenvolvidos possuem a capacidade de induzir a formação de HA *in vitro* em um curto período de tempo, considerando que vidros bioativos podem apresentar a formação de HA dentro de até um mês ²⁴. Além disso, é possível notar nas micrografias que a amostra nBG apresentou cristais micrométricos de HA (micrografias A-C), enquanto a nBGC cristais nanométricos (micrografias D-F), sugerindo que o grau de mineralização foi distinto em cada amostra. Os espectros de IR para os corpos de prova expostos por 1 e 5 dias reforçam essa ideia (Figura 5.7). Enquanto no primeiro dia de imersão ambas apresentaram espectros semelhantes com o deslocamento dos sinais na região das vibrações de Si-O (~1000-880 cm⁻¹) indicando o início do processo de dissolução, ao quinto dia o surgimento de sinais relacionados a vibração das ligações P-O em fosfatos cristalinos (~602-506 cm⁻¹), estiramento assimétrico de ligações P-O (~1024 cm⁻¹) e a presença de novas bandas de carbonato (1650, 1480-1420 e 800 cm⁻¹) evidenciam a formação de hidroxicarbonato-apatita (HCA) nas amostras. Além disso, o desaparecimento da banda referente a ligação Si-O em 460 cm⁻¹ em nBG reforça a ideia da formação de HCA em maior grau o que correlaciona-se com a observação de cristais em escala micrométrica pelo MEV nesta amostra. Por outro lado, essa diferença na mineralização pode ser explicada pelas diferentes características estruturais exibida pelos materiais, em que a amostra derivada por fusão consiste em um vidro, enquanto a amostra derivada de sol-gel é uma vitrocerâmica. Sabe-se que

devido os vidros estarem em um estado termodinamicamente instável, eles apresentam maiores taxas de formação de HCA em comparação as vitrocerâmicas 19,90.

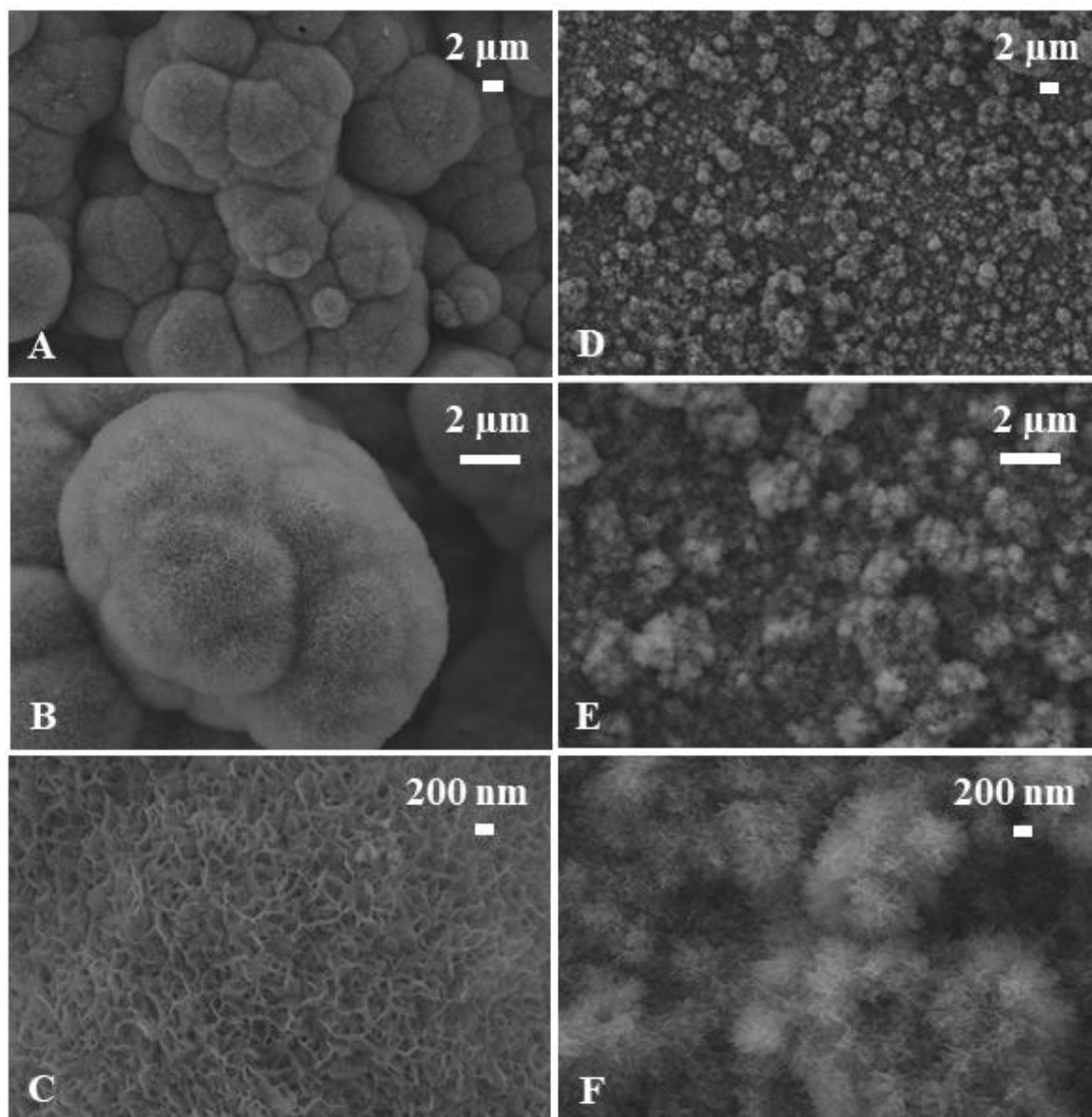


FIGURA 5.6 – Micrografias de MEV dos materiais em pó (corpos de prova) preparados por diferentes rotas de síntese e expostos a solução de SBF por 5 dias a 37 °C: fusão (nBG, micrografias A-C) e sol-gel (nBGC, micrografias D-F).

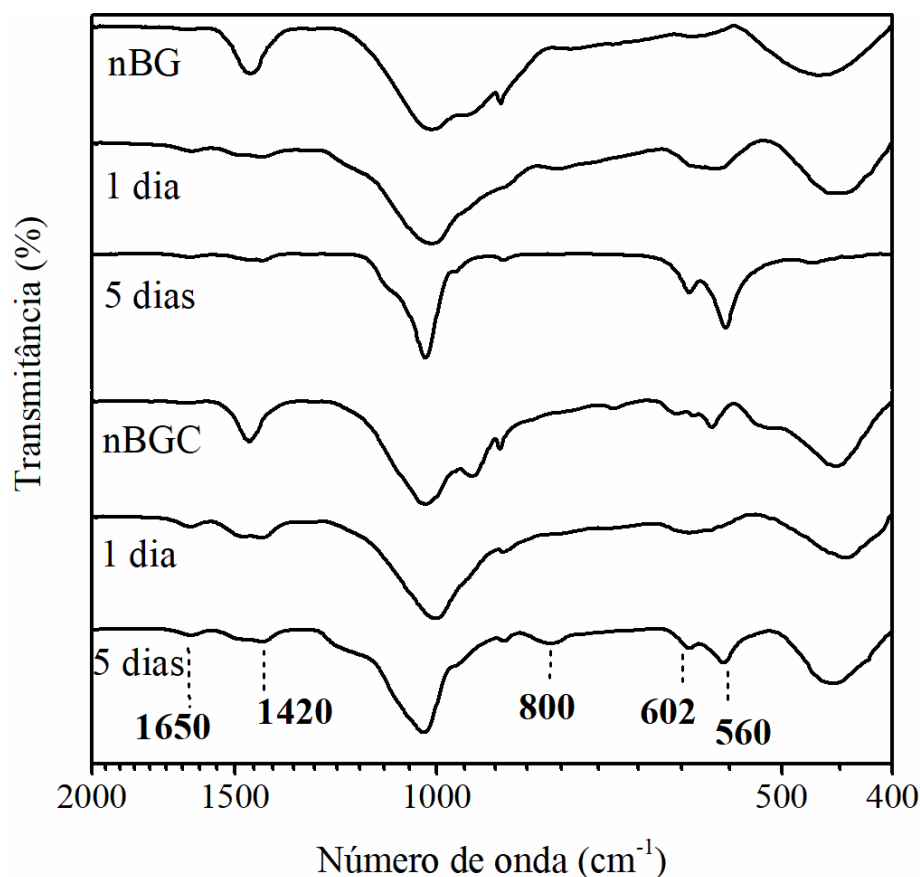


FIGURA 5.7 – Espectros de IR dos materiais em pó (corpos de prova) preparados por diferentes rotas de síntese e expostos a solução de SBF por 0, 1 e 5 dias a 37 °C: fusão (nBG), e sol-gel (nBGC).

Outro importante fator a ser considerado na mineralização é a alteração de pH provocada pelos materiais bioativos em condições fisiológicas. Tal como discutido na Introdução (Item 1.1), vidros e vitrocerâmicas iniciam sua dissolução pela liberação de cátions, tais como Na^+ e Ca^{2+} , com subsequente consumo de H^+ promovendo um aumento local do pH. Entretanto, se o aumento for relativamente alto ($\text{pH} > 8,5$), poderá reduzir a fixação e a estabilidade de proteínas associadas a regeneração óssea, como o colágeno^{91,92}. A Figura 5.8 apresenta o pH medido durante os experimentos de mineralização *in vitro* em função do tempo. Ambas as amostras exibiram perfis similares com a maior variação do pH nas primeiras 24 h seguido de um patamar indicando que os sistemas atingiram a saturação em até 48 h. Após 72 h, observou-se um decréscimo para ambas as amostras em função da substituição da solução de SBF seguido de um novo aumento ao final

de 96 h, mas em menor proporção, e a 120 h ocorreu novamente um decréscimo pela troca da solução de SBF. Com este resultado, pode-se constatar que os materiais vítreos desenvolvidos demonstraram alterações brandas de pH que tendem a reduzir ao longo do tempo, o que está de acordo com as observações de BELLUCCI et al.⁹² em que constatou-se que as variações de pH em SBF induzidas pelo Bioglass 45S5 tendem a estabilizar após três semanas. Por outro lado, a maior variação exibida pela amostra nBGC sugere uma taxa inicial de dissolução mais elevada em comparação a nBG. Esse comportamento pode ser explicado pela maior área de superfície apresentada pela vitrocerâmica aumentando a área de contato do material com a solução e favorecendo a difusão dos íons.

As concentrações de cálcio, fósforo e sódio para os materiais expostos ao SBF foram determinadas por análise de ICP OES (Figura 5.9). A partir desses resultados, nota-se que as concentrações de cálcio nas soluções diferiram significativamente entre as amostras (Tabela 5.4). Enquanto a concentração de cálcio foi reduzida em cerca de 40% na solução em contato com o vidro nBG, foi observado um aumento de cerca de 46% para a vitrocerâmica nBGC. Adicionalmente, ambas apresentaram um aumento na concentração de sódio (~17%) e uma redução de ~ 95% de fósforo nas soluções. As reduções de cálcio e fósforo nas soluções de SBF indicam a formação de HCA. Por outro lado, a maior concentração de cálcio na solução exposta a vitrocerâmica nBGC sugere que este material liberou maior concentração deste cátion do que consumiu, o que pode estar relacionado a pelo menos dois aspectos (i) a vitrocerâmica nBGC apresenta maior quantidade de cálcio em sua composição (12,5%) em relação ao vidro nBG, portanto, pode liberar uma maior quantidade do cátion, e (ii) evidencia a proporção de HCA formada nos materiais, estando a menor concentração de cálcio nas soluções expostas ao vidro nBG associada a um maior grau de mineralização tal como evidenciado pela análise de MEV (Figura 5.6).

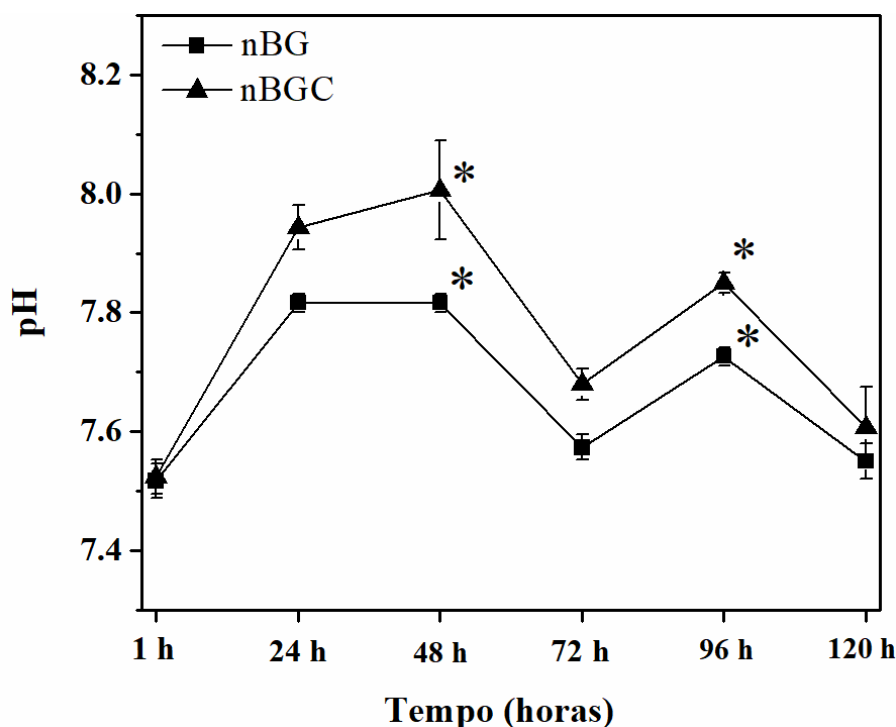


FIGURA 5.8 – Valores de pH das soluções de SBF expostas aos corpos de prova dos materiais em pó preparados por diferentes rotas de síntese: fusão (nBG) e sol-gel (nBGC).

TABELA 5.4 – Concentração em ppm (mg L^{-1}) de cálcio, fósforo e sódio determinados por ICP OES para soluções de SBF expostas aos materiais em pó preparados por diferentes rotas de síntese: fusão (nBG), e sol-gel (nBGC).

Elemento	SBF (ppm)*	nBG (ppm)*	nBGC (ppm)*
Na	3016 \pm 103	3671 \pm 312	3616 \pm 1,8
Ca	83,1 \pm 0,12	49,7 \pm 0,42	154,8 \pm 6,3
P	33,3 \pm 0,02	1,20 \pm 0,067	1,67 \pm 0,062

(*) Desvio padrão para $n = 2$

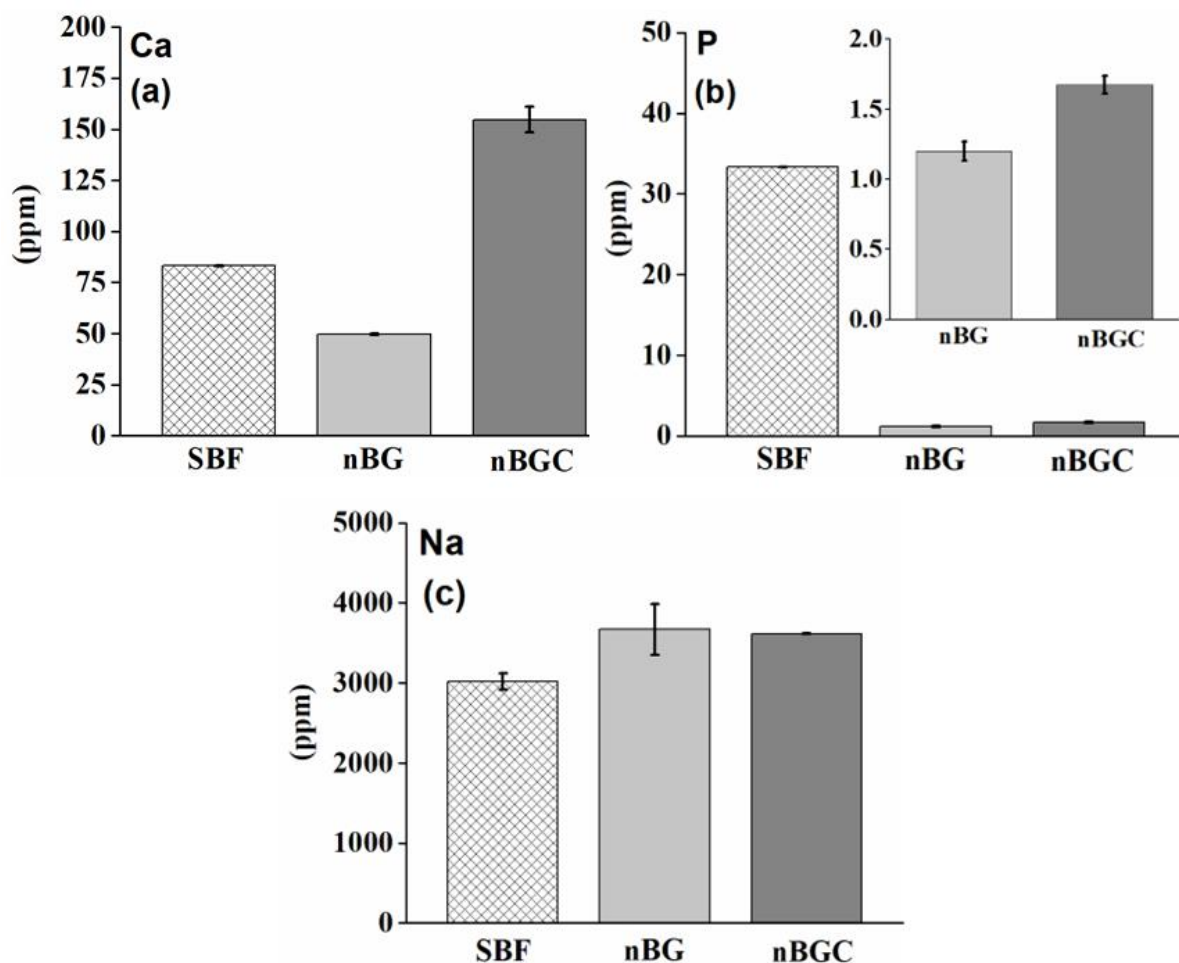


FIGURA 5.9 – Diferentes concentrações de cálcio (a), fósforo (b) e sódio (c) foram determinadas por ICP OES para soluções de SBF expostas aos materiais em pós preparados por diferentes rotas de síntese: fusão (nBG), e sol-gel (nBGC).

5.1.2 - Atividade bactericida

Outra relevante característica de biomateriais a serem utilizados em engenharia tecidual está no desempenho antimicrobial e consequente habilidade desses materiais em prevenir infecções aumentando a taxa de sucesso dos implantes biomédicos⁹³. Sabe-se que alterações na osmolaridade e no pH do meio induzidos pela liberação dos íons dos vidros bioativos pode tornar a membrana das células bacterianas permeáveis permitindo a difusão de cátions do meio para o interior da célula, promovendo assim a morte do patógeno⁷⁶. Tendo isso em vista, os materiais vítreos desenvolvidos neste trabalho foram avaliados quanto a

ação contra a bactéria *Staphylococcus aureus*. Esta bactéria gram-positiva é o principal patógeno oportunista encontrando em ambientes hospitalares e pode gerar infecções no tecido ósseo⁹⁴⁻⁹⁷. Como os vidros bioativos podem apresentar sua atividade antibacteriana pela liberação dos produtos de dissolução, esta propriedade foi avaliada para os extratos obtidos pela exposição do meio de cultivo em contato com diferentes concentrações dos pós vítreos, e os resultados estão na Figura 5.10.

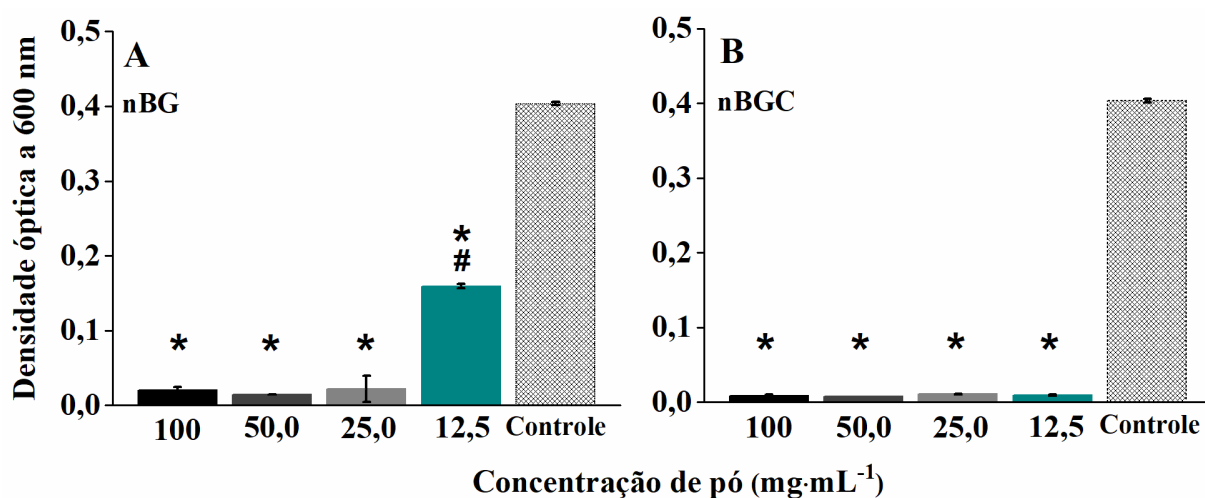


FIGURA 5.10 – Densidade óptica após 24 h para cultura de *S. aureus* inoculada em de meio de cultivo LB previamente exposto por 24 h a diferentes concentrações dos materiais em pó preparados por diferentes rotas de síntese: fusão (nBG), e sol-gel (nBGC). * Indica significância estatística ($p < 0,05$) com relação ao controle, e # significância ($p < 0,01$) entre diferentes concentrações.

Tal como pode ser visto na Figura 5.10, exceto a concentração 12,5 mg mL⁻¹ de nBG, todas as demais promoveram uma redução significativa na densidade óptica dos extratos demonstrando uma efetiva atividade bactericida (> 99,5%) contra *S. Aureus* após a incubação. A amostra nBG a 12,5 mg mL⁻¹ demonstrou um efeito de controle no crescimento bacteriano em 60%. A possível explicação para esta diferença nas atividades entre as amostras a 12,5 mg mL⁻¹ está no valor do pH medido para alíquotas desses extratos: $6,70 \pm 0,01$ (controle) $9,30 \pm 0,07$ (nBG), and $9,72 \pm 0,05$ (nBGC). O maior valor de pH do extrato exposto a

vitrocerâmica nBGC possivelmente favoreceu a atividade bactericida. Em comparação com outros estudos, pode-se citar o trabalho de ZHANG et al.⁹⁸, em que se constatou uma ação bactericida para vidros em concentrações a partir de 50 mg mL⁻¹ para diferentes espécies de bactérias correlacionando-se com um valor de pH ~9,00 como efetivo para inibição. HU et al.⁹⁹, exploraram os efeitos bactericidas do Bioglass 45S5 particulado verificando uma inibição da *S. aureus* (> 98%) para a concentração de 50 mg mL⁻¹ do vidro e com pH do meio superior a 9. Portanto, os materiais nBG e nBGC apresentados neste presente estudo demonstraram uma atividade bactericida superior a outros materiais vítreos relatados na literatura. Por outro lado, essa diferença pode estar associada com as características físico-químicas de cada material tais como tamanho de partículas e composição química.

5.2 - Hidrogéis de PNVCL

A temperatura de transição vítrea (T_g) é uma característica de vidros como já mencionado anteriormente neste trabalho (Sessão 1.1.1), sendo um processo termodinâmico acompanhado de mudanças nas propriedades dos materiais¹⁰⁰. A calorimetria de varredura diferencial (DSC) é uma técnica bastante empregada para a determinação da T_g uma vez que na transição de estados ocorre uma variação da capacidade calorífica (C_p) que é mensurada por uma variação do fluxo de calor na amostra ($W g^{-1}$)¹⁰¹. Nos polímeros amorfos (e em alguns semi-cristalinos) essa transição ocorre com a passagem de um estado amorfo rígido para um estado “borrachoso” com o aumento da elasticidade em decorrência da maior mobilidade molecular das cadeias na T_g ¹⁰². É importante também mencionar que avaliar a T_g pode ser útil para confirmar a obtenção de polímeros, uma vez que os respectivos monômeros não apresentam essa propriedade. Neste trabalho, a síntese do PNVCL foi realizada para três diferentes solventes, são eles etanol (EtOH), acetato de etila (Acetato) e DMSO para a investigação do efeito da variação deste parâmetro nas propriedades finais dos polímeros. Nas Figuras 5.11-13 estão dispostas as curvas de DSC, a partir das quais foi possível identificar os valores de T_g de cada um dos três polímeros, confirmando a formação do PNVCL nas sínteses realizadas com diferentes solventes.

A partir dos valores de T_g , pode-se observar que os polímeros preparados em etanol e DMSO exibem valores próximos entre si (~ 202 °C), enquanto o PNVCL obtido por acetato de etila apresentou um perfil distinto com dois eventos consecutivos de variação em (i) ~ 192 °C, e (ii) ~ 218 °C. Vários fatores podem afetar a T_g nos polímeros, entre os quais pode-se destacar a influência de ligações intermoleculares entre cadeias, fatores estéricos e massa molecular¹⁰⁰. Como no caso deste trabalho os polímeros foram sintetizados sem alteração da estrutura química, por exemplo, pela modificação da cadeia com grupos funcionais alterando o tipo e o grau de interação, ou a disposição das cadeias, espera-se valores de T_g próximos entre as amostras. Por outro lado, diferenças poderiam ser

identificadas a partir de distintas massas moleculares nesses polímeros, uma vez que para promover a mobilidade de cadeias com tamanhos maiores é necessário o fornecimento de uma maior quantidade de energia na forma de calor ¹⁰⁰. Entretanto, esse efeito aumentaria o valor da Tg, sendo a observação de uma segunda temperatura no PNVCL preparado em acetato atribuída a outros fatores. Uma possível explicação pode ser feita pela possibilidade do PNVCL apresentar-se como um polímero semi-cristalino tal como foi sugerido por KOZANOGLU et al. ¹⁰³ em que os autores constataram um grau de orientação cristalográfica no PNVCL por meio de análise de DRX, porém experimentos de DSC não foram explorados no referido estudo. Por outro lado, sabe-se que polímeros semi-cristalinos podem apresentar uma segunda transição definida como Temperatura de Fusão Cristalina (Tm) com ocorrência em valores acima da Tg, o que poderia explicar a presença dos dois intervalos com variação do fluxo no PNVCL sintetizado em acetato ¹⁰⁰. A transição na Tm em polímeros decorre da fusão dos cristalitos em um processo semelhante ao verificado nos sólidos puramente cristalinos ¹⁰⁰. Sendo assim, a presença deste segundo evento poderia indicar diferenças microestruturais no PNVCL sintetizado em acetato com relação aos polímeros preparados em etanol e DMSO.

Outra observação também pode ser feita nas curvas de DSC, mas com relação ao fluxo de calor exibido pelas amostras ao longo de toda varredura. Nota-se que, os polímeros sintetizados em etanol e DMSO apresentam fluxo de calor negativo ao longo de toda a varredura de temperatura. Em termos práticos isso implica que quanto mais negativo foi o valor do fluxo maior foi a quantidade de energia, na forma de potência, necessária para manter o compartimento da amostra e o da referência na mesma temperatura ¹⁰¹. Como a análise por DSC permite relacionar o calor transferido a uma pressão constante (q_p) de uma amostra ou para uma amostra com a capacidade calorífica (C_p) através da relação $q_p = C_p \Delta T$, esta observação pode ser correlacionada diretamente com a capacidade calorífica específica C_p ($J g^{-1} °C^{-1}$) das amostras, parâmetro este que representa a

quantidade de calor necessária para alterar a temperatura de 1 grama da amostra em um grau, a pressão constante ¹⁰⁴. Embora seja um parâmetro macroscópico, C_p está associado ao movimento vibracional molecular e, portanto, as diferenças na magnitude dos fluxos entre as amostras poderia indicar distinções nas estruturas poliméricas a nível microscópico, especialmente em relação ao PNVCL sintetizado em acetato que exibiu valores de fluxo de calor positivos ao longo da medida. Entretanto, estudos adicionais são necessários para verificar as hipóteses levantadas.

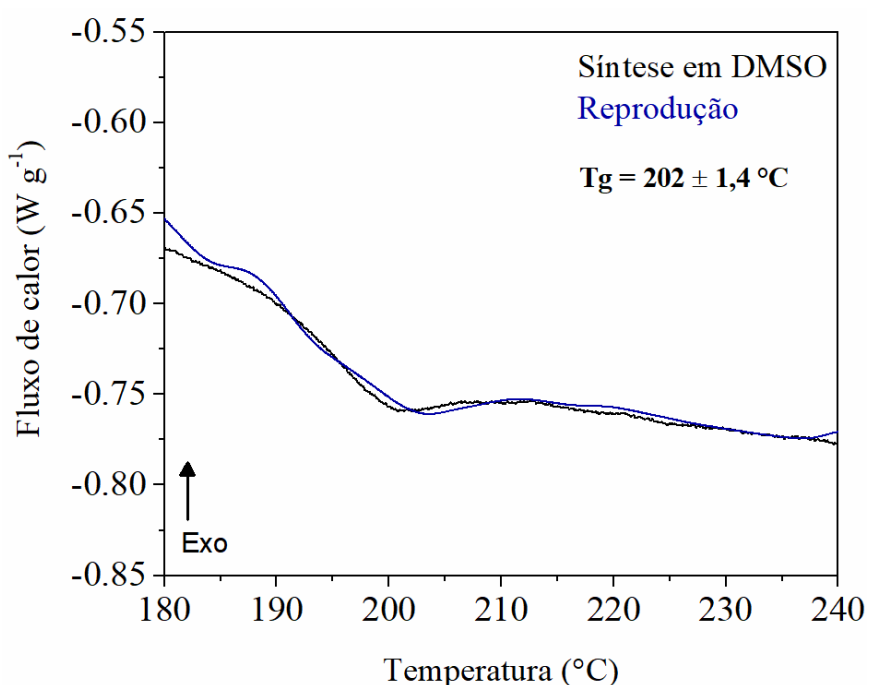


FIGURA 5.11 – Curva de DSC para o PNVCL sintetizado utilizando DMSO como solvente.

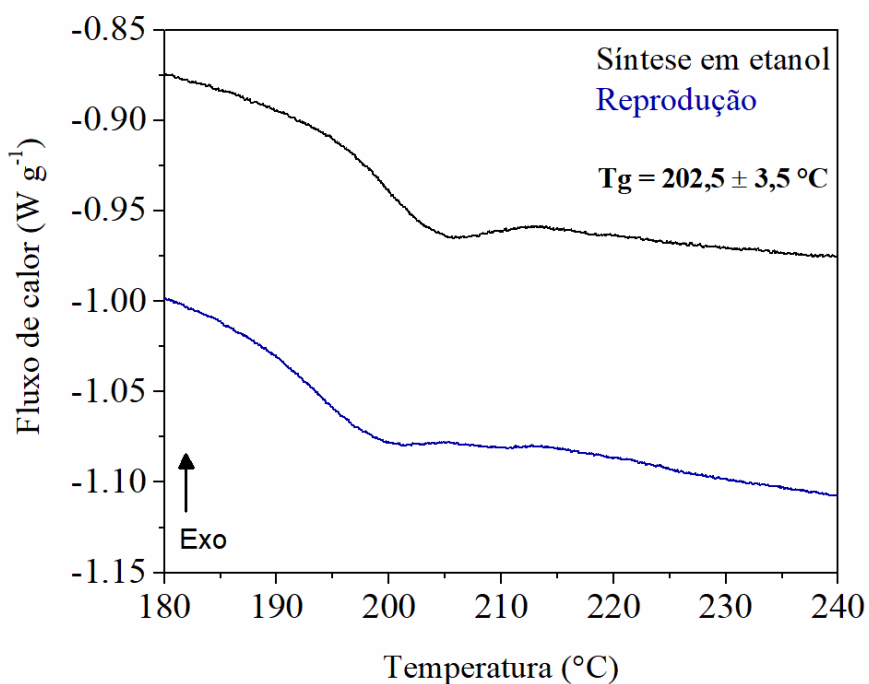


FIGURA 5.12 – Curva de DSC do PNVCL sintetizado utilizando etanol como solvente.

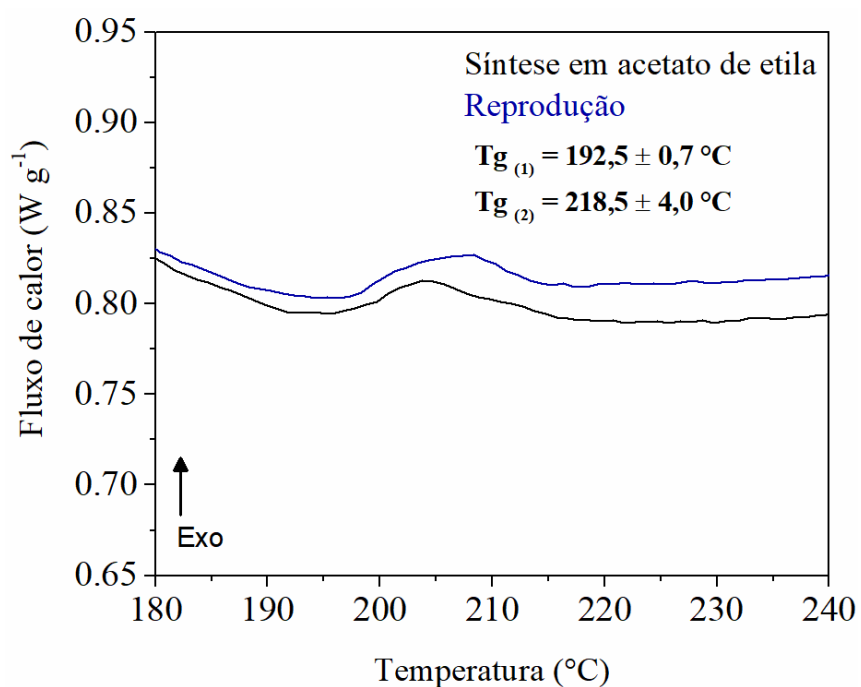


FIGURA 5.13 – Curva de DSC do PNVCL sintetizado utilizando acetato de etila como solvente.

Para acompanhar a transição sol-gel dos polímeros, medidas de transmitância na região do UV-Vis em função da temperatura foram feitas e a

LCST pode ser estimada a partir destas medidas, uma vez que a transição ocorre com a mudança de um estado onde as cadeias estão solvatadas permitindo a passagem de luz, mas ao atingirem temperaturas \geq LCST ocorre agregação tornando o sistema opaco. Como pode ser observado nas Figuras 5.14-16, os três polímeros apresentaram uma transição de estados com temperaturas próximas entre si. Os valores determinados de LCST ($n = 2$) correspondem a $34,0 \pm 1,0$ °C, $33,0 \pm 1,0$ °C e 35 ± 0 °C, para as sínteses em DMSO, acetato de etila e etanol, respectivamente. Este resultado é coerente uma vez que os polímeros apresentam a mesma estrutura molecular. Além disso, alterações de maior amplitude no valor da LCST foram relatadas apenas em copolímeros de PNVCL. VARGAS et al.¹⁰⁵, constatou que a copolimerização de PNVCL com a N-vinilpirrolidona, um monômero de caráter hidrofílico, resultou em um polímero com LCST ~ 38 °C, porém a estrutura contendo o comonômero hidrofóbico acetato de n-hexilo resultou em uma LCST ~ 27 °C, demonstrando que a modificação com diferentes grupos funcionais altera as características de hidrogéis de PNVCL. Por outro lado, estudos anteriores demonstraram que a massa molecular do PNVCL também influencia essas características, mas em menor amplitude, observando-se um deslocamento da LCST para valores maiores com a redução da massa molecular^{54,57}. SALA et al.⁵⁴, sintetizou distintos polímeros (i) PNVCL-L com $\sim 12,9$ kDa e (ii) PNVCL-H com $\sim 142,7$ kDa, constatando-se valores de LCST de 34 e 32 °C, respectivamente, demonstrando que um aumento de 11 vezes na massa molecular média promoveu uma alteração de aprox. 2 °C na temperatura de transição. Portanto, embora as diferenças nos valores de LCST verificadas neste trabalho sejam relativamente pequenas (± 1 °C), isso pode sugerir que os polímeros sintetizados em diferentes solventes exibam distintas massas. De fato, a influência do solvente em reações de polimerização radicalar de compostos vinílicos é conhecida, sendo principalmente relacionada a (1) viscosidade do meio reacional, (2) reatividade do radical de transferência no solvente, e (3) possibilidade de copolimerização com o solvente¹⁰⁶. Esses fatores afetam as taxas de

polimerização o que leva a formação de distintos tamanhos de cadeia. No caso do PNVCL este é um fator a ser considerado pois a massa molecular irá influenciar a temperatura de transição em água. Entretanto, com base nos valores de LCST verificados neste trabalho, os três distintos polímeros preparados apresentam potencial de injeção pois exibem uma transição próxima (e abaixo) da temperatura corpórea.

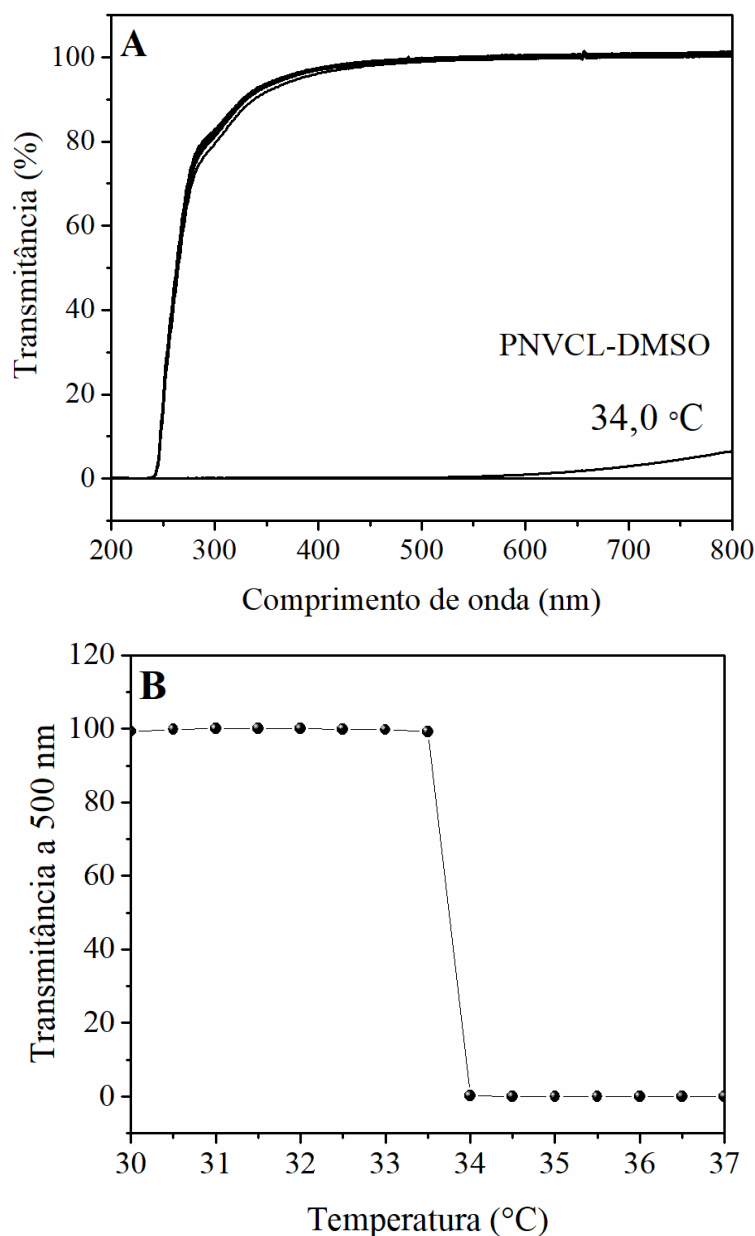


FIGURA 5.14 – Espectro de transmitância no UV-Vis (A), e intensidade da transmitância (em %) medida a 500 nm em função da temperatura (B), para a solução polimérica a 1% (m/v) do PNVCL sintetizado utilizando DMSO como solvente.

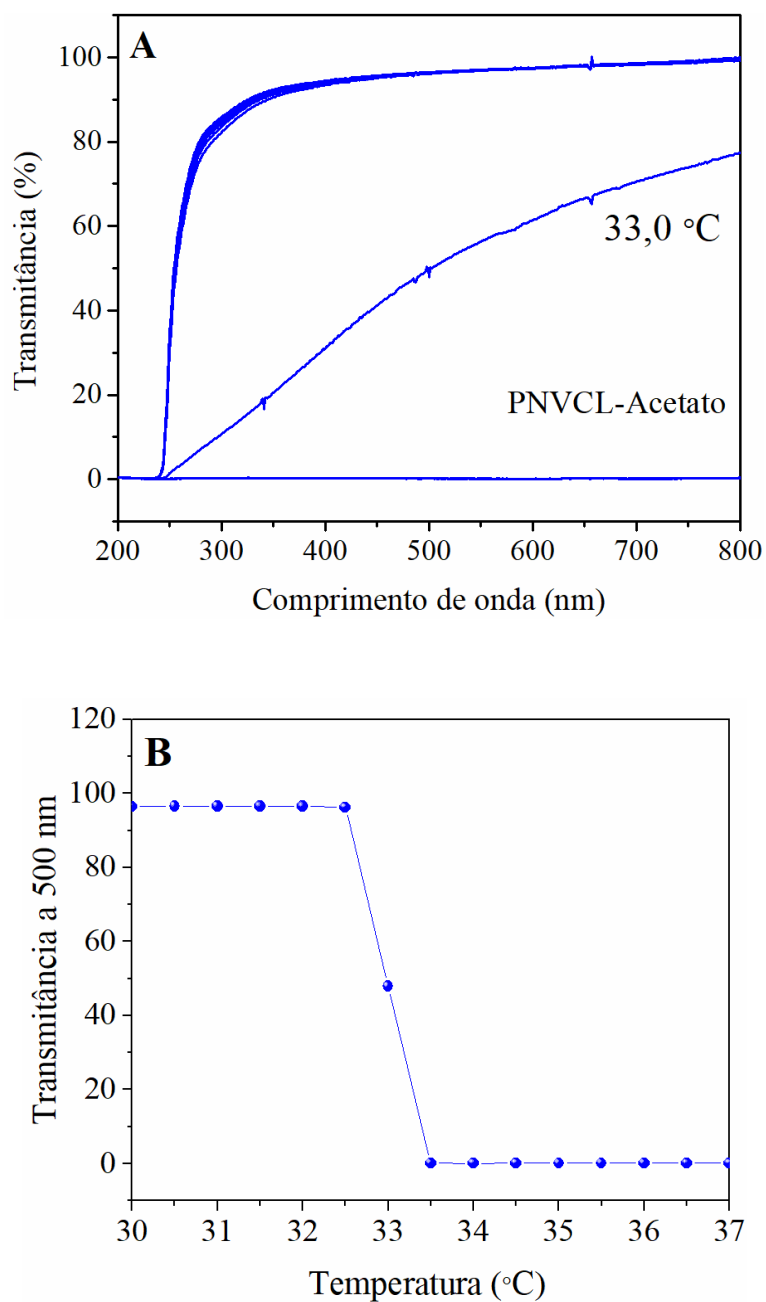


FIGURA 5.15 – Espectro de transmitância no UV-Vis (A) e intensidade da transmitância (em %) medida a 500 nm em função da temperatura (B), para a solução polimérica a 1% (m/v) do PNVCL sintetizado utilizando acetato de etila como solvente.

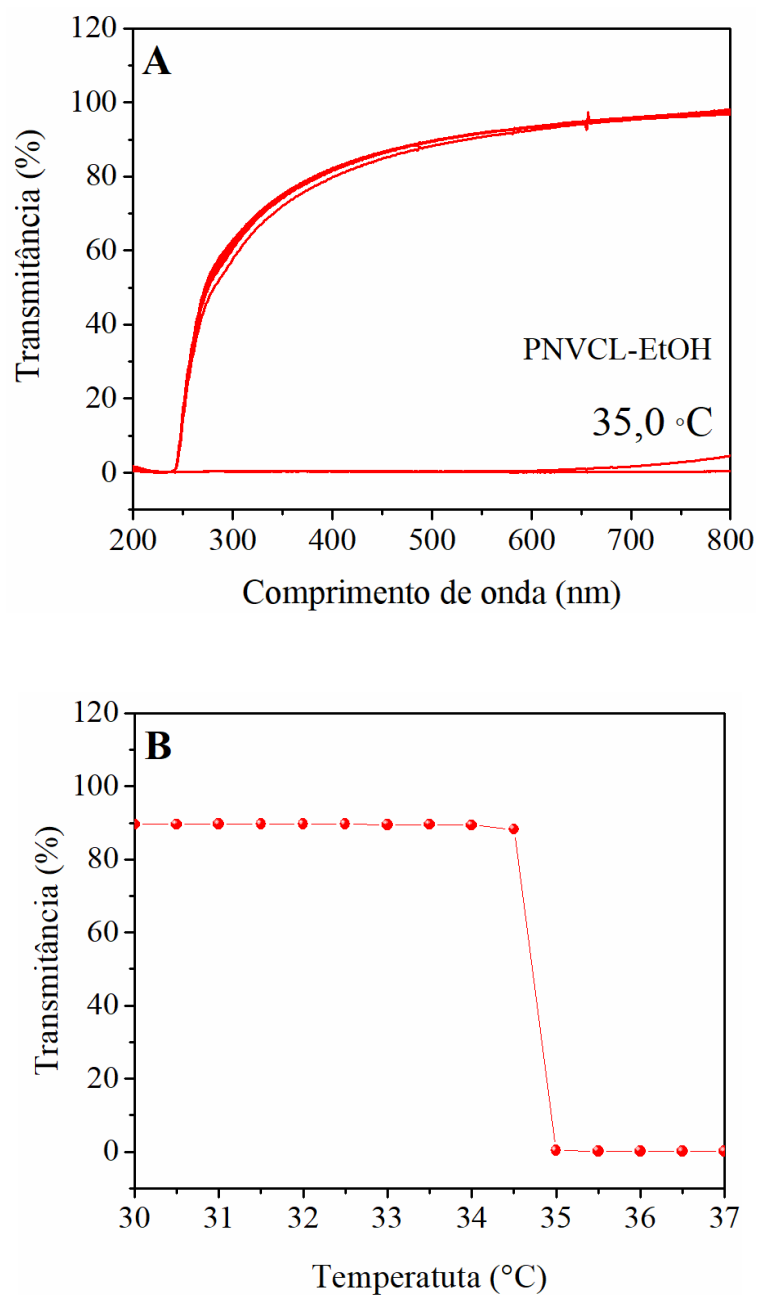


FIGURA 5.16 - Espectro de transmitância no UV-Vis (A) e intensidade da transmitância (em %) medida a 500 nm em função da temperatura (B), para a solução polimérica a 1% (*m/v*) do PNVCL sintetizado utilizando etanol como solvente.

Abaixo da LCST, as cadeias do PNVCL encontram-se solvatadas como já mencionado anteriormente. Nessa condição, medidas de espalhamento dinâmico de luz de soluções diluídas permitem obter a distribuição do diâmetro hidrodinâmico (D_h) das cadeias no sistema. Assim como os valores de Tg e da LCST, o diâmetro do PNVCL em água se relaciona com o tamanho das cadeias no polímero. As distribuições de tamanho obtidas estão na Figura 5.17. Com este resultado é possível notar que os polímeros preparados exibem distintas distribuições de diâmetro com os tamanhos médios de $8,2 \pm 2,4$ nm (DMSO), $6,2 \pm 1,6$ nm (etanol), e $13,8 \pm 3,3$ nm (acetato). Além disso, o PNVCL em acetato demonstrou uma distribuição bimodal. Estes resultados em conjunto com os valores de LCST verificados sugerem que os polímeros apresentam diferentes massas moleculares na seguinte ordem PNVCL-Acetato > PNVCL-DMSO > PNVCL-EtOH. Pode-se ainda destacar outras observações constatadas durante este estudo como, por exemplo, verificou-se em testes exploratórios que soluções com diferentes concentrações do PNVCL sintetizado em etanol exibiram uma aparência líquida *acima* da LCST mesmo para maiores concentrações em água (20-30% *m/v*). Contrariamente, o polímero sintetizado em acetato exibiu um aspecto viscoso em soluções a temperatura ambiente (*abaixo* da LCST), sendo sua completa dispersão em água dificultada. Com base nestas observações e nos resultados obtidos, o PNVCL sintetizado em DMSO foi então escolhido para ser utilizado no restante dos estudos apresentados neste trabalho. Este polímero exibiu uma estreita distribuição D_h além de boa dispersão em água a temperatura ambiente.

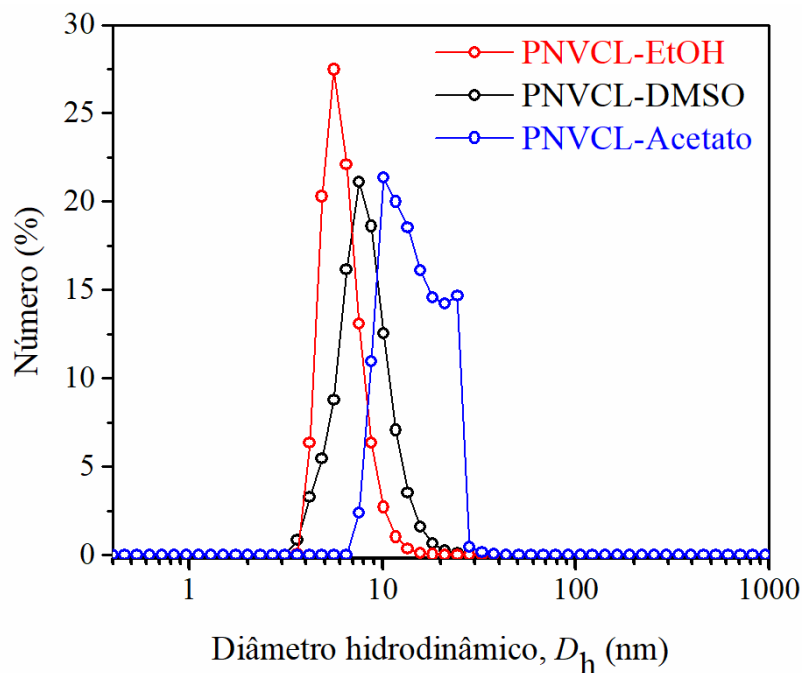


FIGURA 5.17 – Distribuição de diâmetro hidrodinâmico a 25 °C para soluções a 1% (*m/v*) dos polímeros sintetizados utilizando diferentes solventes: etanol (PNVCL-EtOH), dimetilsulfóxido (PNVCL-DMSO) e acetato de etila (PNVCL-Ac).

A confirmação da estrutura do PNVCL sintetizado em DMSO foi feita por ressonância magnética nuclear de carbono (Figura 5.18). Tal como pode ser visto, a amostra exibiu oito sinais de núcleos de carbono, são eles provenientes das unidades mero da cadeia do PNVCL: 22,5 ppm (C_5), 28,4 ppm (C_6), 29,4 ppm (C_7), 34,0 ppm (C_1), 36,7 ppm (C_4), 42,5 ppm (C_8), 46,9 - 47,7 ppm (C_2) e 178 ppm (C_3)^{52,103,107}. O desdobramento do sinal de C_2 indica um arranjo atático nos polímeros, isto é, a disposição alternada dos anéis (grupos laterais) em relação à cadeia principal (alifática)^{108,109}. Essa característica é resultante da quiralidade do carbono C_2 em conjunto com a elevada instabilidade dos radicais de NVCL (monômeros que geram sistemas sem estabilização por ressonância), resultando na ausência de regioseletividade aos substituintes durante a polimerização^{110,111}. Além disso, não foram identificados sinais referentes ao grupo vinil do NVCL (~131,4 e 97,4 ppm)^{52,107} evidenciando uma efetiva retirada de monômeros

residuais com a purificação, pelo menos a uma concentração não detectável pela análise de RMN de carbono.

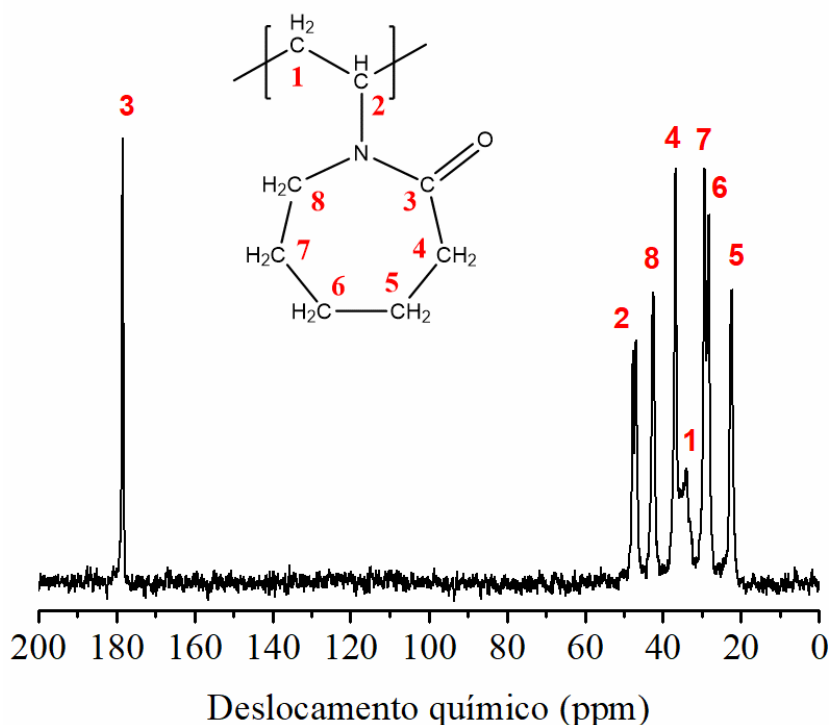


FIGURA 5.18 – Espectro de ^{13}C -RMN do PNVCL sintetizado utilizando DMSO como solvente.

Para avaliar o perfil de degradação e estabilidade térmica do PNVCL, análises de termogravimetria (TGA-DTG) do polímero foram realizadas e os dados estão dispostos na Figura 5.19. Como pode ser visto pelas curvas, a decomposição térmica inicia-se próximo a 400 °C com acentuada perda de massa em 437 °C. Esse perfil evidencia uma intensa degradação oxidativa do PNVCL até os 450 °C, temperatura na qual a amostra apresentou variação total em massa de cerca de 90%, e está em concordância com resultados observados por outros autores ^{51,103,112,113}. As variações até 200 °C representam 3% em massa e estão associadas a retirada de moléculas de água que ficaram retidas no PNVCL durante o processo de secagem do polímero em estufa. As temperaturas inicial do evento de degradação (T_{onset}) e a temperatura final deste evento (T_{endset}) foram determinadas, respectivamente, como 401 e 455 °C. Um segundo evento térmico

até 650 °C está relacionado a oxidação de resíduos estáveis formados na principal etapa de degradação, possivelmente estruturas monoméricas como de poliamida 6 ou nylon 6 advindos da abertura do anel caprolactama ⁵¹.

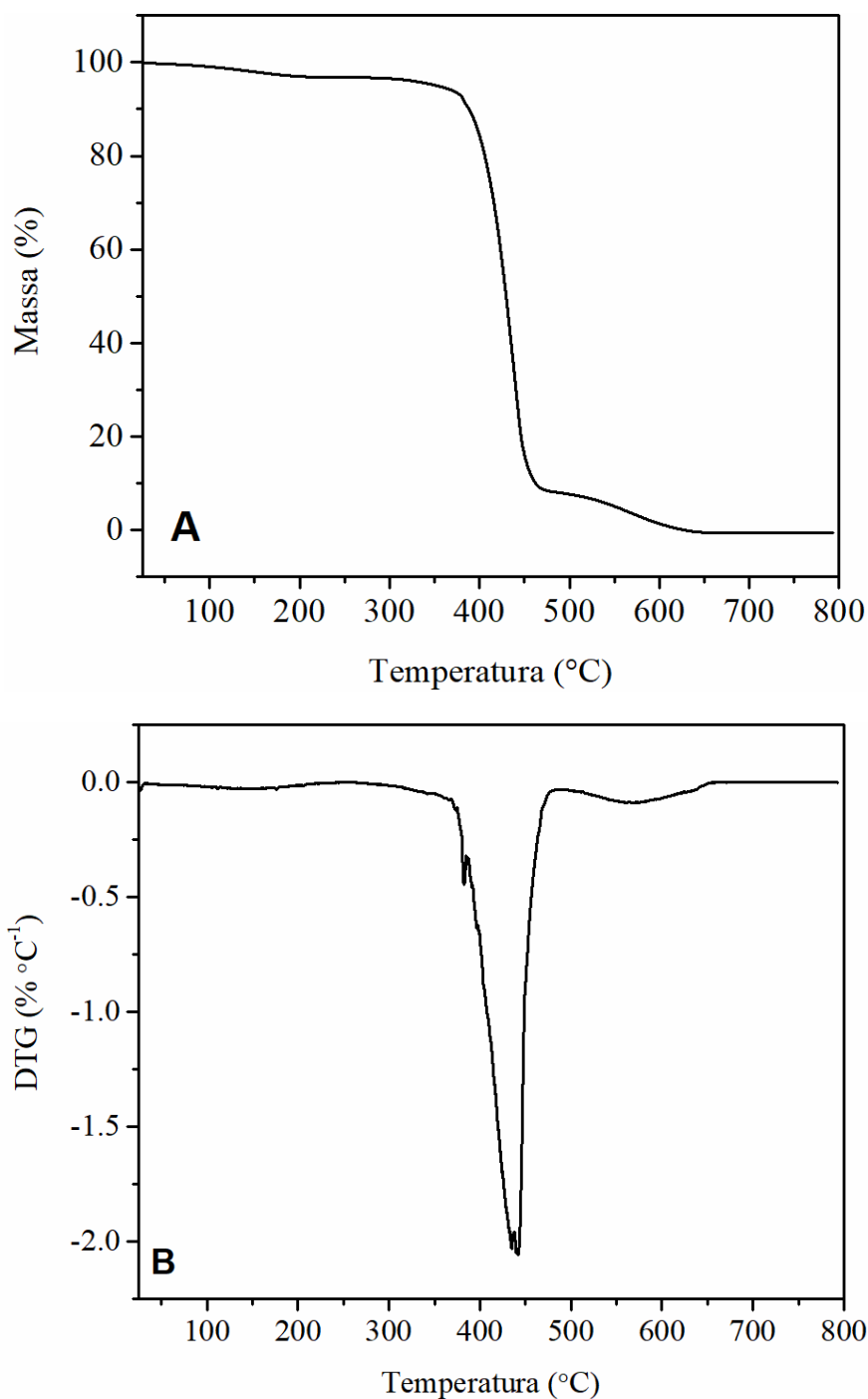


FIGURA 5.19 – Curvas de TG (A) e DTG (B) do PNVCL sintetizado utilizando DMSO.

As propriedades viscoelásticas de hidrogéis de PNVCL são dependentes de sua concentração em solução. Em estudos anteriores de SALA et al.^{51,54}, essa propriedade foi explorada para diferentes concentrações (10-30% *m/v*) do PNVCL sintetizado em DMSO demonstrando que um valor intermediário (20% *m/v*) apresentou os melhores resultados em ensaios de viabilidade quanto a injeção dos hidrogéis contendo células encapsuladas, sendo o resultado correlacionado a uma difusão superior de nutrientes no polímero nesta concentração. Segundo estes autores, isso se deve as características reológicas favoráveis exibidas pelo hidrogel a 20% (*m/v*) na temperatura fisiológica. Por outro lado, a solução a 30% (*m/v*) resultou em um sistema mais denso e com menor difusão de nutrientes, enquanto a concentração de 10% exibiu propriedades reológicas muito inferiores e um comportamento líquido na temperatura fisiológica.

Neste trabalho foram realizados experimentos de DSC a 37 °C sob atmosfera oxidante a fim de verificar possíveis alterações no hidrogel de PNVCL a 20% (*m/v*) em função do tempo (Figura 5.20). Tal como pode ser visto, este sistema não apresentou variações ao longo da análise sugerindo a constância das características do hidrogel nas condições descritas. Sendo assim, com base nos trabalhos citados e nos experimentos realizados neste estudo, determinou-se a concentração de 20% (*m/v*) para ser utilizada na formulação dos hidrogéis contendo as partículas bioativas e os resultados obtidos são discutidos nos tópicos subsequentes.

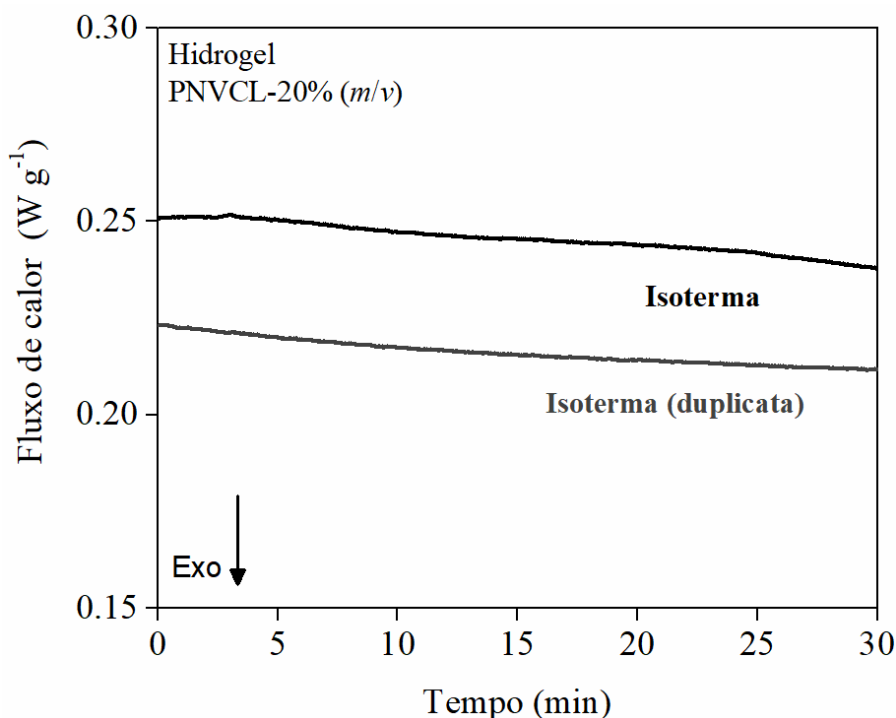


FIGURA 5.20 – Curva de DSC isotérmica a 37 °C da solução de PNVCL (20% *m/v*) sintetizado em DMSO.

5.3 - Hidrogéis de PNVCL contendo partículas bioativas

Os materiais inorgânicos em pó nBG e nBGC apresentados na Sessão 5.1 foram utilizados para a formulação dos hidrogéis contendo partículas bioativas pela adição de 5, 10 e 15% (*m/m*) dos pós inorgânicos em relação a massa de PNVCL em PBS ou meio de cultura (20% *m/v*). Para investigar a presença de possíveis interações entre as fases orgânica e inorgânica e avaliar o comportamento viscoelástico dos materiais resultantes, experimentos de reologia e análise por infravermelho foram feitos. Para a obtenção dos espectros de IR apresentados na Figura 5.22, os hidrogéis foram primeiramente secados em estufa e a análise foi realizada para as amostras em forma de filmes.

Nos espectros de IR, os principais modos vibracionais identificados para o PNVCL sem partículas são provenientes do grupo C=O em 1635 cm^{-1} , estiramentos simétrico e assimétrico de $-\text{CH}_2-$ em 2861 cm^{-1} e 2934 cm^{-1} , respectivamente, e vibrações de $-\text{CH}_2-$ fora do plano em $1350\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ ^{114,115}.

Em relação ao nitrogênio, a vibração do grupo C-N em 1475 cm^{-1} e a deformação fora plano de N-H em 716 cm^{-1} são observadas ^{114,115}. Nas amostras contendo as partículas nBG e nBGC, alterações nos espectros que pudessem indicar interação entre o PNVCL e as partículas, tal como a distorção ou o deslocamento de bandas, não foram verificadas, apenas um abaulamento em relação a linha de base na região de $1100\text{ and }760\text{ cm}^{-1}$ (destacadas em fundo azul nos espectros) devido a presença das partículas vítreas na matriz de PNVCL dessas amostras, sendo proveniente dos sinais de Si-O-Si $\sim 1040\text{-}930\text{ cm}^{-1}$ exibidos pelos materiais nBG e nBGC tal como discutido anteriormente na Sessão 5.1 (Figura 5.4).

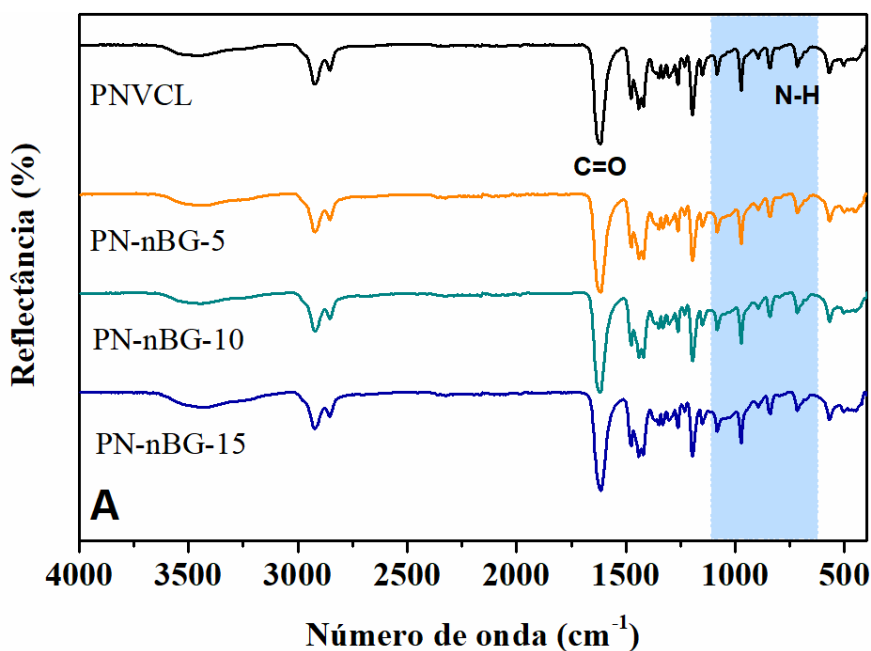


FIGURA 5.21 - Espectros de IR dos filmes poliméricos obtidos pela secagem dos hidrogéis de PNVCL (20% *m/v*) preparados com diferentes quantidades de partículas vítreas nBG (5-15% *m/m* em relação a massa de PNVCL).

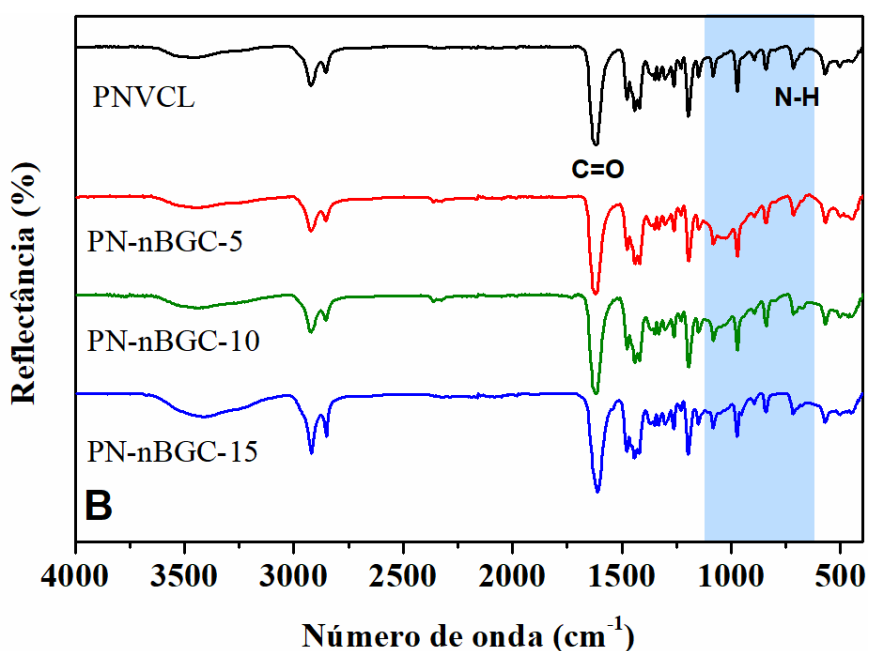


FIGURA 5.22 – Espectros de IR dos filmes poliméricos obtidos pela secagem dos hidrogéis de PNVCL (20% *m/v*) preparados com diferentes quantidades de partículas vitrocerâmicas nBGC (5-15% *m/m* em relação a massa de PNVCL).

Embora a presença de interações intermoleculares entre o PNVCL e as partículas nos filmes poliméricos não terem sido constatadas por análise de IR, essas interações podem estar presentes nos materiais na forma de hidrogéis. Nesse contexto, hidrogéis nanocompósitos já foram preparados pela simples mistura física de nanopartículas inorgânicas (NPs) à matriz polimérica, sendo que as NPs podem estabelecer uma interface cooperativa com a matriz no hidrogel por meio de interações como ligação de hidrogênio ou forças de Van der Waals e resultar em nanocompósitos com propriedades mecânicas melhoradas ¹¹⁶. Portanto, a fim de investigar a natureza da interface entre as partículas desenvolvidas neste trabalho e o PNVCL, bem como elucidar as propriedades viscoelásticas dos hidrogéis na temperatura fisiológica, experimentos de reologia foram conduzidos a 37 °C e os resultados são apresentados a seguir.

Os ensaios de varredura de deformação são mostrados nas Figuras 5.23-24. Este ensaio é de extrema importância no estudo das propriedades viscoelásticas de polímeros em regimes oscilatórios pois permite avaliar os chamados módulos de

armazenamento em cisalhamento (G'), cuja componente está associada a contribuição elástica a cada ciclo, e módulo de perda em cisalhamento (G'') associado a contribuição viscosa, sendo que o balanço entre ambos permite descrever a resposta viscoelástica de polímeros ¹¹⁷. Além disso, G' e G'' são propriedades sensíveis a pequenas alterações na estrutura dos polímeros, como por exemplo interações entre misturas poliméricas ou com partículas ¹¹⁷. Como pode-se notar pelo ensaio de varredura, os hidrogéis neste estudo apresentaram $G'' > G'$ e evidenciam que estes sistemas a 37 °C possuem um comportamento viscoso predominante. Pode-se ainda verificar que a resposta dos módulos G nos hidrogéis com partículas foi dependente do tipo e da quantidade das partículas empregadas na formulação. Para os hidrogéis contendo nBG, a adição das partículas reduziu o intervalo de deformação onde os hidrogéis exibiram uma resposta viscoelástica aprox. linear (~50% de deformação) em comparação ao PNVCL sem partículas (entre 10-50%), além de pouca variação na magnitude dos valores dos módulos. Este resultado sugere que a adição das diferentes quantidades de nBG resultou na formação de novas heterogeneidades no hidrogel, que poderiam ser explicadas pela baixa interação entre as fases orgânica e inorgânica resultando na agregação das partículas de vidro na rede do hidrogel. Por outro lado, um comportamento distinto foi observado para as formulações contendo diferentes quantidades da vitrocerâmica nBGC, em que o aumento na quantidade de 5 a 15% de partículas promoveu um progressivo crescimento nos valores dos módulos saindo de G' com aprox. 7 para 11 Pa, e G'' de aprox. 18 para 30 Pa. Além disso, as descontinuidades na resposta dos módulos na região de até 10% de deformação foram reduzidas em comparação ao PNVCL puro, sugerindo que as partículas de nBGC apresentaram uma boa dispersão no hidrogel.

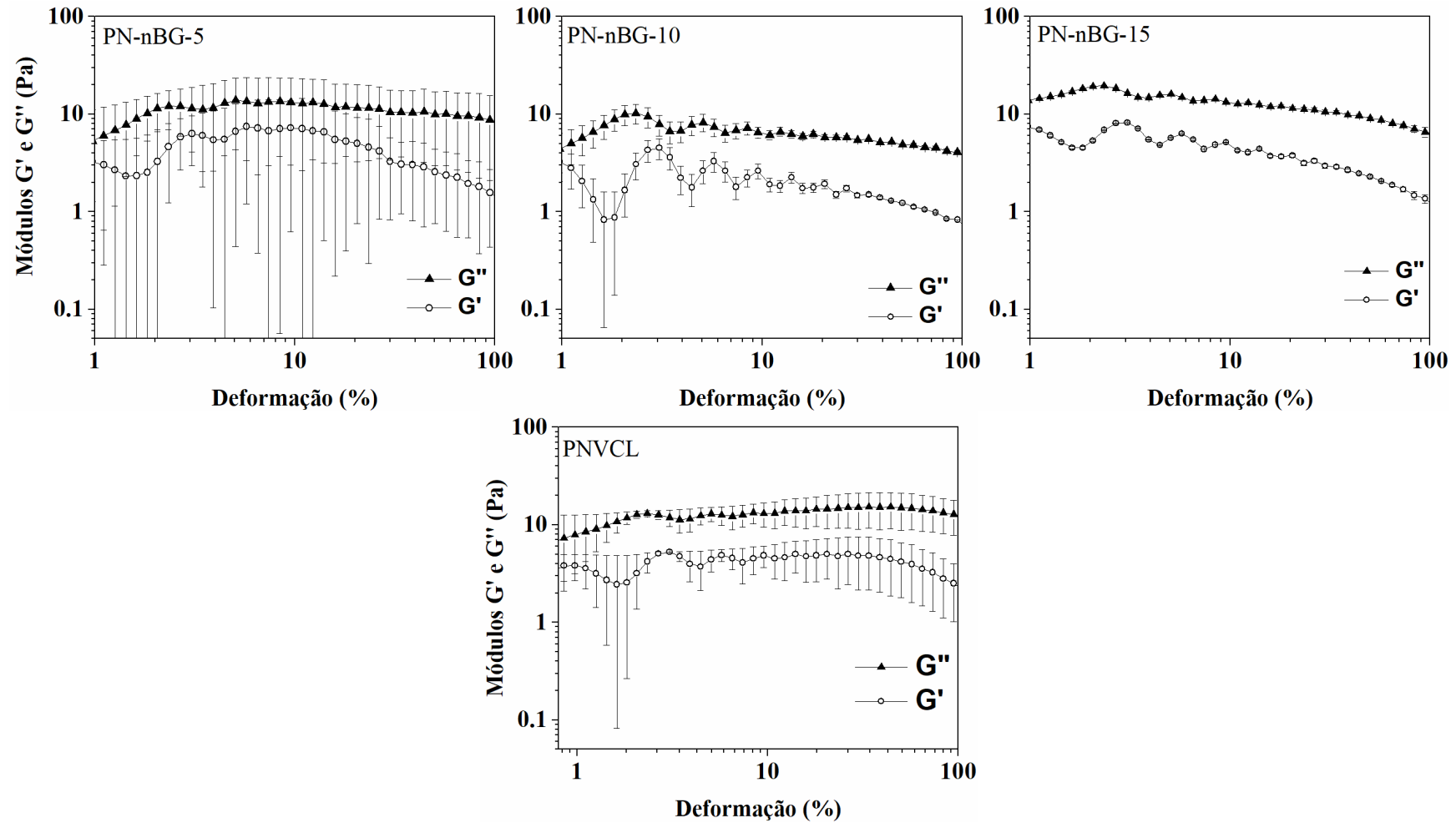


FIGURA 5.23 – Ensaio reológico a 37 °C em regime oscilatório para determinação da região de viscoelasticidade linear dos hidrogéis preparados com diferentes quantidades de partículas vítreas de nBG (5-15% *m/m* em relação a massa de PNVCL) e concentração fixa de PNVCL em PBS (20% *m/v*).

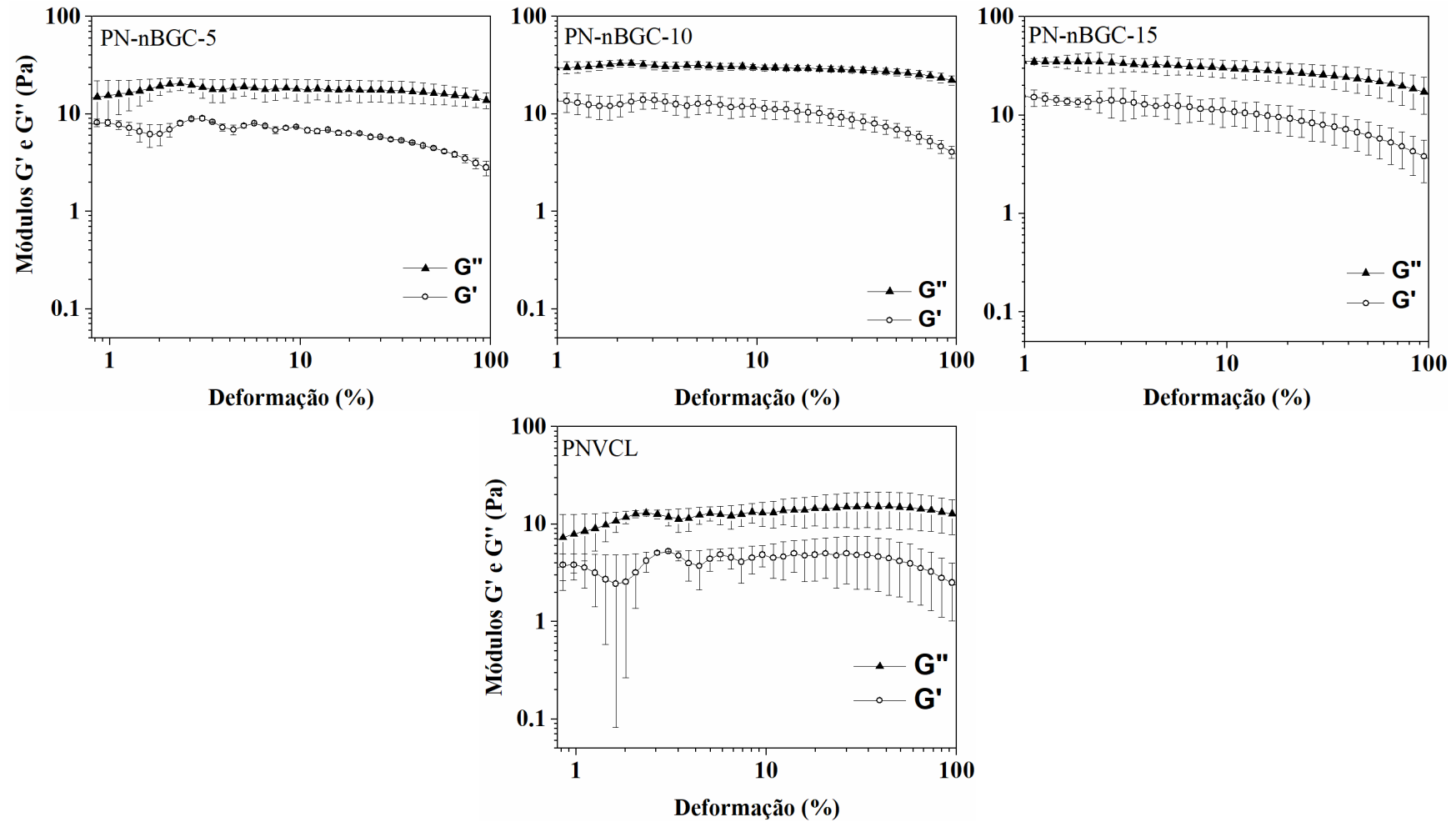


FIGURA 5.24 - Ensaio reológico a 37 °C em regime oscilatório para determinação da região de viscoelasticidade linear dos hidrogéis preparados com diferentes quantidades de partículas vitrocerâmicas nBGC (5-15% m/m em relação a massa de PNVCL) e concentração fixa de PNVCL em PBS (20% m/v).

A diferença observada entre a resposta viscoelástica dos hidrogéis formulados com as diferentes partículas pode ser explicada pela existência de interações, por exemplo, de ligações de hidrogênio entre os silanóis presentes na superfície das partículas com o grupo amida no PNVCL. Essa contribuição possivelmente foi maior para a vitrocerâmica em relação ao vidro tal como pode ser visto pelo aumento das propriedades reológicas nos hidrogéis formulados com a vitrocerâmica. Por outro lado, este resultado estaria relacionado a características específicas de cada material, sendo que no caso da vitrocerâmica esta apresentou reatividade e área de superfície superiores ao vidro nBG favorecendo uma efetiva interação com as cadeias do PNVCL. Adicionalmente, um efeito dos produtos de dissolução das partículas e a alteração do pH do sistema na viscoelasticidade dos hidrogéis não pode ser descartado. Por exemplo, a complexação de cátions Ca^{+2} com grupos carbonílicos em proteínas em sistemas biológicos resultam em certas modificações no arranjo secundário dessas estruturas ¹¹⁸. Similarmente, a liberação dos cátions Na^+ , Ca^{2+} e interações com os grupos carbonila no PNVCL é um fator que também poderia influenciar o comportamento viscoelástico dos hidrogéis ao longo do tempo (e.g. horas), mas investigações detalhadas nesse contexto não foram conduzidas neste estudo.

Comparando os resultados de reologia obtidos com outros trabalhos na literatura, pode-se destacar o estudo de GANTAR et al ¹¹⁹ em que os autores desenvolveram um hidrogel injetável a base de polietilenoglicol modificado contendo nanopartículas de $\text{SiO}_2\text{-CaO}$. No referido estudo, os nanocompósitos foram preparados pela mistura física entre as fases polimérica e diferentes proporções das nanopartículas, sendo verificado módulos $G' > G''$ para os hidrogéis com e sem partículas. Adicionalmente, a introdução das nanopartículas promoveu um crescente aumento dos valores de G' em até cinco vezes conforme o aumento na proporção adicionada. A este efeito os autores atribuíram a menor mobilidade molecular com aumento do emaranhamento do polímero para maiores proporções de partículas. Além disso, os valores de G' exibidos foram da ordem

de ~3000-16000 Pa, que são bastante diferentes dos observados neste presente trabalho. Em outro estudo, D'ESTE et al.¹²⁰ obtiveram hidrogéis termosensíveis injetáveis com valores de G' ~3000 Pa a 37 °C com base em um copolímero de ácido hialurônico e PNIPAm, porém voltados para atuar no preenchimento de defeitos osteocondrais. Com base nestas comparações, é importante mencionar que os biomateriais com características viscoelásticas semelhantes ao osso são relevantes para sistemas do tipo *scaffolds*, enquanto para aplicações de *drug-delivery* outros fatores são de grande importância, tais como a difusão de substâncias bioativas nos hidrogéis. Além disso, hidrogéis de PNVCL com viscoelasticidade semelhantes foram explorados por SALA et al.⁵⁴ em experimentos *in vivo* na injeção subcutânea dos hidrogéis contendo células encapsuladas em ratos, resultando em implantes estáveis mesmo após oito semanas. Portanto, embora os hidrogéis propostos neste estudo tenham características distintas daquelas encontradas no tecido ósseo, pode-se inferir, com base nas propriedades viscoelásticas e transição sol-gel, que estes hidrogéis apresentam potencial como materiais injetáveis para o transporte e a liberação de íons bioativos.

Ensaio reológico de varredura de frequência e de tempo foram realizados neste estudo empregando um valor de deformação constante a 10%, pois os diferentes hidrogéis apresentaram um regime linear de viscoelasticidade em torno deste valor, exceto para as amostras com 10 e 15% de partículas nBG. Para tanto, realizou-se as varreduras de tempo mostradas na Figura 5.25 que permitiram verificar que os hidrogéis de PNVCL puro e contendo 5% de partículas nBG ou nBGC exibiram um comportamento constante ao longo da varredura o que indica que não ocorreram alterações morfológicas nesses sistemas dentro do período de tempo analisado.

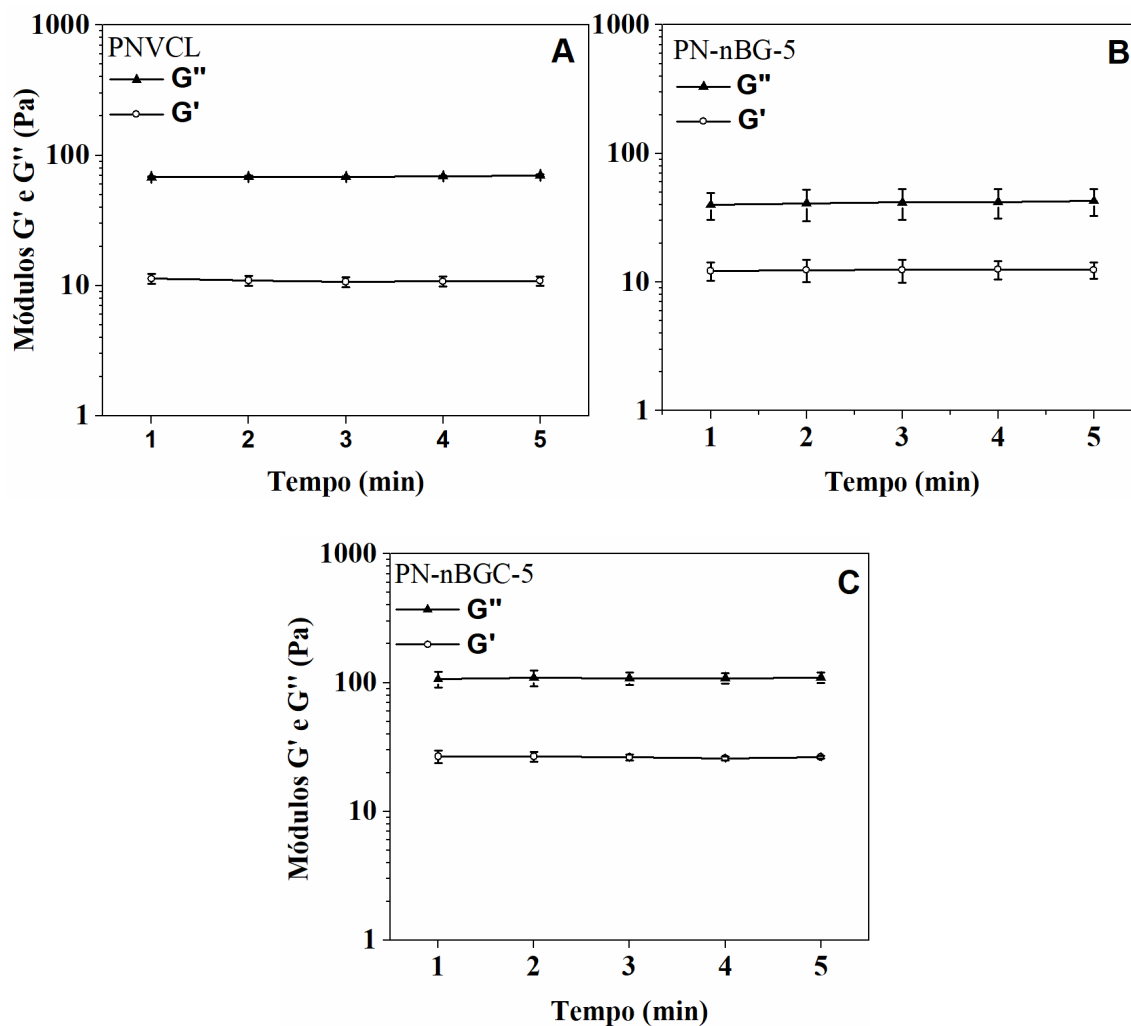


FIGURA 5.25 - Ensaio reológico de varredura de tempo a 37 °C para os hidrogéis formulados: (A) PNVCL em PBS (20% *m/v*), (B) hidrogel de PNVCL preparado com 5% de partículas vítreas nBG (*m/m* em relação a massa de PNVCL), e (C) formulado com 5% de partículas vitrocerâmicas nBGC.

As varreduras de frequência angular são apresentadas na Figura 5.26 e demonstram como as diferentes partículas nBG e nBGC alteraram a viscosidade dos hidrogéis. Pode-se observar que a viscosidade complexa dos sistemas aumentaram quando foram utilizadas 10% da vitrocerâmica nBGC no intervalo de frequência de 1-10 rad s, e em todo o intervalo de varredura para a quantidade de 15% de nBGC. Contrariamente, ocorreu um decréscimo nessa propriedade em relação ao PNVCL puro nos hidrogéis com o vidro nBG independente da quantidade empregada. Este resultado, juntamente com a tendência observada nos

ensaios de deformação (Figuras 5.23-24), reforçam a ideia de uma maior dispersão e interação entre os componentes nos hidrogéis formulados com a vitrocerâmica. Além disso, todas as amostras demonstraram uma redução da viscosidade em frequências ~ 100 rad/s, indicando que os hidrogéis exibem menor resistência ao fluxo sob altas taxas de frequência.

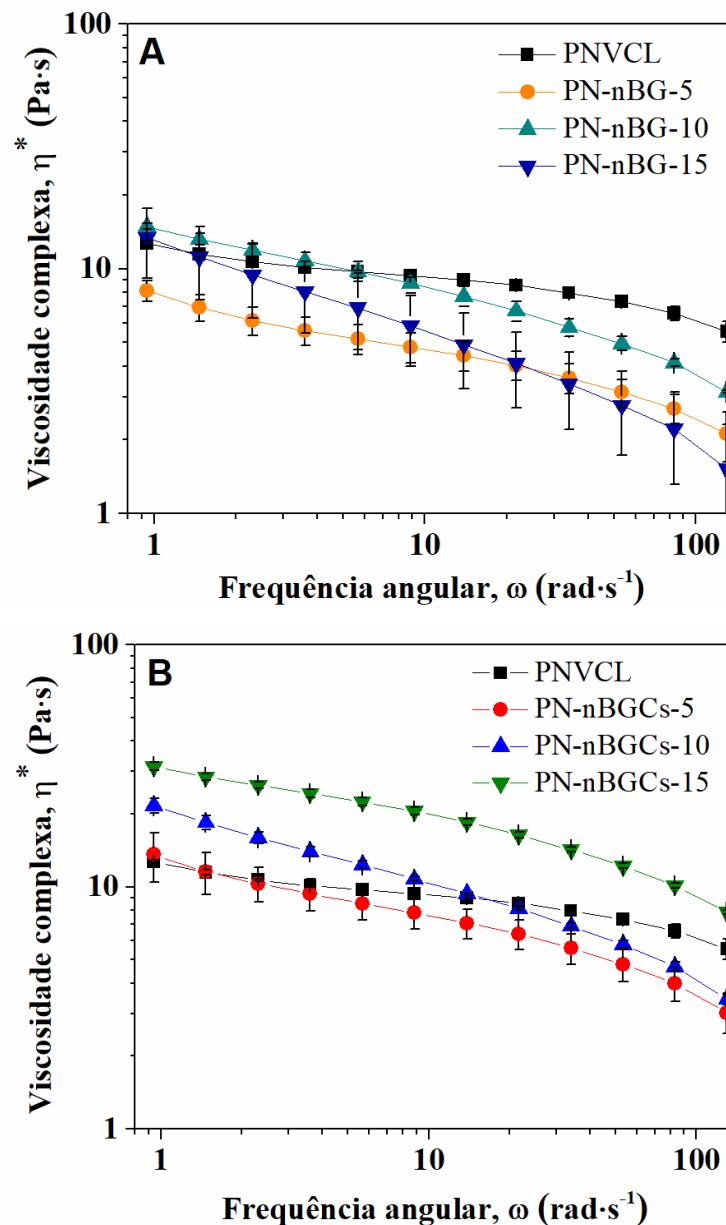


FIGURA 5.26 - Ensaios reológicos de varredura de frequência angular a 37 °C para os hidrogéis formulados: (A) hidrogéis de PNVCL puro em PBS (20% *m/v*) e preparados com diferentes quantidades de partículas vítreas nBG (5-15% *m/m* em relação a massa de PNVCL), e (B) com (5-15%) de partículas vitrocerâmicas nBGC.

5.4 - Estudos de citocompatibilidade

Os estudos de citotoxicidade neste trabalho foram feitos seguindo as diretrizes da ISO 10993-5 para ensaios indiretos avaliando-se os extratos do meio de cultura expostos aos biomateriais. Para tanto, estes estudos foram divididos em três etapas: (i) investigação dos hidrogéis de PNVCL puros, (ii) partículas puras, e (iii) hidrogéis contendo as partículas. Tanto o PNVCL (20% *m/v*) quanto as partículas puras (5-15% *m/m*) foram analisados separadamente utilizando as mesmas concentrações empregadas nos hidrogéis compósitos. Adicionalmente, o PNVCL puro também foi avaliado a 10 e 30% *m/v* a fim de investigar se a liberação de possíveis substâncias citotóxicas estaria relacionada a concentração do polímero no hidrogel. Além disso, ensaios também foram conduzidos utilizando o vidro Bioglass 45S5 (Vitryxx® Bioactive Glass $4.0 \pm 1.0 \mu\text{m}$, Germany) para fins de comparação com um produto comercial. A relação das amostras estudadas encontra-se na Tabela 5.5.

Os extratos foram preparados expondo os meios de cultura pela incubação a 24 e 72 h com os materiais. Após esses intervalos, os extratos foram coletados e adicionados a placa de poços contendo as células previamente cultivadas, seguido de incubação por 24 h. A atividade das células foi então detectada por ensaios de WST-8, tal como esquematizado na Figura 5.27.

TABELA 5.5 – Respectiva composição das amostras avaliadas nos ensaios de citotoxicidade utilizando células de osteosarcoma humano MG-63.

Amostra	Concentração de PNVCL (m/v) ^a	Concentração de partículas (m/m) ^b	Tipo de partícula
PNVCL-10	10	-	-
PNVCL-20	20	-	-
PNVCL-30	30	-	-
nBG-5	-	5	Fusão
nBG-10	-	10	Fusão
nBG-15	-	15	Fusão
nBGC-5	-	5	Sol-gel
nBGC-10	-	10	Sol-gel
nBGC-15	-	15	Sol-gel
BG-5	-	5	Comercial
BG-10	-	10	Comercial
BG-15	-	15	Comercial
PN-nBG-5	20	5	Fusão
PN-nBG-10	20	10	Fusão
PN-nBG-15	20	15	Fusão
PN-nBGC-5	20	5	Sol-gel
PN-nBGC-10	20	10	Sol-gel
PN-nBGC-15	20	15	Sol-gel
PN-BG-5	20	5	Commercial
PN-BG-10	20	10	Commercial
PN-BG-15	20	15	Commercial

(^a) % *m/v* de PNVCL, e (^b) % *m/m* de partículas em relação a massa de PNVCL, correspondendo a 10, 20 e 30 mg mL⁻¹ em meio de cultura DMEM completo.

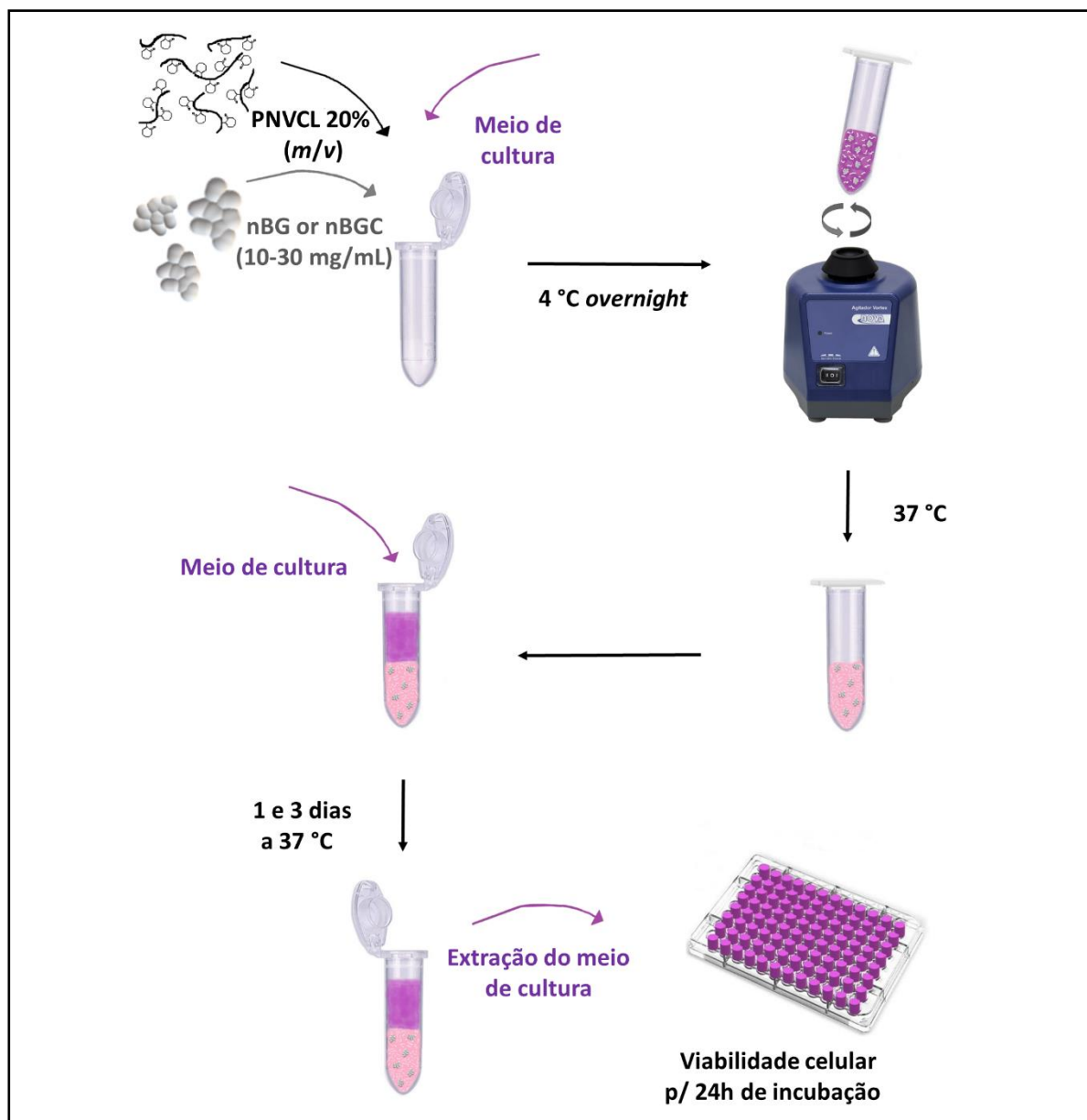


FIGURA 5.27 – Representação esquemática da preparação dos hidrogéis e dos extratos utilizados nos ensaios de citotoxicidade.

5.4.1 - Investigação de diferentes concentrações do hidrogel

Os hidrogéis de PNVCL a 10, 20 e 30% (*m/v*) em meio de cultura antes e após a transição sol-gel podem ser visualizados na Figura 5.28, através da qual é possível notar o aspecto desses diferentes sistemas. Enquanto as concentrações de 20 e 30% resultam em hidrogéis com aspecto de gel, o PNVCL a 10% mostrou-se líquido. Além disso, pode-se notar uma coloração distinta a 30% em função da maior concentração do polímero o que possivelmente está relacionado a uma estrutura de hidrogel mais densa nessa concentração.

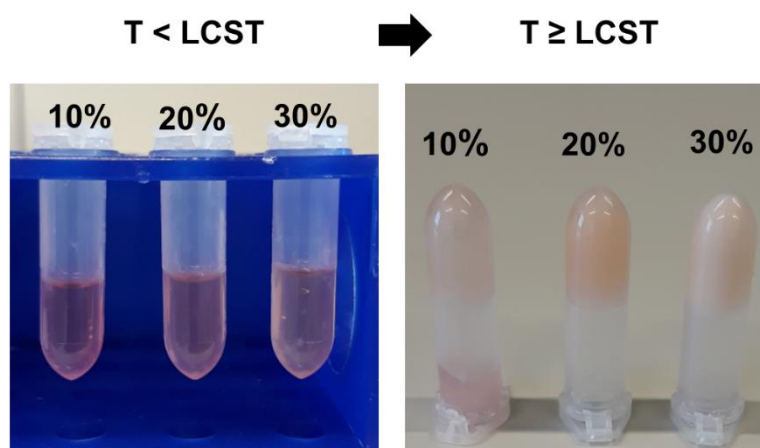


FIGURA 5.28 – Hidrogéis de PNVCL a diferentes concentrações (% *m/v*) em meio de cultura em temperaturas acima (direita) e abaixo (esquerda) da LCST.

Como pode-se notar a partir dos resultados de viabilidade (Figura 5.29), as três concentrações de PNVCL resultaram em extratos atóxicos para as células nos diferentes intervalos de extração. Os hidrogéis a 20 e 30% (*m/v*) demonstraram uma viabilidade de ~85% sem diferença estatística entre essas duas amostras e nos diferentes tempos de extração. Por outro lado, o extrato exposto ao hidrogel a 10% (*m/v*) promoveu um aumento na viabilidade das células comparado ao controle (~30% no dia 1), sugerindo que esta concentração induziu a proliferação de células. Entretanto, hidrogéis a 10% (*m/v*) apresentam uma propriedade reológica pobre tal como relatado em estudos anteriores^{51,54}, como também discutido anteriormente neste trabalho e como pode ser visualizado na Figura

5.28, sendo uma limitação para a sua aplicação *in vivo*, uma vez que o hidrogel nessa concentração poderia ser facilmente difundido pelo corpo.

Os resultados de viabilidade apresentados correlacionam-se bem com as imagens obtidas por microscopia de fluorescência para as células coradas após incubação com os extratos do terceiro dia de extração (Figura 5.29 B). As células em azul foram coradas com a substância DAPI, a qual se liga a regiões ricas em adenina-timina no DNA, tais como o núcleo das células e em conjunto com outros corantes é útil para visualizar a morfologia celular. As imagens com as células coradas em verde foram feitas empregando a substância calceína que fica retida na membrana de células íntegras. A partir das micrografias é possível observar uma grande quantidade de células coradas sem evidências de danos, demonstrando a citocompatibilidade para células MG-63 nas três concentrações de PNVCL avaliadas (Figura 5.29B).

Tendo em vista que o PNVCL a 20% (*m/v*) foi utilizado nos demais estudos, a variação de massa desse sistema foi monitorada ao longo de 21 dias de incubação dos hidrogéis nas mesmas condições dos ensaios de citotoxicidade. Ao final de cada intervalo de tempo, os extratos foram coletados e os respectivos hidrogéis liofilizados, e a massa seca resultante foi pesada. Na Figura 5.30 é possível constatar que não ocorreu perda de massa do PNVCL ao longo de 21 dias, indicando que o polímero manteve-se estável nas condições fisiológicas sem indícios de difusão ou biodegradação, o que vai de encontro com o perfil mais resistente a degradação do PNVCL constatado em outros estudos^{50,59}. Por outro lado, observou-se um aumento de massa de até ~10% após a incubação, o que pode estar relacionado a adsorção de substâncias presentes no meio de cultura e que não foram retiradas com o processo de liofilização, tais como aminoácidos, peptídios, proteínas e entre outras moléculas orgânicas presentes no meio de cultura para crescimento celular.

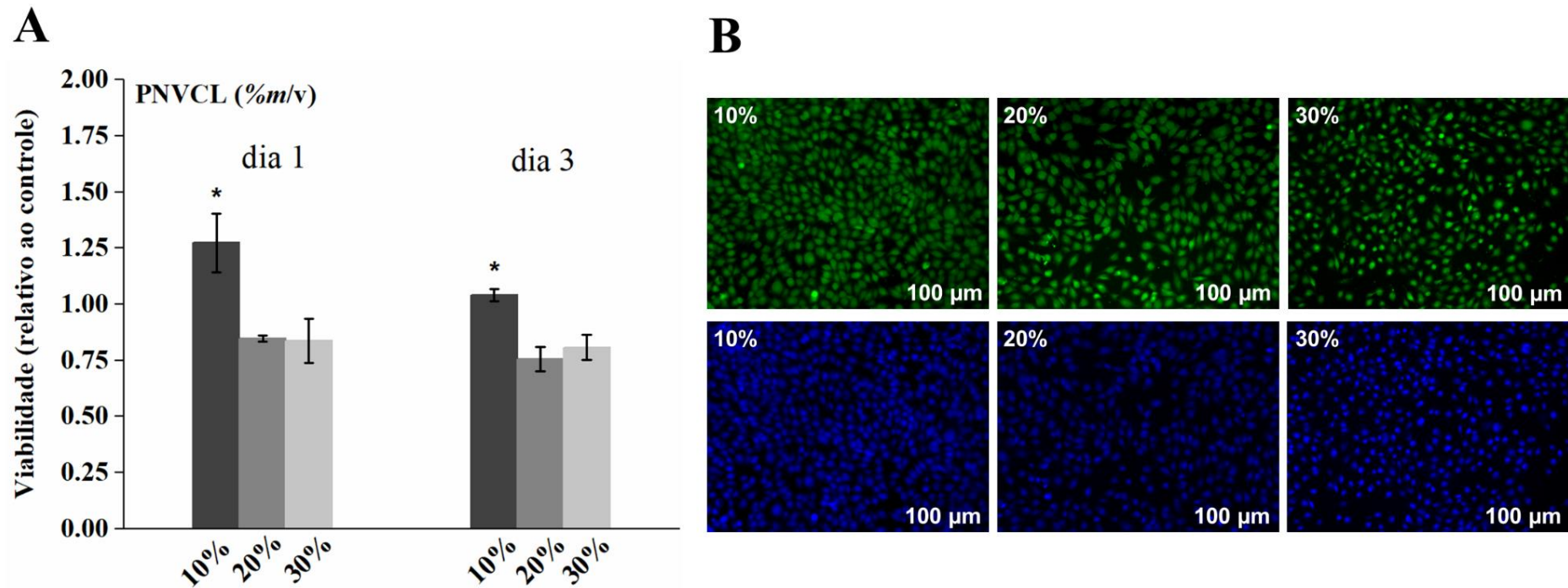


FIGURA 5.29 – (A) Viabilidade de células MG-63 cultivadas por 24 h na presença dos extratos obtidos pela incubação do meio de cultura por 1 e 3 dias com diferentes concentrações de PNVCL (10-30% *m/v*). Os resultados expressam a média entre dois experimentos independentes com $n = 4$ para cada experimento individual. * Indica significância estatística ($p < 0.05$) entre as viabilidades para um mesmo dia de extração. Não foi encontrada diferença estatística ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) para mesmas concentrações em diferentes dias de extração. (B) Micrografias de fluorescência para células MG-63 fixas coradas com DAPI (em azul), e células vivas coradas com calceína (em verde) cultivadas por 24 h com os extratos coletados ao terceiro dia de incubação na presença de diferentes concentrações de PNVCL (% *m/v*).

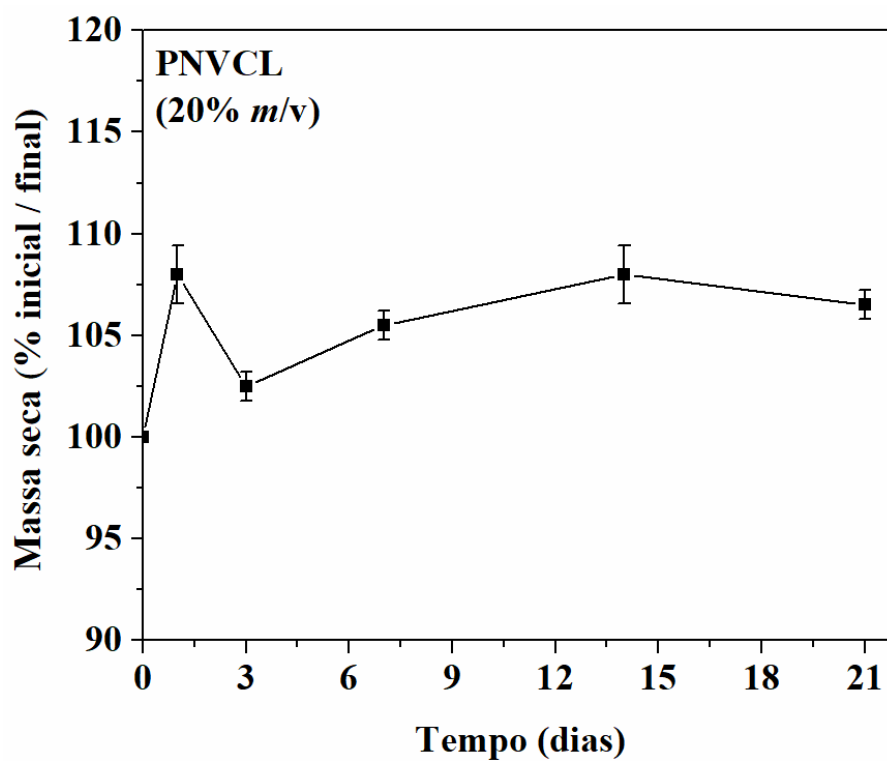


FIGURA 5.30 – Massa residual do hidrogel de PNVCL a 20% *m/v* liofilizado após incubação por diferentes intervalos de tempo em meio de cultura. A porcentagem de massa seca é expressa relativo à massa inicial de polímero puro liofilizado empregado na preparação do hidrogel.

5.4.2 - Investigação do tipo e da quantidade de partículas

Apesar da elevada bioatividade de vidros quaternários $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$ na regeneração de tecidos duros e moles, incluindo o comercial Bioglass 45S5, esses sistemas podem gerar citotoxicidade em função da alta taxa de dissolução e elevação abrupta do pH no microambiente celular¹⁸. Aliado a isto, o uso desses materiais na forma particulada pode levar a desafios adicionais, uma vez que a área disponível para reação torna-se maior em comparação a *scaffolds* dos respectivos materiais sinterizados. Nesse contexto, à medida que partículas de menores tamanhos são de importância do ponto de vista da aplicação na preparação de compósitos, em que essa característica pode contribuir para uma maior dispersão e interação entre as fases orgânica e inorgânica, ela também pode promover citotoxicidade. Dessa forma, o uso de partículas vítreas quaternárias ainda apresenta desafios na engenharia de tecidos.

Para avaliar a resposta de citocompatibilidade das partículas desenvolvidas neste estudo e para poder comparar estes resultados com os materiais no hidrogel de PNVCL, extratos dos meios de cultura expostos as partículas nas mesmas concentrações empregadas nos hidrogéis foram investigados na viabilidade das células e os resultados estão na Figura 5.31. Pode-se constatar que, as partículas vítreas fabricadas pelo método de fusão (nBG) apresentaram respostas similares ao Bioglass comercial nas diferentes condições avaliadas, sendo a menor concentração (10 mg mL^{-1}) citocompatível para os extratos de 1 e 3 dias de extração. Pode-se destacar ainda que as partículas nBG nesta concentração exibiram viabilidade ($\sim 100\%$), resultado superior ao comercial ($\sim 75\%$) nos diferentes dias. Contrariamente, as partículas vitrocerâmicas nBGC demonstraram citotoxicidade nas diferentes concentrações e dias de extração.

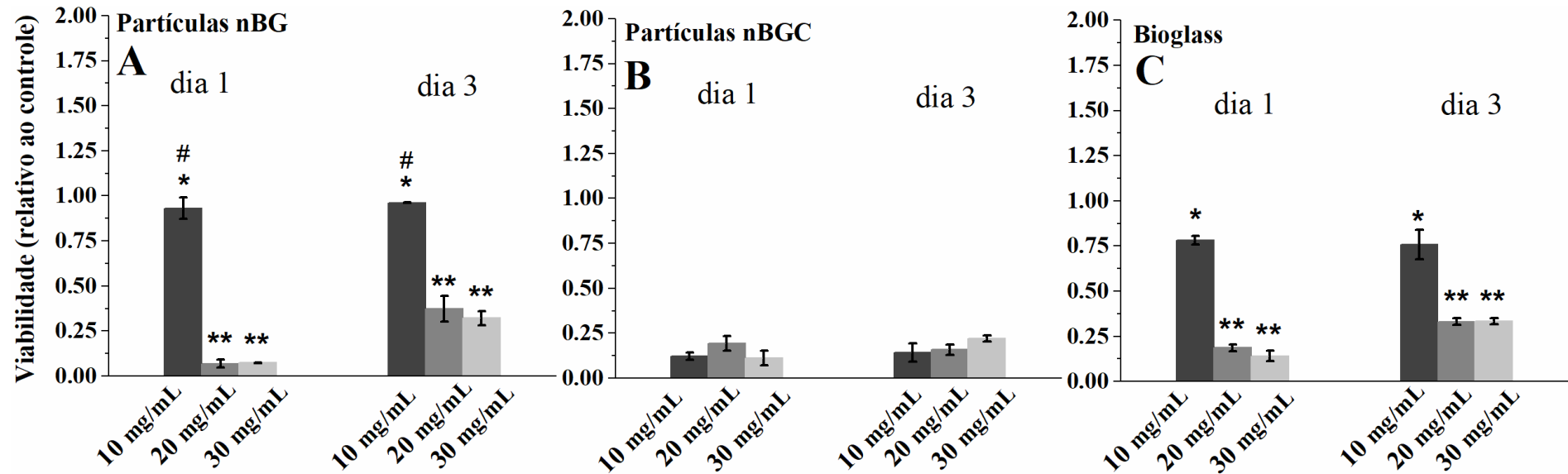


FIGURA 5.31 - Viabilidade de células MG-63 cultivadas por 24 h na presença dos extratos obtidos pela incubação do meio de cultura por 1 e 3 dias com diferentes concentrações de partículas (10-30 mg mL⁻¹): (A) partículas do vidro nBG, (B) partículas da vitrocerâmica nBGC, e (C) partículas do vidro comercial Bioglass 45S5. Os resultados expressam a média entre dois experimentos independentes com $n = 4$ para cada experimento individual: * Indica significância estatística ($p < 0.05$) entre as viabilidades para diferentes concentrações no mesmo dia de extração, ** indica diferença entre mesmas concentrações em dias diferentes de extração, # indica significância ($p < 0.01$) para o mesmo dia de extração.

Os resultados de viabilidade apresentados correlacionaram-se com as micrografias de fluorescência em que se pode observar uma grande quantidade de células íntegras para as amostras dos vidros nBG e Bioglass ao terceiro dia de extração na concentração de 10 mg mL^{-1} , enquanto as células expostas ao extrato obtido da vitrocerâmica exibiu poucas células coradas com calceína embora a marcação dos núcleos com DAPI evidencia que não houve danos ao material genético. Esta observação sugere que a exposição indireta a vitrocerâmica nBGC promoveu a inibição do metabolismo das células resultando na baixa porcentagem detectada pelos ensaios de viabilidade para este grupo de extratos (Figura 5.32).

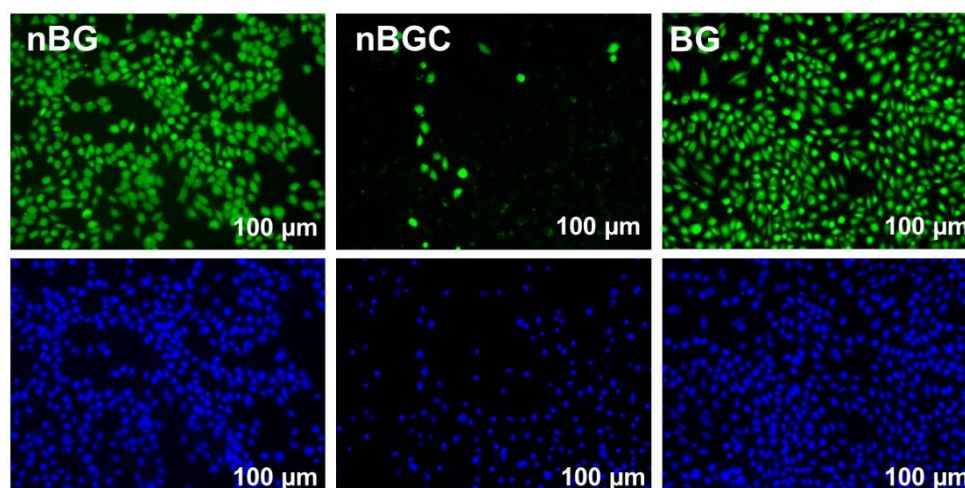


FIGURA 5.32 – Micrografias de fluorescência para células MG-63 fixas coradas com DAPI (em azul), e células vivas coradas com calceína (em verde) cultivadas por 24 h com os extratos coletados ao terceiro dia de incubação na presença de diferentes partículas a 10 mg mL^{-1} : vidro (nBG), vitrocerâmica (nBGC), e Bioglass 45S5 (BG).

A citotoxicidade exibida pelas diferentes partículas pode estar relacionada ao pH dos respectivos extratos (Tabela 5.6). A partir desses valores pode-se notar que o meio de cultura exposto a vitrocerâmica nBGC exibiu os mais elevados valores de pH ($\geq 9,75$) com citotoxicidade em todas as concentrações para 1 e 3 dias de extração. Na sequência, o Bioglass comercial com valores de pH $\geq 9,51$ e, por fim, as partículas vítreas nBG com pH $\geq 9,25$ que exibiu os melhores

resultados de viabilidade celular. Pode-se mencionar que a citotoxicidade para as células MG-63 em compósitos contendo o vidro Bioglass 45S5 foi verificado anteriormente por RIVADENEIRA et al. ¹²¹, em que ocorreu um decréscimo na viabilidade das células MG-63 com a adição do Bioglass à uma matriz de gelatina-amido, o qual foi atribuído a dissolução do vidro. No caso deste presente trabalho, a maior reatividade exibida pela vitrocerâmica nBGC nos diferentes experimentos realizados apontam que esta característica gerou citotoxicidade. Com relação a superior viabilidade das partículas nBG em comparação ao Bioglass a 10 mg mL^{-1} , este resultado possivelmente está associado a diferenças na composição química, em que nBG apresenta uma menor razão $\text{CaO/P}_2\text{O}_5$ a qual tem sido relacionada a vidros com menor amplitude de variação de pH ¹²². Além disso, este efeito é constatado nos resultados apresentados, mas estudos adicionais ainda precisam ser feitos para elucidar os distintos possíveis efeitos biológicos do vidro nBG.

TABELA 5.6 – Valores de pH medidos para os extratos do meio de cultura expostos a diferentes partículas nas concentrações $10\text{-}30 \text{ mg mL}^{-1}$ a 37°C por 1 e 3 dias ($n = 3$).

Amostra	Dia 1	Dia 3
nBG-5	$9,25 \pm 0,05$	$9,23 \pm 0,09$
nBG-10	$9,76 \pm 0,04$	$9,96 \pm 0,01$
nBG-15	$9,98 \pm 0,03$	$10,24 \pm 0,01$
nBGC-5	$9,75 \pm 0,06$	$9,99 \pm 0,08$
nBGC-10	$9,93 \pm 0,07$	$10,42 \pm 0,01$
nBGC-15	$10,43 \pm 0,01$	$10,89 \pm 0,03$
BG-5	$9,51 \pm 0,02$	$9,86 \pm 0,05$
BG-10	$9,77 \pm 0,04$	$10,16 \pm 0,09$
BG-15	$10,04 \pm 0,03$	$10,33 \pm 0,00$

5.4.3 - Investigação dos hidrogéis contendo partículas

Os hidrogéis preparados com as partículas nBG e nBGC antes e após a transição sol-gel podem ser visualizados na Figura 5.33, pela qual é possível observar que todas as composições preparadas demonstraram um aspeto de gel em temperaturas igual ou acima a LCST. A coloração distinta em comparação ao PNVCL puro em meio de cultura na Figura 5.28 se deve a presença do indicador vermelho de fenol no meio que exibe uma coloração rosa quando sob $\text{pH} > 8,00$.

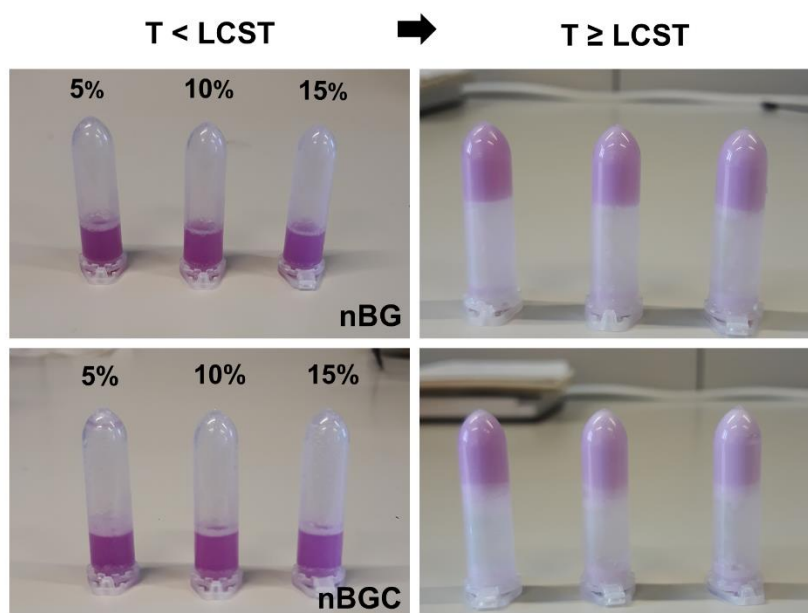


FIGURA 5.33 - Hidrogéis de PNVCL a 20% *m/v* preparados com diferentes quantidades de partículas nBG e nBGC (5-15% *m/m*) em meio de cultura em temperaturas acima (direita) e abaixo (esquerda) da LCST.

Os resultados de viabilidade de células na Figura 5.34 evidenciam que os hidrogéis preparados com diferentes tipos e quantidades de partículas foram citocompatíveis no primeiro dia de extração. Estes resultados contrastam com aqueles verificados para as partículas puras, em que os vidros nBG e Bioglass demonstraram toxicidade em concentrações mais elevadas, de 20 e 30 mg mL^{-1} , enquanto a vitrocerâmica nBGC apresentou-se tóxica independente da concentração.

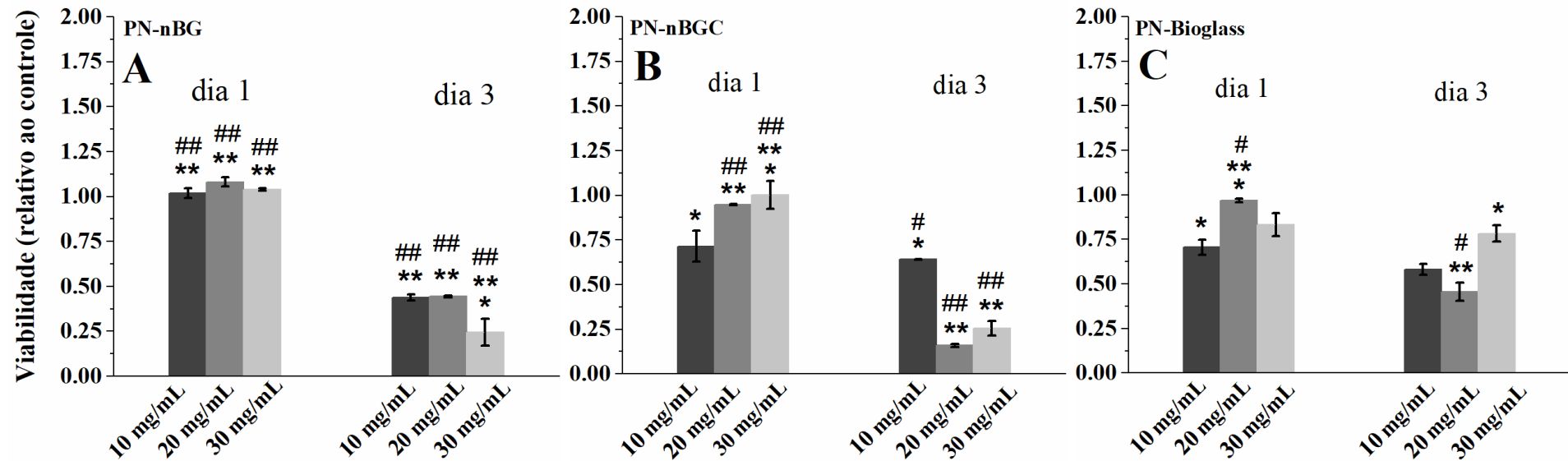


FIGURA 5.34 - Viabilidade de células MG-63 cultivadas por 24 h na presença dos extratos obtidos pela incubação do meio de cultura por 1 e 3 dias com hidrogéis de PNVCL (20% *m/v*) preparados com diferentes quantidades de partículas de 5-15% *m/m* (em relação a massa de PNVCL, correspondendo a 10-30 mg mL⁻¹ no sistema, respectivamente): (A) com partículas do vidro nBG, (B) com partículas da vitrocerâmica nBGC, e (C) com partículas do vidro comercial Bioglass 45S5. Os resultados expressam a média entre dois experimentos independentes com $n = 4$ para cada experimento individual. * e # Indicam significância estatística entre o mesmo dia de extração, $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectivamente. ** e ## Indicam diferença estatística entre mesma concentração de partículas em diferentes dias de extração ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectivamente).

As viabilidades no primeiro dia de extração, portanto, demonstram que a incorporação das partículas no hidrogel de PNVCL foi benéfico para as células. Analisando os valores de pH obtidos para os extratos expostos a estes materiais (Tabela 5.7) e comparando-os com o pH das partículas puras (Figura 5.35), nota-se um efeito de redução de pH quando as partículas foram combinadas ao PNVCL, do qual se destacam os seguintes resultados (dados retirados da Tabela 5.7):

- Para o vidro nBG o maior valor de pH atingido passou de 10,24 para 9,79 após incorporado ao hidrogel;
- A vitrocerâmica nBGC passou de 10,89 para 10,17;
- O vidro Bioglass 45S5 de 10,33 para 9,73.

No terceiro dia de extração, observou-se o aumento dos valores de pH e um decréscimo nas viabilidades para todas as amostras comparadas ao primeiro dia, mas com resultados de viabilidade ainda superiores as partículas puras a 20 e 30 mg mL⁻¹ nos caso dos vidros nBG e Bioglass, e para todas as concentrações de vitrocerâmica. Isso se deve ao controle do pH dos extratos com a incorporação das partículas na rede do hidrogel controlado a reatividade das mesmas ao longo de até três dias consecutivos. Já o aumento do pH e o decréscimo das viabilidades ao terceiro dia pode ser explicado pela condução das análises em sistemas estáticos e sem trocas do meio de cultura gerando um efeito cumulativo dos produtos de dissolução das partículas. Por outro lado, este efeito poderia ser minimizado com a troca do meio de cultura exposto ao hidrogéis em intervalos pré-determinados a fim de simular um sistema de trocas dinâmico tal como ocorre no microambiente celular dos tecidos vivos.

Os resultados de viabilidades se correlacionam bem com as micrografias na Figura 5.36, as quais evidenciam células coradas para os extratos coletados ao terceiro dia em contato com os hidrogéis formulado com 5% (*m/m*) das diferentes

partículas. Este conjunto de resultados sugere que os diferentes materiais vítreos foram encapsulados na rede 3D dos hidrogéis de PNVCL, controlando a reatividade das partículas e resultando em variações de pH mais brandas nos extratos. Efeito semelhante a este foi constatado no estudo de GANTAR et al.¹¹⁹ em que nanopartículas de um vidro SiO₂-CaO foram utilizadas na formulação de hidrogéis injetáveis a base polietilenoglicol, em que os nanocompósitos resultantes apresentaram viabilidade para a linhagem de células HeLa, sendo que hidrogel controlou a degradação das nanopartículas pelo controle do pH, enquanto as nanopartículas puras demonstraram citotoxicidade pela elevação abrupta deste parâmetro (pH ~10,50).

TABELA 5.7 - Valores de pH medidos para os extratos do meio de cultura expostos aos hidrogéis de PNVCL (20% *m/v*) preparados com diferentes quantidades de partículas de 5-15% *m/m* (em relação a massa de PNVCL, correspondendo a 10-30 mg mL⁻¹ no sistema, respectivamente) a 37°C por 1 e 3 dias (*n* = 3).

Amostra	Dia 1	Dia 3
PN-nBG-5	8,70 ± 0,00	9,09 ± 0,01
PN-nBG-10	9,34 ± 0,10	9,70 ± 0,02
PN-nBG-15	9,40 ± 0,01	9,79 ± 0,01
PN-nBGC-5	9,14 ± 0,04	9,58 ± 0,03
PN-nBGC-10	9,58 ± 0,10	9,96 ± 0,07
PN-nBGC-15	10,07 ± 0,03	10,17 ± 0,03
PN-BG-5	9,30 ± 0,04	9,48 ± 0,02
PN-BG-10	9,23 ± 0,01	9,73 ± 0,04
PN-BG-15	9,38 ± 0,04	9,73 ± 0,01

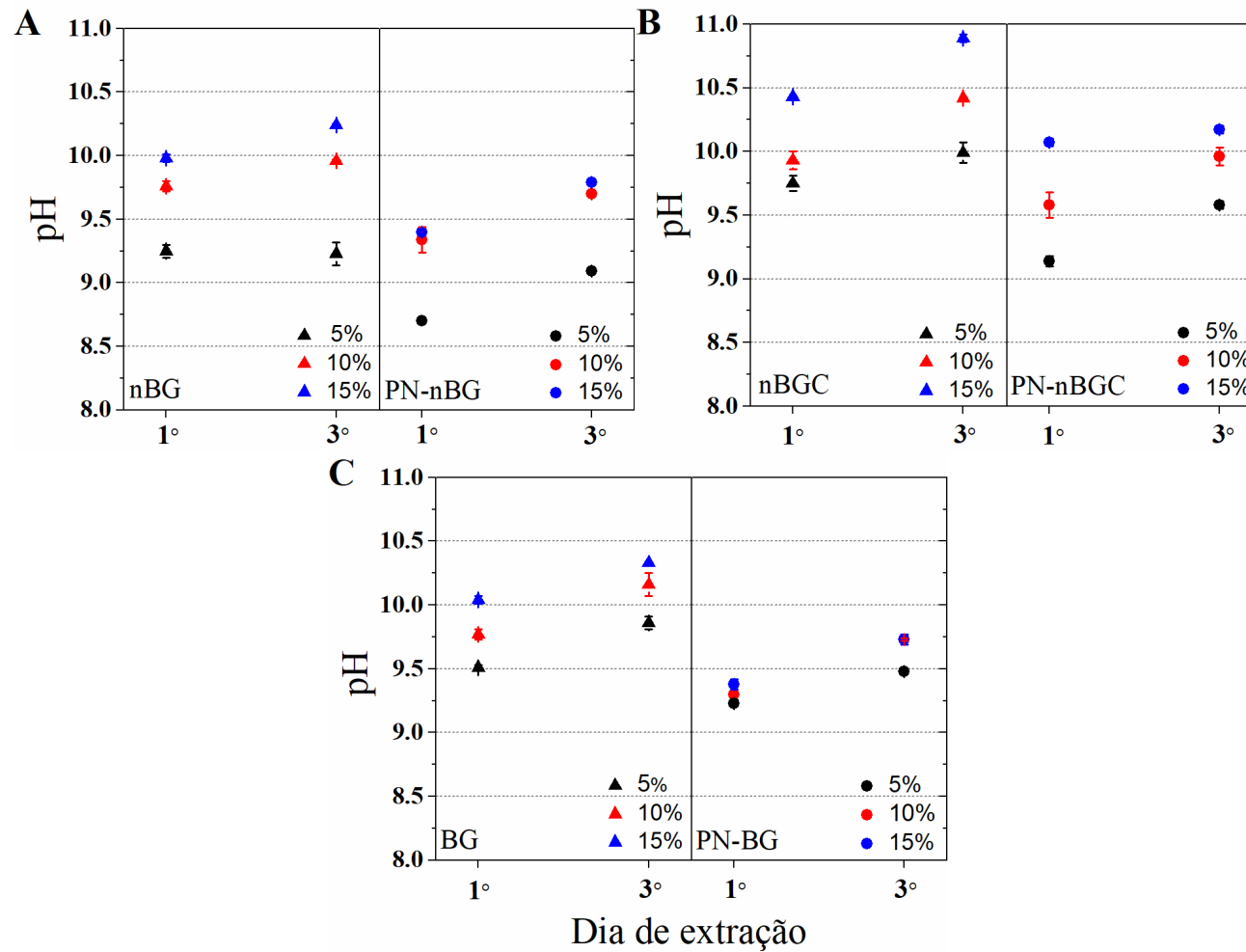


FIGURA 5.35 – Médias dos valores de pH ($n = 3$) medidos para os extratos expostos a diferentes tipos e quantidades de partículas (5-15% m/m) e das partículas em hidrogel de PNVCL a 20% (m/v): (A) vidro nBG, (B) vitrocerâmica nBGC, e (C) vidro Bioglass 45S5.

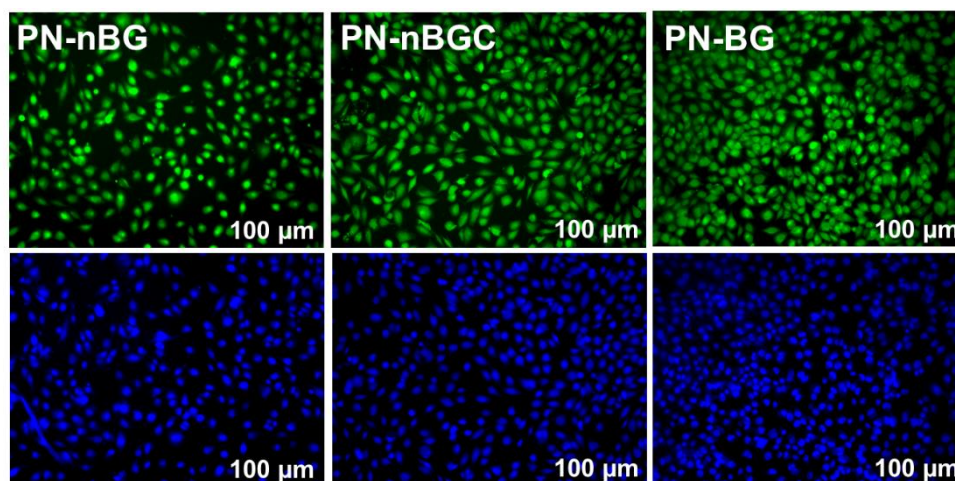


FIGURA 5.36 - Micrografias de fluorescência para células MG-63 fixas coradas com DAPI (em azul), e células vivas coradas com calceína (em verde) cultivadas por 24 h com os extratos coletados ao terceiro dia de incubação na presença dos hidrogéis preparados com diferentes partículas a 5% (*m/m*): vidro (nBG), vitrocerâmica (nBGC), e Bioglass 45S5 (BG).

Sendo assim, os estudos de citocompatibilidade apresentados neste trabalho fornecem evidências suficientes de que os sistemas de PNVCL contendo partículas bioativas de vidro e de vitrocerâmica apresentam potencial como biomateriais para a regeneração de ossos por meio da lenta dissolução dos produtos das partículas responsáveis pela osteogênese e mineralização. O encapsulamento das partículas bioativas no hidrogel de PNVCL permite controlar a reatividade das mesmas oferecendo assim citocompatibilidade. Esses hidrogéis podem ser explorados em estudos *in vitro* subsequentes utilizando outras linhagens celulares, ou avaliados quanto ao potencial como *scaffold* para o suporte e a proliferação de células ósseas nesses biomateriais.

6 - Conclusões

Por meio deste estudo foi possível avaliar, de forma preliminar, o potencial de hidrogéis a base de PNVCL e partículas bioativas como candidato material injetável para regeneração óssea. As partículas de vidro e vitrocerâmica do sistema quaternário $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$ desenvolvidas demonstraram atividade antimicrobiana superior a outros vidros bioativos presentes na literatura contra a bactéria *S. aureus*. Esta diferença foi atribuída a características exibidas por esses materiais após a moagem que apresentaram uma distribuição submicrométrica de tamanho de partículas. A formação de HCA nesses dois distintos materiais foi constatada ao quinto dia de imersão em SBF e indicou uma capacidade de mineralização comparável a outros vidros bioativos padrões. A superior reatividade identificada para vitrocerâmica nos diferentes experimentos realizados em comparação ao vidro foi relacionada ao respectivo histórico de processamento, em que a síntese sol-gel resultou em maior área de superfície embora a cristalização não pode ser evitada com o tratamento térmico deste material. Por outro lado, a cristalização do vidro pode ser evitada no método de fusão, mas o material resultante apresentou menor área de superfície o que é característico desta rota de fabricação.

Os hidrogéis termossensíveis de PNVCL sintetizados nos diferentes solventes exibiram uma transição sol-gel próxima a temperatura fisiológica humana oferecendo assim a possibilidade de serem injetados no corpo. Dentre os polímeros obtidos, o PNVCL sintetizado em DMSO exibiu uma fina distribuição de diâmetro hidrodinâmico tornando-o um material atrativo para o uso injetável. A formulação dos hidrogéis a uma concentração fixa de PNVCL (20% *m/v*) contendo as partículas bioativas permitiu verificar que as propriedades reológicas e a citocompatibilidade dos hidrogéis pode ser controlada pelo tipo e quantidade de partículas empregadas. A adição da vitrocerâmica ao PNVCL melhorou o comportamento viscoelástico do hidrogel na temperatura fisiológica pela existência de uma interface favorável entre o polímero e essas partículas.

Diferentemente, a adição do vidro levou a um decréscimo nessa propriedade em função da baixa interação com o hidrogel o que é explicado pela menor reatividade exibida por essas partículas.

Os estudos de viabilidade utilizando células de osteosarcoma MG-63, um tipo de célula humana óssea, revelou um efeito benéfico para as células quando as partículas foram adicionadas ao hidrogel. Enquanto o vidro e a vitrocerâmica puros promoveram um considerável aumento do pH do meio de cultura causando dano e morte celular, um efeito de controle do pH foi obtido quando essas partículas foram utilizadas em conjunto com o PNVCL obtendo-se hidrogéis compósitos citocompatíveis. Esses hidrogéis podem ser úteis no tratamento e na prevenção da osteoporose oferecendo uma abordagem terapêutica pouco invasiva, mas estudos adicionais são necessários, tais como a investigação das propriedades de injeção e estabilidade dos diferentes hidrogéis no longo prazo.

7 - Referências bibliográficas

1. **Nature portfolio**: Key Advances in Medicine 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/collections/nswglzqrbp/>. Data de acesso: Maio 18, 2022.
2. VERT, M. DOI, Y.; HELLWICH, K.-H.; HESS, M.; HODGE, P.; KUBISA, P.; RINAUDO, M.; SCHUÉ, F. “Terminology for biorelated polymers and applications: IUPAC Recommendations”. *Pure and Applied Chemistry*, **84**: 377, 2012.
3. REDDY, M. S. B.; PONNAMMA, D.; CHOUDHARY, R.; SADASIVUNI, K.K. “A Comparative Review of Natural and Synthetic Biopolymer Composite Scaffolds. *Polymers*”, **13**: 1105, 2021.
4. GONZALES MOLFINO, H. M.; ALCALDE YAÑEZ, A.; VALVERDE MORÓN, V. V.; VILLANUEVA SALVATIERRA, D. V. “Electrospinning: Advances and applications in the field of biomedicine”. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, **20**: 706, 2020.
5. PRADEEP, P. V.; PAUL, L. “Review on novel biomaterials and innovative 3D printing techniques in biomedical applications”. *Materials Today: Proceedings*, **58**: 96, 2022.
6. JAMES, R.; DENG, M.; LAURENCIN, C. T.; KUMBAR, S. G. “Nanocomposites and bone regeneration”. *Frontiers of Materials Science*, **5**: 342, 2011.
7. ROGEL, M. R.; QIU, H.; AMEER, G. A. “The role of nanocomposites in bone regeneration”. *Journal of Materials Chemistry*, **18**: 4233, 2008.
8. SANDERSON, K. “structure: Artificial armour”. *Nature*, **519** (7544), 2015.
9. GIMBLE, J. M.; FLOYD, E. Z.; KASSEM, M.; NUTTALL, M. E. “Aging and Bone”. IN: *Osteoporosis in Older Persons: Pathophysiology and Therapeutic Approach*. DUQUE, G. AND KIEL, D.P. (Eds.). Springer-Verlag, London, 2009. p. 19–28.
10. SCHILLER, P. C.; D’IPPOLITO, G.; HOWARD, G. A. “Biology of Bone”. IN: *Osteoporosis in Older Persons: Pathophysiology and Therapeutic Approach*. DUQUE, G. AND KIEL, D.P. (Eds.). Springer-Verlag, London, 2009. p. 1–18.
11. KNUDTSON, M. “Osteoporosis: Background and Overview”. *The Journal for Nurse Practitioners*, **5**: S4, 2009.
12. **International Osteoporosis Foundation**. Disponível em: <https://www.osteoporosis.foundation/facts-statistics>. Data de acesso: Maio 20, 2022.

13. KLOTZBUECHER, C. M.; ROSS, P. D.; LANDSMAN, P. B.; ABBOTT, T.A.; BERGER, M. “Patients with Prior Fractures Have an Increased Risk of Future Fractures: A Summary of the Literature and Statistical Synthesis”. *Journal of Bone and Mineral Research*, **15** (4): 2010.
14. MIGONNEY, V. *History of Biomaterials*. 2–10. ISTE Ltd and John Wiley & Sons, Inc., 2014. p. 2-10.
15. DACULSI, G. “History of Development and Use of the Bioceramics and Biocomposites. IN: *Handbook of Bioceramics and Biocomposites*. ANTONIAC, I.V. (Eds.). Springer International Publishing, Switzerland, 2016. p. 3–22.
16. HENCH, L. L. “The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*”, **17**: 967, 2006.
17. JONES, J. R. “Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids”. *Acta Biomaterialia*, **23**: S53, 2015.
18. FERNANDES, H. R.; GADDAM, A.; REBELO, A.; BRAZETE, D.; STAN, G.E.; FERREIRA, J.M.F. “Bioactive Glasses and Glass-Ceramics for Healthcare Applications in Bone Regeneration and Tissue Engineering”. *Materials*, **11**: 2530, 2018.
19. ZANOTTO, E. D.; MAURO, J. C. “The glassy state of matter: Its definition and ultimate fate”. *Journal of Non-Crystalline Solids*, **471**: 490, 2017.
20. KAUR, G.; PANDEY, O.P.; SINGH, K.; HOMA, D.; SCOTT, B.; PICKRELL, G. “A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication and apatite formation”. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **102**: 254, 2014.
21. SOUZA, L.; LOPES, J. H.; ENCARNAÇÃO, D.; MAZALI, I. O.; MARTIN, R.A.; CAMILLI, J.A.; BERTRAN, C.A. “Comprehensive in vitro and in vivo studies of novel melt-derived Nb-substituted 45S5 bioglass reveal its enhanced bioactive properties for bone healing”. *Scientific Reports*, **8**: 12808, 2018.
22. CHEN, X.; CHEN, X.; BRAUER, D. S.; WILSON, R.M.; LAW, R. V.; HILL, R. G.; KARPUKHINA, N. “Sodium is not essential for high bioactivity of glasses”. *International Journal of Applied Glass Science*, **8**: 428, 2017.
23. WALLACE, K. E.; HILL, R. G.; PEMBROKE, J. T.; BROWN, C. J.; HATTON, P. v. “Influence of sodium oxide content on bioactive glass properties”. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **10**: 697, 1999.
24. KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?” *Biomaterials*, **27**: 2907, 2006.

25. THOMPSON, I. D.; HENCH, L. L. “Mechanical properties of bioactive glasses, glass-ceramics and composites”. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine, **212**: 127, 1998.
26. TSIGKOU, O.; LABBAF, S.; STEVENS, M. M.; PORTER, A. E.; JONES, J.R. “Monodispersed bioactive glass submicron particles and their effect on bone marrow and adipose tissue-derived stem cells”. Advanced Healthcare Materials, **3**: 115, 2014.
27. LUZ, G. M.; MANO, J. F. “Preparation and characterization of bioactive glass nanoparticles prepared by sol–gel for biomedical applications”. Nanotechnology, **22**: 494014, 2011.
28. SINGH SIDHU, V. P.; BORGES, R.; YUSUF, M.; MAHMOUDI, S.; FALLAH GHORBANI, S.; HOSSEINIKIA, M.; SALAHSHOUR, P.; SADEGHI, F.; AREFIAN, M. “A comprehensive review of bioactive glass: synthesis, ion substitution, application, challenges, and future perspectives”. Journal of Composites and Compounds, **3** (4): 2021.
29. HENCH, L. L.; WEST, J. K. “The sol-gel process”. Chemical Reviews, **90**: 33, 1990.
30. HAN, Y.; LU, Z.; TENG, Z.; LIANG, J.; GUO, Z.; WANG, D.; HAN, M.-Y.; YANG, W. “Unraveling the Growth Mechanism of Silica Particles in the Stöber Method: In Situ Seeded Growth Model”. Langmuir, **33**: 5879, 2017.
31. LABBAF, S.; TSIGKOU, O.; MÜLLER, K. H.; STEVENS, M. M.; PORTER, A. E.; JONES, J. R. “Spherical bioactive glass particles and their interaction with human mesenchymal stem cells in vitro”. Biomaterials, **32**: 1010, 2011.
32. SIQUEIRA, R. L.; COSTA, L. C.; SCHIAVON, M. A.; DE CASTRO, D. T.; DOS REIS, A. C.; PEITL, O.; ZANOTTO, E. D. “Bioglass® and resulting crystalline materials synthesized via an acetic acid-assisted sol–gel route. Journal of Sol-Gel Science and Technology”, **83**: 165, 2017.
33. FAURE, J.; DREVET, R.; LEMELLE, A.; BEN JABER, N.; TARA, A.; EL BTAOURI, H.; BENHAYOUNE, H. “A new sol–gel synthesis of 45S5 bioactive glass using an organic acid as catalyst”. Materials Science and Engineering: C, **47**: 407, 2015.
34. REZABEIGI, E.; WOOD-ADAMS, P.M.; DREW, R.A.L. “Synthesis of 45S5 Bioglass® via a straightforward organic, nitrate-free sol–gel process”. Materials Science and Engineering: C, **40**: 248, 2014.

35. DING, Y.; SOUZA, M. T.; LI, W.; SCHUBERT, D. W.; BOCCACCINI, A. R.; ROETHER, J. A. "Bioactive Glass-Biopolymer Composites for Applications in Tissue Engineering". IN: Handbook of Bioceramics and Biocomposites. ANTONIAC, I.V. (Eds.). Springer International Publishing, Switzerland, 2016. p. 326–351.
36. NIKPOUR, P.; SALIMI-KENARI, H.; FAHIMIPOUR, F.; RABIEE, S. M.; IMANI, M.; DASHTIMOGHADAM, E.; TAYEBI, L. "Dextran hydrogels incorporated with bioactive glass-ceramic: Nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering". Carbohydrate Polymers, **190**: 281, 2018.
37. MOHAN, D.; MOHAN, A.; ANTONIAC, I. V.; CIUREA, A.V. "Current Implants Used in Cranioplasty". IN: Handbook of Bioceramics and Biocomposites. ANTONIAC, I. V. (Eds.). Springer International Publishing, Switzerland, 2016. p. 1276–1303.
38. RAUCCI, M.G.; GIUGLIANO, D.; AMBROSIO, L. "Fundamental Properties of Bioceramics and Biocomposites". IN: Handbook of Bioceramics and Biocomposites. ANTONIAC, I. V. (Eds.). Springer International Publishing, Switzerland, 2016. p. 36–54.
39. SIMIONESCU, B. C.; IVANOV, D. "Natural and Synthetic Polymers for Designing Composite Materials". IN: Handbook of Bioceramics and Biocomposites. ANTONIAC, I. V. (Eds.). Springer International Publishing, Switzerland, 2016. p. 235–284.
40. EROL-TAYGUN, M.; UNALAN, I.; IDRIS, M. I. B.; MANO, J. F.; BOCCACCINI, A. R. "Bioactive Glass-Polymer Nanocomposites for Bone Tissue Regeneration Applications: A Review". Advanced Engineering Materials, **21**: 1900287, 2019.
41. GAČANIN, J.; KOVTUN, A.; FISCHER, S.; SCHWAGER, V.; QUAMBUSCH, J.; KUAN, S.L.; LIU, W.; BOLDT, F.; LI, C.; YANG, Z.; LIU, D.; WU, Y.; WEIL, T.; BARTH, H.; IGNATIUS, A. "Spatiotemporally Controlled Release of Rho-Inhibiting C3 Toxin from a Protein-DNA Hybrid Hydrogel for Targeted Inhibition of Osteoclast Formation and Activity". Advanced Healthcare Materials, **6**: 1700392, 2017.
42. TAN, H.; MARRA, K. G. "Injectable, Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications". Materials, **3**: 1746, 2010.
43. YU, L.; DING, J. "Injectable hydrogels as unique biomedical materials". Chemical Society Reviews, **37**: 1473, 2008.

44. 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**: 336, 2011.
45. EL-SHERBINY, I. M.; YACOUB, M. H. “Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges”. *Global Cardiology Science and Practice*, **38** (3): 2013.
46. MANTHA, S.; PILLAI, S.; KHAYAMBASHI, P.; UPADHYAY, A.; ZHANG, Y.; TAO, O.; PHAM, H. M.; TRAN, S. D. “Smart Hydrogels in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Materials”, **12**: 3323, 2019.
47. HUANG, H.; QI, X.; CHEN, Y.; WU, Z. “Thermo-sensitive hydrogels for delivering biotherapeutic molecules: A review”. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **27**: 990, 2019.
48. GONG, C.; QI, T.; WEI, X.; QU, Y.; WU, Q.; LUO, F.; QIAN, Z. “Thermosensitive polymeric hydrogels as drug delivery systems”. *Curr Med Chem*, **20**: 79, 2013.
49. KLOUDA, L. “Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*”, **97**: 338, 2015.
50. 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.
51. SALA, R. L. Hidrogéis Nanocompósitos Termossensíveis Aplicados no Crescimento de Células-tronco Mesenquimais e Condrócitos para a Engenharia Tecidual. São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química – UFSCar, 2018. Tese de doutorado, 177 p.
52. 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.
53. 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**: 7373, 2021.
54. 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**: 935, 2017.
55. ANDREI, M.; STĂNESCU, P. O.; DRĂGHICI, C.; BUTAC, L. M.; TEODORESCU, M. “Synthesis and characterization of hydrolytically degradable

poly,N-vinylcaprolactam copolymers with in-chain ester groups”. *Colloid and Polymer Science*, **296**: 1905, 2018.

56. DURKUT, S.; ELÇIN, Y. M. “Synthesis and characterization of thermosensitive poly,N-vinylcaprolactam-g-collagen”. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, **45**: 1665, 2017.

57. 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**: 229, 2010.

58. KAMACHI, M. “Influence of solvent on free radical polymerization of vinyl compounds. IN: Polymerization Processes. *Advances in Polymer Science*, 1981. p. 55-87.

59. YANG, Y.; LI, J.; HU, M.; CHEN, L.; BI, Y. “Well-defined poly,DL-lactide-b-poly,N-vinylcaprolactam copolymers: synthesis, solution properties and in vitro degradation”. *Journal of Polymer Research*, **21**: 549, 2014.

60. MARKVICHEVA, E. A.; TKACHUK, N. E.; KUPTSOVA, S. V.; DUGINA, T. N.; STRUKOVA, S. M.; KIRSSH, YU.E.; ZUBOV, V. P.; RUMISH, L. D. “Stabilization of proteases by entrapment in a new composite hydrogel”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **61**: 75, 1996.

61. DONOVA, M. V.; KUZKINA, I. F.; ARINBASAROVA, A. YU.; PASHKIN, I. I.; MARKVICHEVA, E. A.; BAKLASHOVA, T. G.; SUKHODOLSKAYA, G. V.; FOKINA, V. V.; KIRSH, Y. E.; KOSHCHEYENKO, K. A.; ZUBOV, V. P. “Poly-N-vinylcaprolactam gel: A novel matrix for entrapment of microorganisms”. *Biotechnology Techniques*, **7**: 415, 1993.

62. SHAKYA, A. K.; HOLMDAHL, R.; NANDAKUMAR, K. S.; KUMAR, A. “Polymeric cryogels are biocompatible, and their biodegradation is independent of oxidative radicals”. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **102**: 3409, 2014.

63. PICH, A.; HAIN, J.; LU, Y.; BOYKO, V.; PROTS, Y.; ADLER, H.-J. “Hybrid Microgels with ZnS Inclusions”. *Macromolecules*, **38**: 6610, 2005.

64. AGRAWAL, M.; PICH, A.; GUPTA, S.; ZAFEIROPOULOS, N.E.; RUBIO-RETAMA, J.; SIMON, F.; STAMM, M. “Temperature sensitive hybrid microgels loaded with ZnO nanoparticles”. *Journal of Materials Chemistry*, **18**: 2581, 2008.

65. HÄNTZSCHEL, N.; ZHANG, F.; ECKERT, F.; PICH, A.; WINNIK, M.A. "Poly, N-vinylcaprolactam-co -glycidyl methacrylate Aqueous Microgels Labeled with Fluorescent LaF3:Eu Nanoparticles". *Langmuir*, **23**: 10793, 2007.
66. SCHACHSCHAL, S.; PICH, A.; ADLER, H.-J. "Aqueous Microgels for the Growth of Hydroxyapatite Nanocrystals". *Langmuir*, **24**: 5129, 2008.
67. BERGER, S.; SINGH, R.; SUDHA, J. D.; ADLER, H.-J.; PICH, A. "Microgel/clay nanohybrids as responsive scavenger systems". *Polymer*, **51**: 3829, 2010.
68. MOSHAVERINIA, A.; ANSARI, S.; ROOHPUR, N.; RESHAD, M.; SCHRICKER, S. R.; CHEE, W. W. "Effects of N-vinylcaprolactam containing polyelectrolytes on hardness, fluoride release and water sorption of conventional glass ionomers". *The Journal of Prosthetic Dentistry*, **105**: 323, 2011.
69. GARCÍA-SOBRINO, R.; CASADO-LOSADA, I.; BRUNO-PÉREZ, L.; GARCÍA, C.; REINECKE, H.; ELVIRA, C.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, J.; GALLARDO, A.; MARTÍNEZ-CAMPOS, E. "Thermosensitive hydrogels functionalized with pH sensitive COOH groups for bone cell harvesting". *European Polymer Journal*, **169**: 111131, 2022.
70. PARAMESWARAN-THANKAM, A.; PARNELL, C. M.; WATANABE, F.; RANGUMAGAR, A. B.; CHHETRI, B. P.; SZWEDO, P. K.; BIRIS, A. S.; GHOSH, A. "Guar-Based Injectable Thermoresponsive Hydrogel as a Scaffold for Bone Cell Growth and Controlled Drug Delivery". *ACS Omega*, **3**: 15158, 2018.
71. BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. "Adsorption of Gases in Multimolecular Layers". *J Am Chem Soc.*, **60**: 309, 1938.
72. GREGG, S. J.; SING, K. S. W. *Adsorption, Surface Area and Porosity*. Academic Press, London, 1982. p. 15-27.
73. SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, **9**: 671, 2012.
74. PIRAYESH, H.; NYCHKA, J. A. "Sol-gel synthesis of bioactive glass-ceramic 45S5 and its in vitro dissolution and mineralization behavior". *Journal of the American Ceramic Society*, **96**: 1643, 2013.
75. NAWAZ, Q.; DE PABLOS-MARTÍN, A.; MARTINS DE SOUZA E SILVA, J.; HURLE, K.; JAIMES, A. T. C.; BRAUER, D. S.; BOCCACCINI, A. R. "New insights into the crystallization process of sol-gel-derived 45S5 bioactive glass". *Journal of the American Ceramic Society*, **103**: 4234, 2020.

76. MUBINA, M. S. K.; SHAILAJHA, S.; SANKARANARAYANAN, R.; SARANYA, L. "In vitro bioactivity, mechanical behavior and antibacterial properties of mesoporous SiO₂-CaO-Na₂O-P₂O₅ nano bioactive glass ceramics". *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, **100**: 103379, 2019.
77. HUANG, L.-C.; LIN, C.-C.; SHEN, P. "Crystallization and stoichiometry of crystals in Na₂CaSi₂O₆-P₂O₅ based bioactive glasses". *Materials Science and Engineering: A*, **452**: 326, 2007.
78. XIN, R.; ZHANG, Q.; GAO, J. "Identification of the wollastonite phase in sintered 45S5 bioglass and its effect on in vitro bioactivity". *Journal of Non-Crystalline Solids*, **356**: 1180, 2010.
79. MANSOUR, S. A. A. "Thermal decomposition of calcium citrate tetrahydrate". *Thermochimica Acta*, **233**: 243, 1994.
80. MASSERA, J.; FAGERLUND, S.; HUPA, L.; HUPA, M. "Crystallization mechanism of the bioactive glasses, 45S5 and S53P4". *Journal of the American Ceramic Society*, **95**: 607, 2012.
81. CHEN, Q.Z.; LI, Y.; JIN, L.Y.; QUINN, J.M.W.; KOMESAROFF, P.A. "A new sol-gel process for producing Na₂O-containing bioactive glass ceramics". *Acta Biomaterialia*, **6**: 4143, 2010.
82. LEFEBVRE, L.; CHEVALIER, J.; GREMILLARD, L.; ZENATI, R.; THOLLET, G.; BERNACHE-ASSOLANT, D.; GOVIN, A. "Structural transformations of bioactive glass 45S5 with thermal treatments". *Acta Materialia*, **55**: 3305, 2007.
83. LUCAS-GIROT, A.; MEZAH, F. Z.; MAMI, M.; OUDADESSE, H.; HARABI, A.; LE FLOCH, M. "Sol-gel synthesis of a new composition of bioactive glass in the quaternary system SiO₂-CaO-Na₂O-P₂O₅: Comparison with melting method". *Journal of Non-Crystalline Solids*, **357**: 3322, 2011.
84. PERARDI, A.; CERRUTI, M.; MORTERRA, C. "Carbonate formation on sol-gel bioactive glass 58S and on Bioglass® 45S5". *Studies in Surface Science and Catalysis*, **155**: 461, 2005.
85. CERRUTI, M.; MORTERRA, C. "Carbonate formation on bioactive glasses". *Langmuir*, **20**: 6382, 2004.
86. BENTO, R.; GADDAM, A.; FERREIRA, J.M.F. "Sol-gel synthesis and characterization of a quaternary bioglass for bone regeneration and tissue engineering". *Materials*, **14**., 2021.

87. DOOSTMOHAMMADI, A.; MONSHI, A.; SALEHI, R.; FATHI, M. H.; GOLNIYA, Z.; DANIELS, A. U. "Bioactive glass nanoparticles with negative zeta potential". *Ceramics International*, **37**: 2311, 2011.
88. SMEETS, R.; KOLK, A.; GERRESSEN, M.; DRIEMEL, O.; MACIEJEWSKI, O.; HERMANN-SACHWEH, B.; RIEDIGER, D.; STEIN, J.M. "A new biphasic osteoinductive calcium composite material with a negative Zeta potential for bone augmentation". *Head & Face Medicine*, **5**: 13, 2009.
89. PLEWINSKI, M.; SCHICKLE, K.; LINDNER, M.; KIRSTEN, A.; WEBER, M.; FISCHER, H. "The effect of crystallization of bioactive bioglass 45S5 on apatite formation and degradation". *Dental Materials*, **29**: 1256, 2013.
90. FILHO, O. P.; LA TORRE, G. P.; HENCH, L.L. "Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5". *Journal of Biomedical Materials Research*, **30**: 509, 1996.
91. CHEN, Q. Z.; AHMED, I.; KNOWLES, J. C.; NAZHAT, S. N.; BOCCACCINI, A. R.; REZWAN, K. "Collagen release kinetics of surface functionalized 45S5 Bioglass®-based porous scaffolds". *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **86A**: 987, 2008.
92. BELLUCCI, D.; CANNILLO, V.; SOLA, A.; CHIELLINI, F.; GAZZARRI, M.; MIGONE, C. "Macroporous Bioglass®-derived scaffolds for bone tissue regeneration". *Ceramics International*, **37**: 1575, 2011.
93. ZHANG, E.; ZHAO, X.; HU, J.; WANG, R.; FU, S.; QIN, G. "Antibacterial metals and alloys for potential biomedical implants". *Bioactive Materials*, **6**: 2569, 2021.
94. MANCUSO, G.; MIDIRI, A.; GERACE, E.; BIONDO, C. "Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens". *Pathogens*, **10**: 1310, 2021.
95. LI, F.; ZHAI, D.; WU, Z.; ZHAO, Y.; QIAO, D.; ZHAO, X. "Impairment of the Cell Wall Ligase, LytR-CpsA-Psr Protein, LcpC, in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Reduces Its Resistance to Antibiotics and Infection in a Mouse Model of Sepsis". *Frontiers in Microbiology*, **11**, 2020.
96. MONTEIRO, J.M.; COVAS, G.; RAUSCH, D.; FILIPE, S. R.; SCHNEIDER, T.; SAHL, H. G.; PINHO, M. G. "The pentaglycine bridges of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan are essential for cell integrity". *Scientific Reports*. **9** (1), 2019.
97. WEN, Q.; GU, F.; SUI, Z.; SU, Z.; YU, T. "The Process of Osteoblastic Infection by *Staphylococcus Aureus*". *Int J Med Sci*, **17**: 1327, 2020.

98. ZHANG, D.; LEPPÄRANTA, O.; MUNUKKA, E.; YLÄNEN, H.; VILJANEN, M.K.; EEROLA, E.; HUPA, M.; HUPA, L. "Antibacterial effects and dissolution behavior of six bioactive glasses". *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, **93**: 475, 2010.
99. HU, S.; CHANG, J.; LIU, M.; NING, C. "Study on antibacterial effect of 45S5 Bioglass®". *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **20**: 281, 2009.
100. LISBÃO, A. S. "Estrutura e propriedades dos polímeros". EdUFSCar, São Carlos, 2009. p. 87-15.
101. HOHNE, G. W. H.; HEMMINGER, W. F.; FLAMMERSHEIM, H.-J. "Differential Scanning Calorimetry. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 2003. p. 31-121.
102. COWIE, J. M. G.; ARRIGHI, V. "Polymers: Chemistry and Physics of Modern Materials". CRC Press, Boca Raton, 2007. p. 321-327.
103. KOZANOĞLU, S.; ÖZDEMİR, T.; USANMAZ, A. "Polymerization of N-Vinylcaprolactam and Characterization of Poly,N-Vinylcaprolactam". *Journal of Macromolecular Science, Part A*, **48**: 467, 2011.
104. ATKINS, P.; PAULA, J. "Físico Química". LTC, Rio de Janeiro, 2008. p. 34-42.
105. 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** (1): 56, 2013.
106. KAMACHI, M. "Influence of solvent on free radical polymerization of vinyl compounds. IN: Polymerization Processes. Advances in Polymer Science, 1981. p. 55-87
107. BANFI, D.; PATINY, L. "Resurrecting and Processing NMR Spectra On-line". *Chimia*, **62**: 280, 2008.
108. KIRSH, YU. E.; YANUL, N. A.; KALNINSH, K. K. "Structural transformations and water associate interactions in poly-N-vinylcaprolactam-water system". *European Polymer Journal*, **35**: 305, 1999.
109. DEGIRMENCI, I.; NOBLE, B. B.; LIN, C. Y.; COOTE, M. L. "The Mechanism of Stereoregulation" IN: Free-Radical Polymerization of Bulky Methacrylates. MATYJASZEWSKI, K. SUMERLIN, B. S. TSAREVSKY, N. V. American Chemical Society, Washington, 2012. p. 15-32.

110. CHEN, M.; ZHONG, M.; JOHNSON, J. A. "Light-Controlled Radical Polymerization: Mechanisms, Methods, and Applications". *Chemical Reviews*, **116**: 10167, 2016.
111. NAKABAYASHI, K.; MORI, H. "Recent progress in controlled radical polymerization of N-vinyl monomers". *European Polymer Journal*, **49**: 2808, 2013.
112. MACCHIONE, M. A.; GUERRERO-BELTRÁN, C.; ROSSO, A. P.; EUTI, E.M.; MARTINELLI, M.; STRUMIA, M. C.; MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. Á. "Poly,N-vinylcaprolactam Nanogels with Antiviral Behavior against HIV-1 Infection". *Scientific Reports*, **9**: 5732, 2019.
113. PHETRONG, S.; SANSUK, C.; TANGBORIBOONRAT, P.; PAOPRASERT, P. "Temperature-responsive crosslinked materials prepared from natural rubber and poly,N-vinylcaprolactam". *Macromolecular Research*, **25**: 799, 2017.
114. FERNÁNDEZ-QUIROZ, D.; GONZÁLEZ-GÓMEZ, Á.; LIZARDI-MENDOZA, J.; VÁZQUEZ-LASA, B.; GOYCOOLEA, F.M.; SAN ROMÁN, J.; ARGÜELLES-MONAL, W.M. "Effect of the molecular architecture on the thermosensitive properties of chitosan-g-poly,N-vinylcaprolactam". *Carbohydrate Polymers*, **134**: 92, 2015.
115. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. "The Spectrometric Identification of Organic Compounds". John Wiley & Sons, 2005. p. 502.
116. CHEN, T.; HOU, K.; REN, Q.; CHEN, G.; WEI, P.; ZHU, M. "Nanoparticle-Polymer Synergies in Nanocomposite Hydrogels: From Design to Application". *Macromolecular Rapid Communications*, **39**: 1800337, 2018.
117. BRETAS, R. E. S.; D'AVILA, M. A. "Reologia de Polímeros Fundidos". EdUFSCar, São Carlos, 2005. p. 99-148.
118. CHAKRABARTI, P. "Systematics in the interaction of metal ions with the main-chain carbonyl group in protein structures". *Biochemistry*, **29**: 651, 1990.
119. GANTAR, A.; DRNOVŠEK, N.; CASUSO, P.; PÉREZ-SAN VICENTE, A.; RODRIGUEZ, J.; DUPIN, D.; NOVAK, S.; LOINAZ, I. "Injectable and self-healing dynamic hydrogel containing bioactive glass nanoparticles as a potential biomaterial for bone regeneration". *RSC Advances*, **6**: 69156, 2016.
120. D'ESTE, M.; SPRECHER, C. M.; MILZ, S.; NEHRBASS, D.; DRESING, I.; ZEITER, S.; ALINI, M.; EGLIN, D. "Evaluation of an injectable

thermoreponsive hyaluronan hydrogel in a rabbit osteochondral defect model”. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **104**: 1469, 2016.

121. RIVADENEIRA, J.; DI VIRGILIO, A.L.; AUDISIO, M.C.; BOCCACCINI, A. R.; GORUSTOVICH, A. A. “45S5 Bioglass® concentrations modulate the release of vancomycin hydrochloride from gelatin–starch films: evaluation of antibacterial and cytotoxic effects”. *Journal of Materials Science*, **52**: 9091, 2017.

122. O’DONNELL, M. D.; WATTS, S .J.; HILL, R. G.; LAW, R. V. “The effect of phosphate content on the bioactivity of soda-lime-phosphosilicate glasses”. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **20**: 1611 2009.