

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

**“Hidrogéis Nanocompósitos Termossensíveis Aplicados no
Crescimento de Células–tronco Mesenquimais e Condrócitos para a
Engenharia Tecidual”**

Renata Lang Sala*

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 FAPESP (2013/25663-2)**

**São Carlos - SP
2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Renata Lang Sala, realizada em 27/09/2018:

Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo
UFSCar

Profa. Dra. Patricia Targon Campana
USP

Prof. Dr. Caio Marcio Paranhos da Silva
UFSCar

Profa. Dra. Tatiane Moraes Arantes
UFG-Jataí

Prof. Dr. Francys Kley Vieira Moreira
UFSCar

*“One, remember to look up at the stars and not down at your feet.
Two, never give up work. Work gives you meaning and purpose, and life is empty
without it. Three, if you are lucky enough to find love, remember it is there and
don't throw it away.”*

Stephen Hawking

DEDICATÓRIA

A Deus por tudo.

Aos meus pais Cristina e Simon, minha irmã Juliana, meu cunhado Heitor e meus avós Romilda e Joan, pelo imensurável amor, dedicação, apoio e incentivo.

À memória dos meus avós Carlos e Vera.

Ao Marco Aurélio, que sempre esteve ao meu lado, me ajudando a superar os momentos difíceis com seu amor, companheirismo, incentivo e paciência.

Aos amigos que têm caminhado comigo em todos momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Emerson R. Camargo pela orientação, ensinamentos, liberdade e confiança creditada em mim ao longo destes anos.

Ao Prof. Dr. Jason A. Burdick e ao seu grupo de pesquisa pela a oportunidade de pesquisa, suporte, ensinamentos e discussões.

Ao Prof. Dr. Elson Longo e ao Prof. Dr. Edson Roberto Leite pelas discussões, ensinamentos e disponibilizar o LIEC para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Thiago Venâncio, à Dra. Tatielih Pardim e ao Laboratório de RMN da UFSCar pelas medidas de RMN, discussões, aprendizados e amizade.

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

Ao Prof. Dr. Caio Paranhos e à Profa. Dra. Sandra Cruz pelos ensinamentos em polímeros, discussões e sugestões na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Tatiane M. Arantes e ao Prof. Dr. Fernando Henrique Cristovan que além de grandes amigos, sempre me incentivaram e contribuíram com inúmeras discussões e ideias.

Ao Prof. Dr. Fernando Henrique Cristovan e ao Prof. Dr. Maurício Pinheiro de Oliveira pelo aprendizado em síntese de polímeros.

Aos colegas Mário Rodrigo e Bruno Moura pela realização das análises termogravimétricas.

Aos colegas do LIEC e do departamento de química da UFSCar, em especial: Júlio, Francisco, Andressa, Lucas Ribeiro, Igor, Sara, Luiz Gorup, Ana, João Victor,

Patrícia, Estela, Lucas Mendes, André, Lucas Mendonça, Ivo, Bruno, Ricardo, Luiz Neves, Leidy e Santiago.

Aos técnicos e funcionários Ademir, Rorivaldo, Sandra, Daniela, Luma, Cristina, Ariane e Luciani que tanto contribuíram para diversas atividades no laboratório e no departamento de Química, como também transformaram o dia-a-dia muito mais alegre.

A FAPESP pelas bolsas de doutorado e BEPE concedidas (2013/25663-2 e 2015/07185-1).

Ao CNPq, CAPES e CEPID/CDMF.

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

E meus agradecimentos a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e colaboraram para o meu desenvolvimento.

LISTA DE TABELAS

TABELA 5.1 – Atribuição dos números de onda das principais bandas encontradas para os espectros de infravermelho das nanofibras mesoporosas de sílica antes e após remoção do CTAB e modificadas com MPS.	67
TABELA 5.2- Quantificação dos espectros <i>survey</i> para as nanofibras mesoporosas de SiO ₂ e SiO ₂ -MPS.	69
TABELA 5.3- Quantificação dos componentes C 1s dos espectros de XPS de alta resolução para SiO ₂ e SiO ₂ -MPS.	71
TABELA 5.4 - Área específica obtida por BET, volume e diâmetro de poros calculados para as nanofibras mesoporosas de SiO ₂ e SiO ₂ -MPS.	76
TABELA 5.5 - Atribuição dos números de onda das principais bandas encontradas para os espectros de infravermelho do PNVCL e dos copolímeros.	86
TABELA 5.6 - Valores das frações molares (x_{vac}) e mássicas (w_{VAc}) encontradas para os copolímeros a partir dos espectros de ¹ H RMN.	88
TABELA 5.7 - Valores de Tg obtidos experimentalmente e pela Equação de Flory-Fox, e ΔC_p para PNVCL, PNVCL-10 % PVAc, PN-20 % PVAc e PN-40 % PVAc.	90
TABELA 5.8 - Valores de LCST encontrados para dispersões poliméricas aquosas na concentração de 1 % m/v.	107
TABELA 5.9 - Parâmetros obtidos pelo ajuste da Equação 18 para os dados de densidade óptica em função da temperatura para PNVCL, PN-10% PVAc e seus nanocompósitos.	116
TABELA 5.10 - Parâmetros térmicos obtidos a partir das curvas de TG para PNVCL, PN-10 % PVAc e seus nanocompósitos com 1 e 5 % de SiO ₂ -MPS.	142
TABELA 5.11 - Valores de Tg e ΔC_p para PNVCL, PN-10% PVAc e seus nanocompósitos.	145

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 2.1 - Representação demonstrada por VEGA *et al.* ²⁷ das diferentes estruturas de hidrogéis encontradas, desde redes tradicionais de um único polímero (a), até aquelas que incluem redes múltiplas (b, c) e misturas de polímeros (d-f). Redes duplas podem ser interligadas, mas isso não é um requisito.....22
- FIGURA 2.2 - Esquema desenvolvido por YU e DING ³⁰ de como um hidrogel injetável que apresenta uma transição sol-gel em função da temperatura (T_{gel}) pode ser introduzido *in vivo*.24
- FIGURA 2.3 - Representação apresentada por NGUYEN *et al.* ²⁸ de hidrogéis reticulados por ligações covalentes e interações físicas.....24
- FIGURA 2.4 - Representação da etapa de iniciação da polimerização radicalar do PNVCL na presença do iniciador AIBN.....27
- FIGURA 2.5 - Representação da etapa de propagação da polimerização radicalar do PNVCL.....27
- FIGURA 2.6 - Representação da etapa de terminação por combinação (a) ou desproporção da polimerização radicalar do PNVCL.....28
- FIGURA 2.7 - Representação desenvolvida por CORTEZ-LEMUS e CLAVERIE ⁴⁸ do poli(N-vinilcaprolactama) sintetizado em diferentes estruturas para aplicações variadas.....29
- FIGURA 4.1 - Reator utilizado para a síntese dos polímeros e dos nanocompósitos e que possibilita o controle da temperatura, atmosfera, adição dos reagentes e refluxo.42
- FIGURA 5.1 - Demonstração baseada no artigo de HOFFMANN *et al.* ¹²⁶ de como a reação ocorre entre as espécies de sílica, que se encontram como ânions em condições básicas, com o surfactante catiônico CTAB.58
- FIGURA 5.2 - Esquema da formação de materiais mesoporosos na presença de agentes que direcionam a estrutura, proposto por HOFFMANN *et al.* ¹²⁶.58
- FIGURA 5.3 - Representação da ligação do agente organosilano MPS na superfície interna da mesoestrutura de sílica via ligação bidentada (1), tridentada (2) e monodentada (3). R representa o grupo $-CH_2-CH_3$59

FIGURA 5.4 - Imagens de MEV das nanofibras mesoporosas de sílica pura (a) e funcionalizadas com MPS (b). Imagens de MET de alta resolução da SiO ₂ -MPS (c). Ilustração da mesoestrutura hexagonal proposta por YANG <i>et al.</i> ¹²⁷ (d).....	61
FIGURA 5.5 - Distribuições do diâmetro hidrodinâmico obtidas por DLS para dispersões aquosas coloidais das nanofibras puras de sílica (a) e com MPS(b).....	63
FIGURA 5.6 – Difratoograma de raios X (a) e padrão de SAXS (b) para as nanofibras mesoporosas de sílica funcionalizadas com MPS.....	65
FIGURA 5.7 - Espectros de infravermelho das nanofibras mesoporosas de sílica pura (SiO ₂ com CTAB), após a remoção do CTAB (SiO ₂ sem CTAB), modificadas com o agente organossilano (SiO ₂ -MPS), e dos precursores CTAB e MPS.....	66
FIGURA 5.8 - Espectros <i>survey</i> de XPS das nanofibras mesoporosas de SiO ₂ e SiO ₂ -MPS (b).	69
FIGURA 5.9 – Espectros de XPS de C 1s de alta resolução para as nanofibras mesoporosas de SiO ₂ (a) e SiO ₂ -MPS (b).	70
FIGURA 5.10 – Curvas de perda de massa (a) e sua primeira derivada (b) das nanofibras mesoporosas de SiO ₂ (a) e SiO ₂ -MPS (b).	73
FIGURA 5.11 - Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio para as nanofibras mesoporosas de SiO ₂ (a) e SiO ₂ -MPS (b).....	75
FIGURA 5.12 - Espectros de ¹ H RMN do monômero NVCL, de PNVCL-15 % e de PNVCL-30 %.....	79
FIGURA 5.13 - Representação da 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.	80
FIGURA 5.14 - Espectros de transmitância de UV-vis da dispersão polimérica aquosa contendo 1 % m/v de PNVCL.....	81
FIGURA 5.15 - Intensidade da transmitância medida no comprimento de onda de 500 nm em função da temperatura da dispersão polimérica aquosa contendo 1 % m/v de PNVCL. Barra de erros representa o desvio padrão da análise realizada em sextuplicata.	82
FIGURA 5.16 - Reação de copolimerização entre NVCL e VAc na presença do iniciador radicalar AIBN.....	84

FIGURA 5.17 - Espectros de infravermelho para PNVCL e copolímeros de PNVCL-PVAc.	85
FIGURA 5.18 - Espectros de ¹ H RMN dos copolímeros de PNVCL e PVAc dispersos em água deuterada.	87
FIGURA 5.19 - Representação das possíveis reações entre os monômeros NVCL e VAc durante a polimerização radicalar.	89
FIGURA 5.20 - Curvas de DSC do PNVCL, PNVCL-10 % PVAc, PN-20 % PVAc e PN-40 % PVAc.	90
FIGURA 5.21 - Variação da Tg teórica e experimental em função da fração mássica de PVAc.	93
FIGURA 5.22 - Espectros de UV-vis da dispersão polimérica aquosa contendo 1% m/v do copolímero de PNVCL com 10 % de PVAc.	94
FIGURA 5.23 - Espectros de UV-vis da dispersão polimérica aquosa contendo 1% m/v do copolímero de PNVCL com 20 % de PVAc.	95
FIGURA 5.24 - Espectros de UV-vis da dispersão polimérica aquosa contendo 1% m/v do copolímero de PNVCL com 40 % de PVAc.	95
FIGURA 5.25 - Distribuições do diâmetro hidrodinâmico obtidas por DLS para as dispersões poliméricas 1 % m/v de PNVCL (a) e PN-10 % PVAc (b).	97
FIGURA 5.26 - Distribuições do diâmetro hidrodinâmico obtidas por DLS para as dispersões poliméricas 1 % m/v de PN-20 % PVAc (a) e PN-40 % PVAc (b).	98
FIGURA 5.27 - Representação da polimerização radicalar entre SiO ₂ -MPS e NVCL formando nanocompósitos de PNVCL com 1 e 5 % de SiO ₂	99
FIGURA 5.28 - Representação da polimerização radicalar entre SiO ₂ -MPS, NVCL e VAc formando nanocompósitos de PN-10 % PVAc com 1 e 5 % de SiO ₂	100
FIGURA 5.29 - Espectros de ¹ H RMN do PNVCL, PN-10 % PVAc e de seus nanocompósitos com 5 % de SiO ₂ -MPS (PN-5 % SiO ₂ e PN-10 % PVAc-5 % SiO ₂ , respectivamente).	101
FIGURA 5.30 - Espectros de infravermelho da SiO ₂ -MPS, do PNVCL, do PN-10 % PVAc (ou Cop) e de seus nanocompósitos com 1 e 5 % de SiO ₂ -MPS.	102

FIGURA 5.31 - Espectros de UV-vis de dispersões poliméricas aquosas 1 % m/v de PNVCL com 1 (a) e 5 % (b) de SiO ₂ -MPS.....	105
FIGURA 5.32 - Espectros de UV-vis de dispersões poliméricas aquosas 1 % m/v de PN-10 % PVAc com 1 (a) e 5 % (b) de SiO ₂ -MPS.	106
FIGURA 5.33 - Espectros de UV-vis das suspensões coloidais aquosas de nanofibras mesoporosas de SiO ₂ -MPS.....	109
FIGURA 5.34 - Variação da densidade óptica com a temperatura (pontos) e ajuste das curvas (linha vermelha) pela Equação 20 para PNVCL.....	113
FIGURA 5.35 - Variação da densidade óptica com a temperatura (pontos) e ajuste das curvas (linha vermelha) pela Equação 20 para PN-10 % PVAc.	113
FIGURA 5.36 - Variação da densidade óptica com a temperatura (pontos) e ajuste das curvas (linha vermelha) pela Equação 20 para PN-1 % SiO ₂ (a) e PN-5 % SiO ₂ (b).	114
FIGURA 5.37 - Variação da densidade óptica com a temperatura (pontos) e ajuste das curvas (linha vermelha) pela Equação 20 para PN-10 % PVAc-1 % SiO ₂ (a) e PN-10 % PVAc-5% SiO ₂ (b).....	115
FIGURA 5.38 - Distribuições do diâmetro hidrodinâmico obtidas por DLS para as dispersões poliméricas 1 % de PN-1 % SiO ₂ (a) e PN-5 % SiO ₂ (b).....	120
FIGURA 5.39 - Distribuição do diâmetro hidrodinâmico obtida por DLS para a dispersão polimérica 1 % de PN-10 % PVAc-1 % SiO ₂ segundo sua frequência numérica (a) e de intensidade (b).	122
FIGURA 5.40 - Distribuição do diâmetro hidrodinâmico obtida por DLS para a dispersão polimérica 1 % de PN-10 % PVAc-5 % SiO ₂	123
FIGURA 5.41 - Representação da estrutura interligada entre nanofibras de sílica e cadeias poliméricas resultando em grandes centros de espalhamento de luz.	123
FIGURA 5.42 - Imagens de MEV das suspensões poliméricas (0,6 mg mL ⁻¹) de PNVCL (a) e seus nanocompósitos com 1 (b) e 5 % (c) de SiO ₂ -MPS.....	125
FIGURA 5.43 - Imagens de MEV das suspensões poliméricas (0,6 mg mL ⁻¹) de PN-10 % PVAc (a) e seus nanocompósitos com 1 (b) e 5 % (c) de SiO ₂ -MPS.....	126
FIGURA 5.44 - Variação dos módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') da suspensão de PNVCL em função da deformação a 37 °C.	128

FIGURA 5.45 - Variação dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') em função da temperatura (a) e a 37 °C (b) para suspensões poliméricas de PNVCL nas concentrações de 10 a 50 % m/v em PBS.....	131
FIGURA 5.46 - Variação dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') em função da temperatura (a) e a 37 °C (b) para suspensões poliméricas de PN-1 % SiO ₂ nas concentrações de 10 a 50 % m/v em PBS.....	132
FIGURA 5.47 - Variação dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') em função da temperatura (a) e a 37 °C (b) para suspensões poliméricas de PN-5 % SiO ₂ nas concentrações de 10 a 50 % m/v em PBS.....	133
FIGURA 5.48 - Variação dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') em função da temperatura (a) e a 37 °C (b) para suspensões poliméricas de PN-10 % PVAc nas concentrações de 10 a 50 % m/v em PBS.....	134
FIGURA 5.49 - Variação dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') em função da temperatura (a) e a 37 °C (b) para suspensões poliméricas de PN-10 % PVAc-1 % SiO ₂ nas concentrações de 10 a 50 % m/v em PBS.....	135
FIGURA 5.50 - Variação dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') em função da temperatura (a) e a 37 °C (b) para suspensões poliméricas de PN-10% PVAc-5 % SiO ₂ nas concentrações de 10 a 50 % m/v em PBS.....	136
FIGURA 5.51 - Módulos de armazenamento (G' , a) e perda (G'' , b) a 37 °C em função do tempo para os materiais nas concentrações de 10 a 50 % m/v em PBS, em que Cop (PN-10 % PVAc), N1 (PN-1 % SiO ₂), N2 (PN-5 % SiO ₂), N ₃ (PN-10 % PVAc-1 % SiO ₂) e N4 (PN-10 % PVAc-5 % SiO ₂).	138
FIGURA 5.52 - Curvas de perda de massa (a) e suas primeiras derivadas (b) do PNVCL, do PNVCL-10% PVAc e dos seus nanocompósitos com 1 e 5 % de SiO ₂ -MPS.	141
FIGURA 5.53 - Curvas de DSC do PNVCL, do PNVCL-10% PVAc e dos seus nanocompósitos com 1 e 5% de SiO ₂ -MPS.	145
FIGURA 5.54 - Representação dos tratamentos clínicos utilizados para o reparo da cartilagem articular proposto por MAKRIS <i>et al.</i> ²¹⁴	147
FIGURA 5.55 - Distribuição de células na cartilagem articular saudável proposto por JIANG e TUAN ²²¹	147
FIGURA 5.56 - Diferenciação de células tronco mesenquimais em linhagens ostogênicas, condrogênicas e adipogênicas.	149

FIGURA 5.57 - Representação do cultivo celular bidimensional na presença de dispersões poliméricas para o ensaio de citotoxicidade.....	151
FIGURA 5.58 - Viabilidade celular avaliada via ensaio com alamarBlue® após 1 (a) e 3 dias (b) de cultivo de CTMs na presença de suspensões poliméricas em diferentes concentrações. PN-1 % e PN-5 % representam nanocompósitos de PNVCL com 1 % e 5 % de SiO ₂ -MPS, Cop representa PN-10 % PVAc e Cop-1 % e Cop-5 % representam os nanocompósitos de PN-10 % PVAc com 1 % e 5 % de SiO ₂ -MPS. *,** indicam significância estatística (p <0,05 e p <0,01, respectivamente) versus material correspondente com concentração de 10 mg/mL.....	152
FIGURA 5.59 - Representação do sistema tridimensional formado entre os polímeros e nanocompósitos e as células em moldes para cultura.	154
FIGURA 5.60 - Imagens obtidas por microscopia confocal para avaliar a viabilidade de CTMs encapsuladas em hidrogéis de PNVCL, PN-10 % PVAc e PN-1 % SiO ₂ nas concentrações de 5, 10 e 20 % m/v no dia do encapsulamento, dia 0 (barras de escala, 100 µm).	155
FIGURA 5.61 - Imagens obtidas por microscopia confocal para avaliar a viabilidade de CTMs encapsuladas em hidrogéis de PNVCL, PN-10 % PVAc e PN-1 % SiO ₂ nas concentrações de 5, 10 e 20 % m/v após 1 dia de cultura (barras de escala, 100 µm).	156
FIGURA 5.62 - Imagens obtidas por microscopia confocal para avaliar a viabilidade de CTMs encapsuladas em hidrogéis de PNVCL, PN-10 % PVAc e PN-1 % SiO ₂ nas concentrações de 5, 10 e 20 % m/v após 3 dias de cultura (barras de escala, 100 µm).	157
FIGURA 5.63 - Quantidade de GAG por amostra (volume = 50 µL) de hidrogéis de PNVCL, PN-10 % PVAc e PN-1 % SiO ₂ nas concentrações de 5, 10 e 20 % m/v, encapsulados com CTMs e cultivados <i>in vitro</i> durante 7 semanas.....	158
FIGURA 5.64 - Imagens obtidas pela microscopia confocal para avaliar a viabilidade de CTMs encapsuladas em hidrogéis de PNVCL e PN-1 % SiO ₂ na concentração de 20% m/v no dia do encapsulamento, dia 0 e após 1 e 3 dias (barras de escala, 100 µm).	160
FIGURA 5.65 - Viabilidade celular avaliada via ensaio com alamarBlue® após 1 (a) e 3 dias (b) de cultivo de CDs na presença de suspensões poliméricas de PNVCL e PN-1 % SiO ₂ em diferentes concentrações. *,** indicam significância estatística (p <0,05 e p <0,01, respectivamente) versus material correspondente com concentração de 0,001 mg/mL.	162

FIGURA 5.66 - Imagens obtidas por microscopia confocal para avaliar a viabilidade de CDs encapsulados em hidrogéis de PNVCL e PN-1 % SiO₂ na concentração de 20 % m/v no dia do encapsulamento, dia 0, e após 3 dias (barras de escala, 100 μm).
..... 164

FIGURA 5.67 - Viabilidade celular no dia da preparação (a) e após 3 dias (b) de cultivo de CDs encapsulados em hidrogéis PNVCL e PN-1 % SiO₂ (20 % m/v) injetados com três agulhas diferentes (18 G, 21 G e 27 G). ** indica significância estatística (p <0,01) versus material correspondente injetado com agulha 18 G... 165

FIGURA 5.68 - Quantidade de GAG (a) e colágeno (b) por amostra (volume = 50 μL) de hidrogéis de PNVCL e PN-1 % SiO₂ na concentração de 20 % m/v, encapsulados com CDs e cultivados *in vitro* durante 4 e 8 semanas. **, ## indicam significância estatística (p <0,01) versus material correspondente em 4 semanas, e versus PNVCL no mesmo tempo de cultura, respectivamente..... 167

FIGURA 5.69 - Quantidade de DNA por amostra (V = 200 mL) de hidrogéis de PNVCL e PN-1 % SiO₂ (20 % m/v) encapsulados com CDs após 1 dia e 4 e 8 semanas da cultura *in vitro*. ** Indica significância estatística (p <0,01) entre 1 dia e 4 e 8 semanas para o mesmo material. ## Indica significância estatística (p <0,01) entre PNVCL e PN-1 % SiO₂ no 1° dia. 170

RESUMO

HIDROGÉIS NANOCOMPÓSITOS TERMOSENSÍVEIS APLICADOS NO CRESCIMENTO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E CONDRÓCITOS PARA A ENGENHARIA TECIDUAL. Os hidrogéis injetáveis ganharam destaque no campo da engenharia tecidual pois fornecem um veículo terapêutico minimamente invasivo. No entanto, tempo de gelificação prolongado, instabilidade das propriedades físico-químicas, citotoxicidade e restrita investigação *in vitro* e *in vivo* ainda inviabilizam esses biomateriais na prática clínica. Neste estudo, foi proposto a síntese de nanocompósitos a base do polímero termossensível poli(N-vinilcaprolactama) (PNVCL) como potenciais biomateriais injetáveis para engenharia de tecido cartilaginoso devido à sua biocompatibilidade e capacidade de gelificar em temperatura fisiológica. Combinado com o poli(acetato de vinila) (PVAc) e nanofibras mesoporosas de sílica modificadas (SiO₂-MPS), foi possível obter nanocompósitos termossensíveis pela polimerização *in situ* dos monômeros na presença de SiO₂-MPS, com transição de fase difusa em temperaturas abaixo da fisiológica, o que possibilitaria sua aplicação como biomaterial injetável. Além disso, os materiais apresentaram propriedades reológicas superiores na presença de SiO₂-MPS e PVAc e dependentes da concentração dos hidrogéis e da temperatura, resultando em uma estrutura interconectada homogênea entre as cadeias poliméricas ligadas covalentemente com a SiO₂-MPS. A avaliação da atividade biológica dos materiais demonstrou que eles foram biocompatíveis com células-tronco mesenquimais (CTMs) e condrócitos (CDs). Ademais, os hidrogéis de PNVCL e PNVCL com 1 % de SiO₂-MPS mantiveram o fenótipo de CDs, sustentaram a diferenciação condrogênica de CTMs e a secreção de componentes da neocartilagem. Assim, esses estudos demonstram as distintas propriedades que nanocompósitos a base de polímeros termossensíveis são capazes de desempenhar, ampliando suas perspectivas de aplicação principalmente na área de engenharia tecidual.

ABSTRACT

THERMOSENSITIVE NANOCOMPOSITE HYDROGELS APPLIED TO THE GROWTH OF MESENCHYMAL STEM CELLS AND CHONDROCYTES FOR TISSUE ENGINEERING. Injectable biomaterials have gained prominence in tissue engineering since they present a minimal invasive option for therapeutic delivery. However, longer gelation time, instability of physicochemical properties, cytotoxicity and scarce *in vitro* and *in vivo* studies limited these biomaterials for clinical practice. In this study, it was proposed the *in situ* synthesis of nanocomposites based on the thermosensitive polymer poly(N-vinylcaprolactam) (PNVCL) as potential injectable biomaterials for cartilage tissue engineering due to their biocompatibility and ability to gel at physiological temperature. The combination of PNVCL with poly(vinyl acetate) and modified mesoporous silica nanofibers (SiO₂-MPS) enabled obtaining thermosensitive nanocomposites with a diffuse phase transition below the room temperature, suitable for application as injectable biomaterials. In addition, the materials exhibited higher rheological properties in the presence of SiO₂-MPS and PVAc, and dependent on the concentration of the hydrogels and the temperature, which resulted in an interconnected structure formed between the polymer chains covalently bonded to SiO₂-MPS. The evaluation of the biological activity of the materials demonstrated that they were biocompatible with mesenchymal stem cells (MSCs) and chondrocytes (CDs). Additionally, hydrogels of PNVCL and PNVCL with 1 % of SiO₂-MPS maintained the chondrocytes phenotype, induced chondrogenic differentiation of MSCs and secreted neocartilage components. Therefore, these studies demonstrate the distinct properties that nanocomposites based on thermosensitive polymers can perform, expanding their perspectives of application, especially as injectable biomaterials in tissue engineering.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	15
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1- Biomateriais poliméricos	19
2.2- Poli(N-vinilcaprolactama)	25
2.3- Nanocompósitos poliméricos	32
3 – OBJETIVOS	37
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1- Materiais	39
4.1.1- Síntese das nanofibras mesoporosas de sílica	39
4.1.2- Remoção de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB).....	39
4.1.3- Modificação superficial das nanofibras mesoporosas com 3- (trimethoxisilil)propil metacrilato (SiO ₂ -MPS)	40
4.1.4- Purificação dos reagentes precursores da polimerização.....	40
4.1.5- Síntese dos polímeros e copolímeros	41
4.1.6- Síntese dos nanocompósitos	42
4.2- Caracterizações	43
4.2.1- Espectrofotometria na região do ultravioleta e visível (UV-vis).....	43
4.2.2- Espectroscopia vibracional na região de Infravermelho (FTIR)	43
4.2.3- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	44
4.2.4- Microscopia eletrônica de Varredura (FEG-MEV).....	44
4.2.5- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	44

4.2.6-	<i>Difração de raios X (DRX)</i>	45
4.2.7-	<i>Espalhamento de raios X a baixo ângulos (SAXS)</i>	45
4.2.8-	<i>Espalhamento de luz dinâmico (DLS)</i>	45
4.2.9-	<i>Termogravimetria (TG)</i>	45
4.2.10-	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	46
4.2.11-	<i>Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS)</i>	46
4.2.12-	<i>Análise de Área Superficial e Adsorção/Dessorção de N₂</i>	46
4.2.13-	<i>Reologia</i>	47
4.2.14-	<i>Cromatografia de permeação em gel (GPC)</i>	47
4.3.	<i>Estudo da atividade biológica dos polímeros e nanocompósitos</i>	47
4.3.1-	<i>Cultivo e crescimento celular</i>	47
4.3.2-	<i>Ensaio de citotoxicidade</i>	48
4.3.3-	<i>Viabilidade celular tridimensional</i>	49
4.3.4-	<i>Cultura in vitro dos hidrogéis encapsulados com CTMs e CDs</i>	50
4.3.5-	<i>Ensaio bioquímico dos hidrogéis cultivados in vitro</i>	51
4.3.6-	<i>Análise estatística</i>	54
4.4.	<i>Visão geral</i>	55
5 –	RESULTADOS E DISCUSSÕES	57
5.1-	<i>Nanofibras mesoporosas de SiO₂</i>	57
5.2-	<i>Polímeros</i>	77
5.2.1-	<i>Poli(N-vinilcaprolactama) – PNVCL</i>	77
4.2.1-	<i>Poli(acetato de vinila) (PVAc)</i>	83
5.3-	<i>Nanocompósitos</i>	99

5.4- Estudo da atividade biológica dos polímeros e nanocompósitos	146
5.4.1- Ensaio com células tronco mesenquimais humanas (CTMs)	150
5.4.2- Ensaio com condrócitos bovinos (CDs)	160
6- CONCLUSÕES	173
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	177

1 – INTRODUÇÃO

Com o passar dos anos, avanços no desenvolvimento de materiais sintéticos, técnicas cirúrgicas e métodos de esterilização permitiram o surgimento de biomateriais para melhorar a qualidade de vida, estendendo funcionalidades essenciais do sistema corpóreo como também seus ciclos de vida ^{1,2}. Atualmente, a medicina já emprega diversos procedimentos cirúrgicos e de tratamento que fazem uso dos biomateriais como em dispositivos cardiovasculares (marcapasso e *stent*), em aplicações oftalmológicas (lentes de contatos e próteses de retina), aplicações dentárias e ortopédicas (implantes, substratos para engenharia de tecidos), biosensores, suturas, curativos para queimaduras e peles artificiais, como também em sistemas de liberação controlada de fármacos ³. Notoriamente, ramos da medicina regenerativa e engenharia de tecidos possuem uma grande demanda de novos biomateriais à medida em que ainda existem determinadas patologias que não podem ser tratadas com procedimentos e medicamentos típicos, além das abordagens tradicionais comumente apresentarem altos custos ^{4,5}. Esse cenário ainda é agravado pelo crescente envelhecimento populacional, cuja estimativa em 2025 é de cerca de 1,2 bilhão de pessoas com mais de 60 anos no mundo, podendo chegar a dois bilhões de idosos em 2050 ⁶.

A natureza dos materiais utilizados em aplicações biomédicas compreende metais, cerâmicas, polímeros e seus respectivos compósitos (material multicomponente em que pelo menos um dos componentes encontra-se como uma fase contínua), dependendo da funcionalidade e das propriedades que são requisitados a desempenhar ¹. Entre eles, os polímeros exibem papel central no desenvolvimento de biomateriais funcionais em função dos avanços em metodologias sintéticas que permitiram a produção de polímeros com diversos constituintes químicos, estruturas, propriedades e aplicáveis em várias condições do

meio fisiológico ⁷. Diversos estudos empregam biomateriais poliméricos na forma de substratos tridimensionais (*scaffolds*) e sistemas injetáveis, representados principalmente pelos hidrogéis ^{5,8-10}. Estes são utilizados na engenharia tecidual, principalmente por apresentar propriedades físico-químicas e mecânica adequadas para ser implantado em diferentes tecidos de interesse, como por exemplo maleabilidade/elasticidade, absorção de água em sua estrutura e geometria ajustável de acordo com o local de aplicação ^{4,5,11}. Particularmente, sistemas injetáveis formam estruturas tridimensionais das cadeias poliméricas em resposta a estímulos externos, como a temperatura fisiológica, o que permite sua aplicação *in vivo* de maneira minimamente invasiva e a estruturação do hidrogel no local de interesse.

Apesar do grande potencial de hidrogéis responsivos a estímulos, esses sistemas demonstram baixas propriedades mecânicas e liberação relativamente rápida de fármacos hidrofílicos ou ineficiente incorporação de fármacos hidrofóbicos, o que pode limitar sua aplicação ¹²⁻¹⁴. Na busca de biomateriais que desempenham multifunções e superam essas limitações, surgiram os nanocompósitos de hidrogéis. Nanocompósitos são compósitos em que pelo menos um dos seus componentes apresenta no mínimo uma dimensão nanométrica. Quando nanopartículas inorgânicas são inseridas em matrizes poliméricas como os hidrogéis, obtém-se nanocompósitos com propriedades físico-químicas e funcionalidades ajustáveis. Além disso, a natureza da nanopartícula incorporada poderá regular o estímulo para liberação de fármacos em condições fisiológicas específicas como também permite o transporte de fármacos hidrofóbicos ou desempenha variadas funções. O desenvolvimento desses hidrogéis híbridos amplia as perspectivas da criação de biomateriais com respostas moleculares e fisiológicas específicas ¹².

Embora os nanocompósitos sejam amplamente conhecidos e aplicados em vários setores industriais, na área biomédica, especialmente a base de hidrogéis, poucos estudos foram publicados até o momento. Com isso, há ainda a necessidade

de novas pesquisas para a compreensão das interações existentes entre as nanopartículas e as cadeias poliméricas no hidrogel, a fim de adequar suas propriedades a específicas aplicações ¹².

Nesse contexto, neste estudo buscou-se a obtenção de nanocompósitos a base do hidrogel poli(N-vinilcaprolactama) (PNVCL) e nanofibras mesoporosas de sílica. Enquanto PNVCL é responsivo a temperatura fisiológica e ainda pouco empregado na área de engenharia tecidual, as nanofibras mesoporosas de sílica são biocompatíveis, atuam como agentes de reforço e podem ser obtidas com controle de tamanho e a presença de grupos funcionais ligados covalentemente a sua superfície. Avaliou-se como a associação sinérgica desses componentes pode alterar as propriedades e as interações macromoleculares dos hidrogéis a base de PNVCL, como também a biocompatibilidade e a capacidade de atuarem como biomateriais na engenharia tecidual.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Biomateriais poliméricos

Os biomateriais, segundo a definição da IUPAC, são materiais aplicados em contato com tecidos vivos, organismos ou microorganismos. Eles devem ser biocompatíveis (materiais que em contato com um sistema vivo não produzem efeitos prejudiciais indesejados) e podem ser constituídos por materiais cerâmicos, metálicos, poliméricos e compósitos, de origem natural ou sintética ^{1,15}. Os biomateriais são aplicados de forma direta, suplementar ou por substituição de tecidos do corpo ^{1,15} e segundo MAYER *et al.* ¹, eles podem ser superficialmente ou estruturalmente compatíveis. Na primeira, deve-se considerar as propriedades químicas, físicas, biológicas e a morfologia superficial do implante. Já na compatibilidade estrutural inclui-se principalmente o desempenho mecânico do material, como o módulo elástico, tenacidade, rigidez, entre outros, além das propriedades de interface e o modelo do implante. Quando ambas as compatibilidades são obtidas, é alcançada uma ótima interação entre o biomaterial e o organismo ¹.

Historicamente, o emprego desses materiais é relatado desde as civilizações antigas, como os olhos, dentes, orelhas e narizes artificiais encontrados nas múmias egípcias ¹. Hoje em dia, biomateriais são estudados e utilizados para aperfeiçoar e criar diversos métodos terapêuticos, tais como o controle espacial e temporal da liberação de fármacos, na engenharia de tecidos, na estimulação do processo de cicatrização de tecidos e na medicina regenerativa ⁷. Os biomateriais poliméricos são os mais empregados na medicina devido a facilidade de serem sintetizados e processados em estruturas, formas e morfologias variadas, como também com amplas propriedades mecânicas e físico-químicas para aplicações específicas ^{16,17}. Diversos polímeros são estudados para fins biomédicos, entre eles

os polímeros naturais obtidos a partir de diferentes fontes tais como animais, vegetais e o DNA (colágeno, fibronectina, agarose, quitosana, ácido hialurônico, alginatos, *etc*) com estruturas biocompatíveis. Porém, o emprego de polímeros naturais pode ser dificultado pela variabilidade dos polímeros de diferentes fontes e a presença de substâncias citotóxicas quando não for originário de mamíferos, causando reações inflamatórias do tecido ^{5,9,18,19}. Já os polímeros sintéticos podem ser sintetizados com composição, taxa de degradação e propriedades físico-químicas e mecânicas ajustáveis. Dentre eles, os mais estudados são os poli(etileno glicol) (PEG), poli(hidroxietil metacrilato) (PHEMA), poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), poli(álcool vinílico) (PVA), poli(acrilamida), poli- ϵ -caprolactona (PCL), entre outros ^{5,9,20}. São utilizados também materiais sintéticos e naturais combinados, podendo resultar em uma copolimerização em blocos ou por enxerto entre os monômeros, oligômeros e polímeros correspondentes ou apenas uma interação física entre eles. Com isso, é possível combinar a biocompatibilidade de polímeros naturais e as propriedades físico-químicas dos sintéticos ^{5,10}. Por exemplo, multicamadas degradáveis de PEG e ácido poli(acrílico) sobre um substrato de agarose apresentaram uma liberação controlada de proteínas por tempo prolongado, necessária para promover a regeneração e integração de células do sistema nervoso ²¹.

Além da natureza química do polímero, outras características são necessárias para que ele atue como um biomaterial. WICHTERLE e LÍM ²² descreveram no início da década de 60 a necessidade de criar sistemas poliméricos compatíveis com o sistema fisiológico, pois até aquele momento, a aplicação de polímeros para uso aloplástico e protético resultavam em pouca compatibilidade com tecidos vivos, irritação do local e até crescimento de tumores ²². Os autores descreveram que polímeros com grupos hidrofílicos, ligações reticuladas inertes frente aos processos biológicos comuns e que permitissem tanto a absorção de água

como a permeação de metabólicos fisiológicos em seus poros apresentavam boa compatibilidade e ausência de resposta inflamatória ²². Esses sistemas poliméricos foram posteriormente chamado de hidrogéis, e são atualmente os suportes poliméricos mais utilizados para fornecer as condições necessárias para a sobrevivência da célula e para a formação do tecido. Em razão da rede formada pela reticulação das cadeias poliméricas, o hidrogel é capaz de absorver água ou fluidos biológicos e intumescer mais de 1000 vezes o seu peso seco inicial ^{23,24}, preservando sua estrutura original. As interações responsáveis pela absorção de água incluem as forças de hidratação e capilares, e a variação da pressão osmótica, contrabalançadas pelas forças exercidas pelas cadeias poliméricas em resistir à expansão. O grau de intumescimento no estado de equilíbrio dependerá da magnitude dessas forças e determinarão juntamente com a natureza química e morfologia da rede polimérica as propriedades de difusão, de transporte e resistência mecânica ^{25,26}.

Com a evolução das pesquisas nesse campo, inúmeros hidrogéis foram criados e classificados de acordo com a natureza polimérica (natural ou sintética), estrutura da rede formada entre as cadeias poliméricas, tipo de reticulação (por interações covalentes ou físicas), presença de cargas (iônicos, não iônicos e anfóteros) e degradabilidade. As distintas estruturas macromoleculares que compõem os hidrogéis estão representadas na Figura 2.1, e podem ser constituídas por um único polímero (Figura 2.1a); por redes interpenetrantes (IPNs) que interagem entre si por ligação não covalentes e precisam ser rompidas para separar os componentes (Figura 2.1b); por redes semi-IPNs que consistem em uma rede reticulada com polímeros entincheirados na rede (Figura 2.1c); por uma rede dupla que consiste de duas redes com propriedades mecânicas significativamente diferentes reticuladas conjuntamente (Figura 2.1d); por dois materiais reticulados na mesma rede e com mecanismos similares (Figura 2.1e); ou por ligações reversíveis que adicionam um comportamento dinâmico aos hidrogéis (Figura 2.1f) ²⁷.

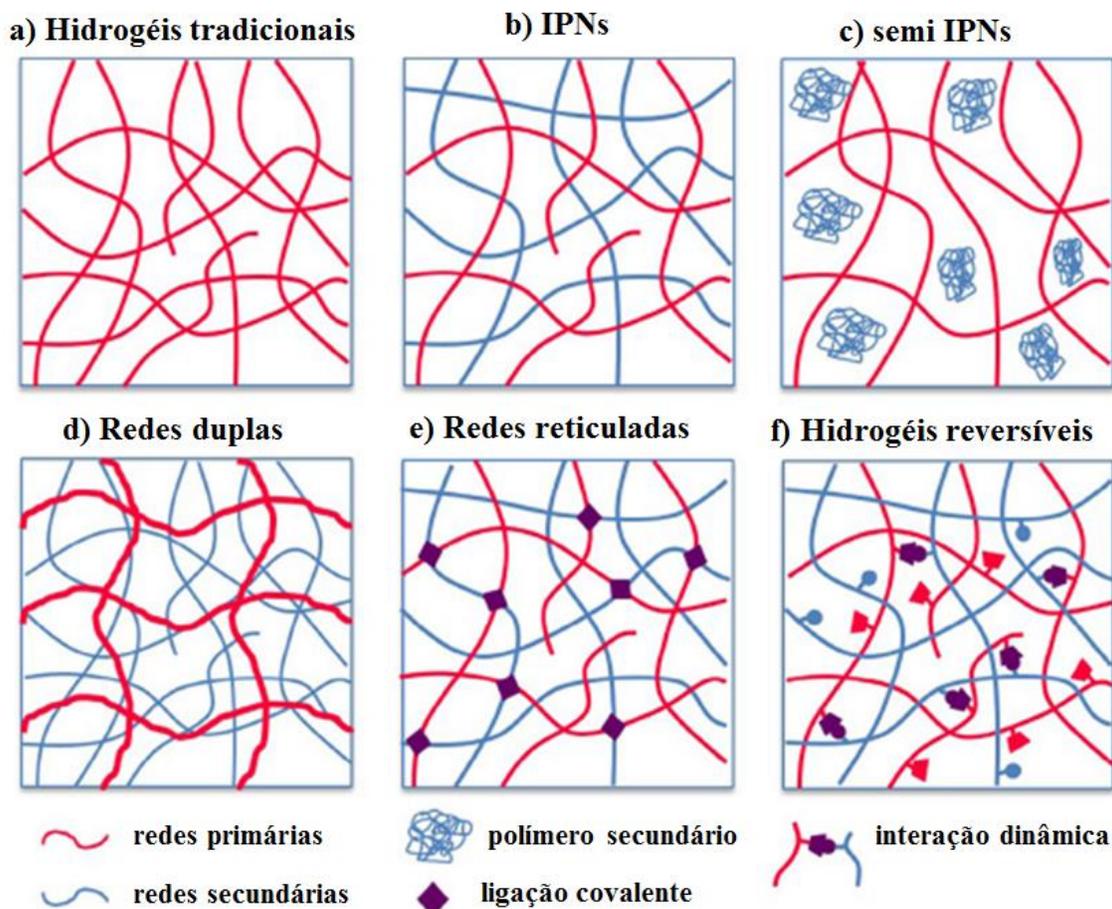


FIGURA 2.1 - Representação demonstrada por VEGA *et al.*²⁷ das diferentes estruturas de hidrogéis encontradas, desde redes tradicionais de um único polímero (a), até aquelas que incluem redes múltiplas (b, c) e misturas de polímeros (d-f). Redes duplas podem ser interligadas, mas isso não é um requisito.

Assim, a natureza química, a estrutura da rede das cadeias poliméricas e o estado de equilíbrio dos hidrogéis são responsáveis por várias propriedades importantes, tais como resistência mecânica, de transporte e de degradação^{28,29}. Quando degradáveis no ambiente fisiológico, os sistemas poliméricos resultam em moléculas menores em decorrência das reações de hidrólise, proteólise, ou por ação enzimática, permitindo que o tecido em crescimento substitua o implante preenchido^{5,30-32}. Essas características adaptáveis permitem mimetizar o ambiente

tridimensional da matriz extracelular com distintas propriedades físico-químicas, como também incorporar componentes e direcionadores bioquímicos e biofísicos ^{18,33}.

Uma das maiores vantagens de se utilizar hidrogéis é que muitos deles podem ser planejados para serem injetáveis por técnicas minimamente invasivas via seringas e cateteres ³³. Uma vez inseridos, ocorrerá a formação do hidrogel *in situ*, como ilustrado na Figura 2.2. A gelificação pode ocorrer pela variação de algumas propriedades físicas como o pH, a temperatura, a concentração iônica, ou por reações químicas, resultando em reticulações formadas por ligações covalentes ou interações físicas. Os hidrogéis reticulados covalentemente serão formados após seus materiais precursores no estado líquido sofrerem reações químicas, como as reações *click*, de adição de Michael, fotopolimerização, *etc.*, como exemplificado na Figura 2.3, porém podem sofrer dissolução quando inseridos *in vivo* devido a uma baixa cinética de gelificação ²⁸. Por outro lado, hidrogéis fisicamente reticulados alcançam o estado de gel pela alteração de forças intermoleculares tais como ligações de hidrogênio, van der Waals e eletrostáticas, e pela formação de compostos de inclusão (por exemplo as interações hóspede-hospedeiro) e de complexos ^{28,34}. Estas alterações podem ocorrer pelo arranjo interno dos próprios polímeros ou podem ser induzidas por estímulos externos como a temperatura, o pH, o campo elétrico, a radiação, a presença de moléculas específicas, entre outros. Nesses casos, quando o material responde a esses estímulos, os materiais são chamados de polímeros inteligentes ^{35,36}. As principais vantagens de utilizar esses materiais injetáveis são a moldabilidade, a adaptação a defeitos de forma, a aplicação *in vivo* de maneira menos invasiva do que tradicionais procedimentos cirúrgicos e a possibilidade de encapsularem células e fármacos. Essas características conferem menores cicatrizes, menor sofrimento durante o tratamento e a redução do tempo de recuperação dos pacientes ³⁷. Entretanto, hidrogéis reticulados fisicamente podem ter reduzidas propriedades

mecânicas comparadas às obtidas para hidrogéis ligados covalentemente, e assim limitar sua aplicação quando se deseja propriedades mecânicas específicas ²⁸.



FIGURA 2.2 - Esquema desenvolvido por YU e DING ³⁰ de como um hidrogel injetável que apresenta uma transição sol-gel em função da temperatura (T_{gel}) pode ser introduzido *in vivo*.

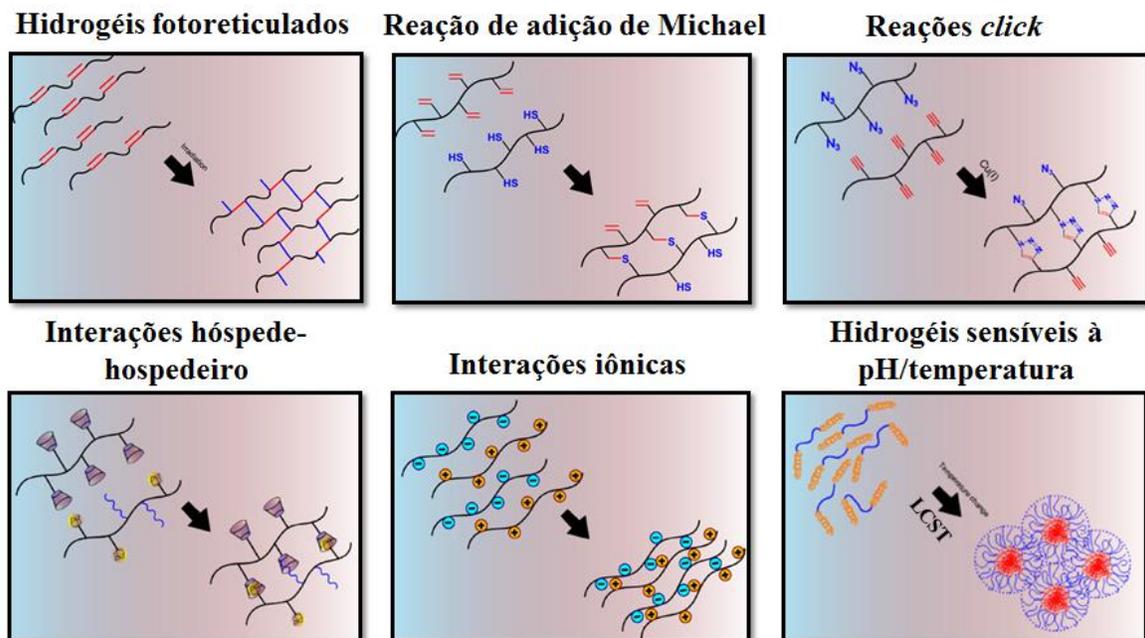


FIGURA 2.3 - Representação apresentada por NGUYEN *et al.* ²⁸ de hidrogéis reticulados por ligações covalentes e interações físicas.

Os hidrogéis fisicamente reticulados que respondem ao estímulo de temperatura são estudados principalmente no ramo biomédico. Mais conhecidos como polímeros termossensíveis, a temperatura é o único estímulo para a sua gelificação, sem a necessidade de tratamentos químicos ou ambientais adicionais. Assim, a sua gelificação ocorre após a injeção do material no tecido alvo devido à mudança da temperatura ambiente para a fisiológica ^{10,38}. Os polímeros termossensíveis são inicialmente dispersos e solvatados em meio aquoso e gelificam durante o aquecimento do sistema quando este alcança temperaturas acima da temperatura crítica inferior de solubilidade (LCST) ³⁹. Esta solidificação é observada quando ocorre uma transição de um estado onde as cadeias se encontram solvatadas e são denominadas de *coils*, para um estado onde elas se encontram na forma de aglomerados, denominados de glóbulos. Esta transição é acompanhada pela separação de fases e pode ser explicada pela evolução de duas etapas ^{40,41}. Inicialmente a ligação de hidrogênio entre as cadeias poliméricas e as moléculas de água são quebradas. Na segunda etapa, as interações intermoleculares do polímero levam a sua auto-agregação e posteriormente a uma separação de fase ⁴¹. Assim, em temperaturas abaixo da temperatura de transição, as cadeias poliméricas estão solvatadas pelas moléculas de água, porém o fornecimento de energia tende a aumentar as forças de atração entre estas, que se aglomeram e conseqüentemente, expulsam as moléculas de água ⁴².

2.2- Poli(N-vinilcaprolactama)

Entre os polímeros termossensíveis conhecidos, o poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAm) é o mais estudado para aplicações terapêuticas, cuja LCST é próxima a 32 °C ^{43,44}. Entretanto, ele apresenta algumas desvantagens relacionadas a sua não biodegradabilidade e a sua hidrólise em condições ácidas,

produzindo compostos tóxicos de amida ⁴⁵. Alternativamente, o poli(N-vinilcaprolactama) (PNVCL) possui características similares ao PNIPAm e é um análogo químico da polivinilpirrolidona (PVP), amplamente empregada para fins farmacêuticos ^{41,46,47}. Apesar de ser menos popular que o PNIPAm, associado a dificuldade do controle da sua síntese ⁴⁸, o interesse no PNVCL se origina da sua biocompatibilidade, baixa toxicidade e ausência de amidas tóxicas como produto da degradação na hidrólise em meio ácido ^{49,50}. Além disso, o PNVCL apresenta uma LCST próxima a temperatura fisiológica e encontrada no intervalo entre 32 e 37 °C ^{51,52}. Dessa forma, este polímero apresenta inúmeras aplicações biomédicas e é estudado principalmente no transporte e na liberação controlada de fármacos, e na microencapsulação de enzimas ^{39,48,53}. Porém, ainda é quase inexplorado como suporte para crescimento celular ⁵⁴ e na reconstrução de tecidos ^{49,55,56}.

O PNVCL é um polímero derivado do monômero N-vinilcaprolactama, disponível comercialmente, comumente polimerizado pelo processo convencional de polimerização radicalar. Esta polimerização ocorre via uma reação em cadeia e tipicamente emprega-se o iniciador radicalar 2,2'-azo-bis-isobutironitrila (AIBN). Este iniciador sofre uma decomposição térmica e gera radicais livres que reagem com os monômeros poliméricos, transferindo-os esses radicais na etapa conhecida como iniciação ^{57,58} (Figura 2.4). Esses monômeros se tornam centros reativos e a polimerização ocorre pela propagação do centro reativo pelas adições sucessivas de monômeros em uma reação em cadeia (Figura 2.5). A polimerização em cadeia, comumente observada em monômeros vinílicos, tem como característica o crescimento do polímero a partir do monômero que reage apenas com o centro reativo, o que resulta em polímeros com alta massa molar mesmo em diferentes porcentagens de conversão. O crescimento da cadeia polimérica cessa quando o centro reativo é destruído por uma ou mais reações de terminação (Figura 2.6), geralmente pelo combinação de dois radicais (Figura 2.6a) ou pela desproporção

(menos usual), na qual o hidrogênio de um radical é transferido para o outro radical (Figura 2.6b)^{57,58}.

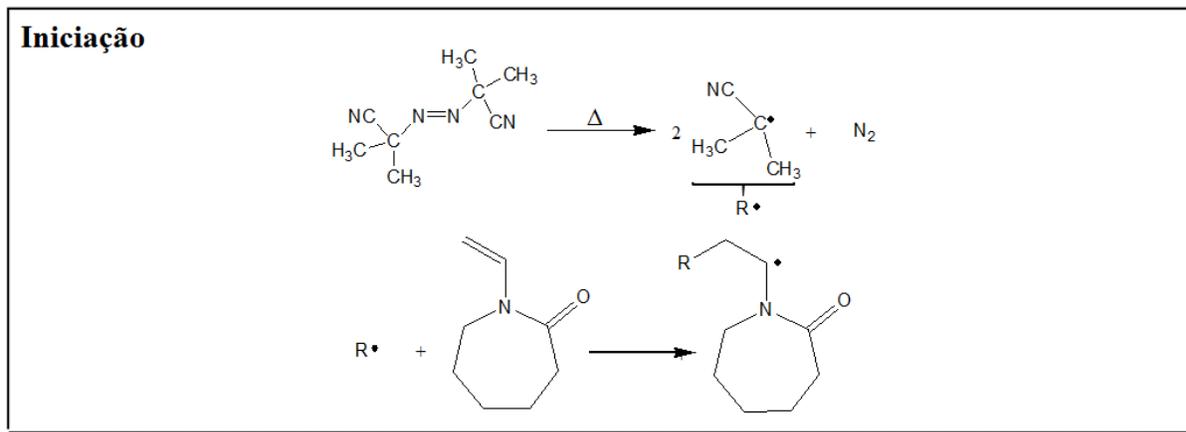


FIGURA 2.4 - Representação da etapa de iniciação da polimerização radicalar do PNVCL na presença do iniciador AIBN.

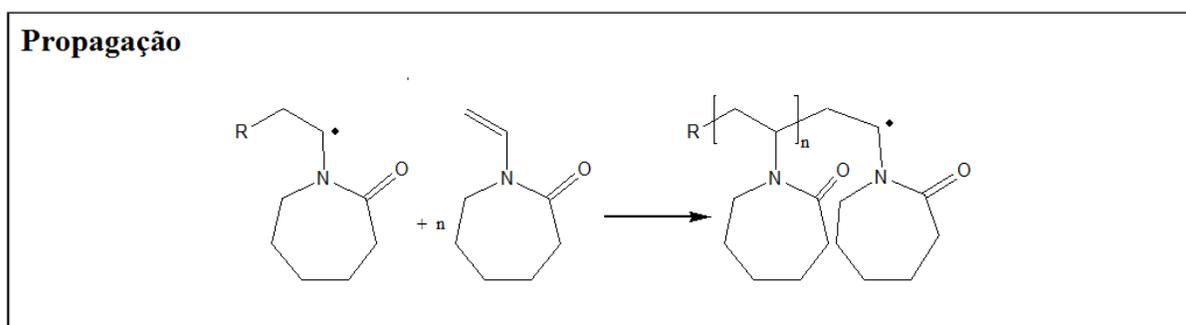


FIGURA 2.5 - Representação da etapa de propagação da polimerização radicalar do PNVCL.

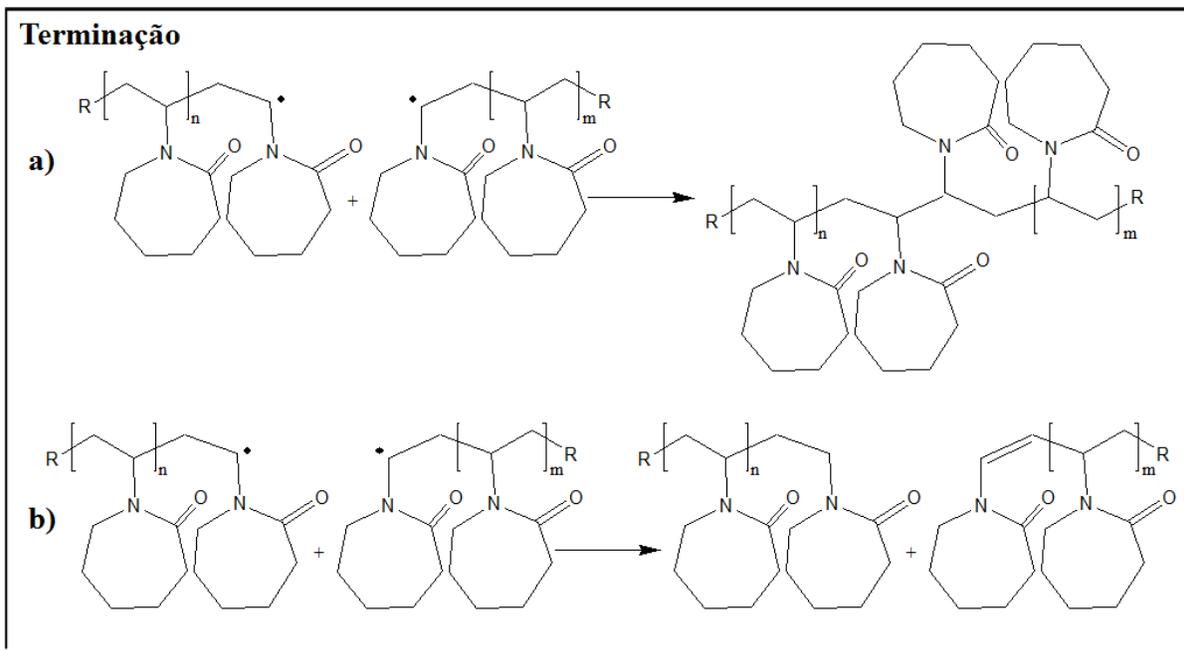


FIGURA 2.6 - Representação da etapa de terminação por combinação (a) ou desproporção da polimerização radicalar do PNVCL.

A polimerização radicalar pode ser conduzida em *bulk*, em suspensão, em solução e em emulsão. Enquanto a polimerização em *bulk* é a mais difícil de se controlar uma vez que ocorre o aumento da viscosidade e má dissipação do calor de reação, as outras três ocorrem na presença de solventes, que reduzem a viscosidade do sistema e contribuem para uma transferência de calor eficiente. Entretanto, algumas desvantagens também estão presentes como as polimerizações em suspensão e em emulsão podem conter resíduos dos estabilizantes empregados, como a polimerização em solução pode sofrer transferência de cadeia para o solvente⁵⁹.

O PNVCL obtido pela polimerização radicalar geralmente apresenta uma larga distribuição da sua massa molar uma vez que seus monômeros na presença do iniciador radicalar formam espécies radicalares com reatividade e taxa de propagação altas devido a sua natureza não conjugada (ausência de estabilização por ressonância) e grupos pendentos doadores de elétrons⁶⁰. A fim de controlar a massa

molar do PNVCL e a distribuição da sua massa molar, empregam-se técnicas para o controle da polimerização radicalar, como a transferência reversível de cadeia por adição-fragmentação (RAFT) ⁶¹, a polimerização radicalar por transferência atômica (ATRP) ⁶², a polimerização radicalar mediada por complexos organometálicos ⁶³, entre outros. Pelas diferentes formas de se obter o PNVCL a partir da polimerização radicalar, este polímero é relatado na literatura com diversas arquiteturas poliméricas por meio de copolímeros aleatórios, copolímeros em bloco, copolímeros enxertados, microgéis, e nanogéis (Figura 2.7) ⁴⁸, com a finalidade de desempenhar funções diversificadas ^{46,48,64-66}.

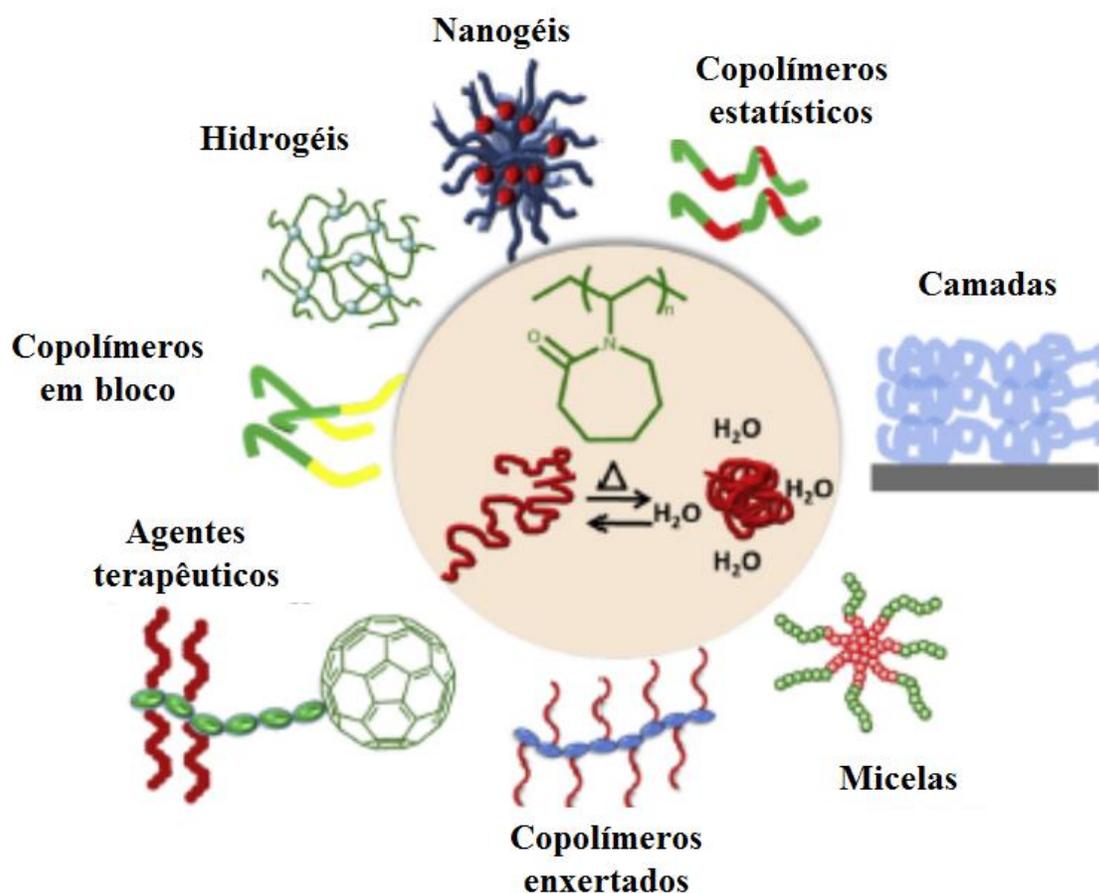


FIGURA 2.7 - Representação desenvolvida por CORTEZ-LEMUS e CLAVERIE ⁴⁸ do poli(N-vinilcaprolactama) sintetizado em diferentes estruturas para aplicações variadas.

O PNVCL exibe um comportamento clássico de transição de fase de acordo com a teoria de Flory-Huggins (Tipo I), cuja LCST diminui tanto com o aumento do comprimento da cadeia quanto com a concentração do polímero. Por outro lado, o PNIPAm exibe uma miscibilidade do Tipo II e sua LCST é independente da massa molecular e é pouco afetada pelas condições do meio ⁴⁵, sendo geralmente modificada pela presença de comonômeros. Assim, a LCST do PNVCL pode ser alterada para temperaturas mais baixas ou mais altas apenas alterando a composição química do sistema com a adição de sais ⁶⁷, diferentes solventes, comonômeros ^{68,69}, surfactantes ⁴⁰ ou mesmo mudando a estrutura do polímero ou sua massa molar (M_w) ⁷⁰⁻⁷⁴. A possibilidade de valores variáveis de LCST permite a aplicação do PNVCL para diferentes faixas de temperatura. Pela polimerização radicalar do PNVCL é possível obter diferentes valores de M_w a partir do controle da razão de monômero/iniciador radicalar e conversão do monômero no meio e tempo reacional utilizados ⁷⁵. LAUKKANEN *et al.* ⁷⁶ estudaram a dependência da LCST com M_w , avaliada entre 21×10^3 a 1500×10^3 g mol⁻¹. Nessa faixa estudada, a LCST variou de 31 °C para 38 °C para as amostras de maior e menor massa molar, respectivamente. Já VIHOLA *et al.* ⁷⁷ investigaram a citotoxicidade *in vitro* de PNVCL sintetizado com distintas massas molares e copolimerizado com cadeias anfífilas de diferentes polímeros. A citotoxicidade foi determinada utilizando-se células intestinais e células pulmonares nas temperaturas abaixo e acima da LCST, em diferentes tempos de incubação e concentração dos polímeros. Observaram que tanto o PNVCL com massas molares de 330×10^3 , 1300×10^3 e 1500×10^3 g mol⁻¹, quanto o copolímero de PNVCL e polietilenoglicol (PEG) com 300×10^3 g mol⁻¹, foram bem tolerados. Além disso, PNVCL com diferentes massas molares não apresentou variação em sua citotoxicidade. No entanto, o polímero mais hidrofóbico, PNIPAm, com 156×10^3 g mol⁻¹ produziu a maior citotoxicidade celular a 37 °C, e os monômeros N-isopropilacrilamida, N-

vinilcaprolactama e o oligômero de PEG mostraram ser mais citotóxicos que os seus polímeros correspondentes ⁷⁷.

A LCST de copolímeros termossensíveis também é fortemente influenciada pela natureza hidrofílica ou hidrofóbica dos comonômeros utilizados e assim diversos copolímeros a base de PNVCL já foram propostos na literatura ^{48,75}. Além disso, a presença de comonômeros pode ajustar o tamanho dos hidrogéis (de nanômetros até micrômetros) com uma grande variedade de estruturas, e adicionar funcionalidades de superfície para acomodar moléculas específicas, características especialmente interessantes para sistemas de liberação controlada de fármacos ^{48,75}.

Entre os diferentes comonômeros estudados, o acetato de vinila (VAc) destaca-se por ser o monômero precursor do poli(acetato de vinila) (PVAc), polímero amplamente empregado na indústria na fabricação de emulsificantes de resina, adesivos, tintas e têxteis, pois apresenta alto teor de adesão, é inodoro e não inflamável ⁷⁸. Já no campo de biomateriais, PVAc tem se destacado pela sua biocompatibilidade, moldabilidade, degradação lenta e sem liberação de subprodutos tóxicos ^{79,80}. Em vista da variedade de funções que PVAc desempenha, alguns estudos descrevem a síntese de copolímeros de PNVCL e PVAc ⁵⁹⁻⁶². O principal objetivo nesses estudos foi a síntese de estruturas com massa molar e polidispersividade controladas. Além disso, investigaram a composição do copolímero formado considerando as reatividades de cada monômero e seu efeito no comportamento termossensível do copolímero, cuja LCST reduziu com o aumento da composição de PVAc segundo o seu caráter mais hidrofóbico. Entretanto, as propriedades mecânicas, físico-químicas e biológicas não foram investigadas nesses trabalhos, o que dificulta avaliar o desempenho desses copolímeros em aplicações como biomateriais.

Quando combinado em outros copolímeros, PVAc revela sua citocompatibilidade e sua potencial contribuição em aplicações biomédicas, como na

formação de membranas para hemodiálise na presença de quitosana ⁸¹ e de membranas obtidas por eletrofiação para engenharia tecidual ⁸². Copolímeros anfifílicos a base de PVAc, PNVCL e PEG (Soluplus®) já são comercializados pela BASF como um veículo de encapsulamento e transporte de fármacos pouco solúveis. Eles demonstraram a capacidade de solubilizar diversos fármacos com biodisponibilidade eficiente quando administrados por via oral, além da possibilidade de serem fabricados pelo processo de extrusão por fusão a quente ⁵³. Apesar do carácter mais hidrofóbico de PVAc, ele se hidrata parcialmente em água e combinado com polivinilpirrolidona permitiu a entrega controlada de fármacos insolúveis em água ⁸³. PVAc apresenta também compatibilidade química com diversos polímeros e compostos inorgânicos, ampliando as aplicações desses materiais ^{78,84}. Como por exemplo, ABDAL-HAY *et al.* ⁸⁴ prepararam nanocompósitos de PVAc e hidroxiapatita por eletrofiação como recobrimentos adesivos para implantes de titânio para regeneração tecidual. A presença do nanocompósito aumentou a resistência a corrosão de substratos de titânio, como também melhorou a adesão, a viabilidade e o crescimento celular de osteoblastos.

2.3- Nanocompósitos poliméricos

Em um cenário de crescimento da população idosa e de doenças crônicas existe uma alta demanda por materiais multifuncionais na área biomédica, especialmente na engenharia de reconstrução de tecidos ⁸⁵. A utilização de materiais nanocompósitos biocompatíveis associa a flexibilidade, da moldabilidade dos materiais poliméricos com a resistência mecânica, propriedades magnéticas, elétricas e ópticas das nanopartículas de natureza inorgânica. Essas novas características adquiridas pela combinação sinérgica dos componentes podem desempenhar propriedades únicas em diversos campos de pesquisa ⁸⁶. No entanto, na área

biomédica, a formação de materiais híbridos ainda é pouco explorada e os componentes são geralmente estudados isoladamente, em que nanopartículas são empregadas principalmente na entrega de fármacos e agentes de contrastes e os hidrogéis na engenharia tecidual ¹². A associação dos componentes resultaria desde a resposta a estímulos induzidos pelo tipo de nanopartícula, quanto a entrega prolongada de fármacos, incluindo os hidrofóbicos e principalmente a geração de sistemas multirresponsivos e multifuncionais ¹². Afim de alcançar essas variadas propriedades, primeiramente as interações existentes nesses hidrogéis nanocompósitos devem ser compreendidas para controlar suas propriedades físico-químicas e biológicas que governarão suas aplicações.

Dentre as nanopartículas utilizadas em biomateriais, a hidroxiapatita apresenta excelente biocompatibilidade e uma estrutura química similar com a porção mineral óssea humana ^{1,87-89}. Entretanto, implantes produzidos totalmente de hidroxiapatita exibem uma baixa resistência à tração, ao impacto e à fadiga ^{90,91}. Quando utilizada como reforço em materiais poliméricos, os nanocompósitos de hidroxiapatita na forma de *whiskers* ou fibras apresentam várias vantagens como biocompatibilidade, inércia química, resistência à corrosão e alta resistência a compressão ⁹². Outro grupo de materiais recentemente estudado engloba os nanotubos de carbono, cujas propriedades elétricas podem ser vantajosas em circuitos cerebrais devido a sua capacidade de baixa impedância e alta transferência de carga ⁹³. Nanotubos de carbonos multilamelares levam também a melhores propriedades mecânicas de nanocompósitos aplicados como *scaffolds*, porém eles não são biodegradáveis e seu desempenho *in vivo* ao longo do tempo ainda não foi avaliado ⁹⁴. Outras nanoestruturas comumente estudadas são as argilas, como a Laponita, utilizadas como carreadoras de fármacos ou de moléculas específicas em seu espaço interlamelar. Por exemplo, KOSHY *et al.* ⁹⁵ adsorveram proteínas nas lamelas de Laponita e inseriram em uma matriz de hidrogel, resultando em

nanocompósitos injetáveis carreadores de proteínas com entrega sustentada e localizada ⁹⁵.

Já a sílica sintetizada por meio do método sol-gel, originalmente descrito por STÖBER *et al.* ⁹⁶, ganha destaque em diversas aplicações biomédicas uma vez que pode ser obtida na forma de complexas nanoestruturas. Variando-se o processo de síntese é possível controlar o tamanho, a morfologia, a porosidade, e as propriedades estruturais dessas nanopartículas. Além disso, as nanopartículas de sílica são hidrofílicas, biocompatíveis, estáveis quimicamente, e apresentam resistência mecânica e térmica. Elas também são facilmente modificadas superficialmente por agentes de contraste, moléculas orgânicas e nanopartículas magnéticas, importantes para o tratamento e detecção de câncer e como agentes antimicrobianos. Como exemplo da versatilidade dessa modificação superficial, ZHANG *et al.* ⁹⁷ prepararam polímeros com distintas propriedades mecânicas e memória de forma a partir de microesferas de sílica modificadas superficialmente com policaprolactona e posteriormente reticuladas. Já na forma de nanofibras mesoporosas de sílica inseridas em nanocompósitos de hidroxipropilmetilcelulose para fins biomédicos, aumentaram as propriedades mecânicas dos materiais em ensaios de compressão, como também não apresentaram citotoxicidade ⁹⁷. Além disso, sua alta área superficial e volume de poros pode imobilizar anti-inflamatórios, células de crescimento, agentes de contraste, moléculas fluorescentes e outras nanopartículas como o ouro, para aplicações em sensores e catalisadores ⁹⁸⁻¹⁰⁰. Ainda, com a possibilidade de produção de estruturas do tipo casca/caroço, encontram importante aplicação como veículo de liberação de fármacos e como agente de reforço de nanocompósitos ¹⁰¹⁻¹⁰⁵.

Embora vários estudos avaliaram nanocompósitos de diversos tipos e composições, nanocompósitos a base de PNVCL permanecem quase inexplorados. Entre eles, é relatado a síntese de nanopartículas casca/caroço de sílica e ouro com

recobrimentos a base de PNVCL ^{47,106}. Já CHANG *et al.* ¹⁰⁶ demonstraram a possibilidade da síntese de estruturas casca/caroço multisensíveis a partir de nanopartículas de sílica mesoporosas carregadas com fármacos, recobertas com um copolímero reticulado de PNVCL e ácido metacrílico, e superficialmente modificadas com polietilenoglicol. Este recobrimento permitiu tanto a difusão controlada dos fármacos como também degradou e liberou todo o medicamento em um ambiente mais ácido e redutor como encontrado no citossol de células cancerígenas. Na forma de hidrogéis, PNVCL foi quimicamente reticulado na presença de celulose nanocristalina ou grafeno e seus nanocompósitos apresentaram superiores módulos de perda e de armazenamento nas análises reológicas obtidas por SANNA *et al.* ^{49,107}.

Estes nanocompósitos formados por polímeros e nanopartículas inorgânicas podem ser preparados por distintos métodos de síntese, formando materiais híbridos por interações de van der Waals e eletrostáticas, como também por ligações de hidrogênio e covalentes ^{108,109}. As três principais metodologias empregadas para a síntese de nanocompósitos são a simples mistura dos componentes, a síntese *in situ* das nanopartículas e a polimerização *in situ* da matriz. O método da simples mistura é o mais utilizado industrialmente, especialmente em compósitos com estruturas lamelares e em camadas, distribuindo-se ao longo da matriz polimérica ^{108,110}. Para os nanocompósitos a base de sílica empregam-se principalmente os métodos de síntese *in situ*, onde a síntese da sílica pelo método sol-gel é feita na presença do polímero. Este método frequentemente determina um arranjo espacial bem ordenado das nanopartículas geradas e a polimerização do monômero pode ocorrer simultaneamente com a formação das nanopartículas ⁸⁶. Já no método de polimerização *in situ* da matriz, o polímero é sintetizado na presença das nanopartículas de sílica dispersas no meio reacional. Para ocorrer a interação sinérgica entre os componentes inorgânicos e orgânicos, comumente empregam-se

técnicas de modificação superficial das nanopartículas de sílica que permitam sua ligação com os monômeros/polímeros. A partir desse método, é possível melhorar a miscibilidade, a compatibilidade e a interação entre os componentes, como também resultar em uma distribuição homogênea das nanopartículas na matriz polimérica ¹⁰⁹. O 3-(trimethoxisilil)propil metacrilato (MPS) é um organosilano normalmente ancorado à superfície de nanopartículas de sílica, pois adiciona grupos vinílicos reativos que reagem com monômeros poliméricos via polimerização radicalar. MPS tem sido empregado como agente de acoplamento na síntese de nanocompósitos de sílica pela polimerização em emulsão e no crescimento do recobrimento polimérico em nanopartículas casca(sílica)/caroço(polímero) ^{104,105,109,111}.

Assim, apesar dos eminentes avanços no desenvolvimento de biomateriais, ainda existe uma escassez de nanocompósitos formados por hidrogéis injetáveis e nanopartículas que exerçam multifunções. Especialmente, não são relatados nanocompósitos que associam polímeros termossensíveis e com propriedades mecânicas advindas de nanopartículas inorgânicas, na geração de biomateriais híbridos para a reconstrução de tecidos cartilagosos. Dessa forma, a hipótese dessa tese foi avaliar e compreender se as propriedades físico-químicas, estruturais, morfológicas, térmicas, reológicas e biológicas do PNVCL são alteradas pela adição de nanofibras mesoporosas de sílica funcionalizadas e PVAc. Com a finalidade de se obter nanocompósitos termossensíveis, com transição de fase abaixo da temperatura fisiológica, que exibam superiores propriedades e multifunções para o desenvolvimento de potenciais biomateriais injetáveis na engenharia tecidual.

3 – OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo sintetizar nanocompósitos injetáveis resultantes da copolimerização de PNVCL e PVAc na presença de nanofibras mesoporosas de sílica para a obtenção de materiais biocompatíveis, que possam ser empregados como *scaffolds* na engenharia tecidual. Para tanto, as principais metas desse estudo foram:

- i. Sintetizar hidrogéis de copolímeros de PNVCL e PVAc com composições variadas dos monômeros, mantendo a temperatura crítica inferior de solubilidade abaixo da temperatura fisiológica (37 °C).
- ii. Estudar o efeito da concentração dos monômeros na LCST dos hidrogéis sintetizados.
- iii. Obter nanofibras de sílica mesoporosas funcionalizadas com MPS que permitam a ligação covalente com o hidrogel durante a polimerização *in situ*, com a finalidade de melhorar a distribuição das nanofibras na matriz polimérica e as propriedades reológicas dos nanocompósitos.
- iv. Caracterizar o comportamento termossensível, estrutural e térmico dos nanocompósitos obtidos na presença de diferentes concentrações das nanofibras de sílica.
- v. Analisar os materiais em testes *in vitro* para determinar sua citocompatibilidade e a capacidade de induzir e suportar a produção de componentes da matriz extracelular da cartilagem para atuar como potenciais *scaffolds* na engenharia de tecidos cartilagosos.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Materiais

4.1.1- Síntese das nanofibras mesoporosas de sílica

Para a síntese das nanofibras mesoporosas de sílica empregou-se a metodologia proposta por RAMBAUD *et al.* ⁹⁸. Inicialmente adicionou-se 0,6 g de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB, Sigma-Aldrich $\geq 99,5\%$), 0,06 g de ácido perfluorooctanoico (PFOA, Sigma-Aldrich 96%), 2,3 mL de uma solução 2 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio (Synth) e 300 mL de água destilada em um béquer. Em seguida adicionou-se 3,82 g de tetraetilortosilicato (TEOS, Sigma Aldrich 98%) e a mistura foi agitada durante 2 h a 60 °C. Posteriormente, as nanofibras mesoporosas de sílica foram purificadas por três repetidas etapas de lavagem em água destilada e centrifugação a 7000 rpm por 4 min, e secas em estufa a 60 °C.

4.1.2- Remoção de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)

Alguns trabalhos demonstraram que a presença do surfactante CTAB em certas concentrações pode resultar em uma viabilidade celular reduzida ^{112,113}. Dessa forma, CTAB foi removido das nanofibras mesoporosas de sílica por extração alcoólica ácida ¹¹⁴. Para isso, 1 g de SiO₂ foi disperso em 100 mL de metanol e homogeneizado em uma cuba ultrassônica, seguido pela adição de 1 mL de ácido clorídrico (HCl, Synth 37 % P.A.). O sistema foi mantido sob refluxo a 80 °C por 24 h, e as nanofibras foram purificadas por seguidas centrifugações a 7000 rpm por 4 min, lavagem com etanol e posteriormente com água destilada, até atingir pH neutro, e secas em estufa a 60 °C.

4.1.3- *Modificação superficial das nanofibras mesoporosas com 3-(trimethoxisilil)propil metacrilato (SiO₂-MPS)*

Após a remoção de CTAB, a modificação da sílica com 3-(trimethoxisilil)propil metacrilato (MPS, Alfa Aesar 98 %) foi realizada baseada no procedimento descrito por ZHAO *et al.*¹¹⁵. 1,0 g de sílica foi disperso em 100 mL de tolueno e homogeneizado em uma cuba ultrassônica. Em seguida adicionou-se 10 mL de MPS e o sistema foi mantido sob refluxo a 85 °C por 6 h. As nanofibras modificadas obtidas (SiO₂-MPS) foram purificadas por três seguidas etapas de lavagem em etanol e centrifugação por 4 min a 7000 rpm e secas em estufa a 60 °C.

4.1.4- *Purificação dos reagentes precursores da polimerização*

O iniciador radicalar 2,2'-azo-bis-isobutironitrila (AIBN, Dupont) foi previamente purificado por recristalização em metanol para remover as impurezas presentes. Para isso, adicionou-se 2,5 g do AIBN em 100 mL de metanol anidro. Esse sistema foi aquecido a 60 °C até todos os cristais serem dissolvidos. A solução foi filtrada, recolhendo o filtrado em outro frasco de Erlenmeyer, que foi evaporado até aproximadamente metade do volume inicial, vedado e levado ao congelador por 4 dias. Os cristais incolores resultantes foram filtrados, secos a temperatura ambiente e armazenados a -6 °C.

O monômero acetato de vinila também foi purificado, pois contém hidroquinona como inibidor de polimerização na sua composição que pode atrapalhar a síntese e a reprodutibilidade do copolímero a ser formado. Para removê-la, colocou-se 100 mL de acetato de vinila em 20 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio (5 %, Synth). Com um funil de separação, recolheu-se o sobrenadante e adicionou-se 20 mL de água destilada para remover vestígios de solução alcalina. O monômero foi posteriormente seco por contato com sais de sulfato de magnésio

(Synth) por 3 horas. O desidratante foi removido por decantação e filtração e o monômero foi armazenado em geladeira ao abrigo de luz.

4.1.5- *Síntese dos polímeros e copolímeros*

A síntese de PNVCL e dos copolímeros foi realizada baseada no procedimento descrito por MEDEIROS *et al.*⁷¹, a partir da polimerização radicalar dos monômeros N-vinilcaprolactama (NVCL, Sigma-Aldrich $\geq 98\%$) e acetato de vinila (VAc, Sigma-Aldrich $\geq 99\%$), nas proporções mássicas de 10, 20 e 40 % de VAc. 5,00 g de monômeros NVCL e VAc foram inicialmente dissolvidos no solvente dimetilsulfóxido (DMSO, Synth) na concentração mássica de 15 % e adicionado ao reator (Figura 4.1), que em seguida foi aquecido a 70 °C e mantido sob atmosfera de nitrogênio e agitação. Posteriormente, 0,01 g do iniciador radicalar AIBN (tempo de meia vida a 70 °C é de 4,8 h⁵⁹) foi dissolvido em um pequeno volume do DMSO total utilizado e gotejado durante 30 min. O sistema reacional foi mantido sob agitação por 4 h e os polímeros resultantes foram purificados por quatro etapas de centrifugação a quente a 10000 rpm por 1 min com água destilada a 50 °C, e secos em estufa a 50 °C por 48 h.

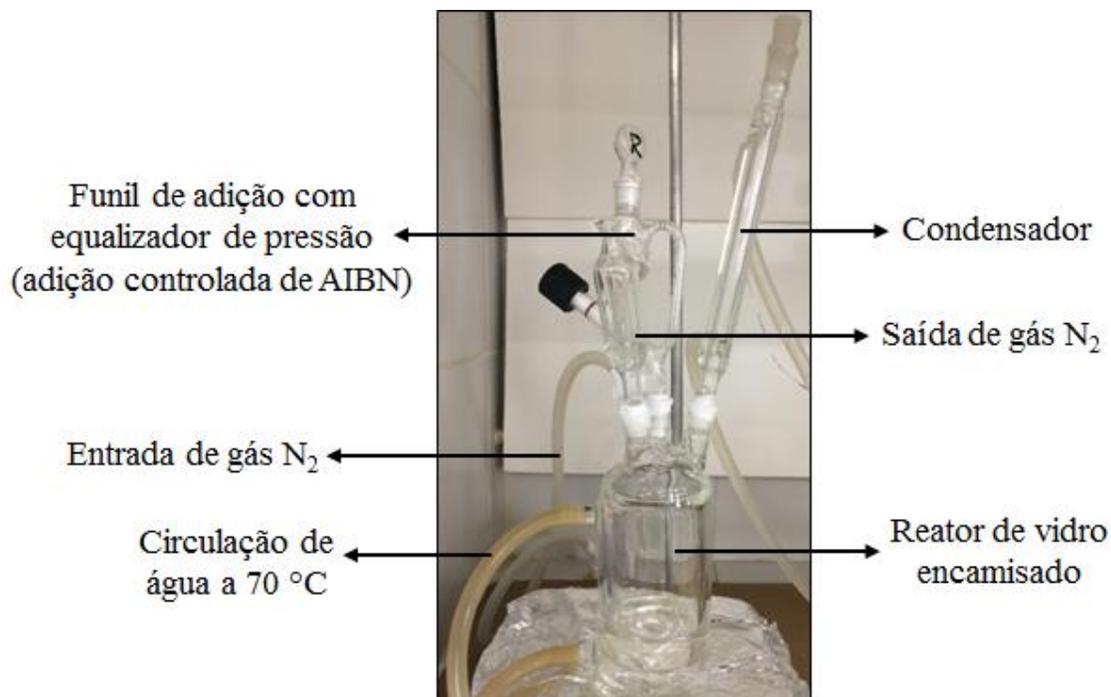


FIGURA 4.1 - Reator utilizado para a síntese dos polímeros e dos nanocompósitos e que possibilita o controle da temperatura, atmosfera, adição dos reagentes e refluxo.

4.1.6- Síntese dos nanocompósitos

Os nanocompósitos de PNVCL/PNVCL-PVAc e SiO₂-MPS nas concentrações mássicas de 1 % e 5 % em relação a massa inicial de monômeros foram preparados similarmente aos polímeros e copolímeros. As nanofibras mesoporosas de sílica modificadas com MPS foram adicionadas ao meio reacional juntamente com os monômeros e o solvente DMSO em um teor total de sólidos de 15% em massa. Em seguida, o iniciador radicalar AIBN (0,2 % em massa) foi adicionado por gotejamento durante 30 min. Os nanocompósitos foram mantidos sob aquecimento a 70 °C, atmosfera de nitrogênio, durante 4 h. Os nanocompósitos resultantes foram purificados por seguidas etapas de centrifugação a quente a 10000 rpm por 1 min com água destilada a 50 °C, e secos em estufa a 50 °C por 48 h.

4.2- Caracterizações

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

Os polímeros e os nanocompósitos foram analisados pela espectrofotometria de UV-vis no modo transmitância entre 200-800 nm em um equipamento Multi-Spec-1501 UV-vis Spectrophotometer Shimadzu, utilizando um controlador de temperatura acoplado TCC-Controller Shimadzu 240, a fim de investigar a temperatura crítica inferior de solubilidade dos materiais. A transmitância das suspensões poliméricas preparadas em água destilada (1 % massa/volume) foi analisada a cada 0,5 °C e o sistema foi mantido por 3 min em cada temperatura para sua estabilização. Para o ajuste das curvas de densidade óptica em função da temperatura empregou-se o software Mathematica®10 para o cálculo dos parâmetros termodinâmicos.

4.2.2- *Espectroscopia vibracional na região de Infravermelho (FTIR)*

As nanofibras mesoporosas de sílica, o surfactante CTAB, os polímeros e os nanocompósitos foram analisados por meio da espectroscopia de infravermelho. Empregou-se um espectrômetro vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) Bruker modelo EQUINOX 55 com um acessório de reflectância difusa (DRIFT) e de transmitância na região de 400-4000 cm^{-1} , com 32 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} . Já a amostra líquida do composto organossilano MPS foi analisada utilizando o acessório de ATR (monocristal de ZnSe) na região de 650-4000 cm^{-1} , com 32 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

4.2.3- *Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)*

Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance III operando em um campo magnético Oxford de 9,4 Tesla, que tem relacionada uma frequência de 400 MHz para o núcleo de hidrogênio-1. As análises em solução foram realizadas com o uso de uma sonda sintonizável para uma ampla faixa de frequências (40-160 MHz) utilizando tubos de 10 mm de diâmetro. As amostras de PNVCL e dos nanocompósitos foram solubilizadas em aproximadamente 2,5 mL de água, utilizando deutério como padrão externo. Todos os experimentos de ^1H e ^{13}C foram realizados à temperatura ambiente. Os espectros de carbono-13 foram obtidos de forma qualitativa, no modo totalmente acoplado e com transferência de NOE (Efeito Overhauser Nuclear) com um tempo de aquisição (AQ) de 0,55 s e tempo de relaxação (d1) de 0,1 s.

4.2.4- *Microscopia eletrônica de Varredura (FEG-MEV)*

A morfologia das nanofibras mesoporosas de sílica e das suspensões poliméricas e dos nanocompósitos aquecidas a 50 °C foi analisada por microscopia eletrônica de varredura, por meio de um microscópio Zeiss Supra 35VP com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (FEG-MEV). Dispersões coloidais das nanofibras de SiO_2 e as suspensões poliméricas foram depositadas em um substrato de silício.

4.2.5- *Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)*

A estrutura mesoporosa das nanofibras de sílica foi analisada por microscopia de transmissão de alta resolução em um microscópio TECNAI F20, operando a 200 kV. As amostras foram depositadas em uma grade de cobre coberta com uma fina camada de carbono amorfo.

4.2.6- *Difração de raios X (DRX)*

As nanofibras mesoporosas de sílica foram caracterizadas por difração de raios X para identificar sua mesoestrutura 2D-hexagonal dos poros. Empregou-se um difratômetro Rigaku modelo DMax 2500PC (radiação Cu K α) com $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$, operando na faixa de 2θ de 3° a 10° , com velocidade de passo de $0,02^\circ$ e tempo de passo de $0,2^\circ/\text{min}$.

4.2.7- *Espalhamento de raios X a baixo ângulos (SAXS)*

Experimentos de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) foram realizados em um equipamento Bruker AXS 2D Nanostar (EUA) com radiação CuK α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), operando a 40 kV/35 mA na faixa de $0,007$ - $0,23 \text{ \AA}^{-1}$, com uma distância entre a amostra e o detector de 1007 mm e resolução mínima em $q = 0,007 \text{ \AA}^{-1}$. As medidas de espalhamento de raios X das nanofibras mesoporosas de sílica foram realizadas durante 1000 s.

4.2.8- *Espalhamento de luz dinâmico (DLS)*

Medidas do diâmetro hidrodinâmico das nanofibras mesoporosas de sílica, dos polímeros e dos nanocompósitos em água destilada foram realizadas em um equipamento Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

4.2.9- *Termogravimetria (TG)*

Para a análise da degradação térmica dos polímeros e do organossilano MPS ancorado nas nanofibras mesoporosas de sílica utilizou-se um analisador de termogravimetria (TG) modelo TG 209 F3 (Netzsch, Alemanha) com taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ entre 25°C e 900°C em uma atmosfera de ar sintético contendo uma vazão de 5 mL min^{-1} de oxigênio e 15 mL min^{-1} de nitrogênio.

4.2.10- *Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)*

As medidas de calorimetria exploratória diferencial dos polímeros e nanocompósitos foram realizadas em um calorímetro com varredura térmica diferencial (DSC) NETZSCH modelo DSC 204 Phoenix, com taxa de aquecimento de $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, em uma atmosfera de N_2 e na faixa de temperatura de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ ao longo de 2 ciclos de aquecimento e resfriamento.

4.2.11- *Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS)*

Os espectros de XPS das nanofibras mesoporosas de sílica foram adquiridos utilizando um espectrômetro ScientaOmicron ESCA+ equipado com uma fonte de raios X monocromática (K-Alpha $1486,6\text{ eV}$) e um analisador de elétrons do tipo hemisférico, com alta resolução e equipado com 125 canais individuais de detecção. Durante as medidas, a pressão da câmara de análise foi de $2 \times 10^{-9}\text{ mbar}$ e os espectros *survey* e de alta resolução foram registrados com uma energia de 50 e 20 eV, respectivamente. O neutralizador de carga Cn10 Omicron com energia de feixe de 1,6 eV foi utilizado para corrigir o efeito de carga, e os ajustes das curvas dos espectros foi gerado após uma subtração de fundo usando o método Shirley.

4.2.12- *Análise de Área Superficial e Adsorção/Dessorção de N_2*

As medidas de área específica das nanofibras mesoporosas de sílica foram obtidas em um equipamento Micromeritics ASAP 2020. As análises foram realizadas utilizando-se nitrogênio a temperatura de 77 K. As amostras foram previamente tratadas a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ em vácuo por três horas. A área superficial específica foi calculada utilizando a equação Brunauer–Emmett–Teller (BET) na região de baixa pressão relativa ($p/p_0 = 0,200$).

4.2.13- *Reologia*

A análise reológica foi realizada em um reômetro AR2000 (TA Instruments) acoplado com um dispositivo de controle Peltier de temperatura, com geometria de cone e placa de 20 mm de diâmetro, com ângulo de cone de 59 min 42 s e espaço entre o cone e a placa de 27 μm . Os módulos dinâmicos de armazenamento (G') e perda (G'') dos polímeros e nanocompósitos dispersos em diferentes concentrações em tampão salino-fosfato (PBS, pH 7,4) foram avaliados na faixa de temperatura de 25 até 37 $^{\circ}\text{C}$, a 3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, 0,5 % de deformação e 1 Hz, a fim de mimetizar a condição de injeção *in vivo* de biomateriais.

4.2.14- *Cromatografia de permeação em gel (GPC)*

Poli(N-vinilcaprolactama) disperso em dimetilformamida (DMF) na concentração de 3 mg/mL foi analisado por GPC utilizando como solvente DMF com 1 % LiBr a 60 $^{\circ}\text{C}$ e vazão de 0,50 mL min^{-1} no sistema Waters Empower equipado com um amostrador 717plus, uma bomba HPLC binária 1525 e um detector de índice de refração 2414. Duas colunas Styragel® (Polymer Laboratories; uma de 5 μm Mixed-C e uma de 10 μm Mixed-B) foram mantidas a 60 $^{\circ}\text{C}$ e utilizadas para a separação. Padrões de poli(metacrilato de metila) (Polymer Laboratories, Varian Inc.) na faixa de massa molar de 500 a 2100000 Da foram utilizados como padrões.

4.3. Estudo da atividade biológica dos polímeros e nanocompósitos

4.3.1- *Cultivo e crescimento celular*

As células escolhidas para o estudo biológico foram as células tronco mesenquimais humanas (CTMs) e os condrócitos bovinos (CDs), típicas células utilizadas na engenharia de tecidos cartilagosos. CDs foram isolados de bovinos jovens (Research 87, Boylston, MA), cultivados e expandidos até primeira passagem

em meio basal, que consiste em meio DMEM (Gibco-Invitrogen) suplementado com 10 % volume/volume de soro fetal bovino (SFB, Gibco-Invitrogen) e 1 % volume/volume de penicilina/estreptomicina/fungizona (PSF; Gibco-Invitrogen) em atmosfera contendo 5 % de CO₂ a 37 °C. CTMs (Lonza) foram cultivadas e expandidas até terceira passagem em meio de crescimento, que consiste em meio essencial mínimo (α -MEM w/o nucleosides, Gibco-Invitrogen) suplementado com 16,7 % massa/volume de FBS (Gibco-Invitrogen) e 1 % volume/volume de penicilina/estreptomicina (Gibco-Invitrogen) em 5 % de CO₂ a 37 °C. Todas células foram subcultivadas em seus respectivos meios de cultura a cada 2 dias.

4.3.2- *Ensaio de citotoxicidade*

A citocompatibilidade dos polímeros e dos nanocompósitos foi avaliada pela técnica colorimétrica com alamarBlue® (composto ativo resazurina). Este ensaio consiste na redução de resazurina de coloração azul conforme a atividade metabólica celular, que atua como indicativo da viabilidade celular. As células viáveis contêm enzimas que reduzem a resazurina em resorufina de coloração rosa. O corante atua como um aceptor de elétrons intermediário na cadeia de transporte de elétrons sem interferência na transferência normal de elétrons nas células. Como o corante indicador aceita elétrons, ele muda do estado azul oxidado não-fluorescente para o estado reduzido fluorescente pela ação de enzimas presentes na mitocôndria e no citoplasma^{116,117}.

A partir da cultura de CTMs e CDs, aproximadamente 10⁴ células foram adicionadas a cada um dos 96 poços da placa de cultura celular e incubadas durante 24 h a 5 % de CO₂ e 37 °C. Os meios de cultura foram então substituídos pelos polímeros e nanocompósitos dispersos nos meios de cultura em uma série de concentrações e incubados por 1 e 3 dias. As suspensões poliméricas foram

previamente esterilizadas em lâmpada de UV de fluxo laminar por 30 min e dispersas no meio de cultura e mantidas a 4 °C por 24 h. Posteriormente, os meios com os materiais foram removidos e as células foram lavadas três vezes com PBS à temperatura ambiente, e 100 µL de solução de alamarBlue® (10% m/m de alamarBlue® em meio basal isento de soro fetal bovino) foi adicionado a cada poço. A placa de cultura celular foi incubada a 37 °C durante 4 h e a absorbância de cada amostra (n = 4) foi medida em um leitor de placas (comprimento de onda de excitação = 540 nm, comprimento de onda de emissão = 610 nm). A viabilidade celular (%) foi calculada de acordo com os valores de fluorescência medidos e normalizados pela fluorescência dos poços com o controle, cujas células semeadas foram apenas incubadas na presença de meios de cultura.

4.3.3- *Viabilidade celular tridimensional*

As células CTMs e CDs foram ressuspendidas a uma concentração de 20 milhões de células/mL nos polímeros e nanocompósitos nas concentrações de 5, 10 e 20 % massa/volume em meios de cultura celular. Em seguida, injetou-se 50 µL destas suspensões utilizando agulhas hipodérmicas em moldes circulares customizados de polidimetilsiloxano com diâmetro de 5 mm, aderidos a lâminas circulares de vidro com diâmetro de 12 mm e tratadas com plasma. Esses moldes foram inseridos no interior dos 24 poços da placa de cultura celular, incubados a 5% de CO₂ e 37 °C até a gelificação dos hidrogéis, e 2 mL de meios basal ou de crescimento foram adicionados em cada poço. No dia da injeção (dia 0), no dia seguinte (dia 1) e após 3 dias (dia 3), a viabilidade celular tridimensional dos hidrogéis encapsulados foram avaliados utilizando o kit *Live/Dead* (Molecular Probes) e os materiais foram visualizados utilizando um microscópio confocal de varredura a laser (TCS SP5; Leica). Nesse ensaio, as células vivas são coradas em verde e células mortas são coradas em vermelho a partir dos corantes fluorescentes

calceína-AM (comprimento de onda de excitação/emissão 485 nm/530 nm) e homodímero de etídio (comprimento de onda de excitação/emissão 530 nm/645 nm), respectivamente. A calceína-AM permeia passivamente a membrana celular e sofre uma hidrólise enzimática por esterases intracelulares presentes em células íntegras, formando uma molécula impermeável e de fluorescência verde. Já quando as células estão danificadas ou com uma membrana com maior permeabilidade, essa atividade enzimática é interrompida e o homodímero de etídio reage com ácidos nucleicos com fluorescência vermelha ¹¹⁸.

As amostras foram preparadas conforme a instrução do fabricante. Inicialmente o meio de cultura da placa é removido e os hidrogéis são lavados três vezes com 1 mL de PBS. Em seguida, 1 mL de solução PBS contendo 0,5 μL (4 mmol L^{-1}) de calceína-AM (Invitrogen) e 2 μL (2 mmol L^{-1}) de homodímero de etídio (Invitrogen) foram adicionados aos hidrogéis, que foram incubados por 30 min à $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e visualizados tridimensionalmente em um microscópio confocal de varredura à laser (TCS SP5, Leica).

4.3.4- *Cultura in vitro dos hidrogéis encapsulados com CTMs e CDs*

Estudos *in vitro* foram conduzidos para investigar a formação da neocartilagem nos hidrogéis na concentração de 20 % massa/volume encapsulados com CTMs e CDs e preparados conforme descrito no ensaio de viabilidade celular tridimensional. Os hidrogéis foram cultivados na presença de 2 mL de meio indutor condrogênico (DMEM de alta glicose, 1 % volume/volume de ITS + Premix, 50 mg mL^{-1} de l-prolina, $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de dexametasona, $0,9 \text{ mmol L}^{-1}$ de piruvato de sódio, 50 mg mL^{-1} de ascorbato e 1 % volume/volume de PSF), que foi substituído três vezes por semana durante 8 semanas. No caso dos hidrogéis encapsulados com CTMs o meio indutor condrogênio também foi suplementado com 10 ng mL^{-1} de TGF- β 3. Nesses ensaios cada amostra foi analisada em quadruplicata (n=4).

4.3.5- *Ensaio bioquímicos dos hidrogéis cultivados in vitro*

Após os hidrogéis (n=4) serem cultivados por 8 semanas, os componentes da neocartilagem formada foram quantificados. Entre eles, o conteúdo de glicosaminoglicanos sulfatados (GAG) nestas amostras foi determinado a partir do ensaio com azul de dimetilmetileno (DMMB) (Sigma-Aldrich), utilizando como padrão o sulfato de condroitina bovina^{119,120}. A quantidade de DNA foi determinada pelo ensaio com PicoGreen® (Invitrogen, Molecular Probes) utilizando como padrão o DNA de fago lambda¹²¹. O conteúdo de colágeno também foi determinado a partir do ensaio de hidroxiprolina (OHP), utilizando como padrão o trans-4-hidroxi-L-prolina (Sigma-Aldrich) e quantificado de acordo com a proporção conhecida 1: 7,14 de OHP:colágeno^{70,122,123}. Amostras poliméricas sem células encapsuladas foram avaliadas em todos os ensaios como grupos controle e não mostraram interferência nos dados obtidos.

Previamente aos ensaios bioquímicos, as amostras foram adicionadas em uma solução tampão na presença da enzima papaína para a digestão das amostras. A solução tampão foi preparada com 3,402 g de acetato de sódio triidratado (ACS, Fischer Scientific), 0,394 g de cloridrato de L-cisteína anidro ($\geq 98\%$, Sigma Aldrich), 4,653 g de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, Fischer Scientific), 250 mL de água deionizada e o pH da solução foi ajustado para 6,0. Posteriormente, uma solução $30 \mu\text{L mL}^{-1}$ de papaína (17 unidades/mg de proteína, 25 mg de proteína/mL, Sigma Aldrich) foi preparada em tampão e 200 μL foram adicionados para cada hidrogel removido do meio de cultura e transferido para tubos eppendorf. As amostras foram mantidas em banho-maria a 60°C por 24h e homogeneizadas em um agitador vortex.

Para o ensaio de DMMB para a detecção de GAG, empregou-se as amostras inicialmente digeridas em tampão com papaína. Padrões de sulfato de condroitina (Sigma-Aldrich) foram preparados a partir de uma solução $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ em

água deionizada, e sua diluição em alíquotas de 1,5 mL de soluções de 1, 0,25, 0,1 e 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Uma solução estoque de DMMB foi preparada a partir da mistura de 8 mg de azul de dimetilmetileno, 2,5 mL de etanol, 1 g de formato de sódio, 1 ml de ácido fórmico e 500 mL de água deionizada. Essa solução foi armazenada ao abrigo de luz a 4 °C. Em uma microplaca com 96 poços, 20 μL das amostras em diferentes fatores de diluição (1 e 4) e dos padrões foram adicionados em duplicata aos poços. Utilizando uma pipeta de multicanal, 125 μL da solução de DMMB foram adicionados aos poços e misturados. Em seguida, a microplaca foi analisada em um leitor de placas na absorvância de 525 nm. A concentração de GAG nas amostras foi calculada de acordo com a regressão linear da curva padrão, e considerando os fatores de diluição utilizados. Amostras acelulares dos hidrogéis também foram avaliadas para analisar a potencial interferência dos materiais no ensaio de DMMB.

Para a determinação de DNA, utilizou-se as amostras previamente digeridas. Para a preparação dos padrões e da solução de PicoGreen® utilizou-se o Tampão 50x TE (500 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 7,5) diluído 50x em água deionizada (800 μL de tampão em 39,2 mL de água). PicoGreen® é um corante de ácido nucleico fluorescente ultrasensível para quantificar DNA de cadeia dupla em solução. No dia do experimento, preparou-se uma solução de PicoGreen®, a partir da sua diluição 1:200 em solução tampão TE. A partir de uma solução estoque do padrão DNA de fago lambda (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) preparou-se a curva de calibração pela diluição fracionada (1:4) da solução estoque. 10 μL de amostra e padrões foram adicionados em duplicata em microplaca de 96 poços de coloração preta e fundo transparente. Utilizando uma pipeta de multicanal, 100 μL da solução de PicoGreen® foram adicionados aos poços e misturados. Em seguida, a microplaca foi analisada em um leitor de placas utilizando os comprimentos de onda de excitação e emissão de 480 nm e 520 nm, respectivamente. A concentração de DNA nas amostras foi calculada de acordo com a regressão linear da curva padrão, e

considerando os fatores de diluição utilizados. Amostras acelulares dos hidrogéis também foram avaliadas para analisar a potencial interferência dos materiais no ensaio de PicoGreen®.

No ensaio de orto-hidroxiprolina (OHP) para a determinação do conteúdo de colágeno, inicialmente as amostras digeridas foram transferidas para ampolas de vidro (2 mL) e a elas adicionadas 250 µL de ácido clorídrico concentrado (37 %). As ampolas foram seladas com um maçarico de propano e mantidas a 110 °C em um termobloco por 1 semana. Posteriormente, as ampolas foram abertas e a solução ácida evaporada com um concentrador SpeedVac (Thermo Scientific). As amostras secas foram diluídas em 500 µL de solução tampão, homogeneizadas em um agitador vortex e armazenadas a 4 °C por 16 h. Esta solução tampão foi preparada com 50 g de ácido cítrico monoidratado, 12 mL de ácido acético glacial, 120 g de acetato de sódio triidratado, 34 g de hidróxido de sódio e 1 L de água deionizada. O pH da solução foi ajustado para 6,0-6,5 e esta diluída a 1:10 em água deionizada. Os padrões foram preparados a partir da diluição de uma solução estoque de trans-4-hidroxi-L-prolina em solução tampão (1 mg/mL).

Para o ensaio de OHP, 150 µL dos padrões e das amostras em diferentes fatores de diluição foram adicionados a microplaca de 96 poços. Em seguida, adicionou-se 75 µL de solução de cloramina T aos poços com uma pipeta de multicanal, as soluções homogeneizadas e mantida a temperatura ambiente por 20 min. A solução de cloramina T foi preparada com 0,3525 g de cloramina T triidratada (95%, Sigma Aldrich), 6,5 mL de 1-propanol, 13,325 mL de solução tampão, 5,175 mL de água deionizada e o pH ajustado para 6,0. Adicionou-se então 75 µL de solução de DMAB em cada poço, homogeneizou-se as soluções e a microplaca foi mantida em banho-maria a 60 °C por 7 minutos e posteriormente em temperatura ambiente por 5 min. A solução de DMAB foi preparada com 4-(dimetilamino)benzaldeído (DMAB, 98% Sigma Aldrich), 6,5 mL de ácido

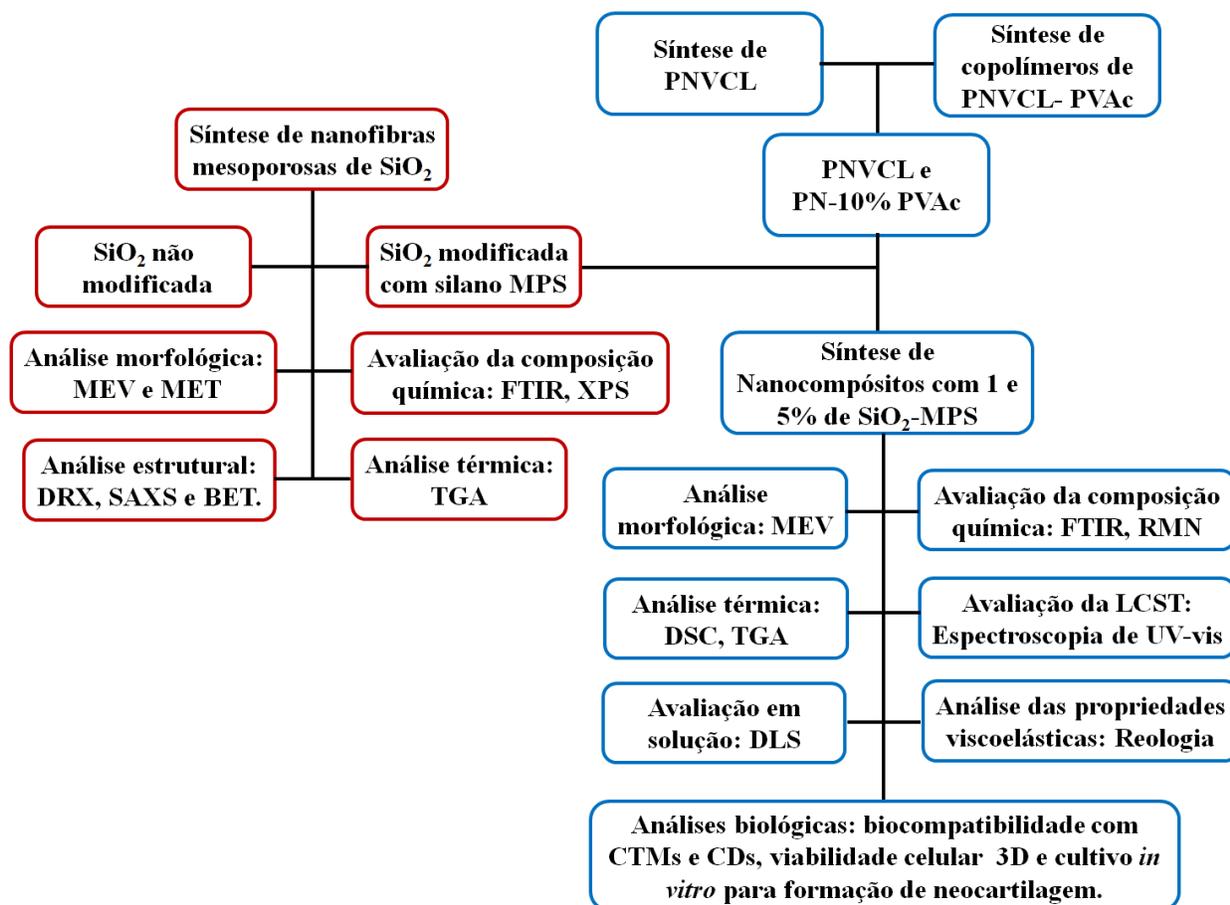
perclórico (15,6%) e 18,5 mL de 1-propanol. Posteriormente, a microplaca foi analisada em um leitor de placas na absorvância de 550 nm. A concentração de colágeno nas amostras foi calculada de acordo com a regressão linear da curva padrão de OHP (1:7,14 de OHP:colágeno), e considerando os fatores de diluição utilizados. Amostras acelulares dos hidrogéis também foram avaliadas para analisar a potencial interferência dos materiais no ensaio de OHP.

4.3.6- Análise estatística

A análise estatística dos ensaios biológicos foi realizada com o software Excel pelo suplemento Daniel's XL Toolbox. A significância entre os grupos (n = 4 por grupo) foi determinada pela análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey (p <0,05), e as barras de erro representam o desvio padrão do valor médio.

4.4. Visão geral

Os experimentos e as metodologias empregados nesse estudo estão resumidos no fluxograma abaixo.



5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1-Nanofibras mesoporosas de SiO₂

As nanofibras mesoporosas de sílica são consideradas promissoras para diversas aplicações nas áreas de catálise, adsorção, cromatografia, nanoeletrônica, membranas e em sistemas de liberação controlada de fármacos. Quando desenvolvidas com poros alinhados em nanocanais paralelamente ao eixo de crescimento das fibras podem otimizar os fenômenos de difusão e percolação em propriedades de transporte ^{98,124}.

As nanofibras mesoporosas de sílica foram sintetizadas pelo método sol-gel pela policondensação do tetraetilortosilicato em condições básicas, cujas espécies de sílica estão na forma de ânions e interagem com cátions quaternários de amônio do surfactante CTAB (Figura 5.1) na formação de mesofases periódicas ^{125,126}. Elas resultam em fibras helicoidais como morfologia final, fator anisotrópico e mesoestrutura helicoidal sem o uso de surfactantes quirais, pelo controle dos parâmetros cinéticos da síntese e da proporção utilizada dos reagentes PFOA, CTAB e o precursor de sílica ⁹⁸. Por exemplo, YANG *et al.* ¹²⁷ observaram que ao variar a razão mássica (R) entre PFOA e CTAB, nanobastões com diferentes dimensões eram sintetizadas. Conforme eles aumentaram a concentração de PFOA e R, nanobastões com maiores razões na proporção do comprimento e diâmetro (C>D), e no ordenamento hexagonal foram obtidos.

O ácido PFOA apresenta ânions perfluorooctanoatos, cuja baixa tensão superficial pode levar à formação de nanopartículas mesoporosas altamente ordenadas em soluções aquosas e o surfactante CTAB é quem formará o *template* de crescimento das fibras helicoidais ^{98,127}. A formação das nanofibras se inicia com um conjunto de micelas com formato cilíndrico que se transforma espontaneamente em

uma morfologia helicoidal de mesoestrutura dirigida pela redução da energia de Gibbs de superfície (ΔG_s)¹²⁷. Em seguida, uma interação atrativa entre o *template* de micelas e o precursor de sílica (Figura 5.2) deve ocorrer para assegurar a formação da mesoestrutura sem ocorrer a separação de fase¹²⁶.

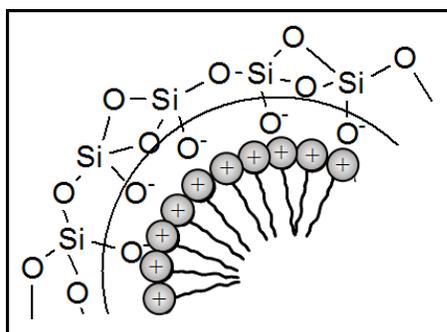


FIGURA 5.1 - Demonstração baseada no artigo de HOFFMANN *et al.*¹²⁶ de como a reação ocorre entre as espécies de sílica, que se encontram como ânions em condições básicas, com o surfactante catiônico CTAB.

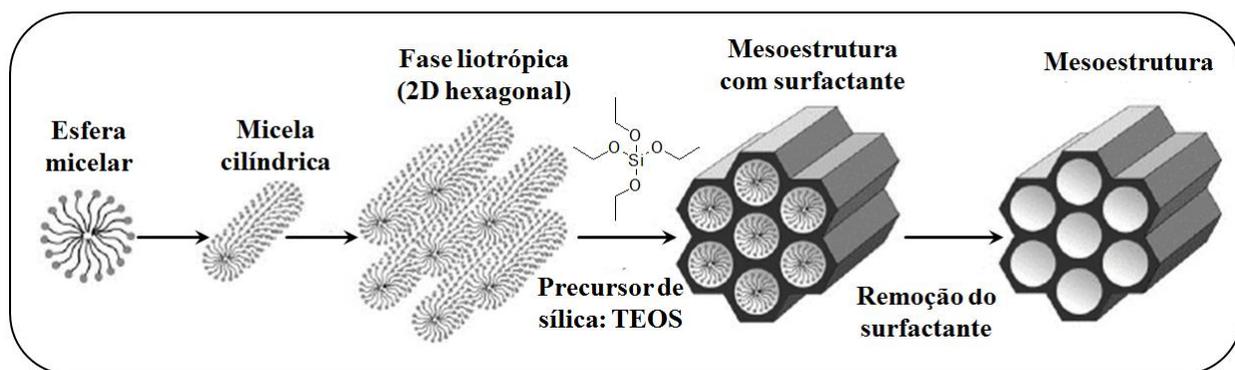


FIGURA 5.2 - Esquema da formação de materiais mesoporosos na presença de agentes que direcionam a estrutura, proposto por HOFFMANN *et al.*¹²⁶.

Posteriormente, as nanofibras mesoporosas de sílica foram funcionalizadas com o agente organosilano MPS. Nesse processo, as espécies ($-OCH_2CH_3$) reagem com os silanóis das superfícies dos poros via uma reação de

condensação e podem ancorar de maneira bidentada (1), tridentada (2) e monodentada (3) ¹⁰², como representado na Figura 5.3. Já os grupos vinílicos na ponta da cadeia do MPS podem se ligar covalentemente aos monômeros poliméricos via polimerização radicalar. A presença de nanopartículas de sílica funcionalizadas com MPS tem reduzido o efeito de aglomeração das partículas devido ao efeito de repulsão estérica induzido pelos grupos na superfície. Além disso, se o MPS tiver compatibilidade química ao monômero polimérico, as nanopartículas serão mais facilmente dispersas na matriz polimérica e podem promover a ligação covalente na interface orgânica/inorgânica ¹²⁸.

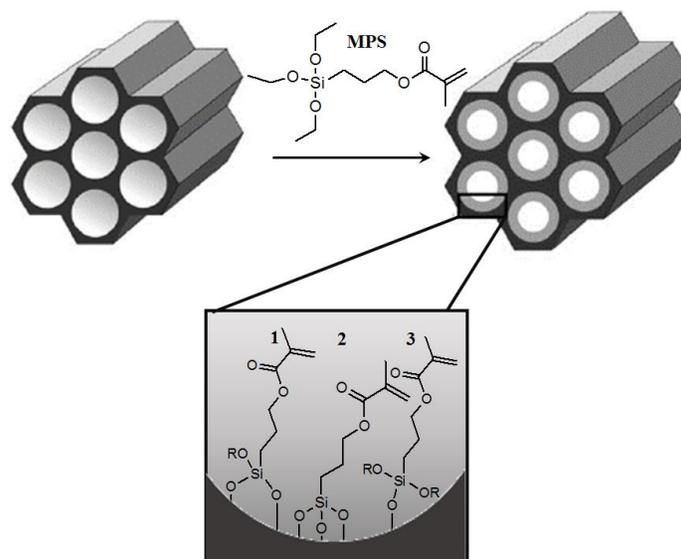


FIGURA 5.3 - Representação da ligação do agente organosilano MPS na superfície interna da mesoestrutura de sílica via ligação bidentada (1), tridentada (2) e monodentada (3). R representa o grupo $-CH_2-CH_3$.

As morfologias das nanofibras mesoporosas de sílica sintetizadas sem e com funcionalizações foram analisadas pelas microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e de transmissão (MET) e são mostradas na Figura 5.4. As nanofibras de sílica (Figura 5.4a) e SiO_2 -MPS (Figura 5.4b) apresentaram distribuição de

comprimento e espessura variando entre 400-500 nm e 60-70 nm, respectivamente, e uma morfologia com formato levemente helicoidal. Pela imagem de MET de SiO₂-MPS na Figura 5.4c é possível observar também a presença do empacotamento hexagonal dos canais mesoporosos helicoidais ao longo das nanofibras ao visualizá-las perpendicularmente ao eixo de crescimento. As setas em vermelho evidenciam ordenamentos na forma de franja referentes ao plano de reflexão 10 de sistemas com simetria hexagonal bidimensional, enquanto as setas pretas indicam o plano 11. Essa estrutura mesoporosa hexagonal formada é melhor representada pela ilustração proposta por YANG *et al.*¹²⁷ na Figura 5.4d.

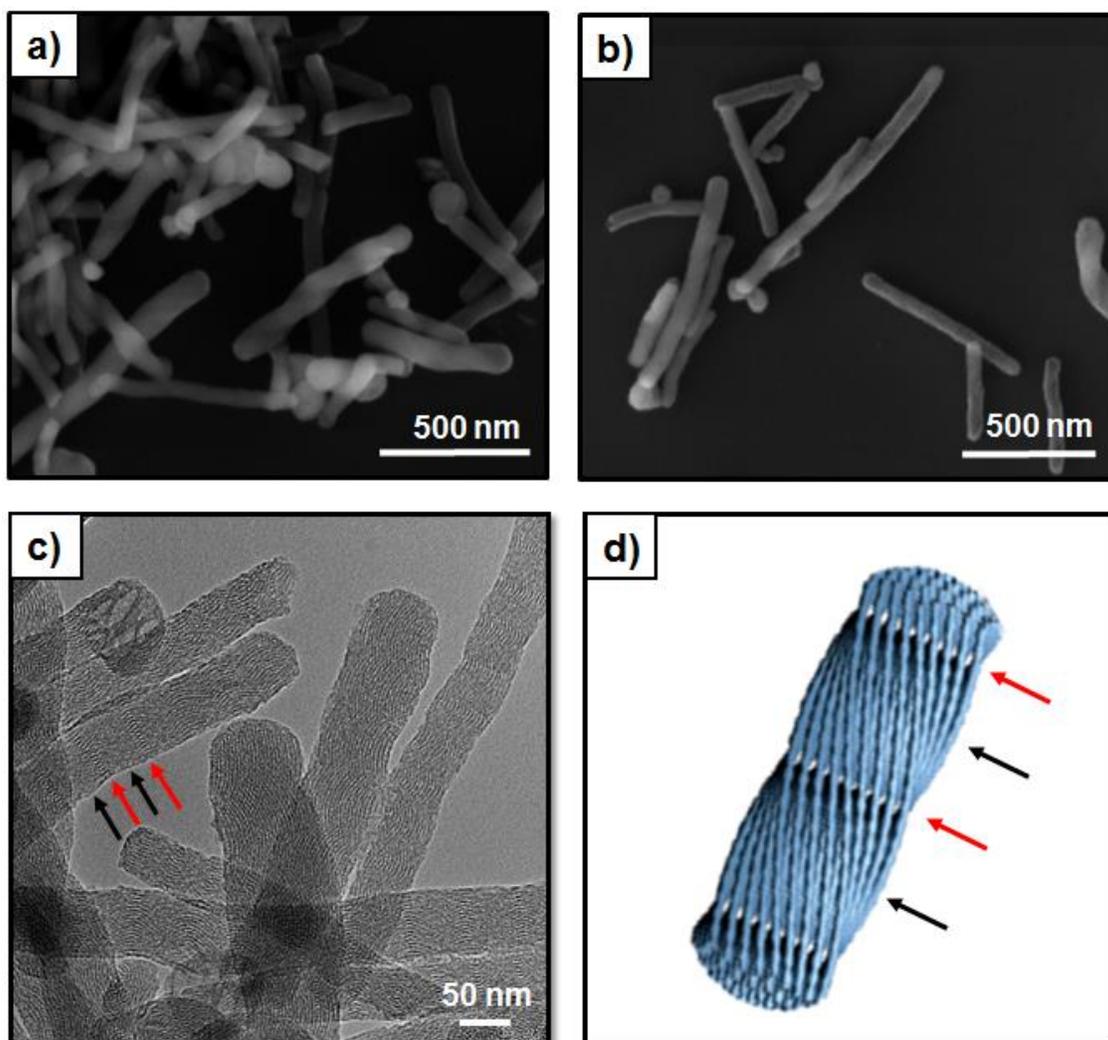


FIGURA 5.4 - Imagens de MEV das nanofibras mesoporosas de sílica pura (a) e funcionalizadas com MPS (b). Imagens de MET de alta resolução da SiO₂-MPS (c). Ilustração da mesoestrutura hexagonal proposta por YANG *et al.* ¹²⁷ (d).

Na Figura 5.5 observa-se as distribuições dos diâmetros hidrodinâmicos (D_h) obtidos pelas análises de DLS e seus respectivos tamanhos médios em função da porcentagem numérica das nanofibras mesoporosas de sílica. Elas apresentam uma distribuição bimodal provavelmente referente ao formato bidimensional da nanofibra, sendo que o menor tamanho encontrado relaciona-se à sua espessura e o maior ao seu comprimento. Comparando-se também as dimensões das

nanopartículas obtidas nas análises de DLS, MEV e MET, observa-se diferentes tamanhos das nanofibras pelas técnicas empregadas. Isto porque, na análise de DLS é avaliado o D_h das partículas coloidais, enquanto que nas técnicas de MEV e MET estima-se o diâmetro da partícula seca a partir da sua área projetada. Na técnica de DLS, um grande número de partículas é analisado, fornecendo maior estatística sobre o sistema em estudo do que técnicas como MEV e MET, onde as partículas são contabilizadas individualmente ¹²⁹. No entanto, no DLS obtém-se distribuições de coeficiente de difusão que são transformados em distribuições de diâmetros hidrodinâmicos pela equação de Stokes–Einstein ¹²⁹.

Além disso, o D_h de partículas não esféricas é considerado como o diâmetro de uma esfera que possui a mesma velocidade de difusão translacional da partícula ¹³⁰. Geralmente, o D_h encontrado nas análises de DLS são maiores do que as dimensões encontradas nas técnicas de MEV e MET, pois quando a partícula se movimenta em uma dispersão coloidal, uma dupla camada elétrica do solvente adere a sua superfície. Essa camada modifica a difusão da partícula no meio, que também é influenciada pela presença de surfactantes e moléculas poliméricas aderidas na superfície, diminuindo ainda mais a difusão no meio ¹³⁰. Por outro lado, essa dupla camada elétrica não é identificada nas análises de microscopia eletrônica, resultando assim em menores partículas do que quando medidas por DLS e em nanofibras de sílica e modificadas com MPS com dimensões similares. Esse efeito pode ser destacado especialmente nas amostras de SiO_2 -MPS, uma vez que sua modificação é feita após a síntese de SiO_2 pura, ou seja, suas dimensões são as mesmas, porém após a modificação o D_h resultante da SiO_2 -MPS foi muito maior que o da SiO_2 pura. Os acréscimos encontrados foram de 29 nm e 189 nm para os tamanhos médios da espessura e comprimento, respectivamente.

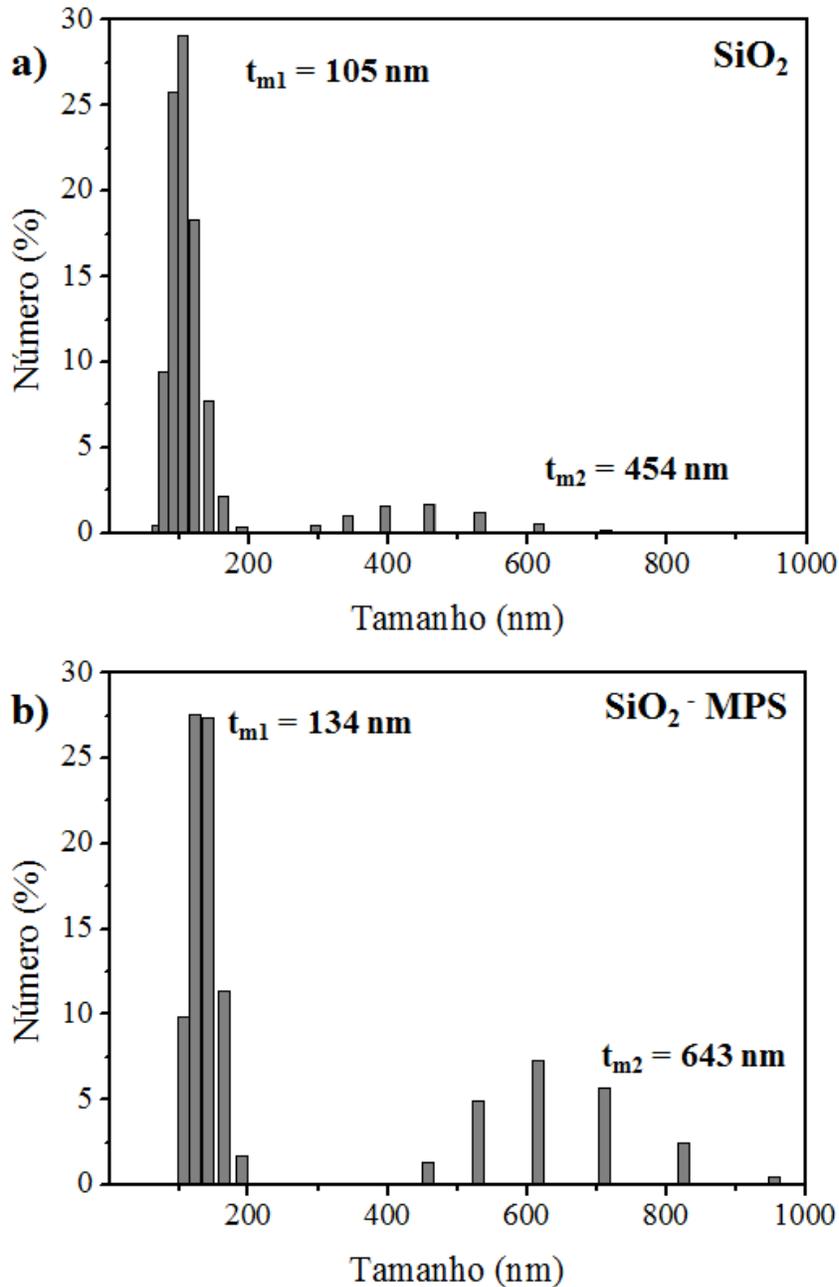


FIGURA 5.5 - Distribuições do diâmetro hidrodinâmico obtidas por DLS para dispersões aquosas coloidais das nanofibras puras de sílica (a) e com MPS(b).

Quando a mesoestrutura das nanopartículas apresenta poros hexagonais ordenados em canais (simetria $p6m$) são identificados planos cristalográficos na região de baixo ângulo de raios X^{98,127}. Para determinar esses planos da nanofibra

mesoporosa de SiO₂-MPS empregou-se as técnicas de DRX e SAXS. Pelo difratograma na Figura 5.6a e no padrão de SAXS na Figura 5.6b são identificados três planos cristalográficos (10, 11 e 20) referentes à mesoestrutura 2D-hexagonal dos poros para a SiO₂-MPS em aproximadamente 2θ=2,13° (10), 3,81° (11) e 4,43° (20). Pelo perfil de SAXS observado, a posição em 2,13° presente em maior intensidade e com pico mais definido pode ser utilizado para estimar o espaçamento interplanar d = 4,1 nm pela Equação de Bragg (Equação 1) e Equação 2, e a célula unitária hexagonal a = 4,7 nm (Equação 3). Outros autores obtiveram valores, perfil de SAXS e difratogramas similares ao obtidos nesse estudo ^{127,131,132}. Geralmente, apenas alguns planos das reflexões hexagonais hk0 são observadas por DRX e SAXS, e quando presentes confirmam a periodicidade da estrutura ao longo das nanofibras mesoporosas ¹³².

$$2d \cdot \text{sen } \theta = n\lambda \quad (1)$$

$$q = \frac{4\pi \text{sen } \theta}{\lambda} \quad (2)$$

$$a = 2d_{10}/\sqrt{3} \quad (3)$$

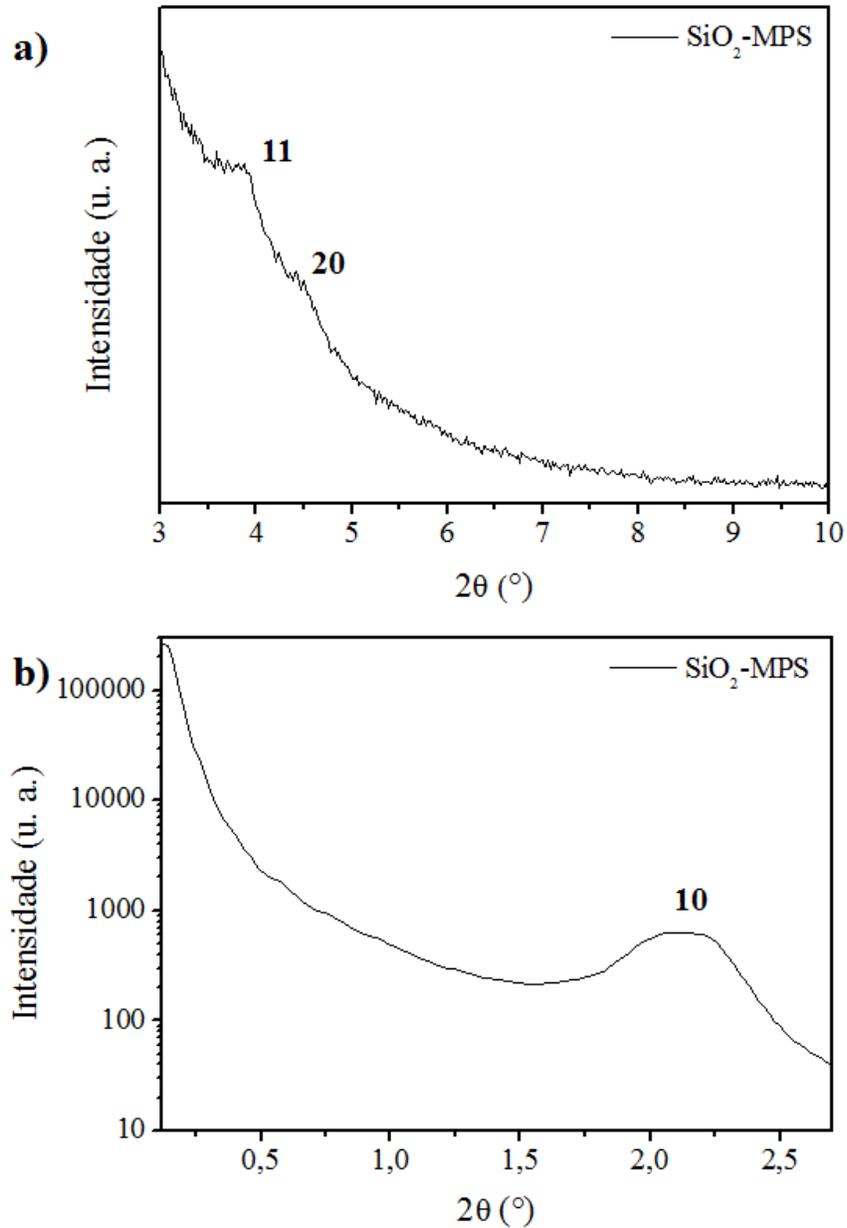


FIGURA 5.6 – Difratoograma de raios X (a) e padrão de SAXS (b) para as nanofibras mesoporosas de sílica funcionalizadas com MPS.

A fim de identificar a formação e as modificações das nanofibras de sílica com MPS, como também a remoção do surfactante CTAB, realizou-se a espectroscopia vibracional na região do infravermelho, cujos espectros são mostrados na Figura 5.7 e os modos vibracionais correspondentes são resumidos na

Tabela 5.1. Os principais estiramentos referentes à sílica são as vibrações dos grupos OH na região de 3700-3200 cm^{-1} e de Si-O na região de 830-1110 cm^{-1} ¹³³. Já os picos observados em 2850, 2925 e em 1452 cm^{-1} são referentes ao estiramento simétrico, estiramento assimétrico e deformação no plano do grupo CH_2 presente tanto no CTAB quanto no MPS ¹³³. Nota-se também que não é mais possível identificar seus respectivos picos no espectro após remover o surfactante CTAB.

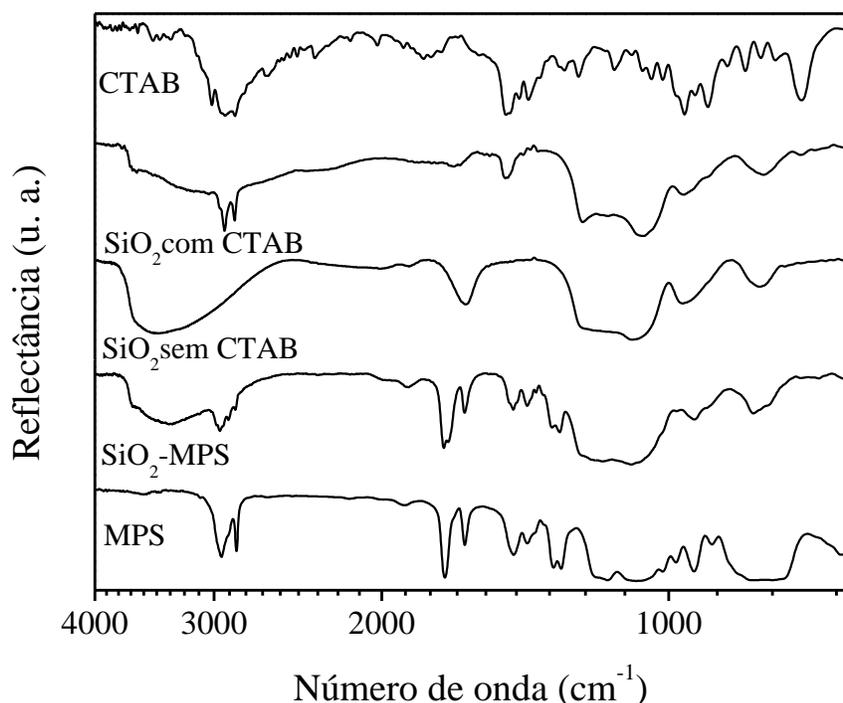


FIGURA 5.7 - Espectros de infravermelho das nanofibras mesoporosas de sílica pura (SiO_2 com CTAB), após a remoção do CTAB (SiO_2 sem CTAB), modificadas com o agente organosilano (SiO_2 -MPS), e dos precursores CTAB e MPS.

A funcionalização da sílica com grupamentos MPS é evidenciada no espectro de FTIR da SiO_2 -MPS pela presença do pico em 1713 cm^{-1} do estiramento C=O e pelos picos presentes entre 1190-1140 cm^{-1} correspondentes ao estiramento C-C(=O)-O dos ésteres, que se sobrepõem com a intensa absorção em 1106 cm^{-1} do estiramento assimétrico Si-O-Si ^{105,133,134}. A modificação superficial da SiO_2 com o

agente silano é comprovada pela presença de um pico em 2954 cm^{-1} do estiramento assimétrico de CH_2 e na região entre $1460\text{-}1320\text{ cm}^{-1}$ decorrente das deformações no plano e fora do plano do grupo CH_2 ^{102,104,105,133,135,136}. BAUER *et al.* ¹³⁶ também mostraram que o desaparecimento do pico em 2843 cm^{-1} no espectro da $\text{SiO}_2\text{-MPS}$ indica a remoção dos grupos metóxi durante a entrada do silano na superfície da nanopartícula. Além disso, eles verificaram que a ausência do pico de silanol em 3670 cm^{-1} ocorre segundo a formação de ligações covalentes resultantes da reação de condensação entre os silanóis na superfície da sílica e o centro de silício do MPS. Dessa forma, nota-se a eficaz modificação da SiO_2 pelo agente silano.

TABELA 5.1 – Atribuição dos números de onda das principais bandas encontradas para os espectros de infravermelho das nanofibras mesoporosas de sílica antes e após remoção do CTAB e modificadas com MPS.

Número de onda (cm^{-1})	Modos vibracionais
3670	estiramento OH (silanol)
1106	estiramento assimétrico de Si-O-Si
966	estiramento Si-OH
809	deformação no plano de OH
457	deformação no plano de Si-O
2925-2954	estiramento assimétrico de CH_2
2850	estiramento simétrico de CH_2
1713	estiramento C=O
1452-1320	deformações de CH_2 no plano e fora do plano
1190-1140	estiramento C-C(=O)-O

Outra maneira de identificar a presença de grupos silanos na superfície de nanopartículas de sílica é por meio da espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS). Na Figura 5.8 observa-se os espectros *survey* das nanofibras mesoporosas de SiO₂ pura e funcionalizadas com MPS, com os componentes de carbono, oxigênio e silício destacados acima de suas energias de ligação, 284,34 eV (C 1s), 532,34 eV (O 1s), 102,84 eV (Si 2p) e 153,84 eV (Si 2s). A quantificação dos componentes encontrados pelos espectros *survey* é mostrada na Tabela 5.2. Para o espectro de SiO₂ pura, é possível identificar os sinais referentes a sílica, O 1s, Si 2s e Si 2p, este último presente em amostra de silício ligado a átomos de oxigênio ¹³⁷. Além disso, identifica-se um pequeno sinal de carbono. Geralmente, qualquer amostra exposta a atmosfera apresentará uma detectável quantidade de carbono, e a presença de carbono nas amostras é utilizada como referência na correção de carga para o tratamento das análises. As principais contaminações com carbono envolvem espécies C-C, C-O-C e C=O, espécies que também estão presentes nas nanopartículas modificadas com organosilanos. Além disso, a presença de carbono no espectro da SiO₂ pura pode também estar correlacionado com resíduos dos precursores de síntese ¹³⁸. Já no espectro de SiO₂-MPS, o sinal de C 1s é mais intenso e acompanhado pela redução dos sinais de O 1s, Si 2s e Si 2p, relacionados ao acréscimo de grupos silanos ligados superficialmente às nanopartículas, que podem mascarar a superfície da sílica, principalmente ao considerar que a profundidade de análise do XPS é tipicamente menor que 10 nm por ser uma técnica de superfície.

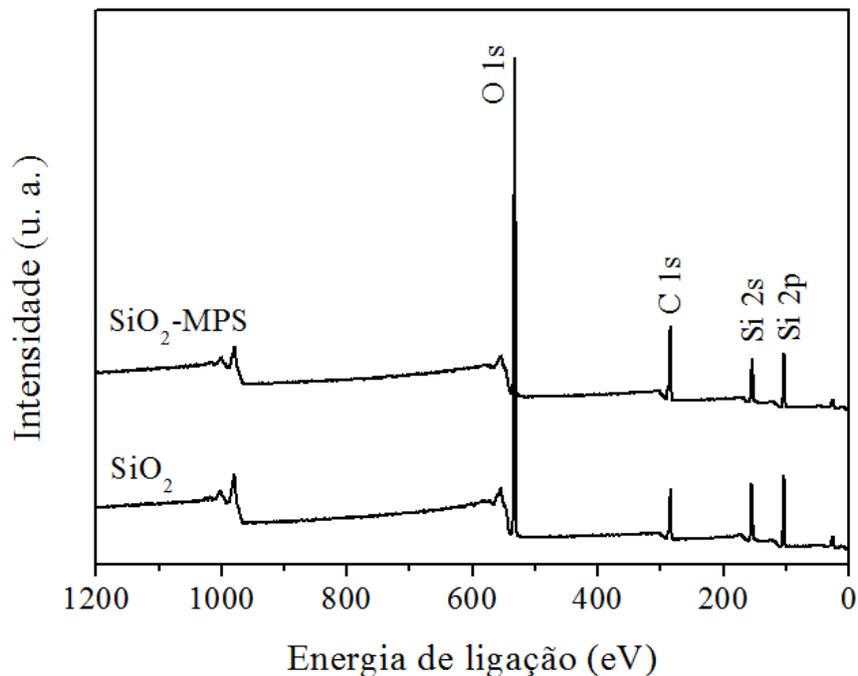


FIGURA 5.8 - Espectros *survey* de XPS das nanofibras mesoporosas de SiO₂ e SiO₂-MPS (b).

TABELA 5.2- Quantificação dos espectros *survey* para as nanofibras mesoporosas de SiO₂ e SiO₂-MPS.

Amostra	Contribuição (%)				Razão
	O 1s	C 1s	Si 2s	Si 2p	C 1s/Si 2p
SiO ₂	39,7	15,0	22,3	23,0	0,6
SiO ₂ - MPS	33,3	25,4	21,5	19,9	1,3

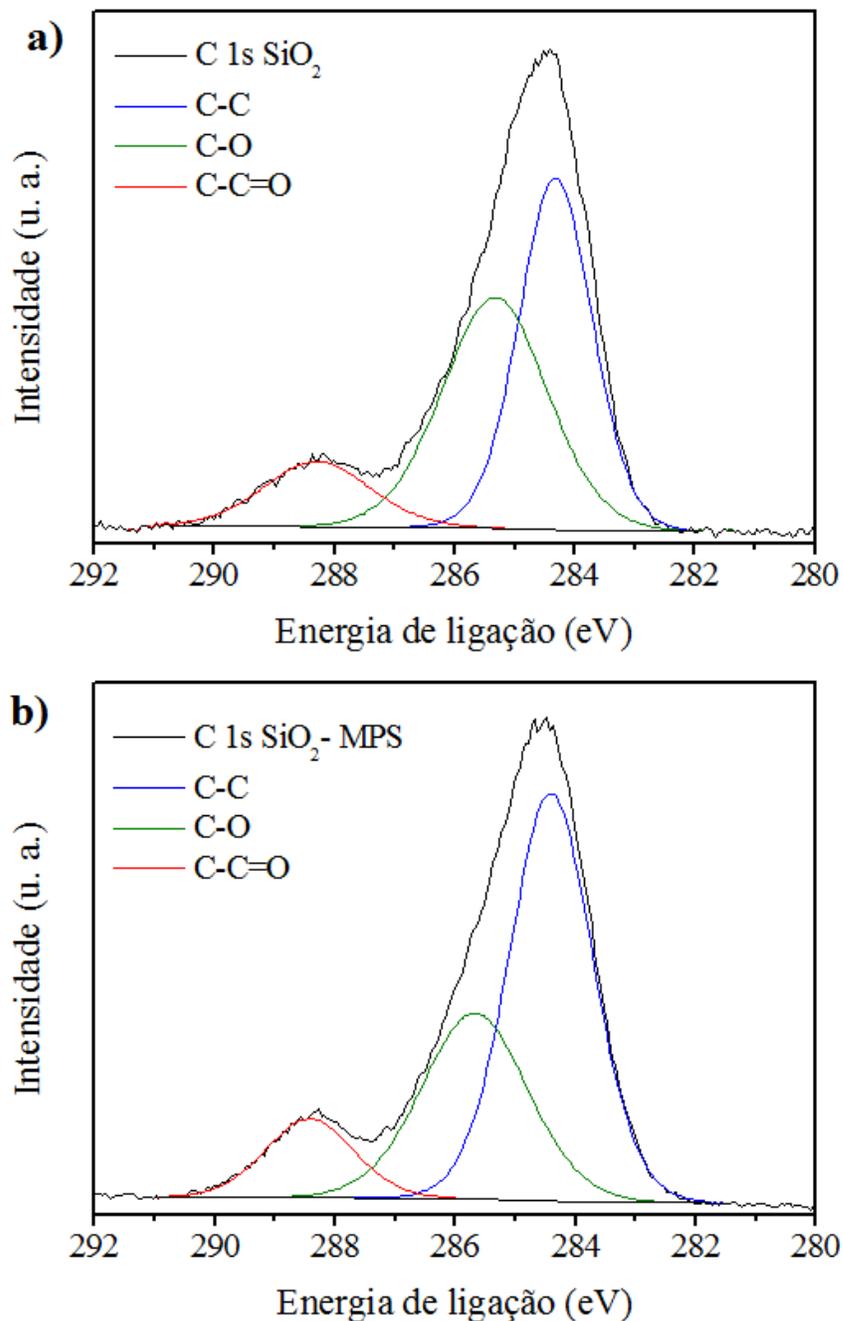


FIGURA 5.9 – Espectros de XPS de C 1s de alta resolução para as nanofibras mesoporosas de SiO₂ (a) e SiO₂-MPS (b).

Comparando a composição relativa das espécies C 1s e Si 2p dos materiais, ocorreu um aumento na razão de 2 para SiO₂-MPS em relação a sílica pura, indicação de uma eficiente modificação superficial das nanofibras com esse

organosilano. Espectros de alta resolução para C 1s presentes na Figura 5.9 indicaram três espécies: C-C, C-O e O-C=O para as amostras de sílica, cuja quantificação dos componentes são mostradas na Tabela 5.3. Outros autores ^{137,138} também identificaram esses grupos para amostras de SiO₂ e relacionaram a presença de contaminantes de carbono e residuais da síntese. Como esperado, uma maior contribuição da espécie C-C foi encontrada para as nanofibras modificadas com MPS, como também demonstrado pelos espectros *survey*. Porém para as outras espécies o valor foi menor quando comparado a sílica pura, dificultando a comparação com a contaminação que resultou nesses sinais.

TABELA 5.3- Quantificação dos componentes C 1s dos espectros de XPS de alta resolução para SiO₂ e SiO₂-MPS.

C 1s	Contribuição (%) / Posição (eV)	
	SiO ₂	SiO ₂ -MPS
Espécies		
C-C	45,3 / 284,3	56,2 / 284,4
C-O/C-N	42,5 / 285,3	32,4 / 285,7
C-C=O	12,1 / 288,3	11,4 / 288,4

As nanofibras mesoporosas de sílica com e sem modificação com MPS também foram caracterizadas pela análise termogravimétrica. Como pode ser observado na Fig. 5.10a, as curvas foram normalizadas para excluir a massa residual proveniente da evaporação da água até 100 °C ¹³⁹. A massa residual de água encontrada para SiO₂ foi de 21,1% e para SiO₂-MPS foi de 2,4% até 100 °C. Essas diferenças são referentes ao caráter mais hidrofílico para SiO₂ e hidrofóbico para SiO₂-MPS reduzindo a quantidade de água adsorvida. Entre 100 e 200 °C, moléculas de água ainda adsorvidas podem ser eliminadas ¹⁴⁰, porém a perda de massa nessa região foi de apenas 1% para ambas nanofibras. Entre 200 e 600 °C ocorre a

degradação térmica referente aos compostos orgânicos presentes nas nanofibras, melhor representada pela primeira derivada (DTG) da curva na Fig. 5.10b. Para a nanofibra mesopora de sílica pura identifica-se dois estágios concomitantes na região entre 150 a 290 °C, resultantes da evaporação de água residual e do surfactante CTAB, cuja temperatura de ebulição é entre 248-251 °C, indicando que mesmo após o procedimento de remoção do surfactante, ainda existe uma pequena porcentagem deste (1,6 %). Entre 200 e 450 °C, as nanofibras de SiO₂ apresentam uma pequena perda linear relacionada principalmente à condensação de hidroxilas vicinais na superfície da sílica (1,4%), e acima de 450 °C, a sílica perde o restante dos grupos silanóis livres (0,7%) ¹⁴⁰.

Já para SiO₂ modificada com MPS, nota-se principalmente uma intensa perda de massa na região entre 237 e 440 °C (9,6%) e outra menos intensa entre 440 e 630 °C (4,5%), melhores observadas pela primeira derivada da sua curva na Fig. 5.10b. Elas estão relacionadas à degradação e evaporação dos grupos orgânicos do MPS e é um indício que estes estavam ligados covalentemente à superfície da sílica, uma vez que sua temperatura de ebulição é por volta de 190 °C ¹⁴¹ e, nesta temperatura, não se observa nenhuma perda de massa. Apesar da pronunciada perda de massa determinada pela curva de TG, a degradação dos grupos organosilanos ligados à sílica não ocorre em uma temperatura única e específica, pois a camada orgânica se decompõe lentamente na superfície da sílica até aproximadamente 600 °C, como também é seguida da carbonização das espécies orgânicas presentes em temperaturas mais altas ^{142,143}. Sendo assim, a porcentagem de MPS presente nas nanofibras mesoporosas de sílica foi de 14,7% considerando a região de perda mássica acima de 237 °C.

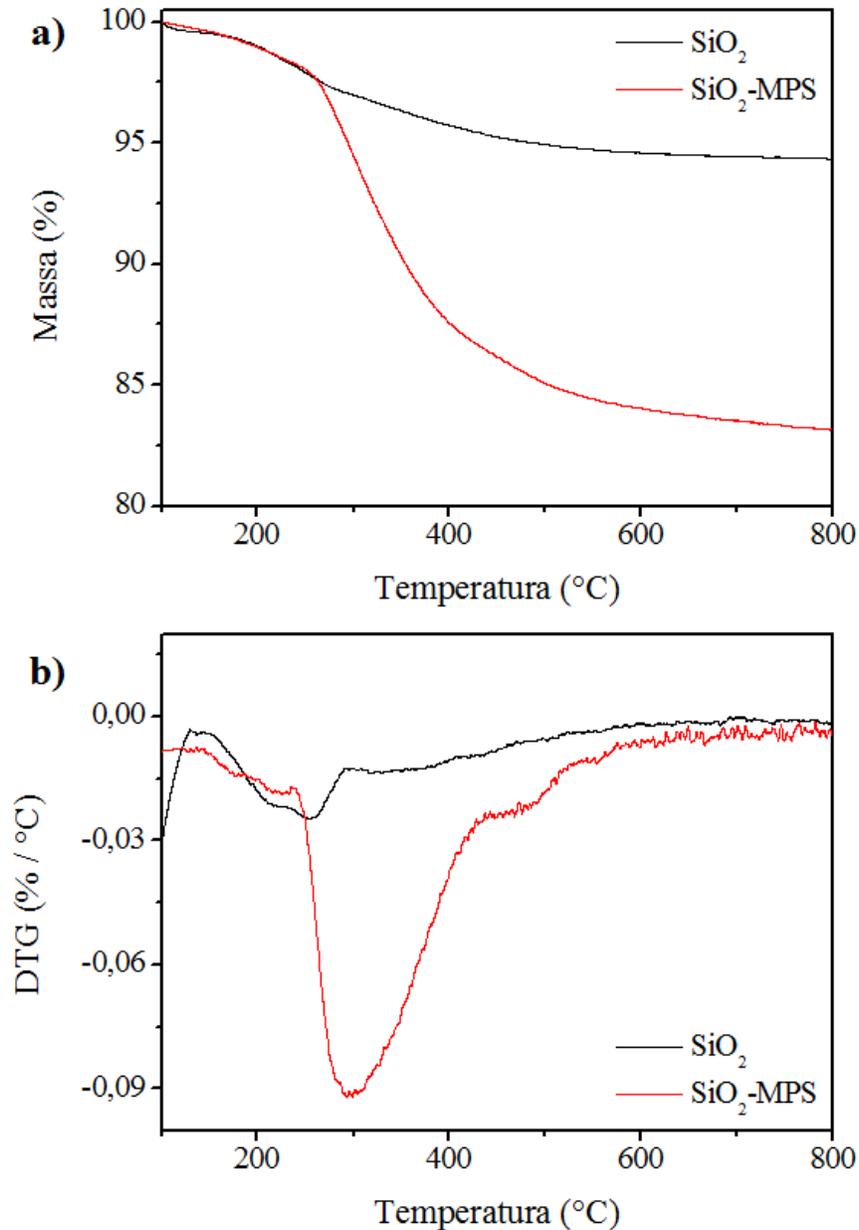


FIGURA 5.10 – Curvas de perda de massa (a) e sua primeira derivada (b) das nanofibras mesoporosas de SiO₂ (a) e SiO₂-MPS (b).

Distintas modificações superficiais presentes nas nanofibras de SiO₂ não apenas apresentam específicas reatividades, como também diferentes atividades adsorptivas. Conjuntamente com as propriedades estruturais e morfológicas das nanofibras, a área superficial, a dimensão, o formato e a distribuição dos seus poros determinarão a aplicação de sistemas mesoporosos de sílica. Geralmente, as

nanofibras mesoporosas de SiO₂ são preparadas por agentes direcionadores de estrutura como surfactantes com comprimentos de cadeia entre C12 a C20 (CTAB - C₁₉H₄₂BrN), que resultam em diâmetros de poro entre 2 e 5 nm ¹²⁶.

Dessa forma, a determinação da área específica da superfície, do volume e dimensão de poro foi realizada por meio das isotermas de adsorção de nitrogênio para substratos sólidos, como a isoterma de Brunauer, Emmett e Teller (BET) e a distribuição dos mesoporos foi calculada pelo método Barret, Joyner e Hallenda (BJH). Na Figura 5.11 observa-se as isotermas de adsorção para as nanofibras de SiO₂ e também a distribuição de poros correspondentes. De acordo com a classificação da IUPAC, as isotermas são do tipo IV e apresentam uma histerese do tipo H1, comumente observadas em materiais absorventes mesoporosos que apresentam uma distribuição de poros abertos cilíndricos e uniformes. Esta isoterma geralmente exibe uma proeminente região na qual a pressão relativa varia pouco e o volume adsorvido aumenta subitamente. Conjuntamente ocorre um *loop* da histerese associado ao processo secundário de condensação capilar e que resulta no preenchimento completo dos mesoporos em pressão relativa menor que 1 ^{98,144,145}.

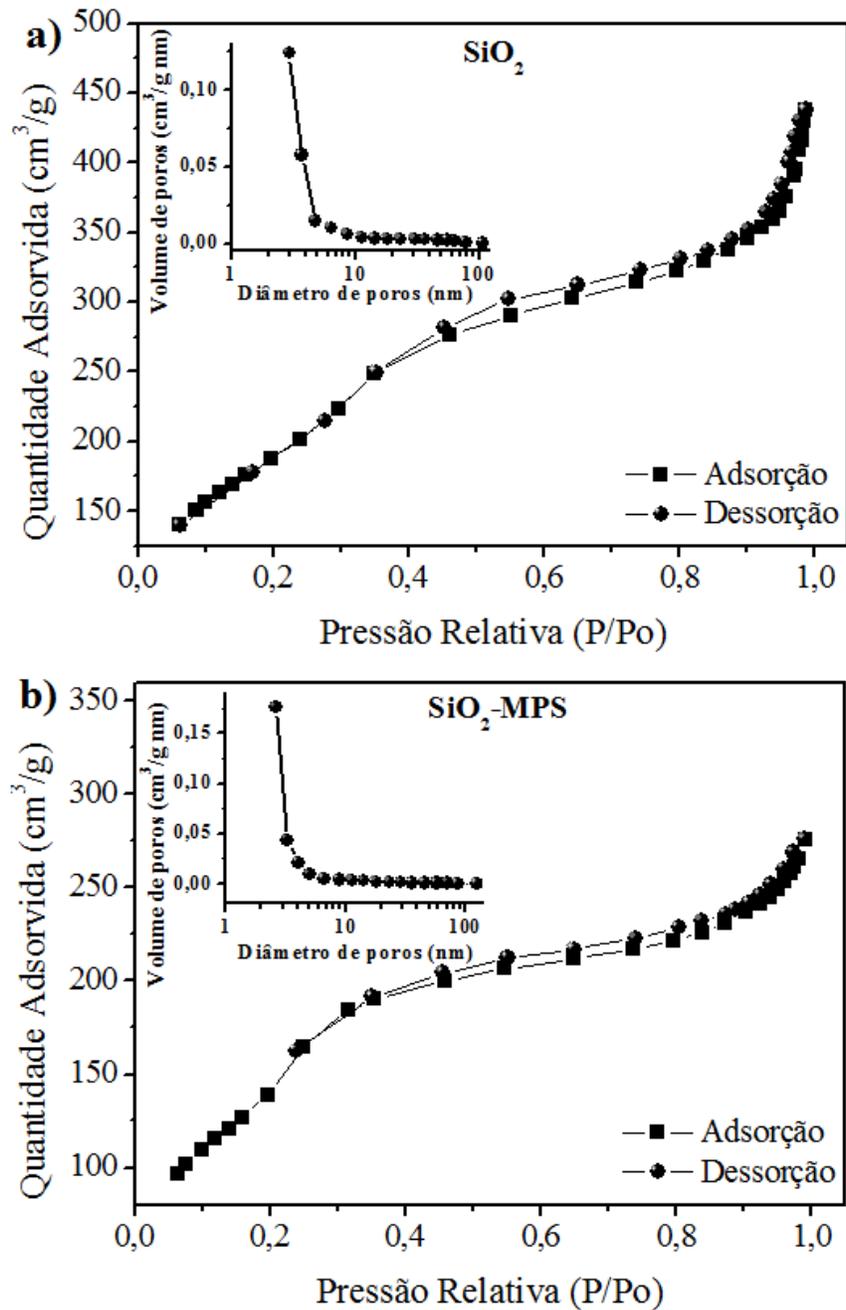


FIGURA 5.11 - Isothermas de adsorção/dessorção de nitrogênio para as nanofibras mesoporosas de SiO₂ (a) e SiO₂-MPS (b).

A área específica obtida por BET, o volume e o diâmetro de poros calculados pelo método BJH a partir das curvas de dessorção são encontrados na Tabela 5.4. Os materiais apresentaram alta área específica (acima de 530 m²/g) e

tamanho de mesoporos entre 2 e 6 nm. Materiais formados a partir de *templates* a base de CTAB geralmente resultam em alta área específica atribuída a combinação das áreas dos canais porosos e das superfícies externas e internas ^{98,144}. Apesar da SiO₂-MPS representar as nanofibras de SiO₂ posteriormente modificadas com grupos silanos, seus valores foram diferentes, indicando que a presença de grupos MPS ancorados na superfície interna dos nanocanais das nanofibras de sílica reduziram a área específica e o diâmetro de poros. Pelos valores encontrados na Tabela 5.4, a presença de 15 % em massa de MPS (valor encontrado na análise de TG) recobriu aproximadamente 23 % da área de específica das nanofibras mesoporosas de sílica. Quando a etapa de funcionalização das nanofibras de sílica é realizada posteriormente à síntese das nanofibras, a mesoestrutura da fase inicial da sílica é mantida, porém pode ser acompanhada pela redução da porosidade devido ao preenchimento parcial com as organofunções e do seu respectivo tamanho de cadeia e grau de ocupação ^{126,132}.

TABELA 5.4 - Área específica obtida por BET, volume e diâmetro de poros calculados para as nanofibras mesoporosas de SiO₂ e SiO₂-MPS.

Material	Área específica (m²/g)	Volume de poro (cm³/g)	Largura de poro (nm)
SiO₂	692,0	0,4	6,4
SiO₂-MPS	531,6	0,3	4,3

5.2-Polímeros

5.2.1- Poli(N-vinilcaprolactama) – PNVCL

O monômero N-vinilcaprolactama apresenta caráter anfifílico pela presença do grupo amida no anel (caprolactama) ligado a um grupo vinílico hidrofóbico. A partir desse grupo, é possível realizar a polimerização radicalar na presença do iniciador AIBN, que com a temperatura se decompõe gerando radicais livres, propagando-se nas moléculas dos monômeros ¹⁴⁶. O PNVCL resultante é solúvel em água, porém quando a solução é aquecida até sua temperatura crítica inferior de solubilidade (LCST), ocorre uma separação de fase das cadeias poliméricas no estado solvatado para o estado de glóbulos. A LCST reportada para PNVCL é abaixo da temperatura fisiológica, e juntamente com a sua biocompatibilidade, esse polímero termossensível tem demonstrado potencial aplicação como biomateriais injetáveis ^{45,66}.

O estudo proposto iniciou-se pela síntese do PNVCL em dimetilsulfóxido (DMSO) variando-se o teor de monômeros no meio reacional. Utilizaram-se duas concentrações em massa de 15 % e 30 % de monômero N-vinilcaprolactama (NVCL) no solvente, durante um tempo de reação de 4 h, tempo escolhido baseado no trabalho de MEDEIROS *et al.* ^{36,71}. Quando variou-se o teor de sólidos, a viscosidade da solução polimérica foi alterada, tornando-se mais viscosa com o teor de 30 %, o que poderia influenciar na difusão dos radicais formados e assim na cinética de polimerização e formação do PNVCL. Utilizando a técnica de RMN em solução do núcleo ¹H foi possível identificar se ambas as amostras resultaram na completa formação da PNVCL ou se ainda continham resíduos monoméricos. Na Figura 5.12 estão presentes os espectros de RMN do monômero

de NVCL em água, da PNVCL preparado com um teor de sólidos de 15 % e disperso em água e do PNVCL preparado com um teor de sólidos de 30 % e disperso em DMSO. Pela elucidação dos espectros, observa-se que PNVCL-30 % apresentou ainda sinais do monômero, indicando que a polimerização não completou-se provavelmente devido à alta viscosidade que o sistema adquiriu, o que pode ter dificultado a difusão dos radicais e posterior polimerização, restando resíduos de monômeros³⁶. Por sua vez, o PNVCL-15 % não apresentou deslocamentos químicos no espectro de RMN referente a presença de monômero, indicando que após as 4 h de síntese já ocorreu a conversão dos monômeros em PNVCL. Assim, o teor de sólidos de 15 % foi escolhido para as sínteses posteriores.

A massa molar do PNVCL sintetizado no teor de sólidos de 15% foi avaliado por GPC. Os valores encontrados para a massa molar numérica média (M_n) foi de 12972 g mol⁻¹, para a massa molar ponderal média (M_w) foi de 67237 g mol⁻¹ e a polidispersividade (M_w/M_n) foi de 5,18. Pelos valores encontrados, o PNVCL foi obtido com uma larga distribuição de massa molar, característica encontrada quando PNVCL é sintetizado pela polimerização radicalar, que ocorre segundo a uma alta taxa de propagação^{48,71,147}, ao decréscimo na taxa de terminação ao longo da polimerização¹⁴⁷ e possíveis reações de transferência de cadeia. Neste processo, o radical da cadeia polimérica em crescimento é transferido para outra espécie que termina a cadeia, mas ao mesmo tempo gera um novo radical. A transferência de cadeia pode ocorrer entre o polímero, o monômero, o iniciador e o solvente do meio reacional⁵⁹.

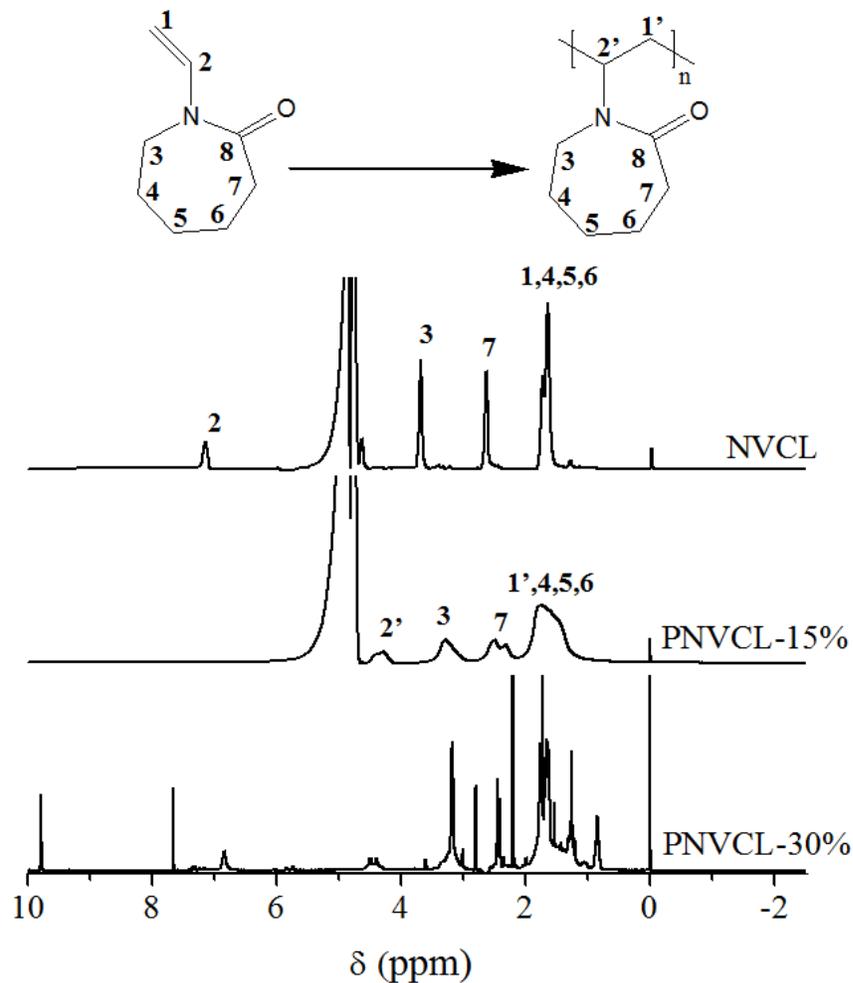


FIGURA 5.12 - Espectros de ¹H RMN do monômero NVCL, de PNVCL-15 % e de PNVCL-30 %.

Quando PNVCL é disperso em uma solução aquosa resulta em uma suspensão coloidal transparente de cadeias poliméricas solvatadas (sol) pelas moléculas de água ^{148,149}, demonstrada na Figura 5.13. Quando a suspensão é aquecida acima da LCST, as cadeias poliméricas se aglomeram por interações intermoleculares como interações dipolo-dipolo entre grupos polares de amida, forças de van der Waals entre as cadeias poliméricas principais e ligações de hidrogênio de grupamentos C=O ¹⁵⁰ e moléculas de água no interior das associações poliméricas, formando um estado aglomerado, opaco e viscoso (gel). Umas das

maneiras de avaliar essa transição sol-gel de suspensões coloidais de polímeros termossensíveis é pela espectrofotometria de UV-vis a partir da transmitância da solução polimérica em função da temperatura. Uma vez que a solução polimérica encontra-se inicialmente transparente à temperatura ambiente, ao longo do seu aquecimento há o turvamento devido a separação de fase e formação de aglomerados poliméricos visíveis, que contribuirão para a redução da transmitância da suspensão.

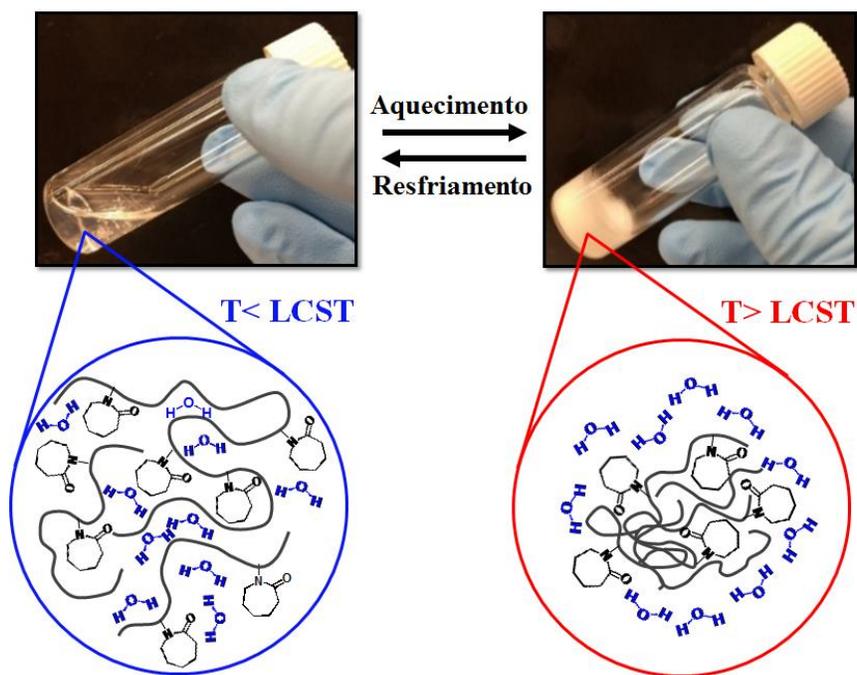


FIGURA 5.13 - Representação da dispersão polimérica aquosa do PNVCCL em temperatura ambiente (transparente e solúvel) e quando aquecida acima da LCST, adquirindo uma coloração opaca devido a separação de fase e formação de agregados poliméricos.

Na Figura 5.14, a transmitância foi avaliada em função da temperatura da dispersão polimérica de PNVCCL em água na concentração de 1% massa/volume para a determinação da LCST. A faixa de temperatura avaliada foi entre 25 e 35 °C, coletando a transmitância da suspensão a cada 0,5 °C e após 3 min de estabilização

em cada temperatura. Pelos espectros obtidos, até 33 °C o polímero encontra-se solubilizado em água e por isso apresenta alta transmitância. Já acima dessa temperatura a amostra começa a turvar devido a segregação das cadeias poliméricas e separação de fase. Conseqüentemente, sua transmitância decai, alcançando o valor de zero em 34 °C, o que resulta em uma LCST de 34 °C *i.e.*, uma temperatura viável para aplicações *in vivo*.

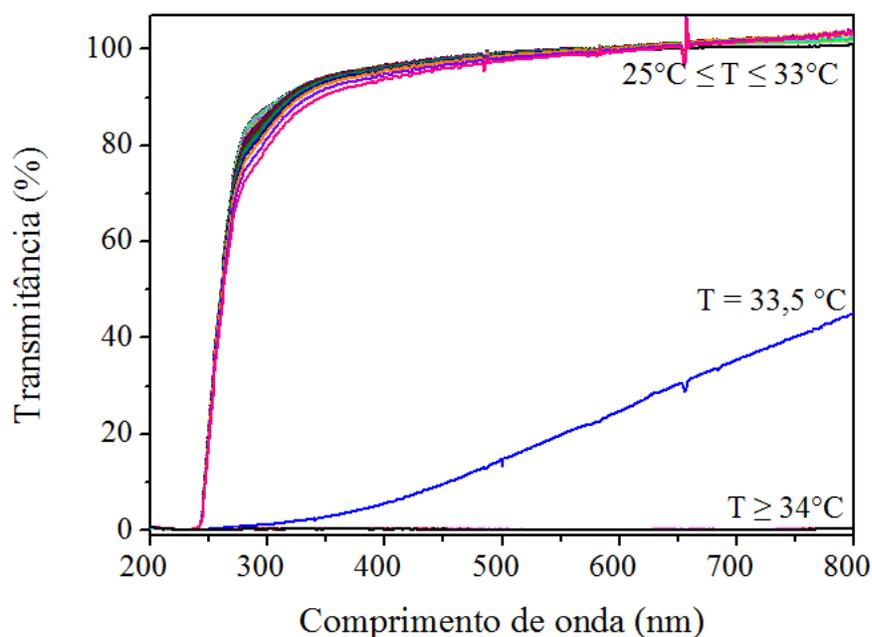


FIGURA 5.14 - Espectros de transmitância de UV-vis da dispersão polimérica aquosa contendo 1 % m/v de PNVCL.

Para visualizar esse colapso do balanço hidrofílico/hidrofóbico do PNVCL e sua reversibilidade, foram realizados 6 ciclos de aquecimento (Figura 5.15) para avaliar a intensidade da transmitância ao longo da temperatura, fixando um comprimento de onda, no caso de 500 nm por ser um valor intermediário. Por se tratar de um fenômeno termodinâmico de transição de fase, pode-se notar na Figura 5.15 que a temperatura de colapso na LCST foi reproduzível para os seis ciclos de

aquecimento, demonstrando a reversibilidade do sistema. Os valores encontrados de LCST na literatura ⁴⁸ para PNVCL são deslocados para maiores ou menores temperaturas ao variar a composição química das suspensões poliméricas pela adição de sais, solventes e surfactantes, ou ainda pela modificação da cadeia polimérica pela adição de comonômeros ou variando a massa molecular ^{40,67,68,70,71}.

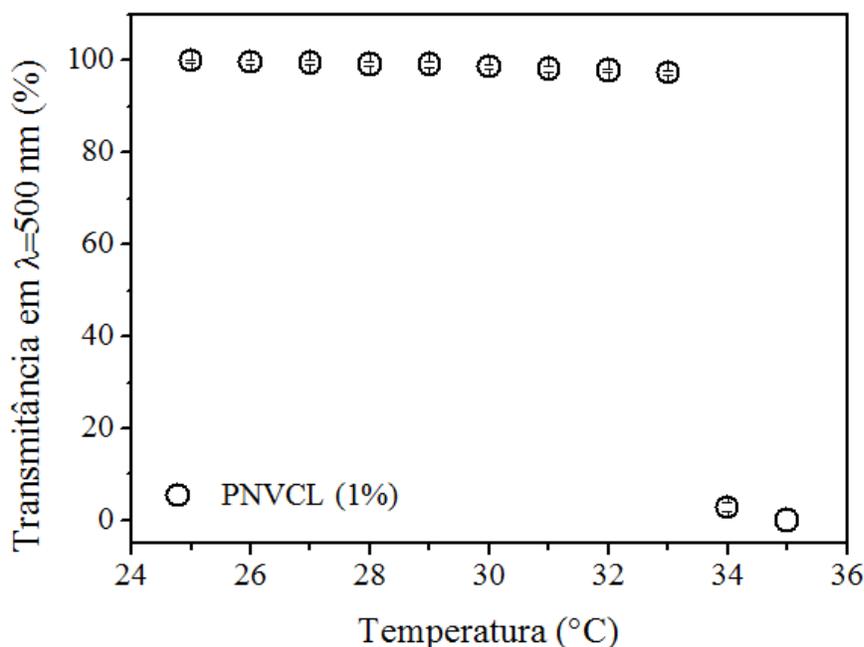


FIGURA 5.15 - Intensidade da transmitância medida no comprimento de onda de 500 nm em função da temperatura da dispersão polimérica aquosa contendo 1 % m/v de PNVCL. Barra de erros representa o desvio padrão da análise realizada em sextuplicata.

MEDEIROS *et al.* ⁷¹ observaram que a LCST aumentou com a diminuição da massa molar do PNVCL uma vez que cadeias poliméricas menores são mais solúveis e assim mais difíceis de aglomerar do que PNVCL com alta massa molar. Esse comportamento ocorre, pois mais energia deve ser dada ao sistema de cadeias menores para que as interações entre o PNVCL e a água se rompam e a

interação polímero-polímero prevaleça e leve à separação de fase. Já VARGAS *et al.* ⁴¹ investigaram como a adição de diferentes comonômeros influenciaram na temperatura de ponto nuvem (T_{CP}), temperatura no ponto de inflexão da curva de transmitância ou temperatura a uma transmitância definida (por exemplo, 50 %), porém os autores não definiram em qual das condições a T_{CP} foi medida. Nesse estudo, copolímeros de PNVCL com diferentes T_{CP} foram obtidos mantendo-se constante a massa molar e a concentração da solução polimérica analisada. Quando 14 mol % de N-vinilpirrolidona (NVP) foi copolimerizada com PNVCL, a T_{CP} aumentou para 38 °C, em contraste com a T_{CP} de 32 °C para o PNVCL puro, devido ao caráter mais hidrofílico da NVP. Já quando o monômero hidrofóbico acetato de n-hexilo foi adicionado como comonômero, a T_{CP} diminuiu para 27 °C. Quando uma espécie ácida foi adicionada na concentração de 4,6 %, como o ácido 2-(metacriloiloxi)benzoico em um pH de 7,4, a T_{CP} resultante foi de 42 °C, devido às unidades ionizadas do ácido que levam a um maior número de ligações de hidrogênio e aumentam o caráter hidrofílico do polímero. Assim nota-se que a LCST do PNVCL pode ser ajustado pela adição de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, mesmo em pequenas concentrações.

4.2.1- Poli(acetato de vinila) (PVAc)

Até o momento alguns trabalhos propuseram a síntese controlada de PNVCL com o comonômero acetato de vinila (VAc) ^{61,63,151,152}, uma vez que eles podem ser combinados a partir da polimerização radicalar. Esses copolímeros foram obtidos na forma aleatória ou em blocos, resultando em estruturas com morfologia e massa molecular controladas. No entanto, esses estudos visavam compreender a rota sintética de obtenção dos copolímeros para controlar seu arranjo macromolecular e o efeito desses comonômeros nos valores de LCST. Por outro lado, a presença de

PVAc no copolímero pode acrescentar ou favorecer outras propriedades que não foram investigadas, como a biocompatibilidade e o aumento de propriedades reológicas ^{61,79,81}. Dessa forma, três copolímeros de PNVCL e PVAc foram sintetizados variando-se a concentração mássica do monômero acetato de vinila (10, 20 e 40 %) adicionado ao meio reacional juntamente com o monômero NVCL para a polimerização radicalar, formando um copolímero aleatório como demonstrado na Figura 5.16.

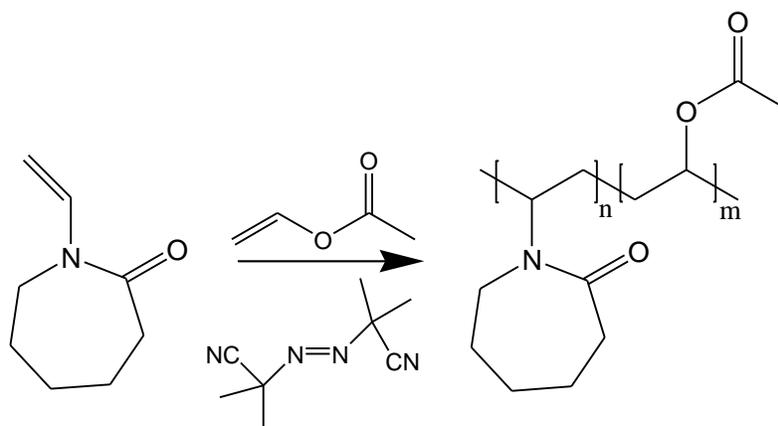


FIGURA 5.16 - Reação de copolimerização entre NVCL e VAc na presença do iniciador radicalar AIBN.

Na Figura 5.17 observa-se os espectros de infravermelho normalizados do PNVCL e seus copolímeros com PVAc e os modos vibracionais correspondentes estão resumidos na Tabela 5.5.

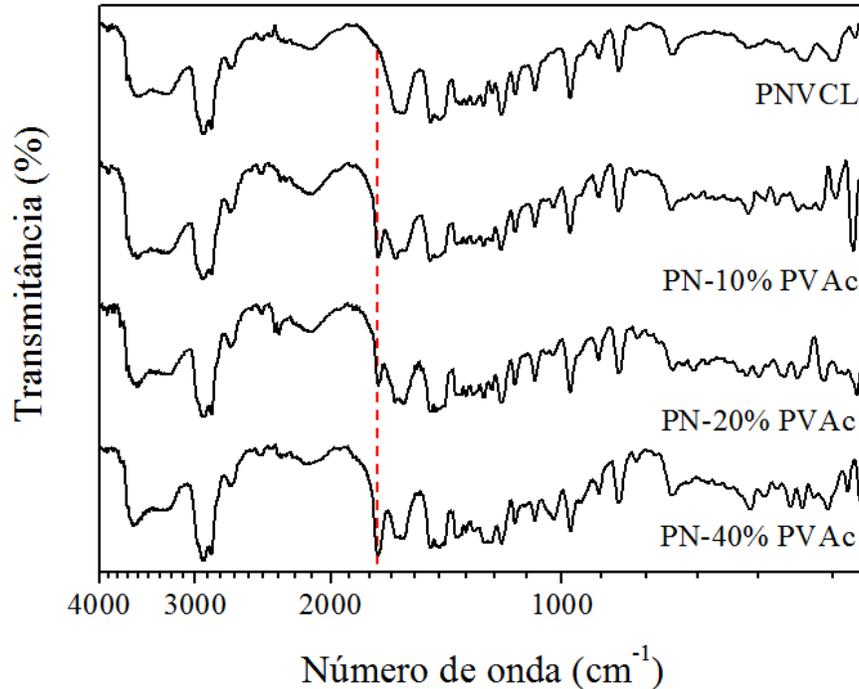


FIGURA 5.17 - Espectros de infravermelho para PNVCL e copolímeros de PNVCL-PVAc.

Os principais estiramentos químicos presentes para PNVCL são referentes aos grupos: C=O em 1635 cm^{-1} , C-N em 1475 cm^{-1} , estiramentos simétrico e assimétrico de $-\text{CH}_2-$ em 2861 e 2934 cm^{-1} , respectivamente, vibrações de $-\text{CH}_2-$ fora do plano em $1350-1150\text{ cm}^{-1}$ e deformação fora plano de N-H em 716 cm^{-1} ^{133,153}. Para o PVAc, identifica-se principalmente o estiramento C=O em 1734 cm^{-1} destacado no espectro, que intensifica-se com o aumento da concentração de PVAc no copolímero, principalmente para PN-40 % PVAc. É possível identificar também, porém em menor intensidade, o estiramento C-O em 1243 cm^{-1} . Espectros similares foram obtidos por outros autores ^{63,154-156}.

TABELA 5.5 - Atribuição dos números de onda das principais bandas encontradas para os espectros de infravermelho do PNVCL e dos copolímeros.

Número de onda (cm ⁻¹)	Modos vibracionais
2934	estiramento assimétrico –CH ₂ –
2861	estiramento simétrico –CH ₂ –
1734	estiramento C=O (PVAc)
1635	estiramento C=O (PNVCL)
1475	estiramento C-N (PNVCL)
1442	deformação C-H
1350-1150	deformação no plano –CH ₂ –
1243	estiramento C-O (PVAc)
718	deformação fora plano N-H (PNVCL)

Pelos espectros de ¹H RMN dos copolímeros na Figura 5.18, os materiais foram obtidos sem a presença de resíduos monoméricos. A presença de PVAc é caracterizada pelo deslocamento químico na região de 2 ppm referente ao hidrogênio do grupo metil terminal do acetato como destacado no espectro. A partir da integração dos deslocamentos químicos referentes ao PNVCL e PVAc é possível determinar a composição molar do copolímero. As regiões escolhidas para a integração foram 3,6-2,9 ppm (2H) para PNVCL e 2,2-2,0 ppm (3H) para PVAc. A fração molar (x_{vac}) de VAc presente no copolímero é calculado pela Equação 4 e os valores encontrados são mostrados na Tabela 5.6.

$$x_{VAc} = \frac{\text{integral na região de } 2,2 - 2,0 \text{ ppm}}{\text{número de prótons}} \quad (4)$$

A fração molar encontrada pode ser convertida em fração mássica de VAc (w_{VAc}) a partir da Equação 5 e os valores obtidos são mostrados na Tabela 5.6. M_{VAc} e M_{NVCL} representam a massa molar da unidade monomérica de VAc (86,09 g mol⁻¹) e NVCL (139,19 g mol⁻¹) respectivamente.

$$w_{VAc} = \frac{x_{VAc} \cdot M_{VAc}}{x_{VAc} \cdot M_{VAc} + x_{NVCL} \cdot M_{NVCL}} \quad (5)$$

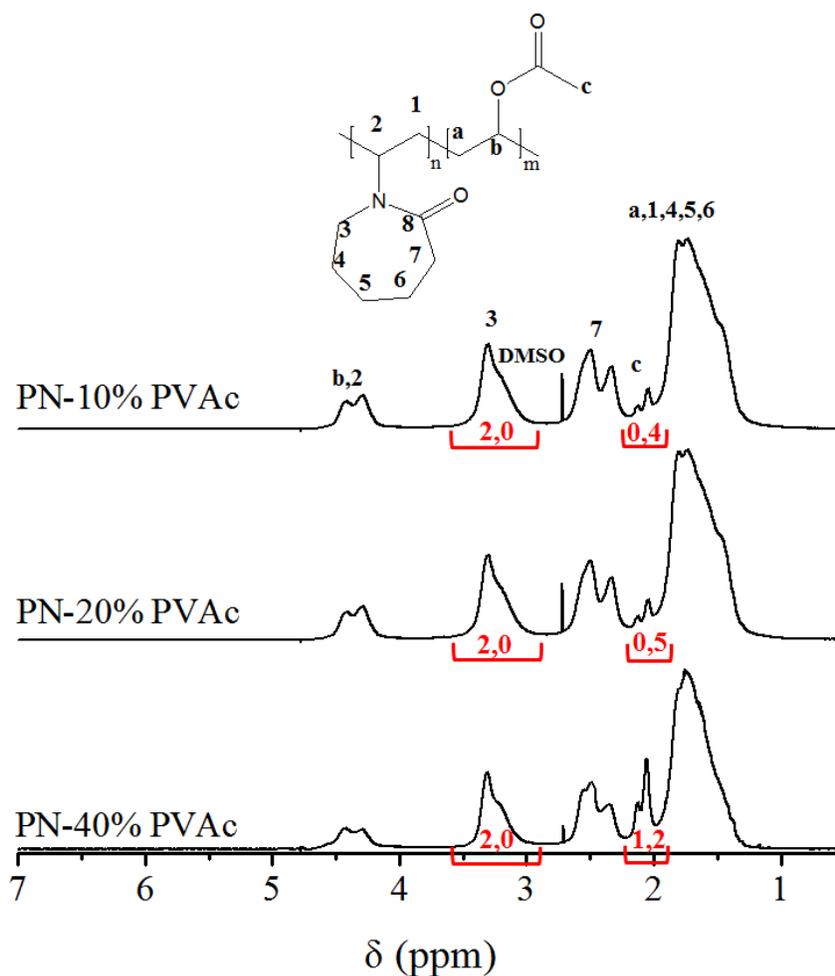


FIGURA 5.18 - Espectros de ¹H RMN dos copolímeros de PNvCl e PVAc dispersos em água deuterada.

TABELA 5.6 - Valores das frações molares (x_{VAc}) e mássicas (w_{VAc}) encontradas para os copolímeros a partir dos espectros de 1H RMN.

Material	x_{VAc}	w_{VAc}
PN-10 % PVAc	0,13	0,09
PN-20 % PVAc	0,17	0,11
PN-40 % PVAc	0,40	0,29

Pelos valores encontrados, a composição mássica de PVAc nos copolímeros foi de 9 %, 11% e 29 %, indicando uma concentração menor do comonômero no copolímero formado do que inicialmente adicionado no meio reacional. KERMARGORET *et al.* ¹⁵¹ observaram a mesma tendência de obter copolímeros de PNVCL-PVAc com reduzido teor de VAc do que inicialmente adicionado. Esse comportamento é relacionado à razão de reatividade (r) relatado para os monômeros, $r_{NVCL}=1,06$ e $r_{VAc}=0,36$ em polimerização em *bulk* ¹⁵¹. Durante a polimerização, os monômeros podem reagir conforme as quatro reações mostradas na Figura 5.19 e para cada uma delas existe uma constante de reatividade (k_{ij}) associada. Assim a razão de reatividade para cada monômero é definida como descrito na Equação 6 ¹⁵⁷. Uma vez que $r_{NVCL}>1$ a reação entre os monômeros de NVCL é mais facilitada do que entre os comonômeros de diferentes espécies, o que pode ter resultado em um copolímero com menor concentração de VAc e com uma distribuição aleatória ao longo da cadeia polimérica.

$$r_{NVCL} = \frac{k_{11}}{k_{12}} ; r_{VAc} = \frac{k_{22}}{k_{21}} \quad (6)$$

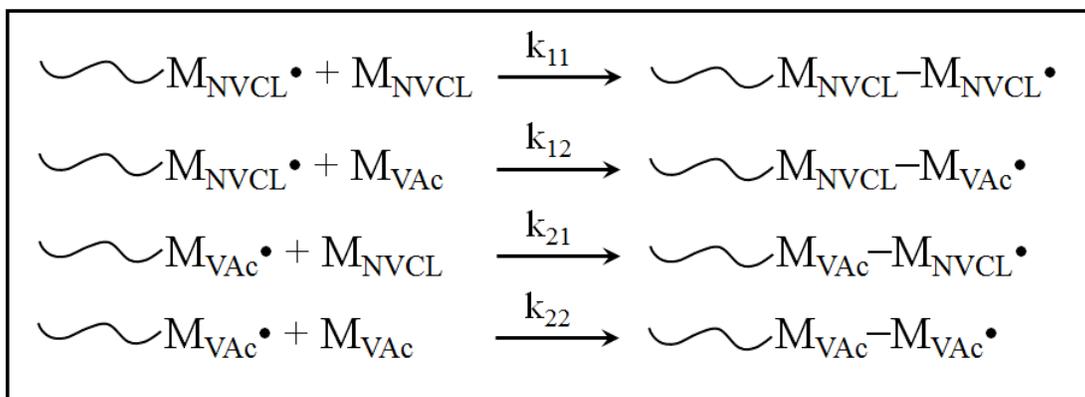


FIGURA 5.19 - Representação das possíveis reações entre os monômeros NVCL e VAc durante a polimerização radicalar.

Sistemas poliméricos formados por copolímeros ou blends poliméricas são comumente avaliados por análises de DSC para investigar como a temperatura de transição vítrea (T_g) varia com a composição dos comonômeros. Esta temperatura é o valor médio da faixa de temperatura em que a porção amorfa do polímero sofre uma transição do estado vítreo para o estado borrachoso ¹³³. Copolímeros alternados e aleatórios, cujas unidades monoméricas estarão distribuídas ao longo da cadeia polimérica apresentam uma única T_g resultante da contribuição ponderada de ambos meros poliméricos. A partir do estudo de polímeros termodinamicamente miscíveis, encontrou-se que a T_g se situa entre os valores de T_g dos homopolímeros correspondentes e diversas equações foram desenvolvidas para estimar a T_g do copolímero. Entre elas, a Equação de Flory-Fox (Equação 7) é comumente empregada para descrever a T_g de copolímeros aleatórios e determinar a composição dos comonômeros presentes. w_{VAc} e w_{NVCL} são as frações mássicas dos meros VAc e NVCL no copolímero e T_{gPVAc} e T_{gPNVCL} são as temperaturas de transição vítrea dos homopolímeros ^{146,157}.

$$\frac{1}{T_{g\text{copolímero}}} = \frac{w_{VAc}}{T_{gPVAc}} + \frac{w_{NVCL}}{T_{gPNVCL}} \quad (7)$$

Na Figura 5.20 e na Tabela 5.7 encontram-se as curvas de DSC e os valores de Tg experimentais e teóricos previstos pela Equação de Flory-Fox para PNVCL e os copolímeros com 10, 20 e 40 % de PVAc. Para o cálculo de Tg teórico empregou-se as frações mássicas encontradas pelos espectros de RMN.

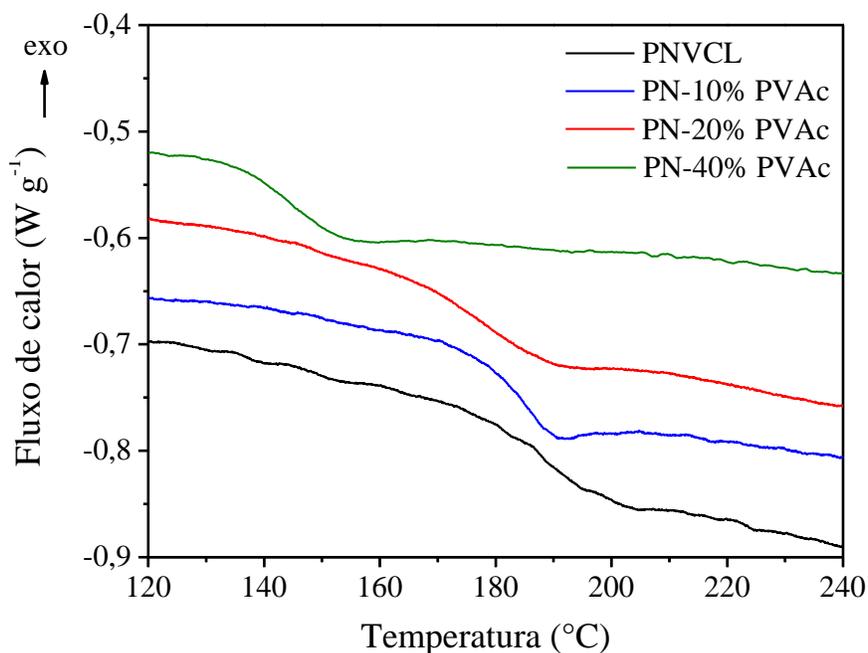


FIGURA 5.20 - Curvas de DSC do PNVCL, PNVCL-10 % PVAc, PN-20 % PVAc e PN-40 % PVAc.

TABELA 5.7 - Valores de Tg obtidos experimentalmente e pela Equação de Flory-Fox, e ΔC_p para PNVCL, PNVCL-10 % PVAc, PN-20 % PVAc e PN-40 % PVAc.

Material	Tg experimental (°C)	Tg teórico (°C)	ΔC_p (J g ⁻¹ K ⁻¹)
PNVCL	188	188	0,31
PN-10 % PVAc	185	158	0,28
PN-20 % PVAc	178	153	0,29
PN-40 % PVAc	147	117	0,21

Para avaliar a temperatura de transição vítrea (T_g) de materiais a base de PNVCL é necessário eliminar a presença de água das amostras, pois ela funciona como um plastificante das macromoléculas de PNVCL. KIRSH *et al.* ¹⁵⁰ mostraram que sua T_g pode variar de 147 a -17 °C dependendo do número de moléculas de água presente, que também aumenta sua capacidade calorífica específica (ΔC_p). Esse intenso efeito plastificante das moléculas de água ocorre pela troca de calor específico na desvitrificação das misturas de água e PNVCL. Essas variações de T_g e ΔC_p são incomuns em comparação a outros polímeros sintéticos e refletem a especificidade das interações de PNVCL e água. Essas interações são compostas por interações dipolo-dipolo entre grupos polares de amida, interações entre anéis de caprolactama na conformação de "cadeira" e ligações de hidrogênio de grupamentos C=O e moléculas de água ¹⁵⁰. Assim, a variação do número de moléculas de água nesse sistema influencia a energia e a distribuição dessas interações, como também o processo de relaxação das cadeias poliméricas.

Dessa forma, a T_g do PNVCL é identificada a partir do segundo ciclo de aquecimento na análise de DSC, onde encontra-se a T_g de 188 °C e por isso, a temperatura ambiente ele se encontra no estado vítreo. Quando modificado com PVAc, a T_g e ΔC_p dos copolímeros foram reduzidos uma vez que o homopolímero PVAc apresenta uma T_g de 41 °C ¹⁵². Apenas uma T_g é identificada nas curvas de DSC para os copolímeros, indicando a obtenção de copolímeros aleatórios cuja T_g é resultante da contribuição dos ambos meros poliméricos ¹⁴⁶. Comparando os valores de T_g obtidos experimentalmente e calculados pela equação de Flory-Fox, observa-se valores experimentais superiores. Essa variação entre os valores de T_g , melhor representada na Figura 5.21, foi consistente e com uma diferença de aproximadamente 26 °C. Apesar desse deslocamento superior para os valores de T_g dos copolímeros obtidos experimentalmente em relação aos teóricos, eles seguiram a mesma tendência conforme o aumento da fração mássica de VAc, validando a

composição de PVAc dos copolímeros previamente encontrada pelas análises de RMN. PAN-PAN *et al.* ¹⁵⁸ também observaram o deslocamento positivo dos valores experimentais comparados aos obtidos pela equação de Flory-Fox de blendas de PMMA. Os autores relacionaram esse comportamento a presença de interações por ligações de hidrogênio entre os meros das cadeias poliméricas que contribuem para o aumento da Tg proposta teoricamente. A presença de interassociações poliméricas não é o único fator que contribui para o desvio da Tg teórica obtida pela equação de Flory-Fox, mas também sistemas polidispersos, complexas estruturas poliméricas, ou sistemas que não atendam as condições pré-estabelecidas pela equação, levam a variação dos valores encontrados ^{159,160}. No presente caso, a obtenção de um sistema polidisperso de copolímeros e a ausência do homopolímero sintetizado de PVAc para determinar sua Tg específica (ao invés de utilizar a Tg encontrada na literatura) podem ter contribuído para a variação encontrada. Por outro lado, ETCHENAUSIA *et al.* ¹⁵² sintetizaram copolímeros de PNVCL com variadas composições de PVAc com massa molar similar e baixa polidispersividade. Nesses estudos, os valores de Tg calculados pela equação de Flory-Fox se ajustaram aos valores experimentais obtidos.

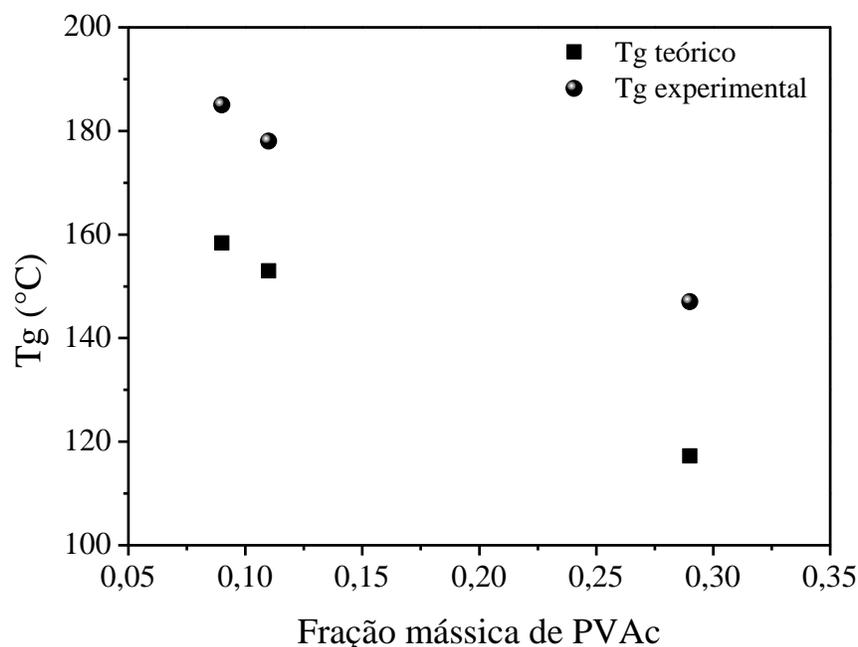


FIGURA 5.21 - Variação da Tg teórica e experimental em função da fração mássica de PVAc.

Como a LCST do PNVCL pode ser modificada pela presença de comonômeros ^{68,69,161}, suspensões poliméricas na concentração de 1% m/v dos diferentes copolímeros foram analisadas pela espectrofotometria de UV-vis e são mostradas nas Figuras 5.22, 5.23 e 5.24. Para os materiais PN-10 % PVAc, PN-20 % PVAc e PN-40 % PVAc os valores de LCST foram 31,5, 32 e 20,5 °C. A temperatura da transição de fase reduziu conforme a presença e o aumento da concentração de PVAc comparado ao PNVCL puro, pois PVAc apresenta um caráter mais hidrofóbico, reduzindo a solubilidade do copolímero em água e assim favorecendo o colapso das cadeias poliméricas quando o sistema é aquecido ⁶³. A similaridade entre os valores de LCST dos copolímeros com 10 e 20 % de PVAc, ressaltam que os dois materiais apresentaram similares concentrações de unidades monoméricas de VAc, como também demonstrado pelos espectros de RMN. Similarmente, KERMARGORET *et al.* ¹⁵¹ e ETCHENAUSIA *et al.* ¹⁵² observaram a redução da LCST com o aumento da composição de VAc, porém para obter uma LCST de aproximadamente 20 °C, a fração molar de VAc necessária foi superior à utilizada,

isto é, 0,53 e 0,45, respectivamente. Ambos estudos preparam copolímeros de PNVCL e PVAc obtidos por métodos de síntese que resultam em controlada massa molecular com baixa polidispersividade e notaram que com o aumento da concentração de VAc no copolímero, maior massa molar foi obtida. Assim, uma vez que a massa molar de polímeros termossensíveis, como também sua polidispersividade influenciam na temperatura da transição de fase, possíveis discrepâncias entre os valores de LCST entre os diferentes estudos são obtidos mesmo com similares concentrações de VAc.

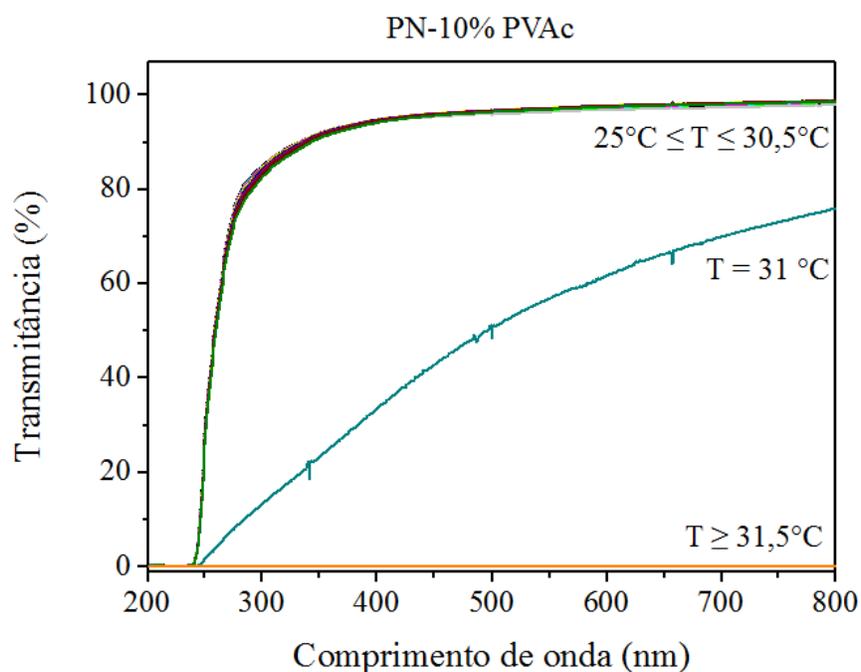


FIGURA 5.22 - Espectros de UV-vis da dispersão polimérica aquosa contendo 1% m/v do copolímero de PNVCL com 10 % de PVAc.

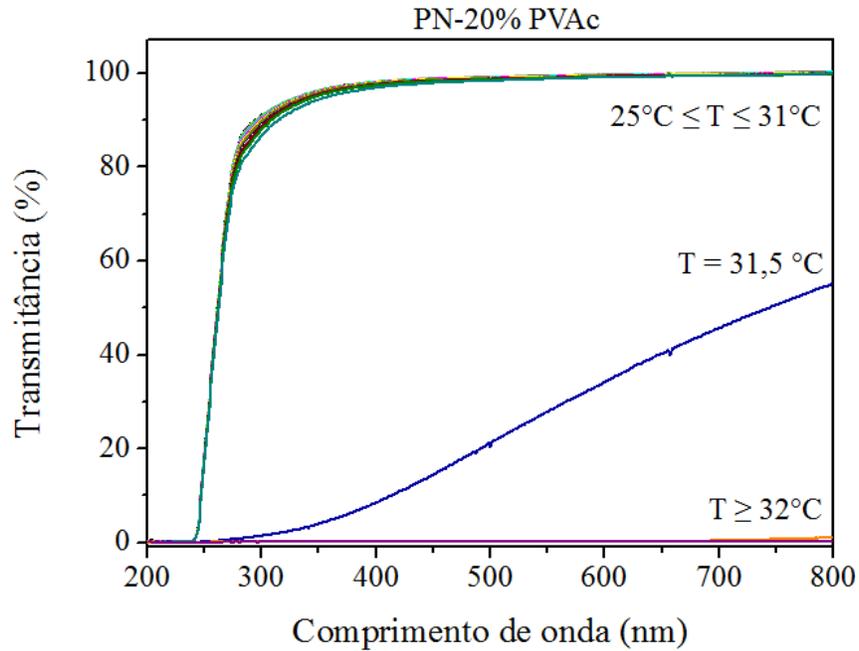


FIGURA 5.23 - Espectros de UV-vis da dispersão polimérica aquosa contendo 1% m/v do copolímero de PNVCL com 20 % de PVAc.

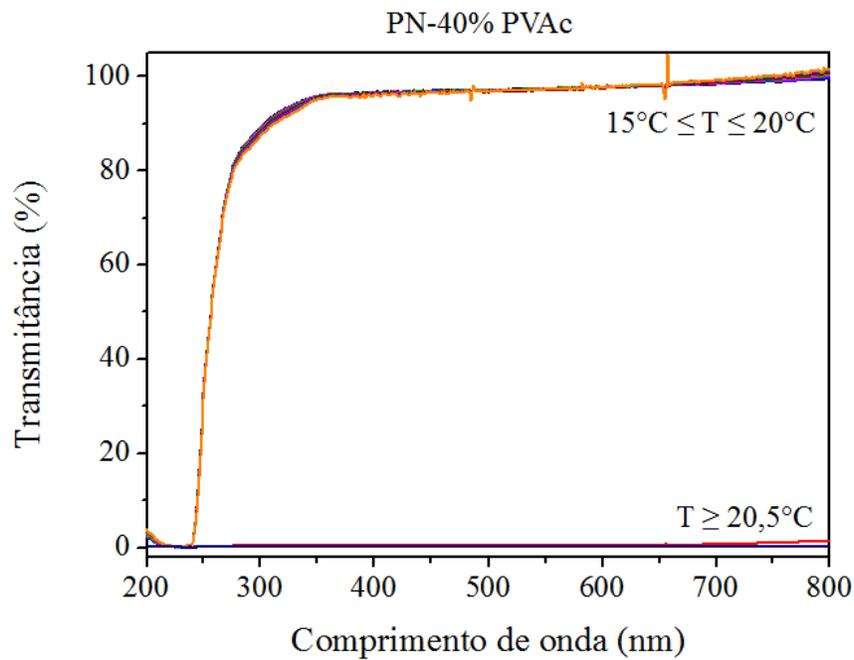


FIGURA 5.24 - Espectros de UV-vis da dispersão polimérica aquosa contendo 1% m/v do copolímero de PNVCL com 40 % de PVAc.

Os copolímeros também foram analisados pelo espalhamento de luz dinâmico para investigar se a presença de PVAc influenciou no diâmetro hidrodinâmico (D_h) dos polímeros obtidos. Nas Figuras 5.25 e 5.26, distribuições similares de D_h são observadas para as dispersões poliméricas na concentração de 1% massa/volume a 25 °C, cujos tamanhos médios obtidos foram: 12 nm para PNVCL, 10 nm PN-10 % PVAc, 10 nm para PN-20 % PVAc e 11 nm para PN-40 % PVAc. Esses valores e a distribuição larga encontrada indicam que as cadeias poliméricas estão solvatadas no meio aquoso e com conformação macromolecular com diâmetro hidrodinâmico similar para os diferentes copolímeros, independente da porcentagem do comonômero VAc incorporado. Valores semelhantes foram obtidos por KERMARGORET *et al.*¹⁵¹ e ETCHENAUSIA *et al.*¹⁵². No entanto, este último notou que ao aumentar a fração molar de VAc acima de 0,53 o valor de D_h aumentava para 20 nm e estava relacionado ao processo de automontagem dos copolímeros em agregados formados por 3 cadeias poliméricas, induzidos por interações hidrofóbicas intermoleculares não covalentes.

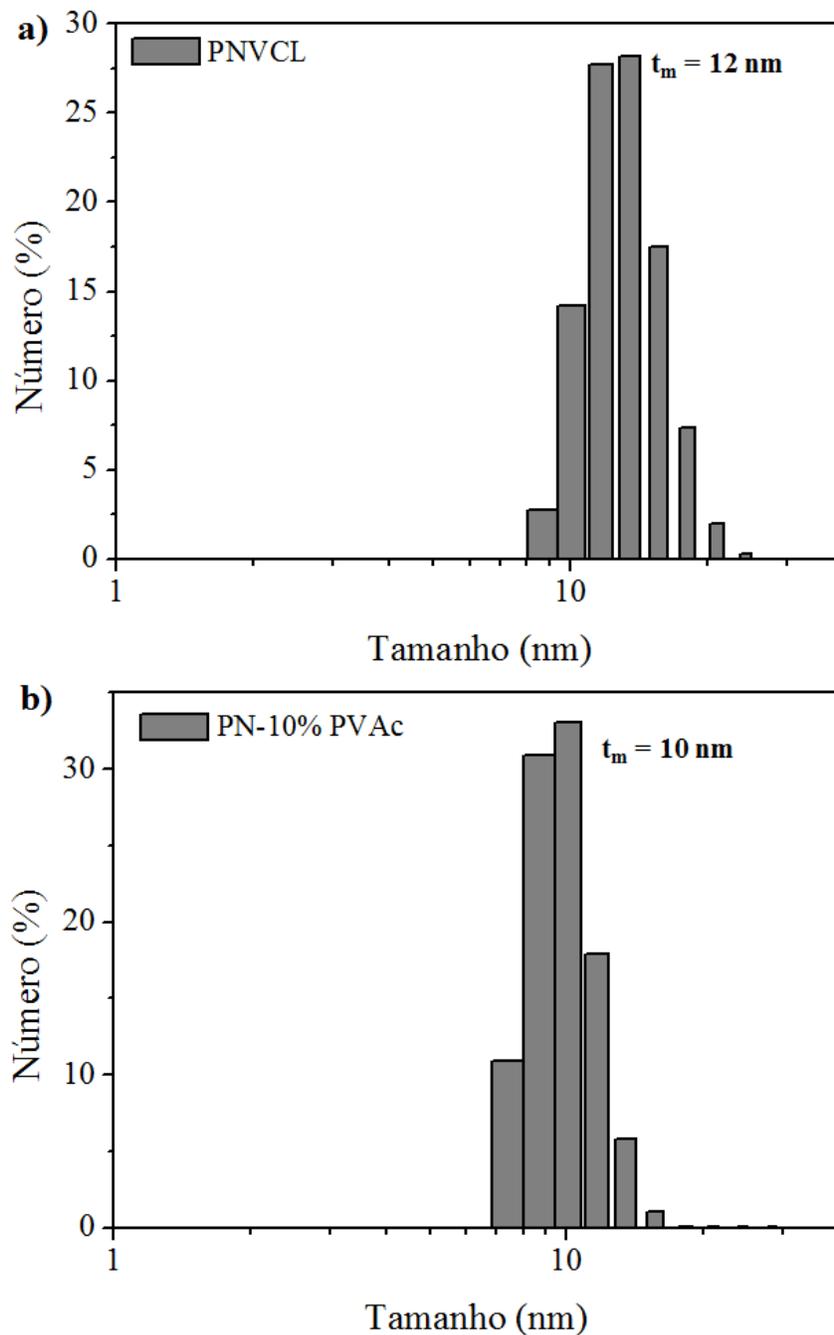


FIGURA 5.25 - Distribuições do diâmetro hidrodinâmico obtidas por DLS para as dispersões poliméricas 1 % m/v de PNVCL (a) e PN-10 % PVAc (b).

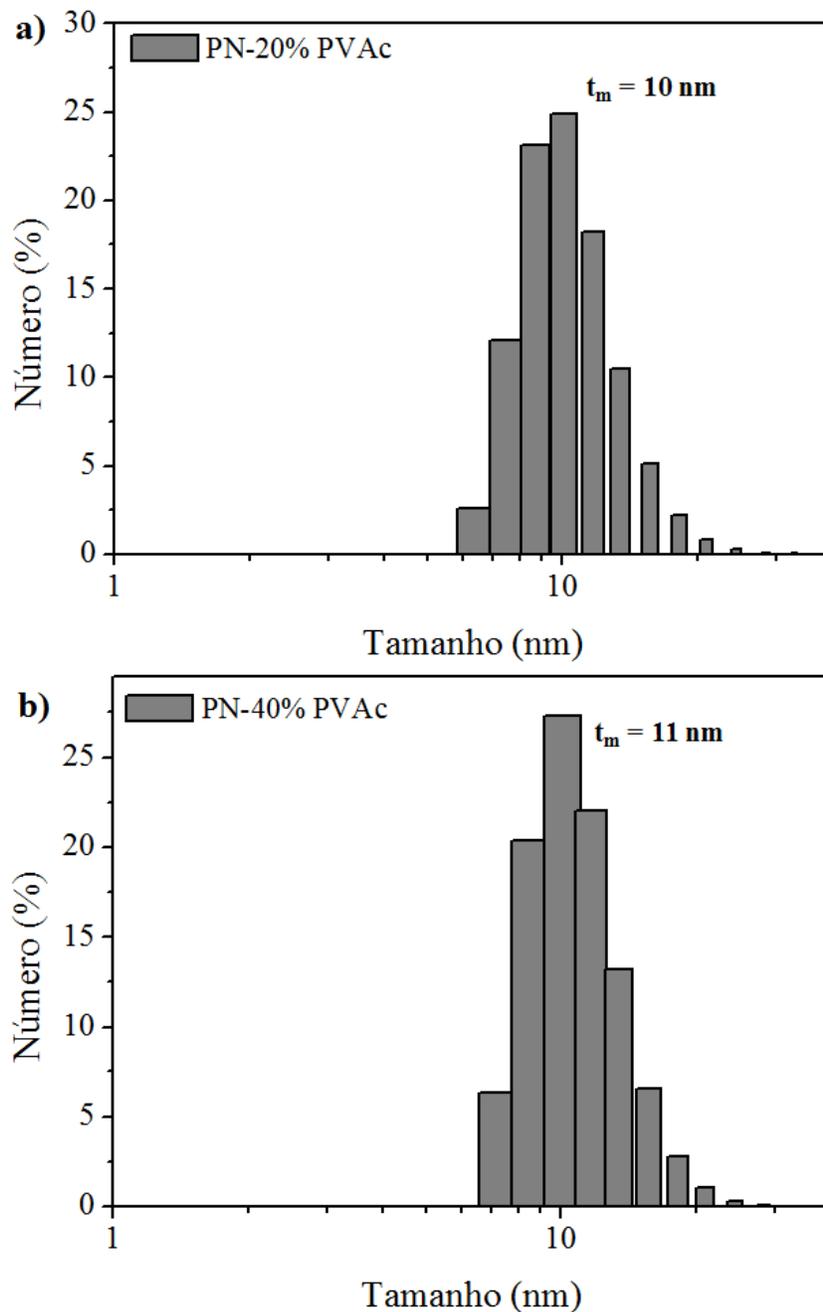


FIGURA 5.26 - Distribuições do diâmetro hidrodinâmico obtidas por DLS para as dispersões poliméricas 1 % m/v de PN-20 % PVAc (a) e PN-40 % PVAc (b).

Conforme os resultados obtidos, o copolímero escolhido para a síntese dos nanocompósitos foi o PN-10 % PVAc, pois apresentou composição em massa de comonômeros similar a composição inicial adicionada no meio reacional. Além

disso, maiores teores de VAc resultam em menores valores de LCST, o que poderia dificultar o manuseio das amostras poliméricas em seu estado solvatado, especialmente no manuseio *in vitro* e *in vivo*, onde são requisitados valores de LCST próximos a temperatura fisiológica para a aplicação como biomateriais injetáveis.

5.3-Nanocompósitos

Nanocompósitos de PNVCL e PN-10 % PVAc foram sintetizados *in situ* na presença de 1 e 5% massa/massa de SiO₂-MPS, cujos grupos metacrilatos podem se ligar via polimerização radicalar com os monômeros NVCL e VAc como representado nas Figuras 5.27 e 5.28 e promover a ligação covalente entre os componentes inorgânicos e orgânicos. Além disso, a presença de grupos MPS reduz a aglomeração de nanopartículas induzida pelas interações de van der Waals existentes entre elas, a partir do seu efeito estérico, e adiciona um caráter hidrofóbico à SiO₂, favorecendo a compatibilidade com alguns monômeros poliméricos ¹²⁸.

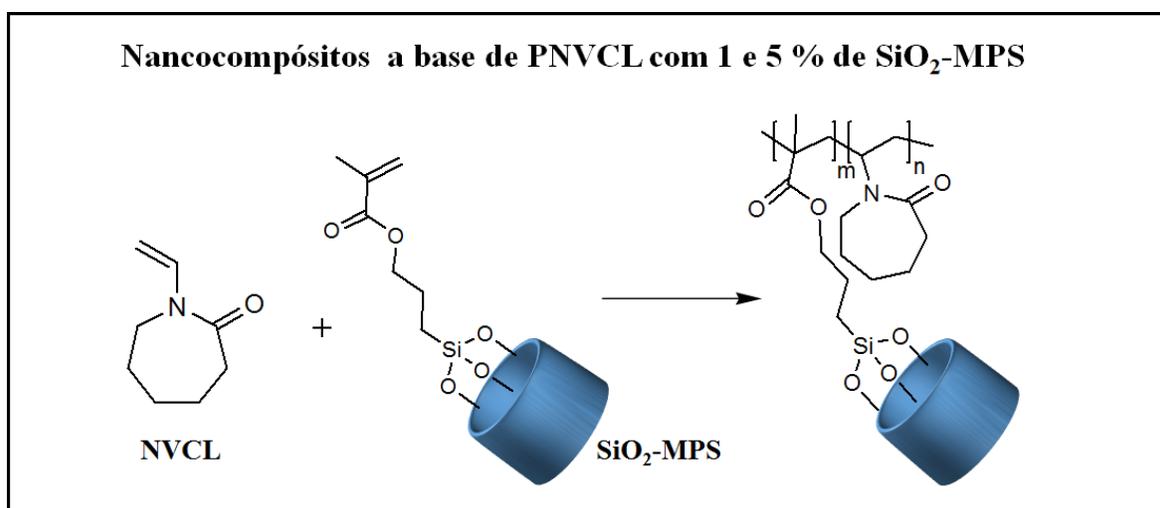


FIGURA 5.27 - Representação da polimerização radicalar entre SiO₂-MPS e NVCL formando nanocompósitos de PNVCL com 1 e 5 % de SiO₂.

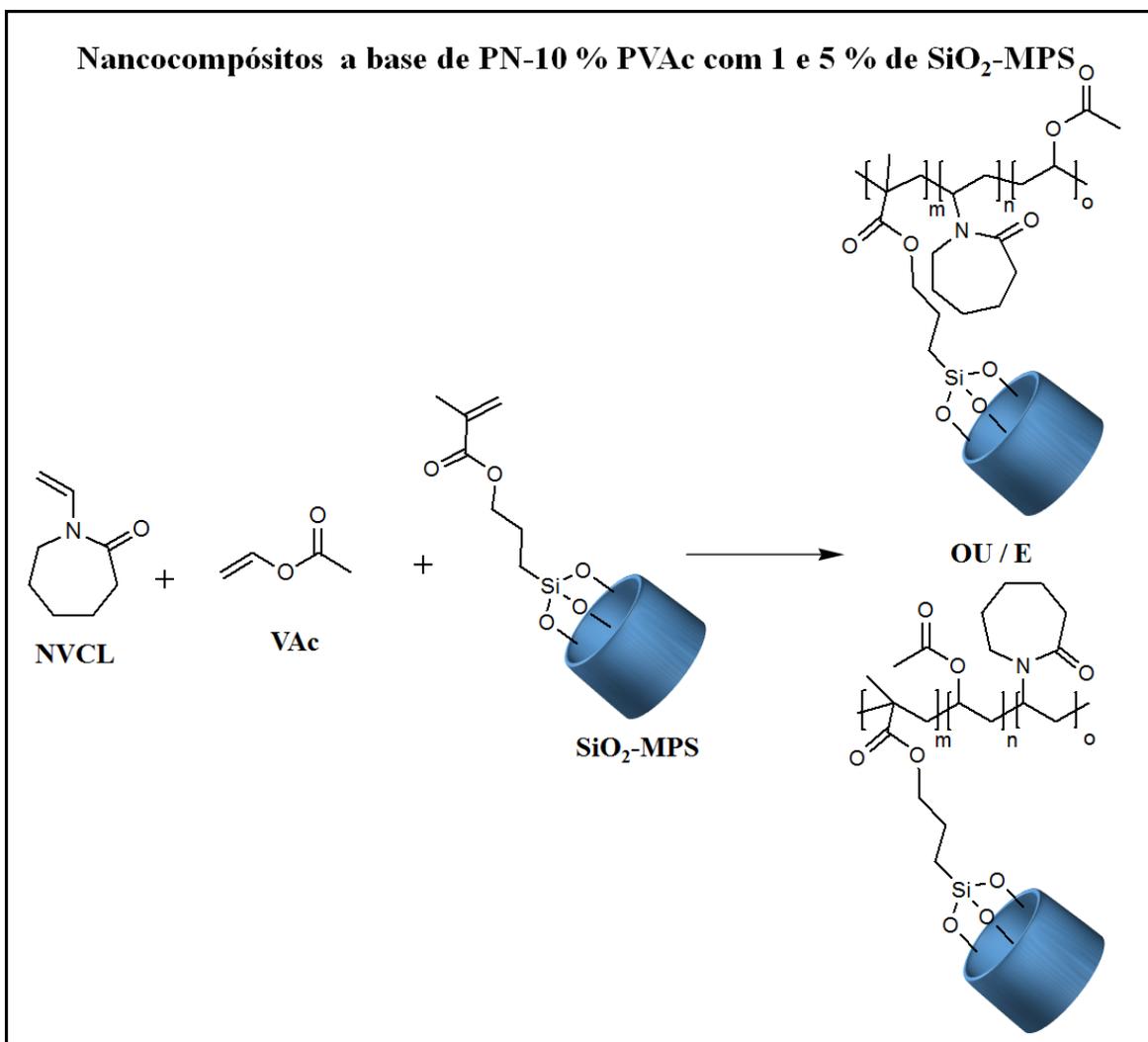


FIGURA 5.28 - Representação da polimerização radicalar entre SiO₂-MPS, NVCL e VAc formando nanocompósitos de PN-10 % PVAc com 1 e 5 % de SiO₂.

Para analisar os materiais produzidos, caracterizações por RMN do núcleo ¹H foram empregadas para PNVCL, PN-10 % PVAc e seus nanocompósitos (Figura 5.29). Os nanocompósitos avaliados estavam presentes em maior concentração de nanofibras de SiO₂ para observar se os polímeros e copolímeros seriam formados na presença de SiO₂-MPS. Pela ausência de resíduos do monômero de NVCL foi possível obter nanocompósitos com espectros similares aos seus

respectivos polímeros puros, sem deslocamentos químicos evidentes pela presença das nanofibras de sílica.

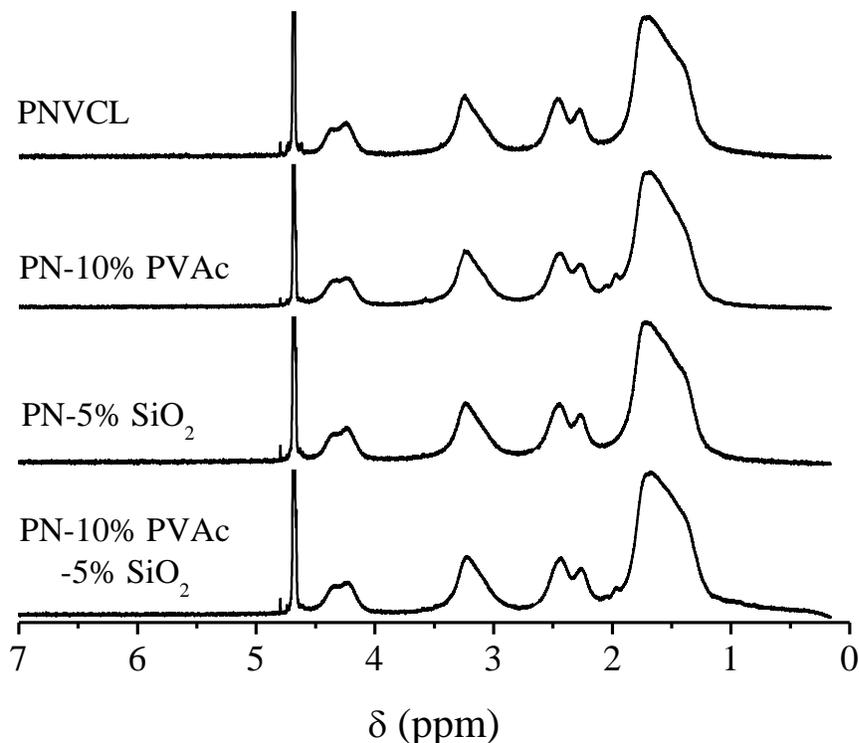


FIGURA 5.29 - Espectros de ¹H RMN do PNVCL, PN-10 % PVAc e de seus nanocompósitos com 5 % de SiO₂-MPS (PN-5 % SiO₂ e PN-10 % PVAc-5 % SiO₂, respectivamente).

Na Figura 5.30, espectros de infravermelho dos materiais poliméricos demonstraram que a presença das nanofibras de sílica provavelmente não modificou o sistema vibracional das ligações poliméricas presentes nos PNVCL e PN-10 % PVAc, já que não observa-se deslocamento das bandas principais. Porém é possível identificar a presença de sílica nos nanocompósitos com 5 % de SiO₂, especialmente pela distorção do espectro na região de 1275-983 cm⁻¹ onde está presente a banda intensa de Si-O proveniente das nanofibras e o aparecimento do pico em 1725 cm⁻¹ referente ao estiramento C=O do grupo MPS ancorado nas nanofibras de sílica.

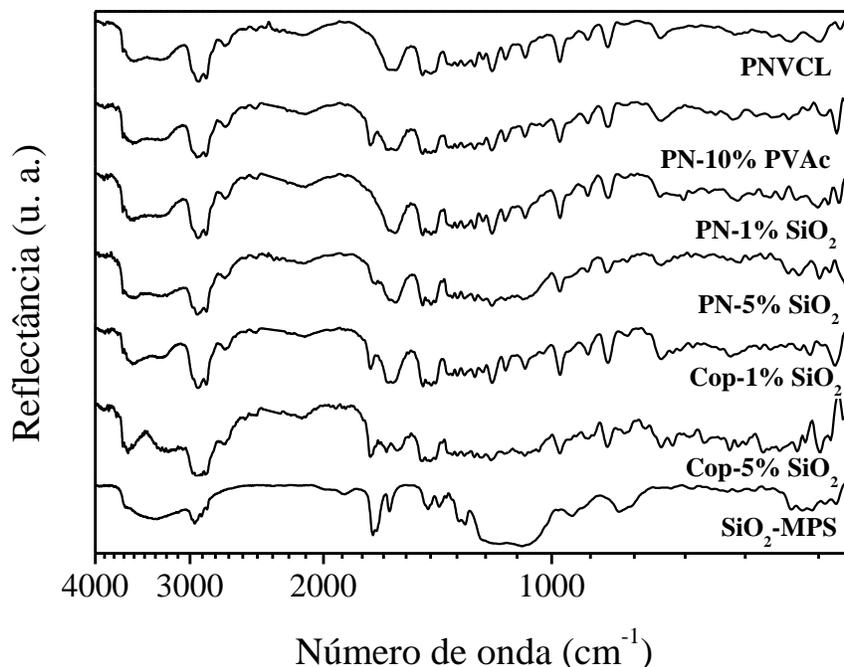


FIGURA 5.30 - Espectros de infravermelho da SiO₂-MPS, do PNVCL, do PN-10 % PVAc (ou Cop) e de seus nanocompósitos com 1 e 5 % de SiO₂-MPS.

Alguns autores utilizaram nanocompósitos de sílica com o polímero termossensível PNIPAm, principalmente em sistemas casca/carço para estudar a liberação controlada de fármacos. Entre eles, PARK *et al.*¹⁶² prepararam nanocompósitos de PNIPAm enxertado em sílica, compostos por um carço esférico de sílica mesoporosa modificada superficialmente com o agente silano MPS. Em seguida, essas nanopartículas foram polimerizadas com o monômero NIPAm, formando uma casca de PNIPAm. Os nanocompósitos resultantes tiveram morfologia dependente da temperatura de síntese ser acima ou abaixo da LCST do PNIPAm puro e da concentração de reticulante. Eles obtiveram nanocompósitos com comportamentos divergentes, alguns sem LCST e alguns com valores superiores de LCST em relação ao PNIPAm puro. Os autores relacionaram estes resultados a uma possível supressão do comportamento termodinâmico da PNIPAm pela ligação química formada entre o polímero e a sílica. Já LOOS *et al.*⁵⁴ prepararam compostos

híbridos de PNVCL e de tetrametoxisilano, que agiria como um reticulante físico da matriz polimérica previamente sintetizada. Os materiais obtidos apresentaram propriedades mecânicas e de inchamento dependentes da quantidade adicionada de silano, porém os valores de LCST ficaram inalterados para os diferentes materiais.

No presente estudo é interessante que a presença da sílica não modifique drasticamente a LCST do PNVCL para não inviabilizar sua utilização como biomaterial injetável. Neste contexto, na Figura 5.31 a transmitância em função do comprimento de onda das dispersões poliméricas aquosas com 1 % m/v de PNVCL polimerizado na presença de 1 % e 5 % de SiO₂-MPS foi avaliada em diferentes temperaturas. Já na Figura 5.32 observa-se a transmitância em função do comprimento de onda das dispersões poliméricas nas concentrações de 1 % massa/volume do copolímero PNVCL-10 % PVAc na presença de 1 % e 5 % de SiO₂-MPS. Todos os valores de LCST encontrados para os materiais estão resumidos na Tabela 5.8.

A presença de nanofibras de sílica nos polímeros levou a um ligeiro acréscimo de até 1 °C em suas temperaturas de transição de fase, provavelmente pois a presença de nanofibras ligadas entre as cadeias poliméricas dificulta suas interações e a formação do estado aglomerado. Além disso, essa redução da transmitância aconteceu gradualmente conforme o aumento de temperatura, principalmente porque para o aquecimento de cada 0,5 °C aguardava-se 3 min para a estabilização da temperatura e análise da transmitância. Este fenômeno nunca foi observado anteriormente em estudos sobre sistemas de SiO₂ a base de PNVCL^{106,163} e outros polímeros termossensíveis, como o PNIPAm^{162,164,165}. A redução difusa da transmitância poderia estar relacionada a mudança no perfil de auto-aglomeração das cadeias poliméricas imposta pela presença das nanofibras, ou pela polidispersividade das cadeias poliméricas que começariam a precipitar em temperaturas diferentes. Esse perfil observado pode ser resultado das interações formadas entre as nanofibras

com o polímero, como também a influência dessas na polimerização. No entanto, o polímero puro de PNVCL é polidisperso e não apresentou essa variação da transmitância. Além disso, os nanocompósitos apresentaram valores de LCST similares aos seus respectivos polímeros, o que indicaria similar tamanho de cadeia, uma vez que a massa molar influencia na temperatura de transição de fase.

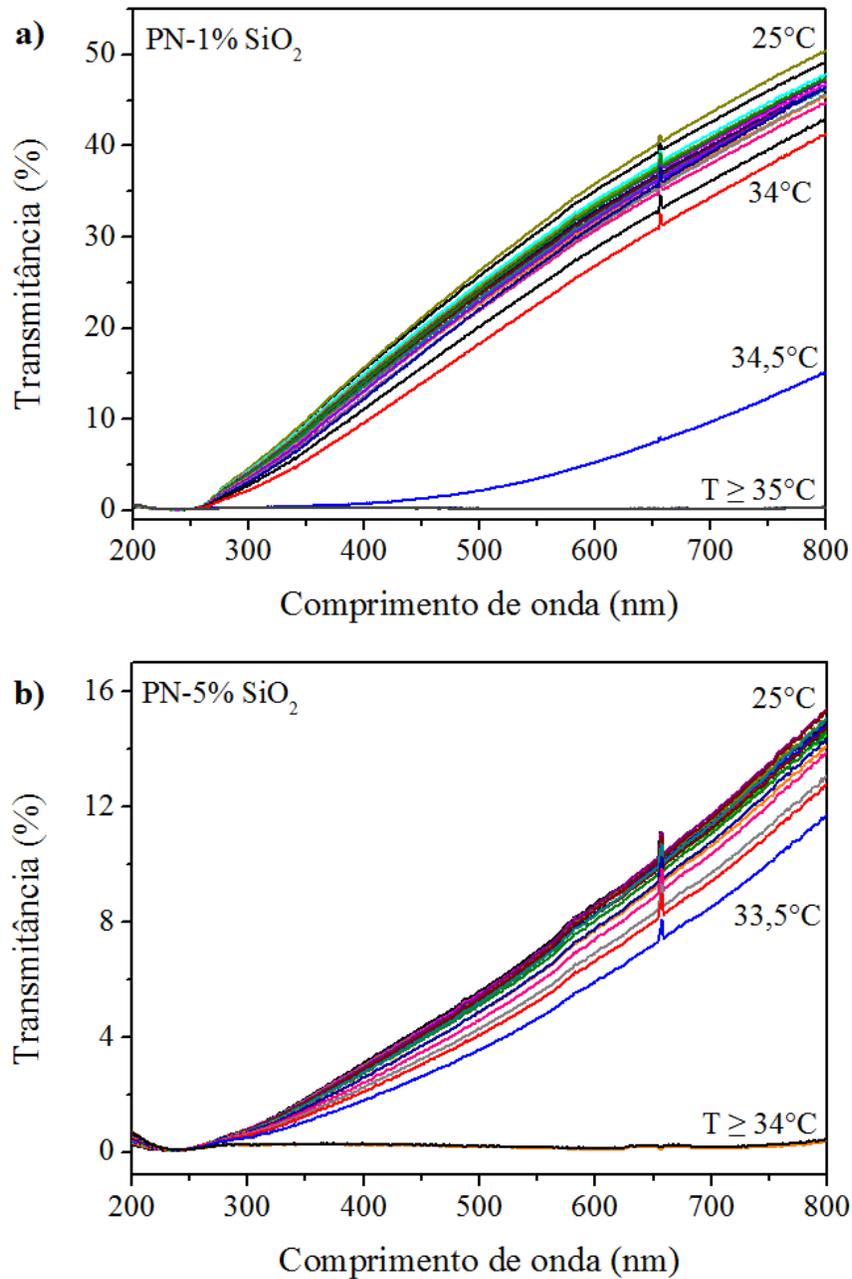


FIGURA 5.31 - Espectros de UV-vis de dispersões poliméricas aquosas 1 % m/v de PNVCL com 1 (a) e 5 % (b) de SiO₂-MPS.

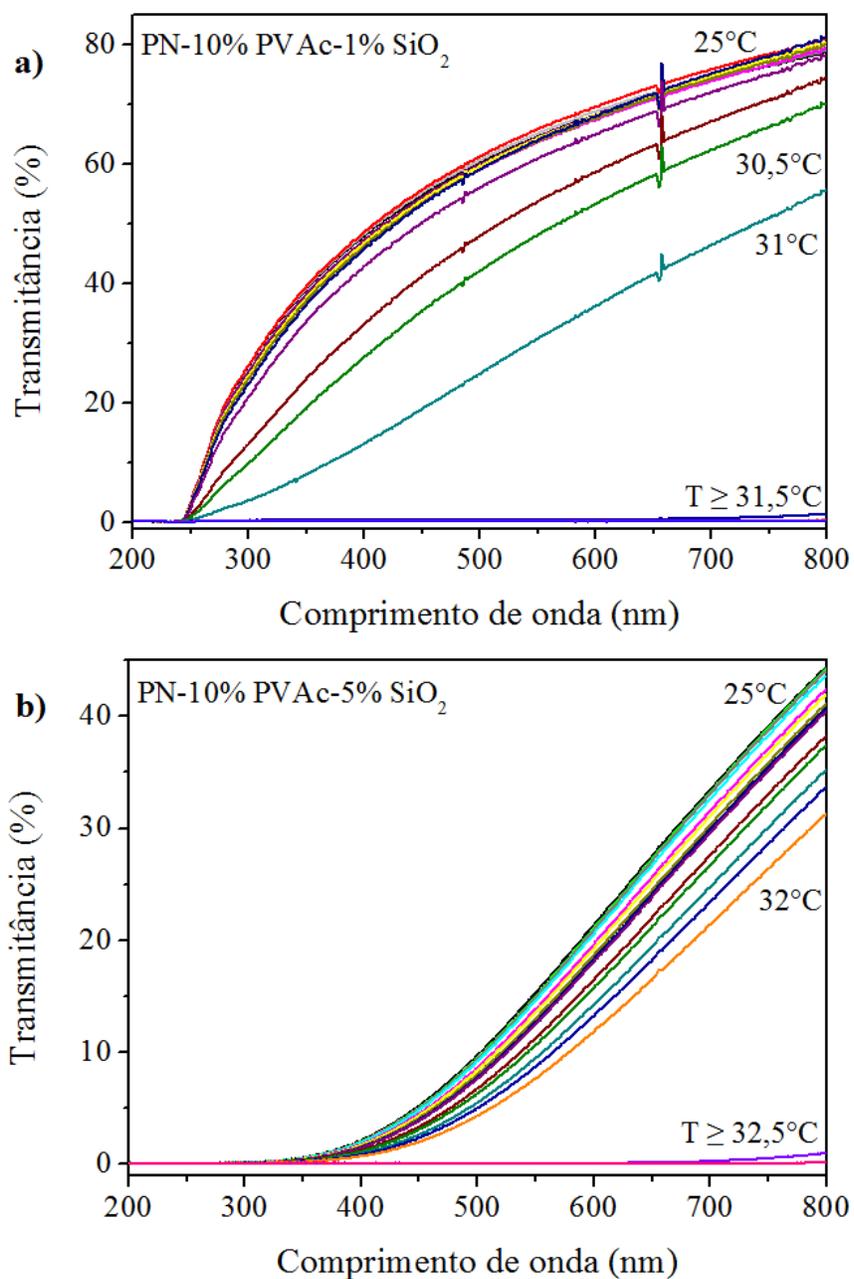


FIGURA 5.32 - Espectros de UV-vis de dispersões poliméricas aquosas 1 % m/v de PN-10 % PVAc com 1 (a) e 5 % (b) de SiO₂-MPS.

TABELA 5.8 - Valores de LCST encontrados para dispersões poliméricas aquosas na concentração de 1 % m/v.

Material	LCST (°C)	LCST (K)
PNVCL	34	307,15
PN-1 % SiO ₂	35	308,15
PN-5 % SiO ₂	34	307,15
PN-10 % PVAc	31,5	304,65
PN-10 % PVAc-1 % SiO ₂	31,5	304,65
PN-10 % PVAc-5 % SiO ₂	32,5	305,65

Observa-se também que com a crescente quantidade de SiO₂-MPS nas soluções poliméricas a transmitância a 25 °C é menor, obtendo-se uma intensidade máxima de transmitância no comprimento de onda de 800 nm de 50 % para PN-1% SiO₂, 15 % para PN-5 % SiO₂, 81 % para PN-10 % PVAc-1 % SiO₂ e 44 % para PN-10 % PVAc-5 % SiO₂. Essa turbidez intrínseca dos nanocompósitos a temperatura ambiente (abaixo da LCST) quando dispersos em soluções aquosas foi diferente para os nanocompósitos a base de PNVCL e de PN-10 % PVAc contendo a mesma concentração de sílica. Essa discrepância entre as transmitâncias abaixo da LCST pode estar relacionada a duas potenciais hipóteses: a real concentração de nanofibras presentes nos nanocompósitos a base de PN-10 % PVAc é menor do que a presente nos nanocompósitos de PNVCL, o que acarretaria em uma transmitância inicial superior. Nesse caso a concentração real de sílica deve ser estimada por outro método de detecção. No entanto, o perfil da transmitância apenas das nanofibras de SiO₂-MPS foi avaliado a partir de sua suspensão coloidal aquosa nas concentrações teóricas (1 e 5 %) encontradas nos nanocompósitos e no fator de diluição utilizado para as análises de espectrofotometria de UV-vis (Figura 5.33). As transmitâncias das suspensões de SiO₂-MPS nas concentrações 0,01 e 0,05 % no comprimento de

onda de 800 nm foram 85 % e 44 %, respectivamente, valores que se assemelham aos encontrados para os nanocompósitos preparados com o copolímero. Contudo, a região do espectro de UV-vis abaixo de 800 nm e a variação da transmitância observada foi bastante discrepante entre as nanofibras de sílica e os nanocompósitos. As dispersões de SiO₂-MPS apresentam transmitância acima de 8 % a 200 nm enquanto os nanocompósitos não apresentaram transmitância até 350 nm, dependendo da concentração de nanofibras e dos polímeros utilizados. A variação entre a menor e a maior intensidade transmitida para as nanofibras de SiO₂-MPS foi similar independente da sua concentração e com valor máximo de 37 %, enquanto que para os nanocompósitos essa diferença variou conforme a amostra e a concentração de sílica, chegando a um máximo de 85 %.

Deste modo, a segunda hipótese para essa turbidez desigual dos materiais nas temperaturas abaixo da LCST é a formação de distintas interações entre as nanofibras de SiO₂ e PNVCL ou PN-10 % PVAc. De forma geral, os possíveis mecanismos de modificação dessas interações seriam resultantes dos maiores e diferentes centros de espalhamento, estados de solvatação e/ou estabilidade coloidal, causando a queda da transmitância. Assim a segunda hipótese é a mais provável, pois enquanto o polímero e o copolímero puros resultam em uma suspensão aquosa estável turva acima da LCST, os nanocompósitos formam um sistema particulado turvo que precipita quando atinge a LCST. Por causa disso, para as análises de espectrofotometria de UV-vis, as suspensões poliméricas dos nanocompósitos dentro das cubetas eram constantemente homogeneizadas com uma pipeta de Pasteur.

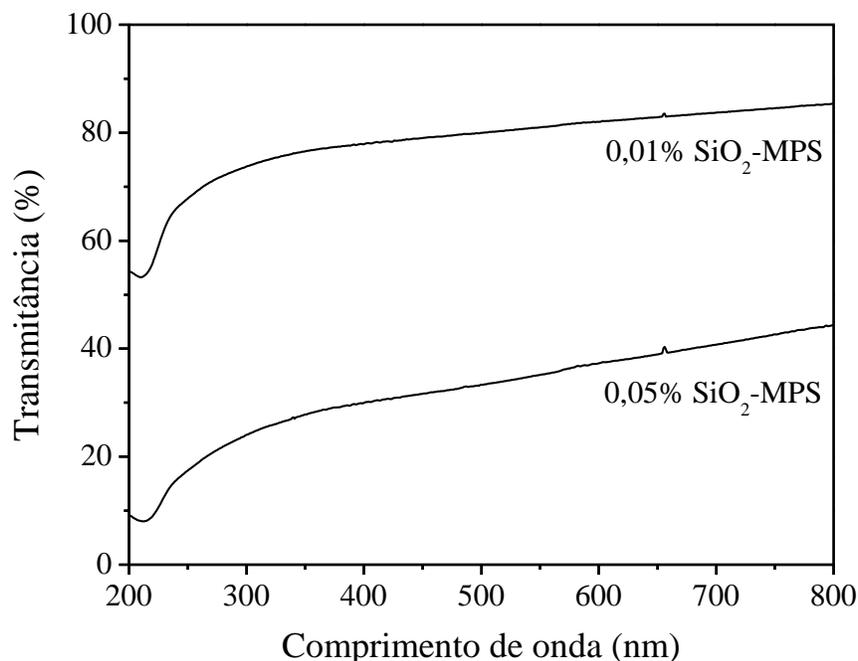


FIGURA 5.33 - Espectros de UV-vis das suspensões coloidais aquosas de nanofibras mesoporosas de SiO₂-MPS.

Uma vez que a redução da transmitância em função da temperatura para os nanocompósitos não é um efeito trazido apenas pela transmitância intrínseca da presença de SiO₂-MPS mas também pela nova estrutura formada, pode-se analisar os parâmetros termodinâmicos durante a transição de fase. Considerando que nesse processo existam apenas dois estados para as cadeias poliméricas, solvatadas ou na fase globular, a transição de fase pode ser compreendida em analogia com a análise de van't Hoff sobre o desdobramento das proteínas globulares¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Seguindo esse modelo, ALF *et al.*¹⁶⁷ e TIKTOPULO *et al.*¹⁶⁸ calcularam as variações de entalpia durante a transição sol-gel do PNIPAm como homopolímero, hidrogel reticulado por ligações covalentes, seus copolímeros e em diferentes massas moleculares. Já em uma abordagem mais recente desse modelo, FUCIÑOS *et al.*¹⁶⁹ avaliaram as propriedades ópticas de nanohidrogéis de PNIPAm por espectrofotometria de UV-vis e desenvolveram uma relação matemática que correlacionasse a temperatura e o

pH, ou a temperatura e adição de um co-solvente orgânico, na formação do estado colapsado desses nanohidrogéis.

De acordo com os espectros de UV-vis previamente mostrados para os materiais, define-se um comprimento de onda intermediário (por exemplo 500 nm) e compara-se a transmitância em função da temperatura. A transmitância é então convertida em densidade óptica (OD) pela Equação 8 devido a sua relação com a concentração dos componentes no sistema, obtendo-se as curvas nas Figuras 5.34, 5.35, 5.36 e 5.37 que evidenciam a transição das cadeias poliméricas inicialmente solvatadas para seu estado colapsado com conformação globular. Valores de OD correspondentes aos estados solvatado (OD_S) e globular (OD_G) são obtidos pelos pontos das curvas com menor e maior valores. Em qualquer temperatura (T) na transição, as cadeias poliméricas coexistem em ambos estados solvatados e globulares ao assumir um sistema de dois estados em equilíbrio^{166,169}. Assim, nessa condição a aglomeração parcial do polímero em solução é matematicamente equivalente a coexistência de uma fração das cadeias poliméricas solvatadas (f_S) em equilíbrio com uma fração globular (f_G), como demonstrado nas Equações 9, 10, 11, 12 e 13. K_c é a constante de equilíbrio aparente na transição.

$$OD = 2 - \log(T\%) \quad (8)$$

$$OD = f_S \cdot OD_S + f_G \cdot OD_G = OD_S + f_G(OD_G - OD_S) \quad (9)$$

$$f_S + f_G = 1 \quad (10)$$

$$OD = OD_S + f_G(OD_G - OD_S) \quad (11)$$

$$f_G = \frac{OD - OD_S}{OD_G - OD_S} \quad (12)$$

$$K_c = \frac{[C]}{[S]} = \frac{f_G}{1 - f_G} \quad (13)$$

No equilíbrio, a variação de energia de Gibbs é zero ($\Delta G_T = 0$), e a variação de energia de Gibbs padrão (ΔG°_T) na temperatura T da transição relaciona-se a K_c segundo a Equação 14, e também as variações da entalpia (ΔH°_T) e entropia (ΔS°_T) durante a transição sol-gel (Equação 15). R é a constante dos gases (8.314 J mol⁻¹ K⁻¹) e T é a temperatura absoluta (K).

$$\Delta G^\circ_T = -RT \ln K_c \quad (14)$$

$$\Delta G^\circ_T = \Delta H^\circ_T - T\Delta S^\circ_T \quad (15)$$

A transição de fase é também acompanhada pela variação da capacidade térmica molar (ΔC_p) devido a reestruturação das moléculas de água principalmente ao redor dos glóbulos formados. Considerando que ΔC_p durante a transição de fase independe da temperatura, é possível determinar as variações da entalpia (ΔH°_m) e entropia (ΔS°_m) no ponto mediano da transição, quando $T=T_m$ e T_m é igual a LCST do sistema (Equações 16 e 17) ¹⁶⁹.

$$\Delta H^\circ_T = \Delta H^\circ_m + \Delta C_p(T - T_m) \quad (16)$$

$$\Delta S^\circ_T = \Delta S^\circ_m + \Delta C_p \ln \frac{T}{T_m} \quad (17)$$

Quando $T=T_m$, as cadeias poliméricas nas fases solvatada e globular estão na mesma concentração, $K_s = 1$ e $\Delta G^\circ_T = 0$ e assim, substituindo os termos obtém-se Equações 18 e 19.

$$\Delta S^\circ_m = \frac{\Delta H^\circ_m}{T_m} \quad (18)$$

$$\Delta G^\circ_T = \Delta H^\circ_m \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) + \Delta C_p \left[(T - T_m) - T \cdot \ln \frac{T}{T_m} \right] \quad (19)$$

Reordenando as equações 11, 13, 14 e 19, FUCIÑOS *et al.* encontraram a Equação 20 que pode ser ajustada nas curvas de OD (curvas em vermelho nas Figuras 5.34, 5.35, 5.36 e 5.37) em função da temperatura para os materiais e determinar T_m , ΔH_m° e ΔC_p , cujos valores encontram-se na Tabela 5.9.

$$OD = OD_S - \frac{OD_G - OD_S}{1 + e^{-\left(\frac{(T-T_m)(T_m \cdot \Delta C_p - \Delta H_m^\circ)}{R \cdot T \cdot T_m}\right) \left(\frac{T}{T_m}\right)^{\frac{\Delta C_p}{R}}}} \quad (20)$$

Pelas Figuras 5.34 e 5.35, observa-se que PNVCL e PN-10 % PVAc apresentam valores de OD praticamente constantes até alcançar a LCST, onde ocorre um crescimento abrupto nos valores de OD e que são ajustados pela Equação 20. Já para os nanocompósitos presentes nas Figuras 5.36 e 5.37, abaixo da transição de fase os valores de OD não são constantes e são crescentes até a mudança de fase. Esse crescente valor de OD abaixo da LCST não é previsto pelo modelo matemático da Equação 20, porém ele foi ajustado e os parâmetros de T_m e ΔH_m° puderam ser determinados para todos os nanocompósitos, exceto para o PN-10 % PVAc-5 % SiO₂. Diante disso, a presença de SiO₂-MPS introduziu um terceiro estado adicional aos estados solvatados e globulares previstos para PNVCL e que provavelmente se relaciona a interface de interação das nanofibras e os polímeros. Este efeito observado foi ainda mais pronunciado para os nanocompósitos preparados com PN-10 % PVAc, demonstrando distintas interações entre as nanofibras de sílica e as matrizes poliméricas de PNVCL e PN-10 % PVAc além do modelo proposto para um sistema com apenas dois estados em equilíbrio.

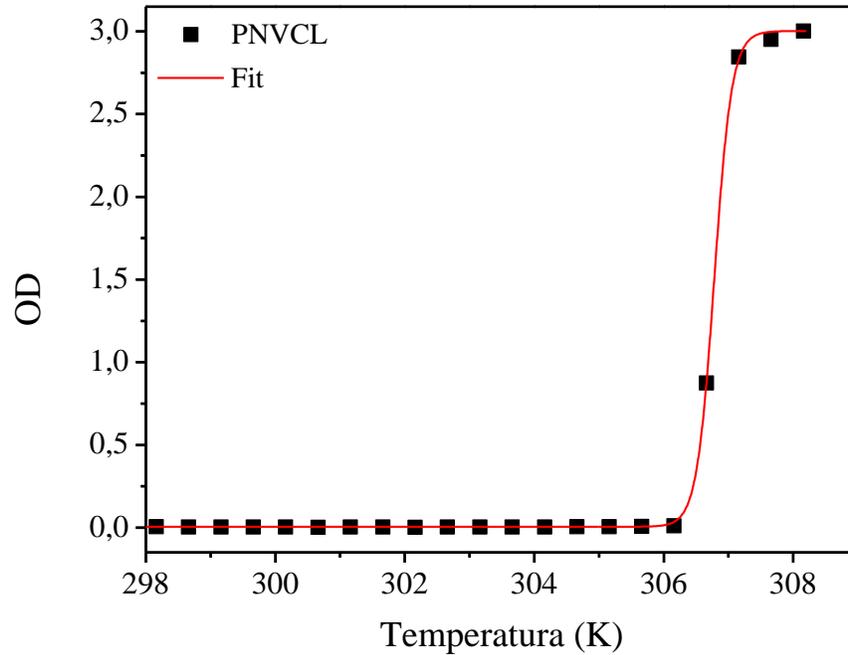


FIGURA 5.34 - Variação da densidade óptica com a temperatura (pontos) e ajuste das curvas (linha vermelha) pela Equação 20 para PNVCL.

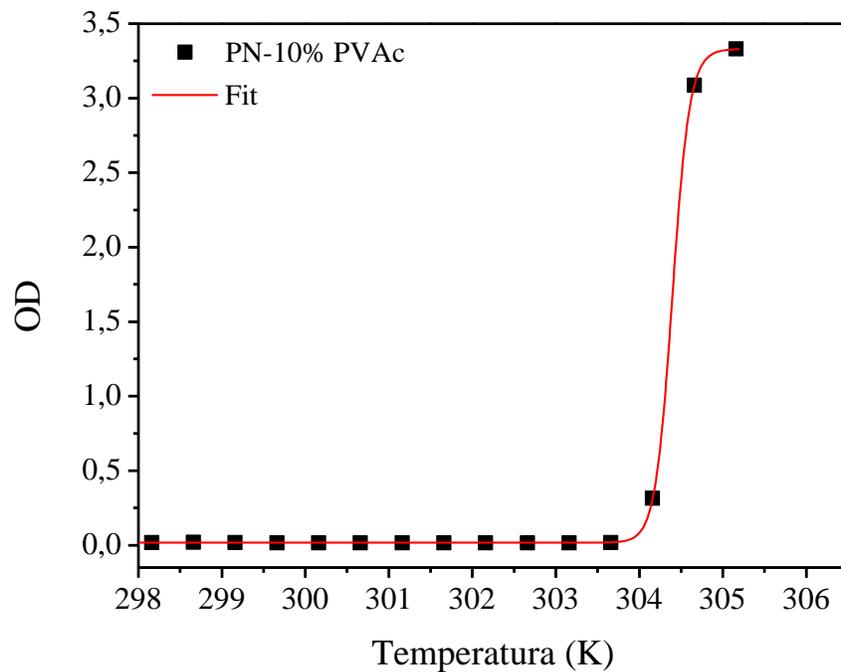


FIGURA 5.35 - Variação da densidade óptica com a temperatura (pontos) e ajuste das curvas (linha vermelha) pela Equação 20 para PN-10 % PVAc.

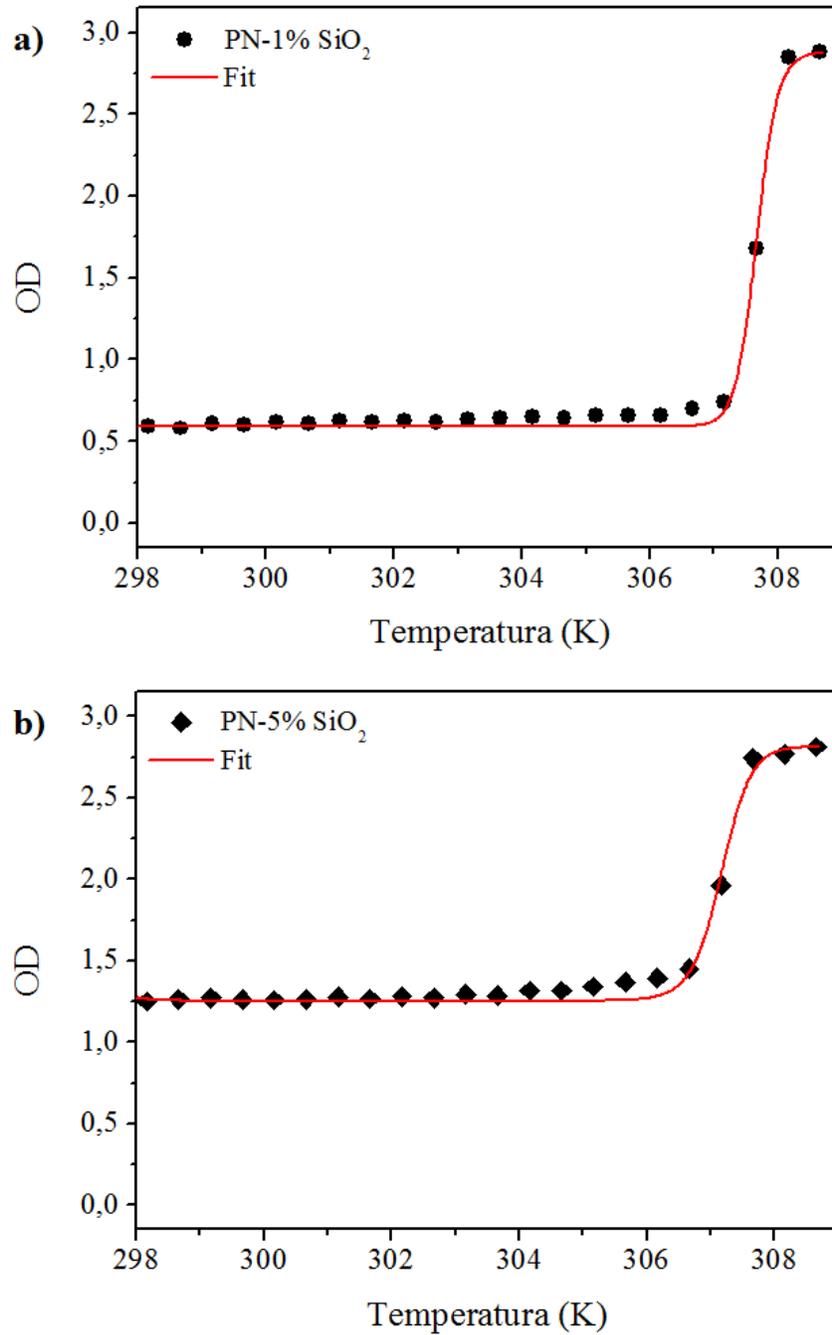


FIGURA 5.36 - Variação da densidade óptica com a temperatura (pontos) e ajuste das curvas (linha vermelha) pela Equação 20 para PN-1 % SiO₂ (a) e PN-5 % SiO₂ (b).

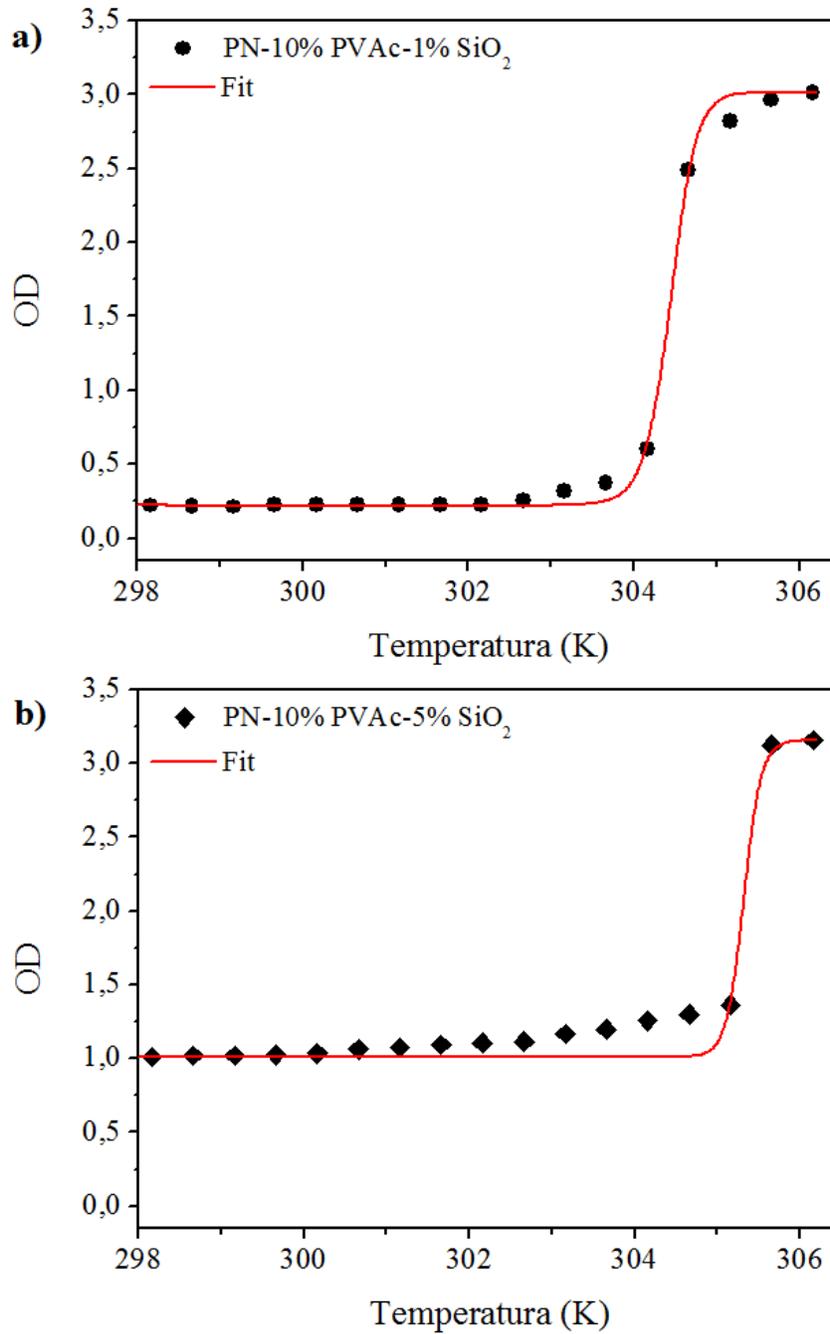


FIGURA 5.37 - Variação da densidade óptica com a temperatura (pontos) e ajuste das curvas (linha vermelha) pela Equação 20 para PN-10 % PVAc-1 % SiO₂ (a) e PN-10 % PVAc-5% SiO₂ (b).

TABELA 5.9 - Parâmetros obtidos pelo ajuste da Equação 18 para os dados de densidade óptica em função da temperatura para PNVCL, PN-10% PVAc e seus nanocompósitos.

Material	T_m (K)	ΔH°_m (kJ mol⁻¹)	ΔC_p (kJ mol⁻¹ K⁻¹)
PNVCL	306,78±0,01	5789,24±202,02	-25,27±1394,45
PN-1 % SiO ₂	307,67±0,01	4784,27±575,34	-0,04±2338,23
PN-5 % SiO ₂	307,17±0,03	3346,09±398,33	646,00±120,52
PN-10 % PVAc	304,40±0,01	7488,17±35,03	-508,32±1949,95
PN-10 % PVAc-1 % SiO ₂	304,44±0,02	4858,97±362,99	1286,49±642,70
PN-10 % PVAc-5 % SiO ₂	305,32±0,39	7341,99±8928,17	-169,18±10242

As curvas obtidas para os sistemas poliméricos a base de PNIPAm apresentadas por ALF *et al.*¹⁶⁷ e FUCIÑOS *et al.*¹⁶⁹ demonstraram que a transição entre as fases solvatada e globular ocorre em uma maior faixa de temperatura (~5-13 °C) do que PNVCL (1 °C). Conseqüentemente, esta região da transição continha um maior número de pontos (>6) do que os obtidos (1) para o PNVCL, determinantes para os cálculos termodinâmicos. Os valores encontrados nesses cálculos são referentes ao número de mols de unidades cooperativas, consideradas domínios da cadeia polimérica envolvidos na transição sol-gel^{167,168}. Monômeros pertencentes à mesma unidade cooperativa exibem similar comportamento durante a transição, enquanto que a presença de comonômeros pode resultar em distinto comportamento. Nos estudos citados, copolímeros a base de PNIPAm também foram propostos com ácido acrílico (AA)^{169,170} e o agente reticulante dietilenoglicol divinil éter (DE)¹⁶⁷, resultando em copolímeros com maior faixa de transição de fase do que o correspondente PNIPAm puro e com menor valor de ΔH°_m. Esse comportamento foi correlacionado ao caráter hidrofílico de AA que dificultou o processo de desidratação

das cadeias poliméricas para a formação do estado globular ¹⁶⁹, e a restrições na mobilidade de cadeias reticuladas, reduzindo o tamanho da unidade cooperativa ¹⁶⁷.

Por outro lado, o PN-10 % PVAc apresentou uma variação abrupta de OD na transição de fase, similar a obtida para PNVCL, e ΔH°_m superior ao homopolímero. Devido ao caráter hidrofóbico do monômero VAc, as interações hidrofóbicas acima da LCST são favorecidas. No entanto abaixo desta temperatura, quando as cadeias poliméricas estão solvatadas, as moléculas de água se organizam ao redor desses grupos gerando uma alta unidade cooperativa entre os componentes. Com a transição de fase, esse arranjo é perturbado e o processo de desidratação é acompanhado pelo efeito endotérmico ^{69,167,171}, resultando em ΔH°_m maiores ou menores quando comonômeros hidrofóbicos ou hidrofílicos são adicionados a homopolímeros de PNVCL, respectivamente. Valores de ΔH°_m para sistemas a base de PNVCL foram previamente relatados a partir de análises de microcalorimetria ^{69,171}. Porém, nessa técnica mede-se a variação total da entalpia na transição de fase incluindo todos os processos envolvidos e independente de qualquer modelo, como o utilizado baseado no sistema de dois estados proposto no modelo de van't Hoff. Assim ΔH°_m encontrado de ambas formas resultaram em valores diferentes.

Vale ressaltar que tanto o copolímero sintetizado quanto outros presentes na literatura a base de PNVCL e com comonômeros hidrofóbicos (PVAc) ⁶³ e hidrofílicos ^{68,172,173} apresentaram uma transição de fase em menores faixas de temperatura comparadas às obtidas para copolímeros de PNIPAm, destacando mais uma singularidade de sistemas a base de PNVCL frente ao PNIPAm.

Apesar da existência de estudos sobre nanopartículas inorgânicas combinadas com polímeros termossensíveis, especialmente em sistemas casca/caroço, até o presente momento, a avaliação da influência de nanopartículas na variação da transmitância com a temperatura não foi conduzida para nanocompósitos a base de PNVCL. O ajuste das curvas de OD em função da

temperatura pela Equação 20 foi eficiente para a previsão da LCST, indicando a temperatura para a transição sol-gel, em concordância com os resultados previamente encontrados na Tabela 5.8.

Para os nanocompósitos de PNVCL com 1 e 5 % de SiO₂-MPS, o aumento da concentração de sílica resultou em menores valores de ΔH°_m . Essa redução pode estar relacionada ao que ALF *et al.*¹⁶⁷ encontraram para polímeros de PNIPAm reticulados. A formação de um sistema nanoestruturado interligado de nanofibras de sílica e cadeias poliméricas, reduziu a mobilidade do polímero e a presença de SiO₂-MPS adicionou um impedimento estérico ao processo de solvatação das cadeias poliméricas. Assim, esse sistema apresentou uma menor unidade cooperativa, reduzindo a contribuição entálpica por unidade monomérica. O nanocompósito PN-10 % PVAc com 1 % de SiO₂ apresentou ΔH°_m ainda menor do que o copolímero puro mas similar ao PN-1 % SiO₂. Já o nanocompósito PN-10 % PVAc com 5 % de SiO₂ demonstrou um aumento do seu valor de ΔH°_m , porém ele não foi significativo pelo alto valor do desvio padrão encontrado, indicando que o modelo matemático não se aplicou a variação de OD por temperatura para este material. Nota-se também que os perfis das curvas obtidas para os nanocompósitos de PN-10 % PVAc foram diferentes dos obtidos para os nanocompósitos de PNVCL, com uma variação de OD sem pontos intermediários na transição de fase. Da mesma maneira que a Figura 5.28 demonstra possíveis maneiras das nanofibras de sílica se ligarem aos copolímeros, os nanocompósitos resultantes apresentaram distintos perfis da variação de OD que podem estar correlacionados a variações das interações na interface inorgânica e matriz polimérica.

Apesar de FUCIÑOS *et al.*¹⁶⁹ demonstrarem que a partir da Equação 20 seria possível obter os parâmetros T_m , ΔH°_m e ΔC_p , eles não obtiveram valores significativos de ΔC_p devido ao alto desvio padrão e os valores negativos encontrados. Similarmente, não foi possível obter valores expressivos para ΔC_p , e

até o momento esse parâmetro foi obtido na literatura apenas por análise de microcalorimetria.

Utilizando as mesmas soluções poliméricas analisadas pela espectrofotometria de UV-vis, foram feitas medidas de espalhamento de luz dinâmico para investigar se a presença de sílica influenciou no diâmetro hidrodinâmico dos nanocompósitos. Os nanocompósitos a base de PNVCL apresentaram distribuições unimodais nos histogramas numéricos presentes na Figura 5.38. Anteriormente, mostrou-se na Figura 5.25 que D_h médio para PNVCL foi de 12 nm, enquanto que PN-1 % SiO_2 e PN-5 % SiO_2 apresentaram sua distribuição localizada entre 200-1200 nm, com tamanhos médios de 388 e 394 nm respectivamente. Nesta região é onde se encontram as nanofibras de SiO_2 -MPS que provavelmente por estarem ligadas às cadeias poliméricas, resultaram em maiores dimensões do que previamente obtidas pelas dispersões coloidais de sílica. Os dados foram analisados baseados nas distribuições numéricas e não em função da intensidade de luz espalhada, que é proporcional à sexta potência do diâmetro da partícula. No caso de uma amostra polidispersa, a intensidade da luz espalhada por partículas maiores ou aglomerados sobreporá a de partículas menores, e assim no caso de amostras polidispersas, a análise da porcentagem numérica das partículas com diferentes D_h pode ser mais adequada ^{174,175}.

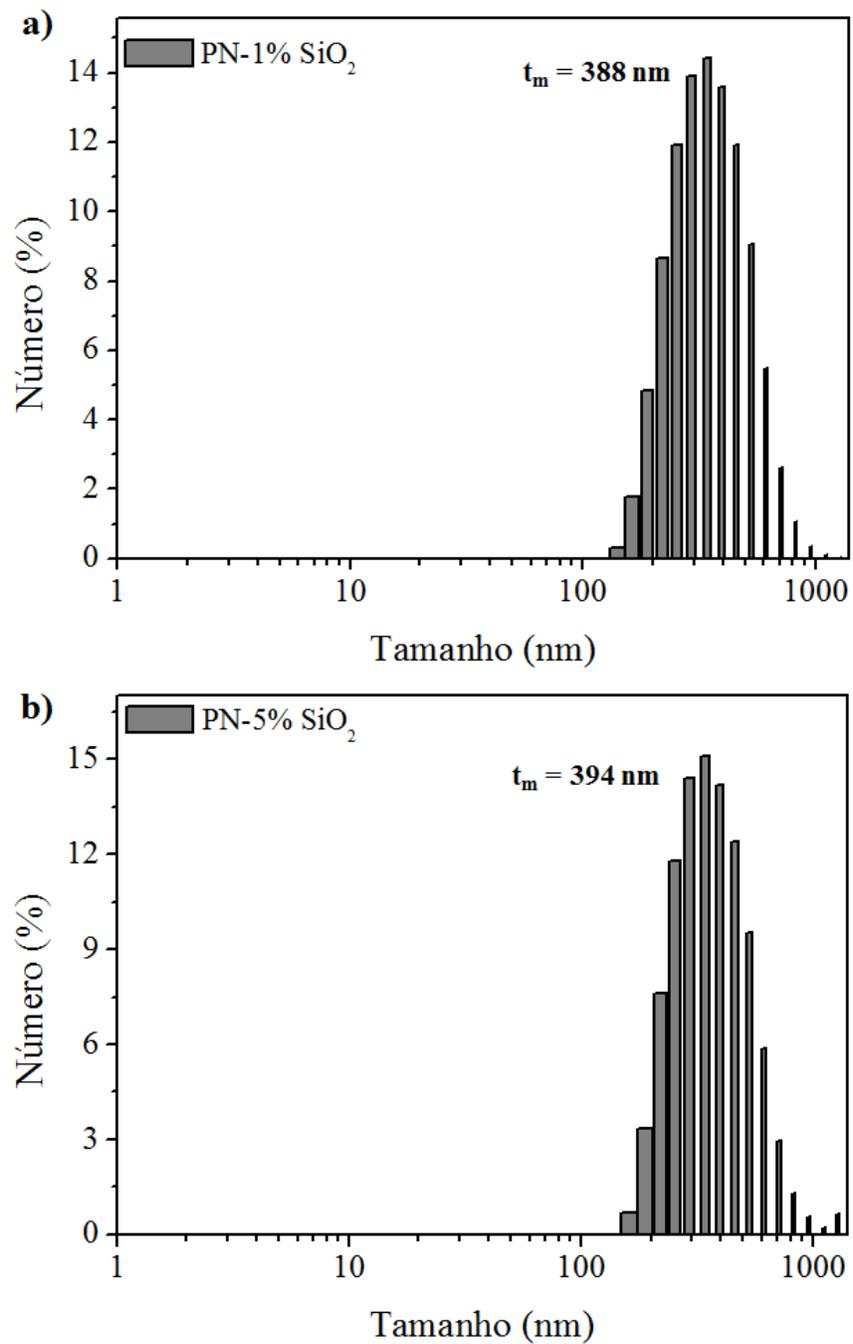


FIGURA 5.38 - Distribuições do diâmetro hidrodinâmico obtidas por DLS para as dispersões poliméricas 1 % de PN-1 % SiO₂ (a) e PN-5 % SiO₂ (b).

Para os nanocompósitos preparados a partir do copolímero (Figura 5.39 e 5.40), PN-10 % PVAc-1 % SiO₂ apresentou uma distribuição unimodal e bimodal nas distribuições numérica e de intensidade, respectivamente. Foi possível identificar tamanhos médios de D_h de 10 nm das macromoléculas poliméricas, com distribuição muito similar à PN-10 % PVAc, e 350 nm referente às nanofibras de sílica. Com isso foi possível observar a existência de uma população de cadeias poliméricas livres e outra de cadeias interligadas com a sílica. Além disso, a presença de nanofibras provavelmente não afetou a polimerização e obtenção do copolímero, uma vez que similares diâmetros hidrodinâmicos foram observados. Já o nanocompósito PN-10% PVAc-5% SiO₂ apresentou perfil de distribuição de D_h similar aos nanocompósitos de PNVCL, demonstrando a formação de um maior centro de espalhamento e polidisperso provavelmente resultante das interações entre os componentes como representado da Figura 5.41. Esses domínios de espalhamento encontrados para os nanocompósitos terão diferentes velocidades de sedimentação, difusão no solvente e grau de solvatação quando comparados com os polímeros puros cujas cadeias poliméricas encontram-se na configuração livre e solvatada no meio ¹⁷⁶. Consequentemente, essas estruturas formadas influenciaram na transmitância observada nos espectros de UV-vis como também na termodinâmica de transição de fase do polímero termossensível.

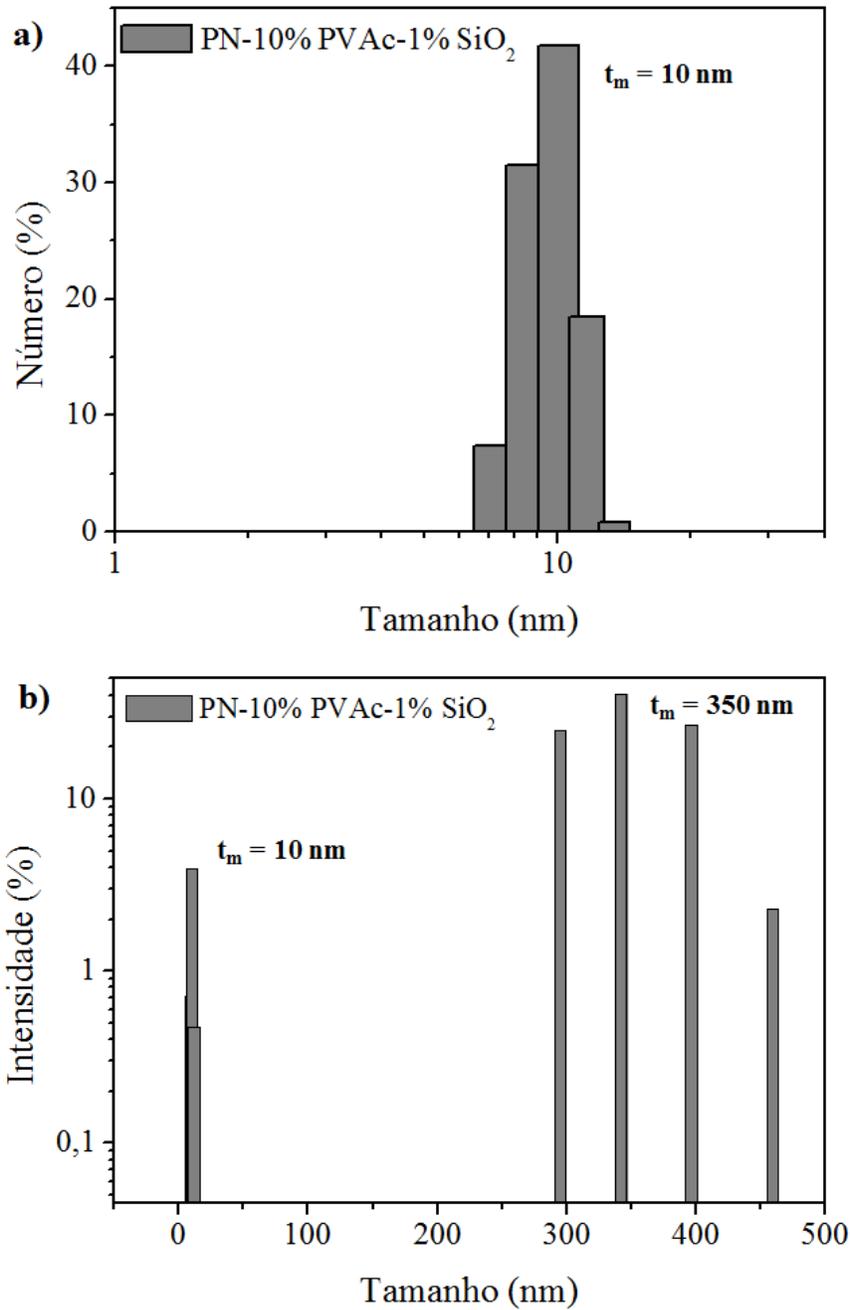


FIGURA 5.39 - Distribuição do diâmetro hidrodinâmico obtida por DLS para a dispersão polimérica 1 % de PN-10 % PVAc-1 % SiO₂ segundo sua frequência numérica (a) e de intensidade (b).

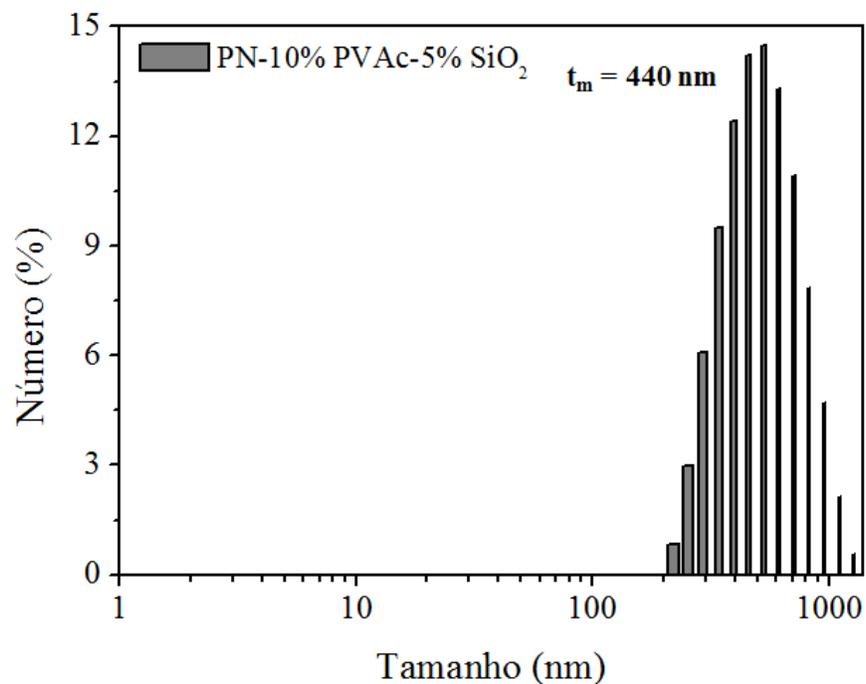


FIGURA 5.40 - Distribuição do diâmetro hidrodinâmico obtida por DLS para a dispersão polimérica 1 % de PN-10 % PVAc-5 % SiO₂.

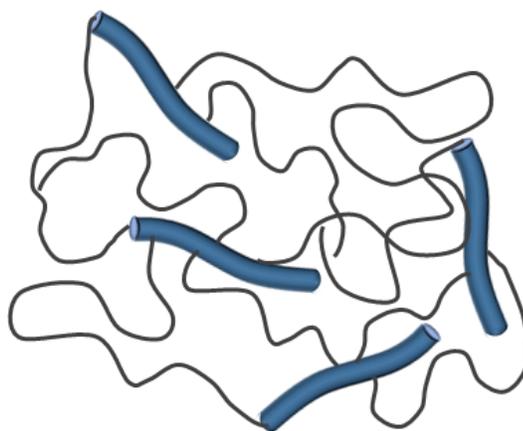


FIGURA 5.41 - Representação da estrutura interligada entre nanofibras de sílica e cadeias poliméricas resultando em grandes centros de espalhamento de luz.

Para estimar a formação da fase globular encontrada nos sistemas poliméricos acima da LCST, dispersões poliméricas diluídas ($\sim 0,6 \text{ mg mL}^{-1}$) foram

aquecidas acima da LCST (50 °C) e depositadas em substratos de sílcio também aquecidos nessa temperatura. Após a evaporação do solvente, as amostras foram investigadas por MEV e as imagens obtidas são mostradas nas Figuras 5.42 e 5.43. Para PNVCL, observa-se a formação de glóbulos esféricos e polidispersos. Para PN-1 % SiO₂, os glóbulos esféricos menores apresentam-se interligados com as nanofibras de sílica. Com o aumento da concentração de SiO₂-MPS, elas ficam mais evidentes nas imagens integrando-se com os glóbulos. Este comportamento observado juntamente com a ausência de nanopartículas aglomeradas ou isoladas no substrato indicam uma possível interação covalente entre os componentes inorgânicos/orgânicos, que permitiu que as nanofibras ficassem distribuídas ao longo da matriz polimérica. Essa nova estrutura interligada poderia contribuir para o aumento da massa molar média do sistema em comparação com as cadeias poliméricas individuais correspondentes. Quando a dispersão polimérica foi aquecida e submetida a transição de fase, as nanofibras mesoporosas de sílica integraram o estado polimérico globular, distribuindo-se ao longo dos glóbulos formados.

Já para o copolímero e seus nanocompósitos um comportamento similar foi observado, porém PN-10 % PVAc apresentou glóbulos com diâmetro e formato esférico mais homogêneos do que PNVCL puro. Na presença de 1 % de SiO₂-MPS as estruturas dos glóbulos poliméricos foram similares às apresentadas pelo copolímero puro, porém as nanofibras de sílica estavam presentes no interior ou na superfície dos glóbulos. Por outro lado, PN-10 % PVAc-5 % de SiO₂ apresentou glóbulos maiores, com formato irregular e integrados com nanofibras mesoporosas de sílica que poderiam estar relacionados a uma possível coalescência dos glóbulos durante a secagem. A formação dessa estrutura interligada de polímero e nanofibras de sílica se assemelha ao que foi anteriormente observado nas análises de DLS a temperatura ambiente, cujo diâmetro hidrodinâmico dos nanocompósitos teve uma

distribuição unimodal larga, englobando a região onde as nanofibras de sílica estão presentes.

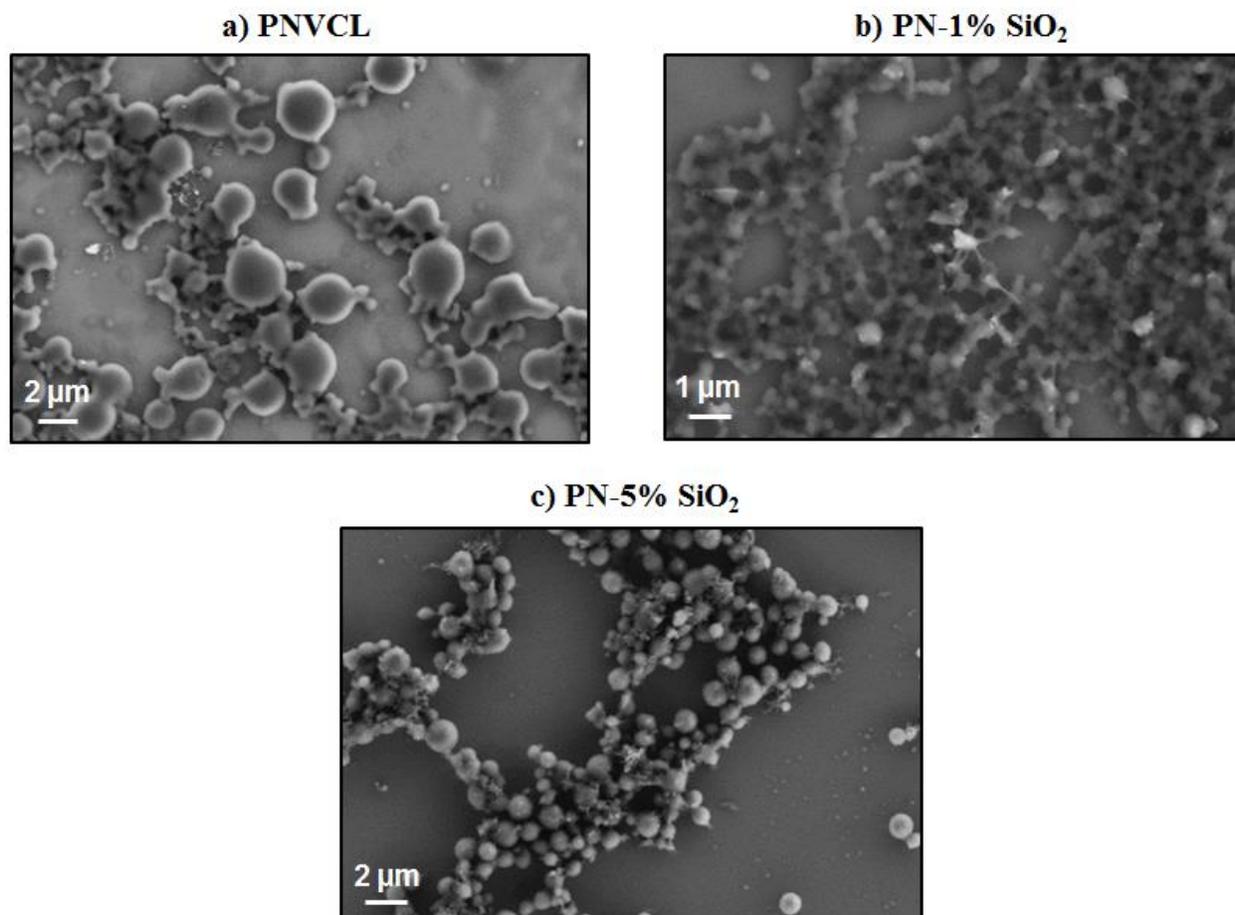


FIGURA 5.42 - Imagens de MEV das suspensões poliméricas ($0,6 \text{ mg mL}^{-1}$) de PNVCL (a) e seus nanocompósitos com 1 (b) e 5 % (c) de SiO_2 -MPS.

Até o presente momento, sistemas a base de PNVCL só foram avaliados por MEV quando preparados como microgéis reticulados sintetizados a pela polimerização por emulsão ou precipitação^{155,177-179}. Nesses casos, PNVCL é polimerizado principalmente com ácido metacrílico, formando hidrogéis em formato esférico na escala de nanômetros até micrômetros. Abaixo da LCST, as partículas incham em água e apresentam um diâmetro hidrodinâmico que é reduzido acima da LCST, devido a desidratação dessas estruturas. Diferentemente desses trabalhos, os sistemas em estudo foram sintetizados em *bulk* sem adição de reticulantes químicos,

resultando em cadeias poliméricas livres em solução abaixo da LCST. Com isso, pelo método de preparação de amostra proposto, foi possível visualizar pela primeira vez a estrutura globular formada quando suspensões poliméricas a base de PNVCL são aquecidas em uma temperatura acima da transição de fase.

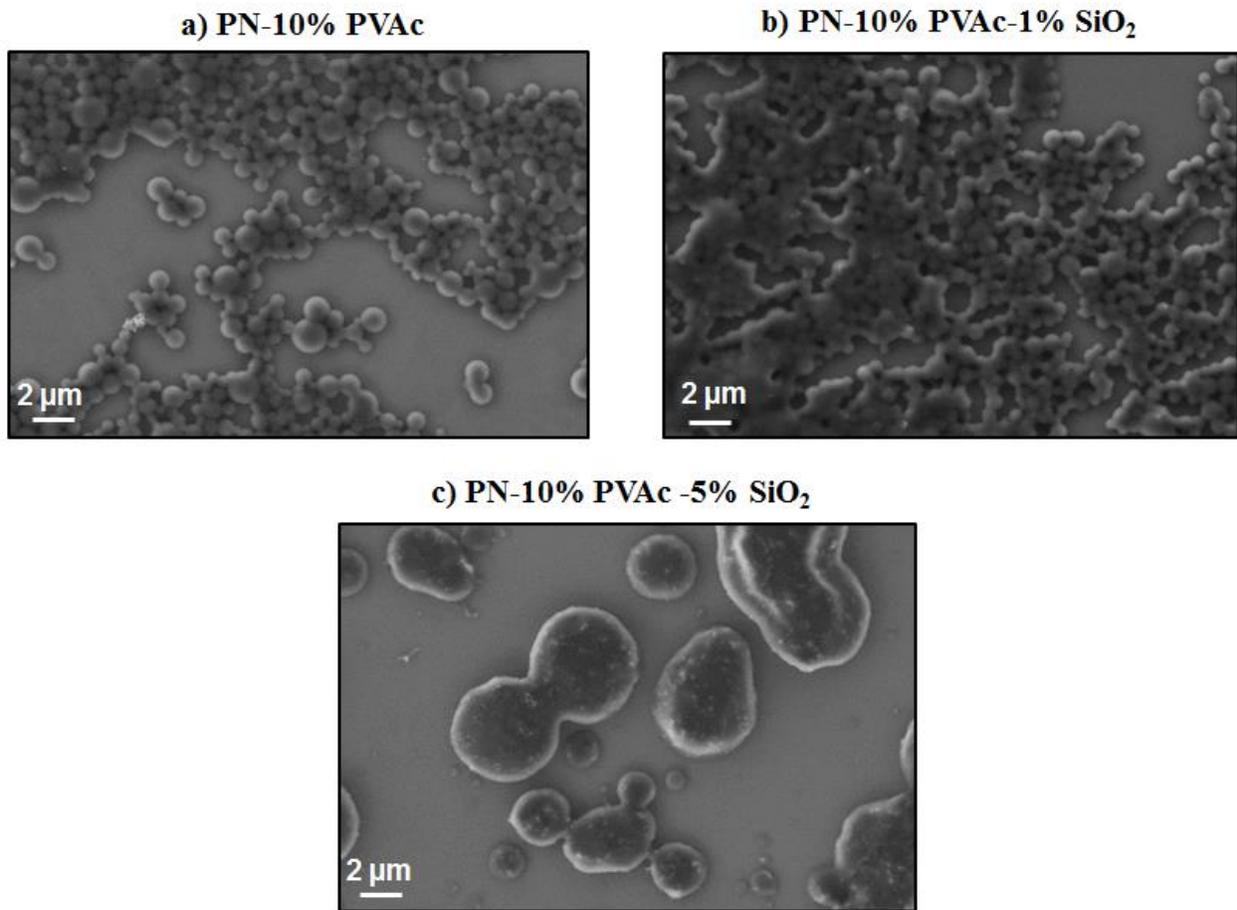


FIGURA 5.43 - Imagens de MEV das suspensões poliméricas ($0,6 \text{ mg mL}^{-1}$) de PN-10 % PVAc (a) e seus nanocompósitos com 1 (b) e 5 % (c) de SiO₂-MPS.

A aplicação de polímeros termossensíveis na área de engenharia tecidual e carreadores de fármacos é de grande interesse devido a formação de um hidrogel *in situ* no momento que atinge sua LCST¹⁸⁰. Idealmente o hidrogel injetável deve se comportar como um líquido de baixa viscosidade para ser ministrado por uma seringa e que preencha completamente o local de interesse. Posteriormente,

requer-se a gelificação rápida do hidrogel com superiores propriedades mecânicas para evitar a difusão do material do local de injeção e sua estabilidade ¹⁸¹.

A análise reológica tem sido a técnica de caracterização mais empregada para a avaliação de hidrogéis, pois por meio das suas propriedades viscoelásticas é possível obter importantes informações sobre o desempenho mecânico desses materiais. Além disso, esta é uma análise sensível que requer pequenas amostras e revela as diferenças na arquitetura, grau de reticulação, transição sol-gel, homogeneidade e heterogeneidade estrutural e massa molar ^{182,183}. Especialmente para hidrogéis que são formados *in situ* pelo aquecimento ^{184,185}, fotopolimerização ¹⁸⁶, reações click ^{187,188}, entre outros, essa técnica permite o controle e o ajuste de diversos parâmetros experimentais para o estudo detalhado desses sistemas. Uma vez que esses hidrogéis inicialmente estão no estado líquido, não podem ser moldados em um formato específico e nem apresentam resistência mecânica suficiente para serem avaliados *in situ* por tradicionais caracterizações mecânicas. Desse modo, a análise reológica tem se mostrado imprescindível na avaliação de hidrogéis para a engenharia de tecidos, cujas variações em módulos de armazenamento, grau de reticulação, reticulações irreversíveis ou dinâmicas ditam as interações com diferentes tipos células e desempenham específicas funções na regeneração e reparo de diferentes tecidos ^{189,190}.

A principal técnica reológica empregada para caracterizar hidrogéis é o cisalhamento oscilatório de pequena amplitude (COPA), empregando-se uma tensão e deformação de baixas magnitudes para não destruir ou modificar as amostras. Quando essas são avaliadas no regime linear viscoelástico, o estudo dos módulos dinâmicos G' e G'' pode deduzir aspectos importantes da estrutura do gel e do comportamento mecânico, e os módulos terão valores independentes da amplitude da deformação ¹⁸². Sendo que o módulo de armazenamento ou elástico (G') representa a medida da energia armazenada e recuperada por ciclo, enquanto o

módulo de perda ou viscoso (G'') representa a energia dissipada ou perdida como calor por ciclo de deformação senoidal ^{191,192}.

A partir da avaliação inicial de G' e G'' em função da taxa de deformação é possível determinar o regime linear viscoelástico (RLV) dos sistemas à base de PNVCL. Dessa forma, inicialmente os módulos dinâmicos de uma suspensão polimérica de PNVCL foram avaliados em função da deformação entre 0,01-100 % fixando uma frequência arbitrária de 1 Hz (Figura 5.44). Como o intuito era mimetizar a condição de injeção de biomateriais *in vivo*, o ensaio foi realizado a 37 °C, e o PNVCL disperso em tampão fosfato-salino (PBS) na concentração de 20 % massa/volume (concentração utilizada nos ensaios biológicos, descritos em mais detalhes posteriormente). Para a análise na Figura 5.44 observa-se um comportamento linear especialmente para G'' até 20 % de deformação, característico da região de RLV. Escolheu-se então um baixo valor de deformação (0,5 %) para conduzir os próximos experimentos.

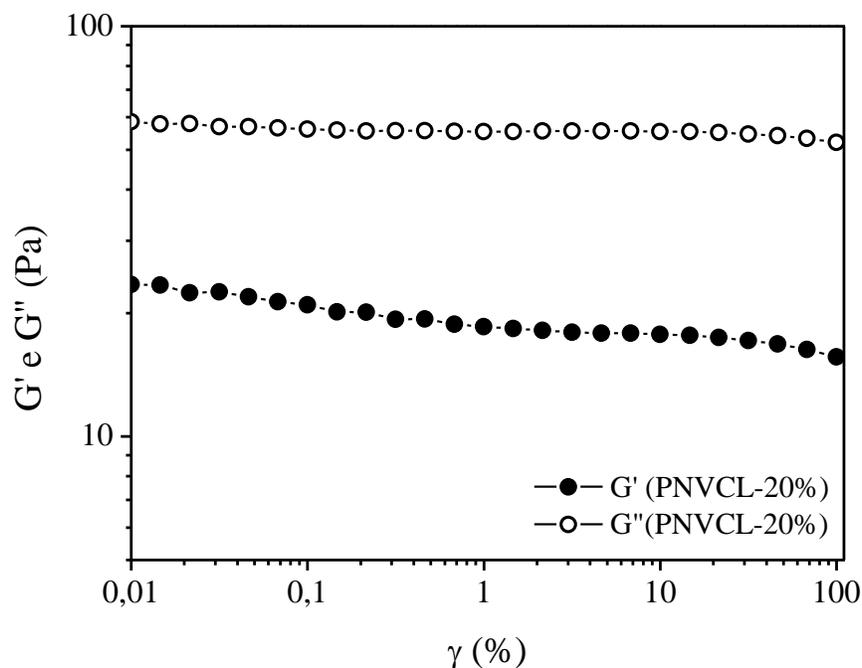


FIGURA 5.44 - Variação dos módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') da suspensão de PNVCL em função da deformação a 37 °C.

As propriedades viscoelásticas dos polímeros puros (PNVCL e PN-10 % PVAc) e dos nanocompósitos com 1 e 5 % de SiO₂-MPS foram avaliadas pelo monitoramento dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') em função da temperatura (item a das Figuras 5.45 a 5.50) e a 37 °C (item b das mesmas Figuras) para suspensões poliméricas nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 % massa/volume em PBS. Observa-se que o aumento da temperatura resulta em maiores valores de G' e G'' para todos os sistemas, independentemente da concentração de polímero, relacionado a transição de fase do estado solvado (sol) para o globular (gel) com o alcance da LCST. Para todos os materiais, é possível ver essas diferenças nos módulos G' e G'' entre 31-35 °C, dependendo da respectiva LCST (como observado anteriormente nos espectros de UV-vis), e concentração da amostra. Ao alterar a concentração da suspensão do sistema de 10 a 50 %, as propriedades reológicas são mais elevadas. Para todas as curvas G''>G', comportamento característico de materiais líquidos viscosos ¹⁹³, enquanto que G'>G'' representa materiais com comportamento de sólidos elásticos ^{194,195}, exibido principalmente por hidrogéis de alta massa molecular e cadeias poliméricas reticuladas ligações covalentes ¹⁸². Nota-se também que os valores dos módulos são crescentes mesmo em temperaturas superiores as respectivas LCSTs, e apenas se estabilizam quando a temperatura foi fixada em 37 °C.

HALLIGAN *et al.* ¹⁹⁶ também sintetizaram PNVCL e copolímeros de PNVCL-PVAc em *bulk* pela fotopolimerização, resultando em uma polidispersividade acima de 10, com M_n= 388 g mol⁻¹ e M_w= 3932 g mol⁻¹, e LCST de 32,4 °C. A partir da análise reológica de uma suspensão 3 % m/m de PNVCL, o valor máximo de G'' foi de 0,2 Pa encontrado em temperaturas acima da LCST, enquanto que para os copolímeros esses dados não estão disponíveis. A curva obtida apresentou perfil similar ao mostrado para PNVCL na Figura 5.45a com G''>G'.

Porém, eles continuaram aquecendo o sistema até 50 °C, encontrando em 47 °C o ponto de cruzamento onde $G''=G'$, e acima dessa temperatura a suspensão polimérica adquire a condição de gel com $G'>G''$. Assim, os autores encontraram 2 temperaturas, a LCST acompanhada do aumento das propriedades reológicas e a temperatura onde ocorre a transição sol-gel. No trabalho desses pesquisadores não foi mencionado a taxa de aquecimento utilizada, no entanto o alcance da condição de gel poderia ter uma contribuição cinética do arranjo macromolecular dos glóbulos poliméricos ¹⁹⁶. Afim de mimetizar o comportamento de um biomaterial injetável, no presente estudo, a temperatura máxima de aquecimento foi de 37 °C com uma taxa de aquecimento de 3 °C min⁻¹. Nessas condições não foi possível observar o cruzamento em $G''=G'$ e o comportamento de um sólido elástico com $G'>G''$. Potencialmente, análises reológicas em ampla faixa de temperatura, tempo e frequência permitiria encontrar esses pontos nas curvas de G'' e G' .

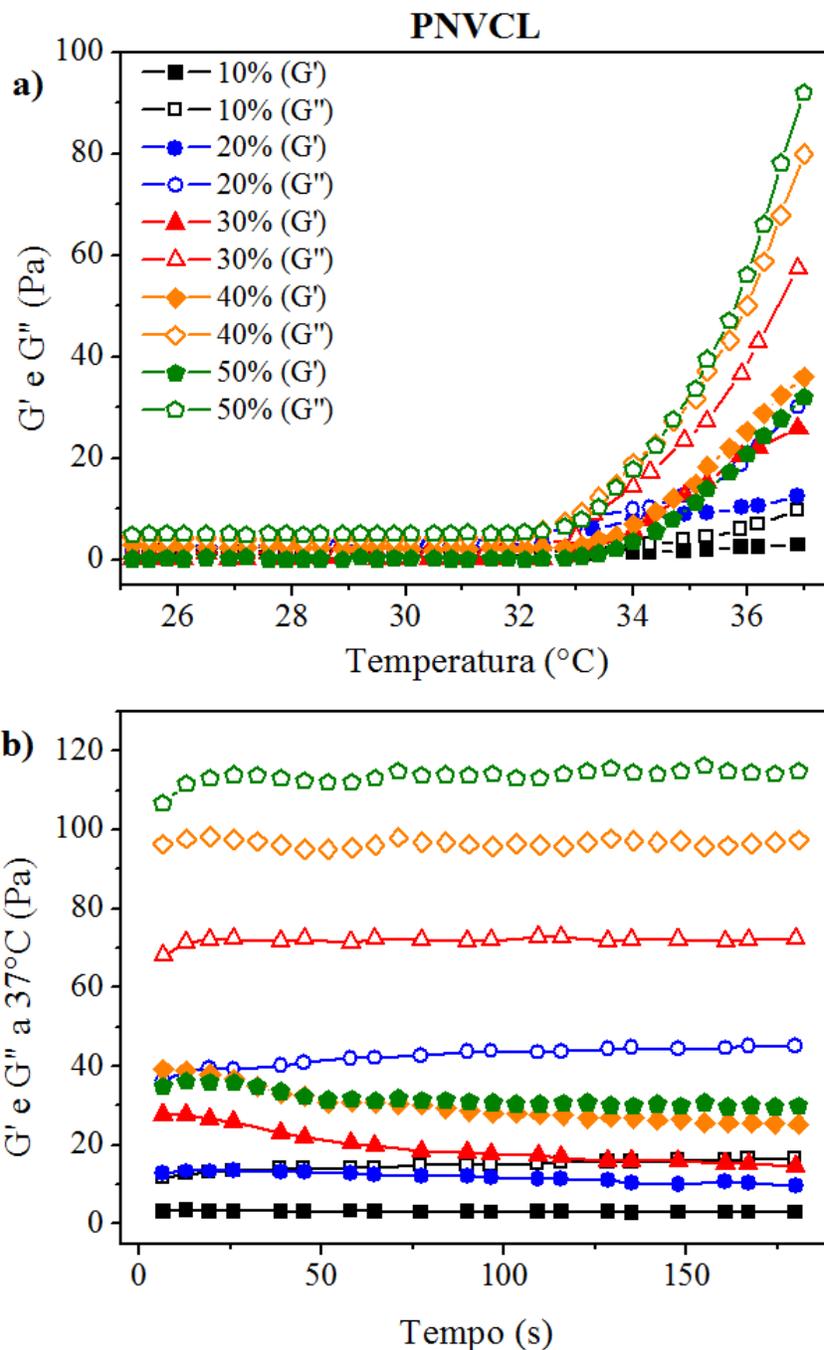


FIGURA 5.45 - Variação dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') em função da temperatura (a) e a 37°C (b) para suspensões poliméricas de PNVCL nas concentrações de 10 a 50 % m/v em PBS.

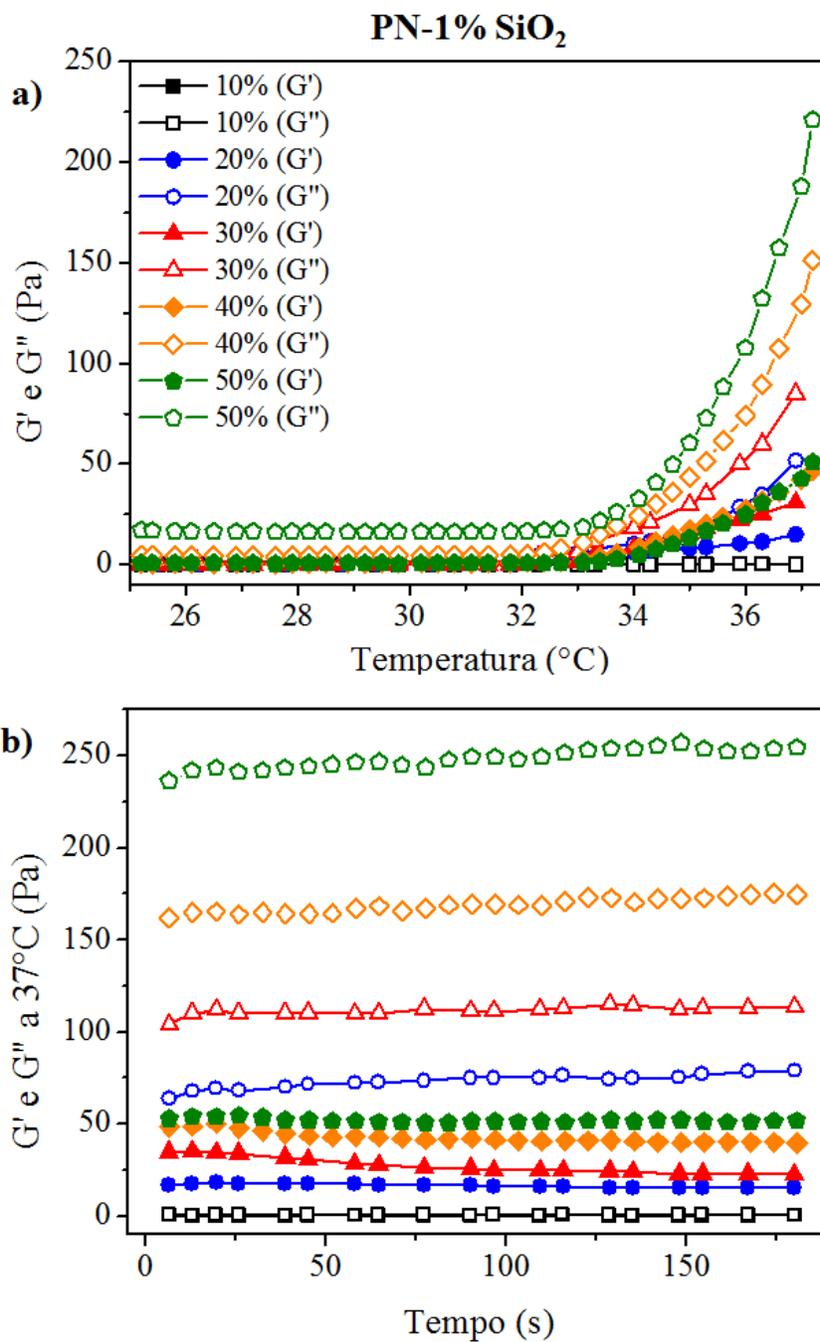


FIGURA 5.46 - Variação dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') em função da temperatura (a) e a 37°C (b) para suspensões poliméricas de PN-1 % SiO₂ nas concentrações de 10 a 50 % m/v em PBS.

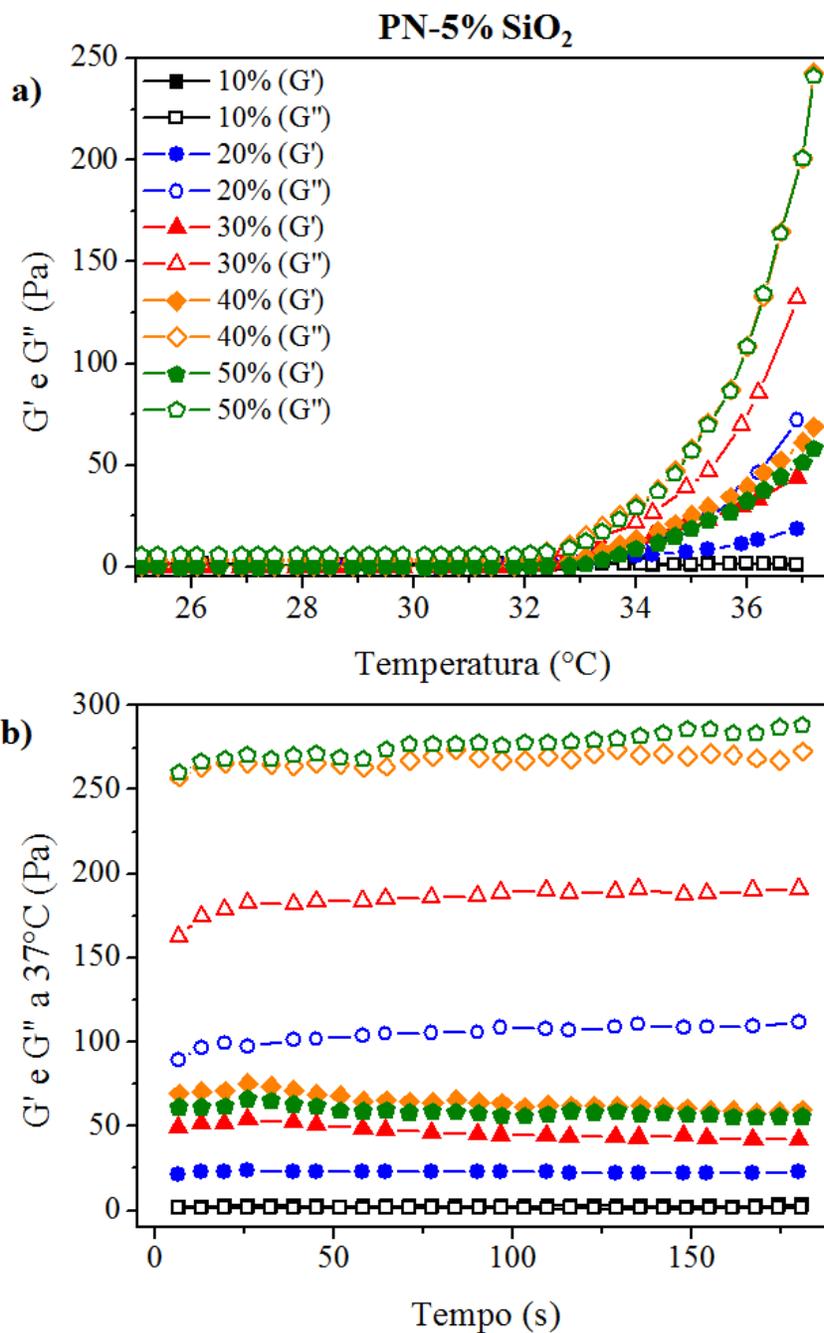


FIGURA 5.47 - Variação dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') em função da temperatura (a) e a 37°C (b) para suspensões poliméricas de PN-5 % SiO₂ nas concentrações de 10 a 50 % m/v em PBS.

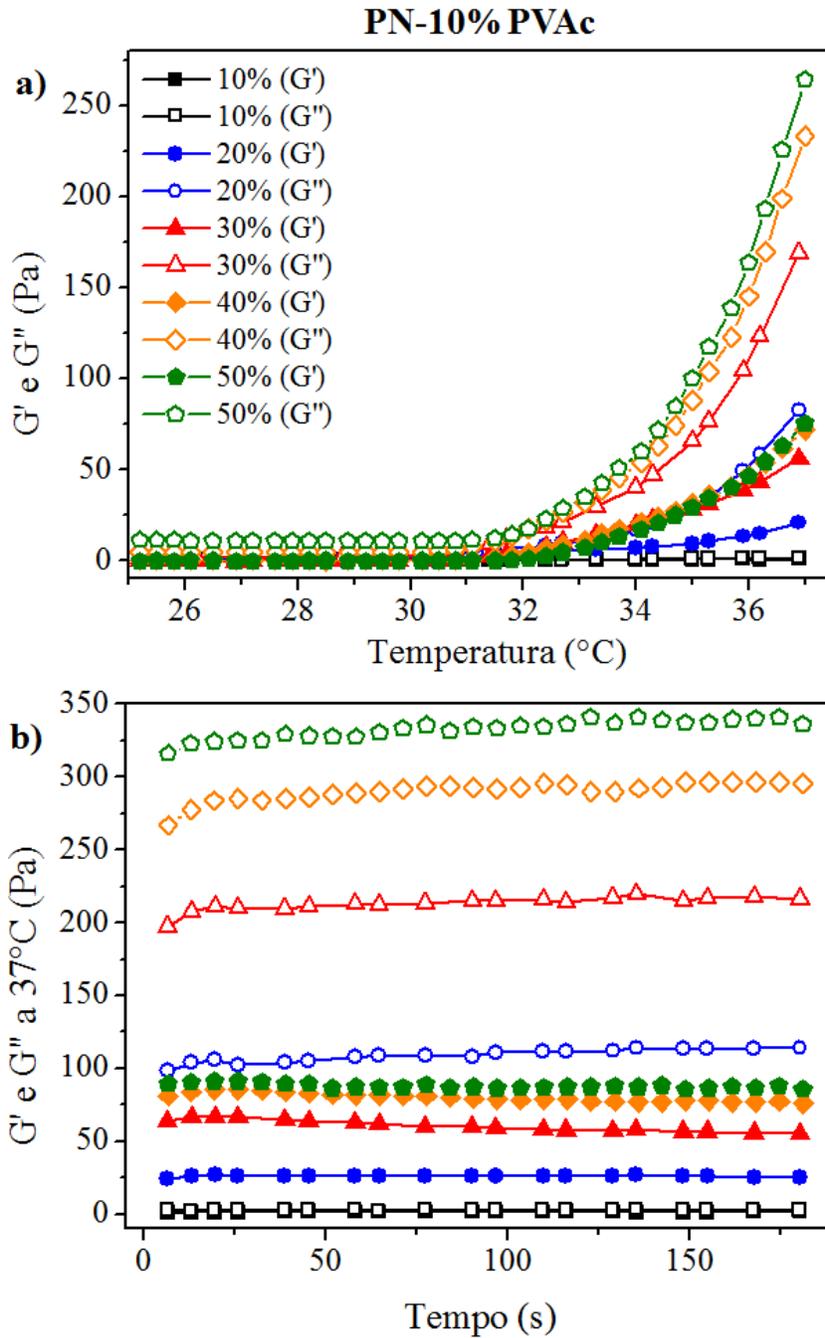


FIGURA 5.48 - Variação dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') em função da temperatura (a) e a 37°C (b) para suspensões poliméricas de PN-10 % PVAc nas concentrações de 10 a 50 % m/v em PBS.

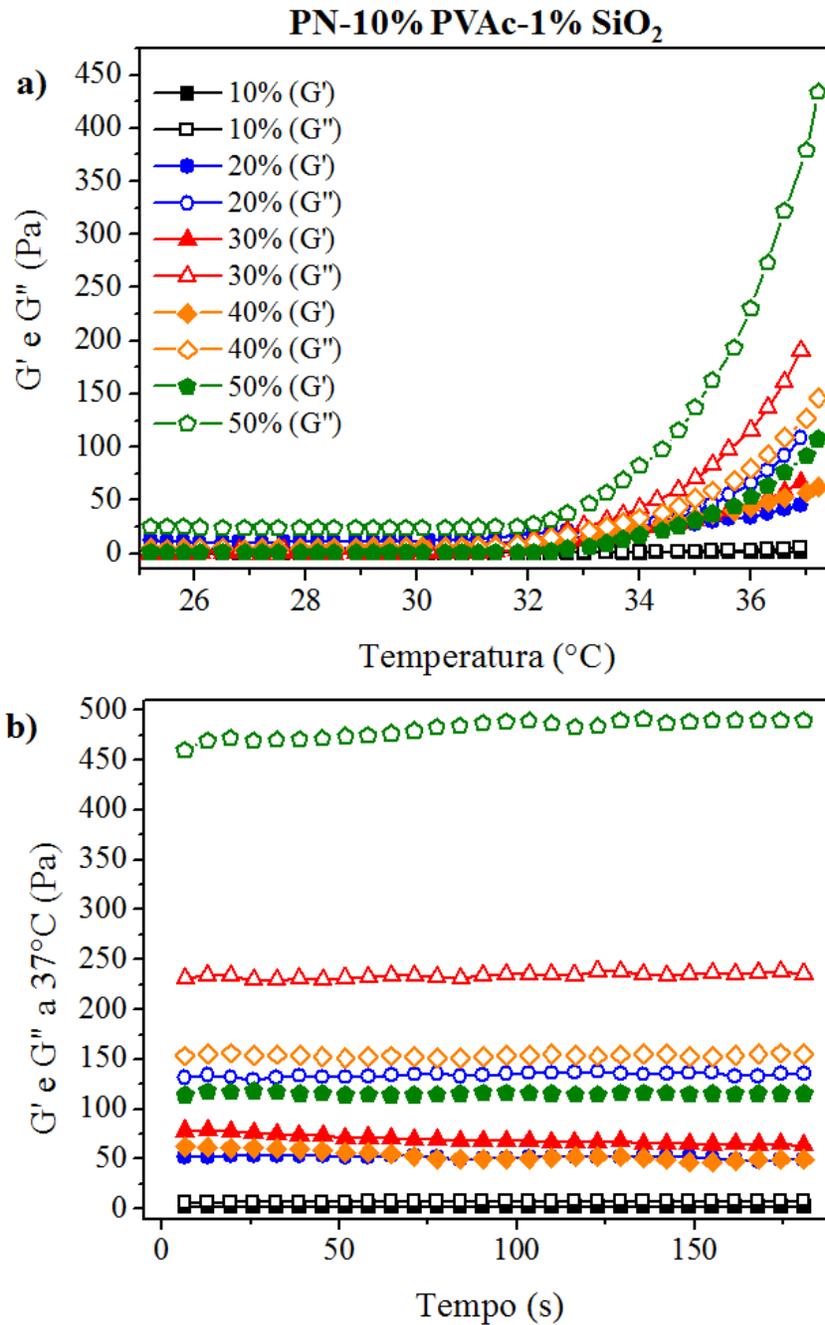


FIGURA 5.49 - Variação dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') em função da temperatura (a) e a 37°C (b) para suspensões poliméricas de PN-10 % PVAc-1 % SiO₂ nas concentrações de 10 a 50 % m/v em PBS.

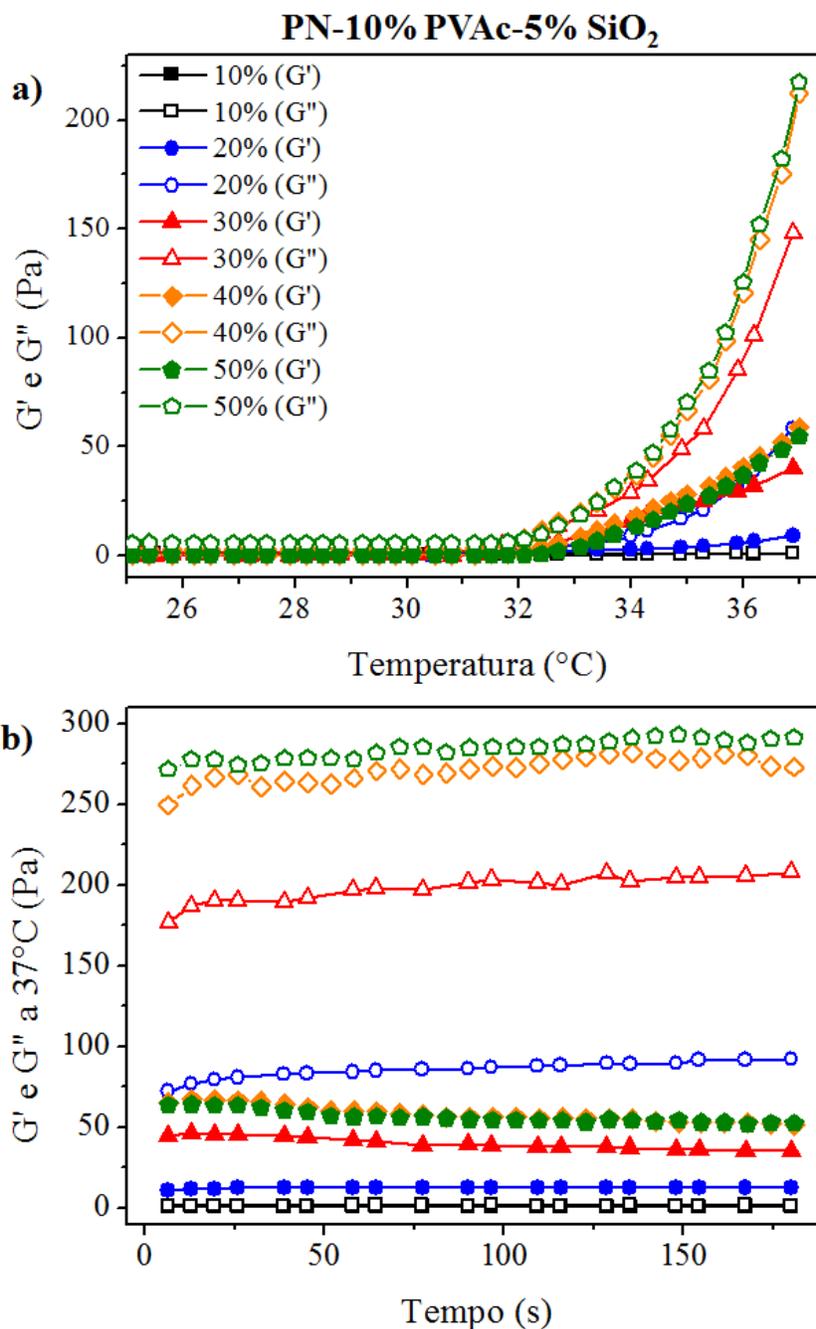


FIGURA 5.50 - Variação dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') em função da temperatura (a) e a 37°C (b) para suspensões poliméricas de PN-10% PVAc-5 % SiO₂ nas concentrações de 10 a 50 % m/v em PBS.

Os módulos de armazenamento e perda dos sistemas poliméricos a 37°C foram avaliados em função do tempo e comparados na Figura 5.51 afim de

investigar a influência do PVAc e das nanofibras de sílica nas propriedades reológicas dos materiais a base de PNVCL. A presença desses componentes aumentou os valores de G' e G'' do PNVCL em até 5 vezes, sem perder o comportamento termossensível. Esse aumento pode ser resultado de uma interação eficiente entre os componentes, mesmo em baixas concentrações e a formação de um sistema interligado tridimensionalmente ^{193,197}. Enquanto PNVCL e PN-10 % PVAc na presença de 1 % de SiO₂-MPS tiveram acréscimo nas suas propriedades reológicas, com 5 % de SiO₂-MPS esses valores foram levemente superiores ou inferiores, respectivamente. Apesar da ausência de artigos sobre nanocompósitos a base de PNVCL, esses resultados obtidos quando comparados a outras matrizes poliméricas demonstraram comportamento distinto. Por exemplo, NUSSER *et al.* ¹⁹⁸ e XU *et al.* ¹⁹⁹ relataram nanocompósitos com crescentes propriedades reológicas com o aumento na concentração de silsesquioxanos poliédricos e argilas distribuídos na matriz polimérica. Com isso, reduzidos valores dos módulos ou um crescimento não linear dos mesmos podem estar relacionados a presença de heterogeneidades como agregados de sílica, adicionando defeitos aos sistemas e reduzindo G' e G'' . Ademais, nas concentrações de 30 a 50 % observa-se variações dos valores de G'' e G' ao longo do tempo a 37 °C. Para estas maiores concentrações, a solvatação dos materiais em PBS em temperatura ambiente pode não ter sido muito eficiente e resultado em heterogeneidades durante o aquecimento e a transição de fase nos ensaios reológicos.

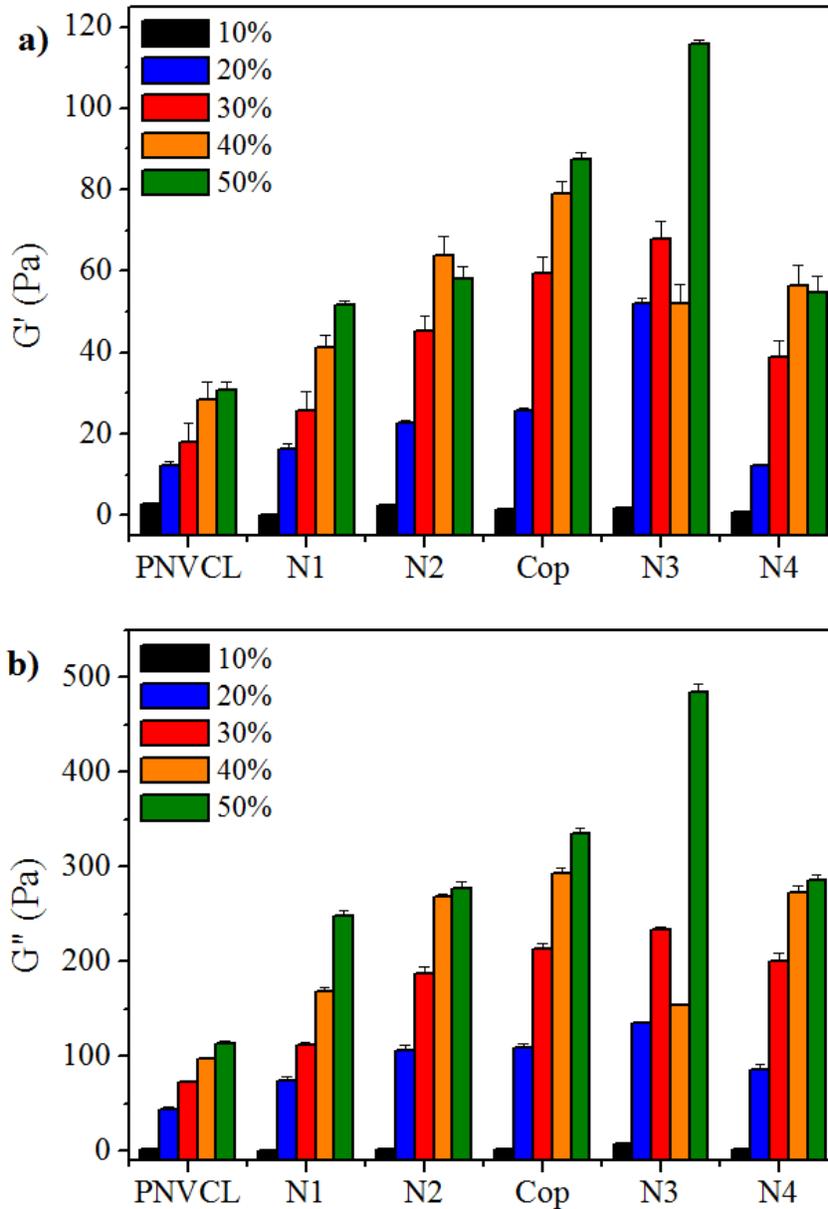


FIGURA 5.51 - Módulos de armazenamento (G' , a) e perda (G'' , b) a 37 °C em função do tempo para os materiais nas concentrações de 10 a 50 % m/v em PBS, em que Cop (PN-10 % PVAc), N1 (PN-1 % SiO_2), N2 (PN-5 % SiO_2), N3 (PN-10 % PVAc-1 % SiO_2) e N4 (PN-10 % PVAc-5 % SiO_2).

Similarmente, JIANG *et al.*²⁰⁰ sintetizaram nanocompósitos a base de hidrogéis de poli(acrilamida) e variando-se a concentração de sílica encontram distintas propriedades reológicas. Para as concentrações 1, 2 e 3% de sílica, as curvas de G' aumentaram, enquanto que na concentração de 4 % os valores de G' reduziram porém ainda superiores ao polímero puro (similar ao observado no presente estudo). Eles relacionaram o aumento inicial das propriedades reológicas com a formação de uma rede interligada de cadeias poliméricas e sílica, que contribuíram para o aumento da porção elástica do nanocompósito. Por outro lado, a redução dos valores de G' foi provocado por um excesso de sílica que provavelmente inibiu a polimerização *in situ* do hidrogel e a formação dessa rede entre os componentes²⁰⁰.

Assim, diferentemente dos hidrogéis injetáveis formados por reações químicas que podem resultar em toxicidade local, tempo de gelificação lenta e gelificação irreversível^{28,201}, os materiais em estudo podem ser obtidos com propriedades reológicas ajustáveis pelo presença do comômero VAc, nanofibras de sílica e concentração do material, além de rápida resposta ao estímulo da temperatura. Ademais, os materiais atingiram o estado globular sem a necessidade de reticulantes adicionais, com valores de módulo estáveis na temperatura de 37 °C e com comportamento de sistema polimérico viscoso ($G'' > G'$).

Até o momento, as análises foram feitas para as dispersões coloidais poliméricas. Para investigar o comportamento térmico dos materiais por análises de TG e DSC, as amostras foram secas na forma de filmes. Porém, ao manuseá-las nota-se que os filmes são transparentes, extremamente quebradiços; por outro lado, quando as nanofibras de sílica estavam presentes, formou-se um filme contínuo, homogeneamente opaco e com menor aspecto quebradiço. Essas diferenças, associadas a maiores propriedades reológicas em solução aquosa, é uma indicação que modificar as nanopartículas de SiO₂ com MPS é uma eficiente estratégia de melhorar a interação entre a sílica e o polímero durante a polimerização *in situ*.

A estabilidade térmica dos polímeros e dos nanocompósitos foi determinada pelas curvas de perda de massa e suas primeiras derivadas presentes na Figura 5.52 e foram normalizadas para excluir a perda de massa referente a adsorção de água que é observada até 200 °C. A temperatura inicial de perda de massa (T_{inicial}) foi determinada pela interseção da extrapolação da curva da massa inicial com a tangente da inclinação máxima da curva de TG na Figura 5.52a. Já a temperatura de perda de massa máxima (T_{max}) foi obtida pelo pico da primeira derivada (Figura 5.52b) e ΔT representa a diferença entre T_{max} e a temperatura inicial que essa perda máxima ocorre (T_1), e está relacionado à cinética de degradação térmica. T_{max} e T_1 estão indicados na Figura 5.52b. Assim, quanto maior o valor de ΔT , mais lento é a liberação de voláteis durante o processo de degradação²⁰². A Tabela 5.10 mostra os parâmetros obtidos das curvas de TGA para os materiais.

O início da degradação do PNVCL ocorreu em 384 °C e a perda de massa máxima foi em 422 °C, como similarmente relatado por KOZANOĞLU *et al.*²⁰³ e DURKUT *et al.*¹⁸³. Esses autores realizaram os experimentos em atmosfera de nitrogênio e as curvas resultantes da perda de massa continham apenas um patamar de degradação. No entanto, na curva de PNVCL um pequeno patamar adicional está presente e com perda de massa máxima em aproximadamente 522 °C. Ele indica que após a principal etapa de degradação térmica forma-se um resíduo estável que apenas posteriormente é oxidado. Um dos prováveis compostos provenientes da degradação térmica do PNVCL advém da abertura do anel caprolactama, resultando na estrutura da unidade monomérica da poliamida 6 ou Nylon 6. Curvas de perda de massa de Nylon 6 foram obtidas em ar, com dois patamares de degradação similares aos obtidos para o PNVCL, porém com valores de T_{max} em 460 °C e 560 °C^{204,205}. Com isso, provavelmente ambos polímeros exibem similares processos de degradação térmica.

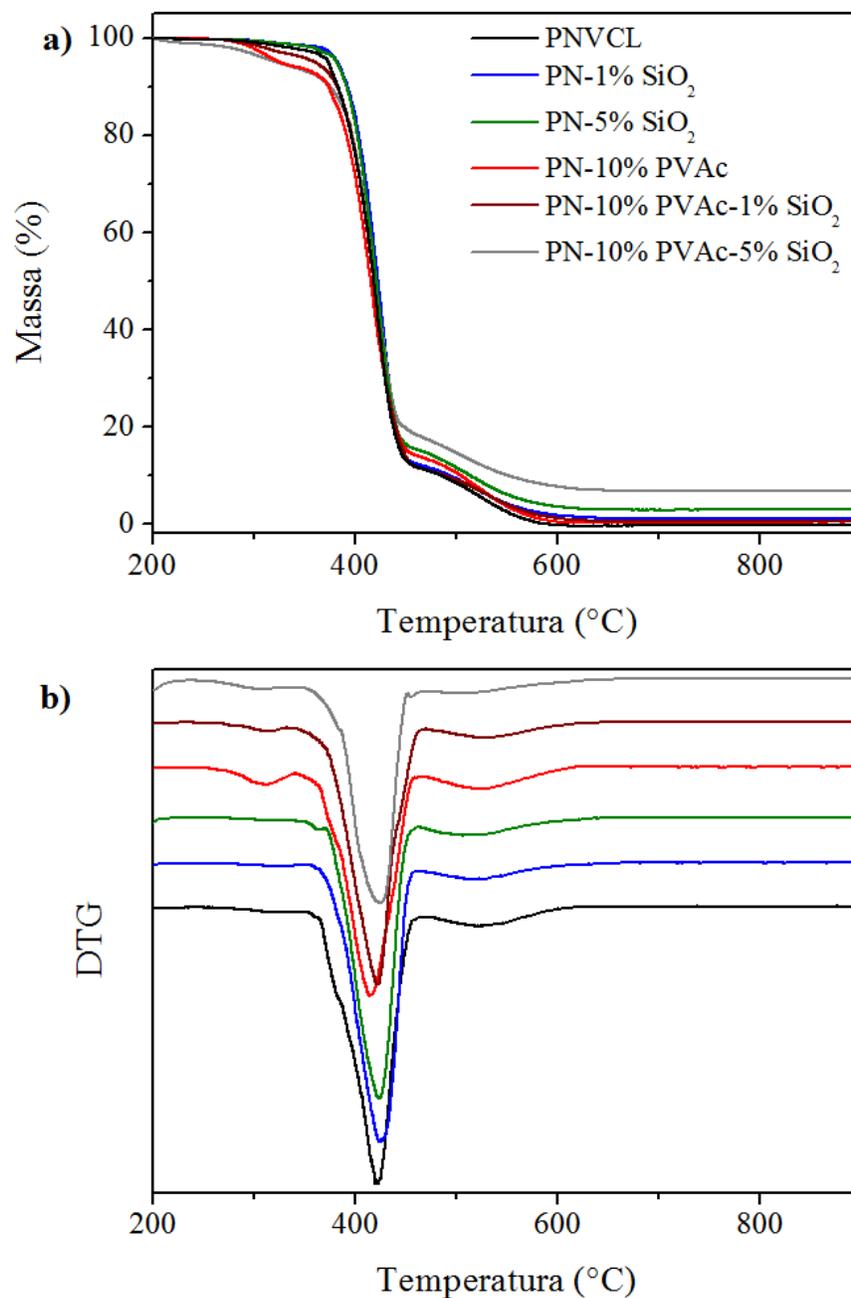


FIGURA 5.52 - Curvas de perda de massa (a) e suas primeiras derivadas (b) do PNVCL, do PNVCL-10% PVAc e dos seus nanocompósitos com 1 e 5 % de SiO₂-MPS.

TABELA 5.10 - Parâmetros térmicos obtidos a partir das curvas de TG para PNVCL, PN-10 % PVAc e seus nanocompósitos com 1 e 5 % de SiO₂-MPS.

Material	T_{inicial} (°C)	T_{max} (°C)	ΔT (°C)	Massa residual (%)
PNVCL	384	422	107	0
PN-1 % SiO ₂	393	425	105	1,1
PN-5 % SiO ₂	394	424	113	2,8
PN-10 % PVAc	380	415	119	0,3
PN-10 % PVAc-1 % SiO ₂	385	422	120	0,6
PN-10 % PVAc-5 % SiO ₂	387	424	112	6,3

Para o copolímero PN-10 % PVAc observa-se um terceiro patamar de perda de massa adicional aos presentes para PNVCL e com T_{max} em 310 °C. Pela literatura ^{206,207}, PVAc apresenta uma degradação mássica máxima próxima a 300 °C, e MAURIN *et al.* ²⁰⁸ demonstraram que as curvas de perda de massa de copolímeros de etileno e PVAc continham o mesmo patamar presente em PN-10% PVAc. Essa perda de massa inicial é referente a degradação das unidades de VAc com a liberação de ácido acético ²⁰⁸. A respeito da degradação máxima obtida para o copolímero, T_{inicial} e T_{max} foram levemente inferiores ao PNVCL e com maior valor de ΔT, indicando que a cinética de degradação foi mais lenta do que para o PNVCL puro.

A partir dos dados da Tabela 5.10, observa-se que T_{inicial} e T_{max} foram levemente superiores para todos os nanocompósitos, indicando que as nanofibras podem ter retardado a liberação de voláteis na etapa inicial e a temperatura máxima de degradação térmica ^{109,209}. A respeito dos valores de ΔT, na presença de 1 % de SiO₂-MPS os nanocompósitos apresentaram valores similares aos polímeros puros correspondentes. Enquanto que os nanocompósitos PN-5 % SiO₂ e PN-10 % PVAc-

5% SiO₂ exibiram valores superior e inferior, respectivamente. Assim, esse pequena diminuição de ΔT pode estar associado a uma possível catálise da degradação do PVAc pelas nanofibras de sílica por meio de um mecanismo radicalar dos oxigênios reativos na quebra das cadeias. FUKUSHIMA *et al.*²¹⁰ observaram comportamento similar na degradação de nanocompósitos de sílica a base de poli(ácido láctico). Por outro lado, PN-5 % SiO₂ apresentou maior ΔT pois provavelmente, a presença de nanopartículas retardou a difusão de gases através da massa polimérica pelo aumento do caminho livre médio do gás no PNVCL, diminuindo assim a cinética de liberação²⁰².

A quantidade de sílica encontrada a 800 °C para os nanocompósitos são mostrados na Tabela 5.10. Nessa temperatura, toda a fração de material orgânico já foi degradada e por isso não há massa residual para PNVCL e PN-10 % PVAc. As nanofibras de sílica funcionalizadas discutidas anteriormente continham aproximadamente 14,7 % de MPS, que a 800 °C também já foi eliminado. Assim a massa residual dos nanocompósitos representa a composição inorgânica de sílica que quando adicionadas nas concentrações de 1% e 5% na síntese dos nanocompósitos deveria apresentar uma massa residual de 0,8% e 4,3%, respectivamente. Conforme o aumento da concentração de sílica nos nanocompósitos, maior foi a massa residual encontrada. Porém, nota-se uma variação das massas encontradas em comparação com as concentrações inicialmente adicionadas. Esses resultados indicam que possivelmente durante a etapa de purificação dos nanocompósitos, nanofibras de sílica e até mesmo cadeias poliméricas não ligadas ou com menores tamanhos de cadeias foram eliminadas no procedimento de centrifugação e lavagem, contribuindo para a alteração da massa residual encontrada.

Além disso, os espectros de UV-vis dos nanocompósitos previamente mostrados exibiram uma turbidez abaixo da LCST distinta para os nanocompósitos com a mesma concentração de sílica, porém com diferentes matrizes poliméricas.

Uma das hipóteses era que os nanocompósitos a base de PNVCL poderiam conter uma maior concentração de nanofibras e por isso sua transmitância inicial era menor do que os materiais a base de PN-10 % PVAc. Pelas curvas apresentadas, PN-10 %-1 % SiO₂ contém menos sílica, enquanto PN-10 %-5 % SiO₂ tem maior concentração de nanofibras do que os nanocompósitos de PNVCL. Dessa forma, a turbidez desigual dos nanocompósitos nas temperaturas abaixo da LCST é resultante da formação de distintas interações e arranjos macromoleculares entre as nanofibras de sílica e as matrizes poliméricas.

A temperatura de transição vítrea (T_g) e da capacidade calorífica específica (ΔC_p) identificada a partir do segundo ciclo de aquecimento na análise de DSC para PNVCL, PN-10 % PVAc e seus nanocompósitos com 1 e 5 % de SiO₂-MPS são mostradas na Figura 5.53 e os valores de T_g e ΔC_p são encontrados na Tabela 5.11. Nanocompósitos de PNVCL com 1 % e 5 % de SiO₂-MPS tiveram um aumento de 10 °C e 8 °C, respectivamente quando comparados ao PNVCL puro. Maiores valores de T_g para nanocompósitos podem ser atribuídos ao movimento segmentado confinado das cadeias moleculares interagindo com as nanofibras mesoporosas, reduzindo a mobilidade das cadeias poliméricas²¹¹, como também um aumento da massa molar média da nova estrutura interligada formada. Para os nanocompósitos de PN-10 % PVAc, apenas na presença de 5 % de SiO₂ a T_g resultante teve um aumento de 4 °C. Durante a transição vítrea dos materiais, ΔC_p que está relacionado a relaxação das regiões amorfo rígidas na matriz polimérica, sofreu uma pequena redução para todos os materiais quando comparados ao PNVCL puro. Isso é uma indicação que a interação entre a sílica e as matrizes poliméricas formou uma região interfacial mais rígida que favorece a redução de ΔC_p ¹⁰⁵.

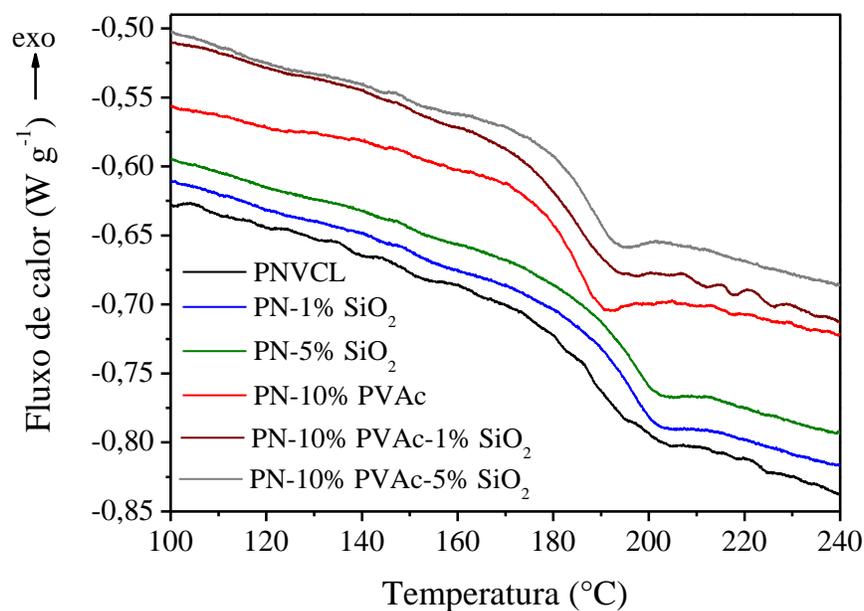


FIGURA 5.53 - Curvas de DSC do PNVCL, do PNVCL-10% PVAc e dos seus nanocompósitos com 1 e 5% de SiO₂-MPS.

TABELA 5.11 - Valores de T_g e ΔC_p para PNVCL, PN-10% PVAc e seus nanocompósitos.

Material	T _g (°C)	ΔC _p (J g ⁻¹ K ⁻¹)
PNVCL	188	0,31
PN-1 % SiO ₂	198	0,29
PN-5 % SiO ₂	196	0,28
PN-10 % PVAc	185	0,28
PN-10 % PVAc-1 % SiO ₂	185	0,30
PN-10 % PVAc-5 % SiO ₂	189	0,27

5.4-Estudo da atividade biológica dos polímeros e nanocompósitos

A área de engenharia de tecidos cartilagosos é de crescente interesse devido à limitada capacidade da cartilagem de se autoreparar e regenerar pela ausência de vascularização ali presente. Assim, há a demanda de novas tecnologias para reparar a cartilagem danificada por lesões traumáticas e osteoartrite, comumente encontrada em idosos ^{194,212,213}. Atualmente, os tratamentos clínicos existentes para o reparo da cartilagem articular envolvem microfraturas, o transplante autólogo de condrócitos, o transplante osteocondral e o implante de *scaffolds*, representados na Figura 5.54 ²¹⁴. Embora essas terapias tenham reduzido a dor e retardado a degeneração da cartilagem, ainda apresentam limitações como procedimentos cirúrgicos complicados, risco de infecções, baixa integração com o tecido circundante e formação de fibrocartilagem, composta principalmente de colágeno tipo I, que possui propriedades mecânicas e químicas inferiores às da cartilagem hialina ^{194,212,214-216}. A cartilagem articular é a cartilagem hialina nas superfícies articulares dos ossos e dentro da cavidade articular ²¹⁷. Ela é formada por diversos componentes, principalmente água, fibrilas de colágeno tipo II e proteoglicanos, cuja unidade básica são os glicosaminoglicanos (GAG), um dos responsáveis pelas propriedades hidrofílicas dos proteoglicanos e conferem ao tecido cartilaginoso a capacidade de suportar altas cargas compressivas ^{218,219}.

A cartilagem articular tem uma arquitetura distribuída em zonas (Figura 5.55) com variações de composição bioquímica e distribuição de células. Células com fenótipo de células tronco mesenquimais são detectadas na zona superficial, enquanto abaixo os condrócitos são encontrados em diferentes distribuições e são responsáveis pela secreção dos componentes da matriz extracelular cartilaginosa como colágeno, glicoproteínas e proteoglicanos ^{220,221}.

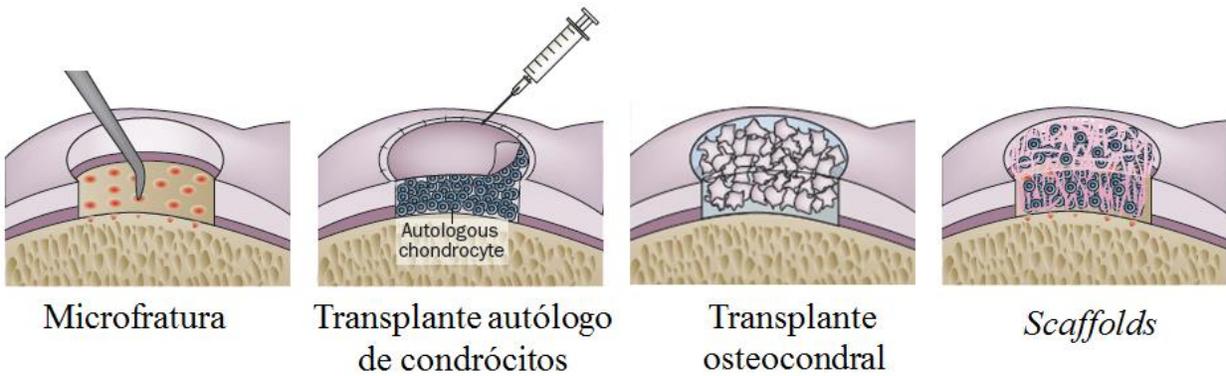


FIGURA 5.54 - Representação dos tratamentos clínicos utilizados para o reparo da cartilagem articular proposto por MAKRIS *et al.* ²¹⁴.

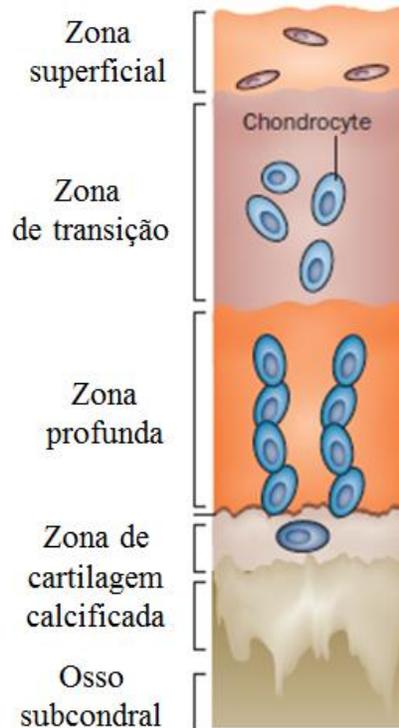


FIGURA 5.55 - Distribuição de células na cartilagem articular saudável proposto por JIANG e TUAN ²²¹.

Os principais *scaffolds* desenvolvidos para a reconstrução de cartilagem empregam condrocitos (CDs) ou células tronco mesenquimais (CTMs). Embora

condrócitos são as células típicas da cartilagem, há a possibilidade de perderem sua habilidade de produzir componentes da matriz extracelular do tecido cartilaginoso quando expandidos em cultura *in vitro*, no fenômeno conhecido como dediferenciação ²²¹.

Já as células tronco mesenquimais são células multipotentes capazes de se diferenciar em linhagens ostogênicas, condrogênicas e adipogênicas (Figura 5.56) mediante moléculas indutoras na suplementação do meio de cultura. Contudo, quando as CTMs são inseridas no tecido cartilaginoso lesionado, as condições microambientais podem não induzir ou manter a diferenciação condrogênica mesmo na presença dos agentes indutores ²²⁰. Além disso, a diferenciação das CTMs cultivadas em *scaffolds* é influenciada pelo formato, topografia, densidade de reticulações, propriedades viscoelásticas e mecânicas dos hidrogéis e tecidos empregados ^{119,189,190,222}. As CTMs também exibem a tendência de sofrer alterações fenotípicas hipertróficas sob indução condrogênica e conseqüentemente a calcificação da matriz de neocartilagem. BIAN *et al.* ¹¹⁹ variaram a densidade da reticulação química do hidrogel ácido hialurônico e observaram que o aumento do grau de reticulações diminuiu a formação e a distribuição da matriz extracelular por CTMs. Além disso, promoveu a conversão hipertrófica das CTMs e a mineralização da neocartilagem tanto *in vitro* como *in vivo*. Esses resultados demonstraram que a densidade de reticulação de hidrogéis ditam a diferenciação condrogênica de CTMs uma vez que modifica as propriedades mecânicas, a difusividade de solutos e a permeabilidade da matriz tridimensional em que as células estão inseridas ¹¹⁹.

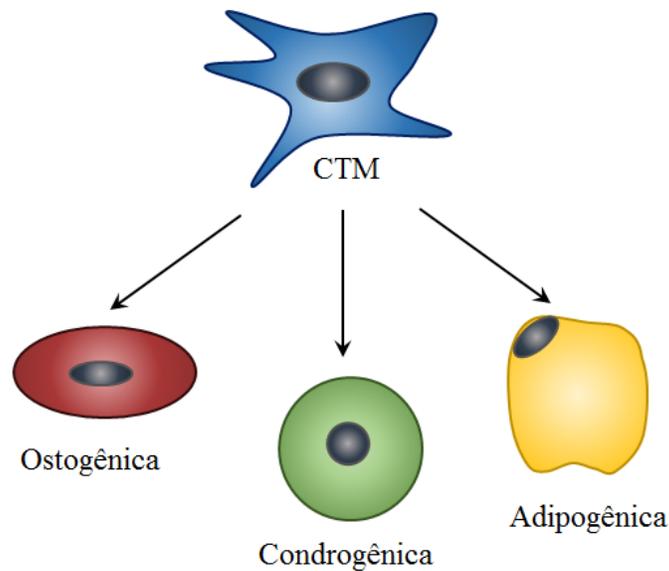


FIGURA 5.56 - Diferenciação de células tronco mesenquimais em linhagens ostogênicas, condrogênicas e adipogênicas.

Assim, o desenvolvimento de biomateriais para a reconstrução de cartilagem envolve grande desafios que incluem desde o tipo de célula a ser utilizada, até as propriedades físico-químicas, biológicas e desempenho dos materiais ao longo do tempo. Entre esses biomateriais, os hidrogéis termossensíveis são potenciais materiais para a engenharia tecidual de cartilagens pois são formados após o processo de injeção *in vivo* induzido pela temperatura fisiológica. Com isso, podem ser implantados de maneira minimamente invasiva, além de preencher completamente o defeito e incorporar células, agentes terapêuticos e fatores de crescimento, que estimularão a formação da matriz extracelular e o reparo do tecido ^{119,223-226}.

O PNVCL é apontado na literatura por ser biocompatível e ganha destaque em aplicações como sistemas para a entrega controlada de fármacos e imobilização de enzimas ^{48,227,228}. Entretanto, poucos trabalhos relatam o uso de PNVCL na engenharia tecidual, as interações entre matriz polimérica e células, e a formação de tecidos *in vitro* e *in vivo* ^{55,56,229}. Entre eles, LYNCH *et al.* ⁵⁵ prepararam hidrogéis de PNVCL com ácido hialurônico modificado com anidro metacrílico

(MeHA) com baixas propriedades reológicas ($G' < 8$ Pa) e observaram sistemas biocompatíveis quando cultivados por 10 dias na presença de CDs. Eles quantificaram a presença de glicosaminoglicanos, componente utilizado para avaliação da produção de componentes da matriz extracelular da cartilagem, e notaram maiores valores para os hidrogéis preparados apenas por MeHA. Hidrogéis apenas de PNVCL não foram testados, mas os autores observaram a formação de hidrogéis injetáveis que induziram a formação dos componentes da neocartilagem. SHAKYA *et al.*⁵⁶ implantaram diferentes criogéis reticulados de PNVCL acelulares em camundongos e avaliaram sua toxicidade e degradação. Apesar do PNVCL não ser considerado um polímero degradável, nos ensaios *in vitro* e *in vivo* houve a degradação de 30 % e 75%, respectivamente, e não induziu a toxicidade sistêmica ou local na região da implantação. O mecanismo de degradação dos criogéis no meio biológico é um processo complexo que envolve características tanto do material quanto processos químicos e biológicos do meio, porém nesse estudo eles notaram uma ação combinada dos processos de degradação extracelular e fagocitose por macrófagos ativados.

5.4.1- Ensaios com células tronco mesenquimais humanas (CTMs)

No presente estudo, a viabilidade celular dos polímeros e nanocompósitos sintetizados foram avaliados na presença de células tronco mesenquimais humanas e condrócitos bovinos, e posteriormente os materiais foram cultivados por até 8 semanas em meio indutor condrogênico para avaliar se os materiais atuavam como *scaffolds* para o crescimento de neocartilagem.

O PNVCL tem demonstrado ser biocompatível e bem tolerado por células^{48,77}. Entretanto, dependendo da massa molecular, da concentração e da presença de comônômeros, os materiais podem resultar em citotoxicidade¹⁴⁸. A

citotoxicidade relacionada a massa molecular tem sido associada a hidrogéis com cadeias poliméricas mais curtas, em particular aquelas que podem penetrar na membrana celular, alterando a atividade celular. No caso de polímeros com maior massa molecular, acredita-se que os efeitos citotóxicos estejam relacionados à redução da difusão de nutrientes e oxigênio para as células, levando à morte celular²³⁰.

Inicialmente, a citocompatibilidade dos polímeros e nanocompósitos em diferentes concentrações foi avaliada pela técnica colorimétrica com alamarBlue® na presença de CTMs. Este indicador fluoresce e muda de cor em resposta à redução química do meio de cultura, resultante da atividade metabólica das células vivas²³¹. Para esse ensaio, uma suspensão de células foi adicionada em uma placa de 96 poços e cultivada por 24 h, formando uma monocamada de células. Em seguida, dispersões poliméricas nas concentrações de 10, 50 e 100 mg/mL foram adicionadas à placa de cultura celular, como representado na Figura 5.57, incubadas por 1 e 3 dias a 37 °C e avaliadas pelo ensaio com alamarBlue® utilizando um leitor de placas. A Figura 5.58 mostra a viabilidade celular obtida para os materiais após 1 e 3 dias de cultivo.

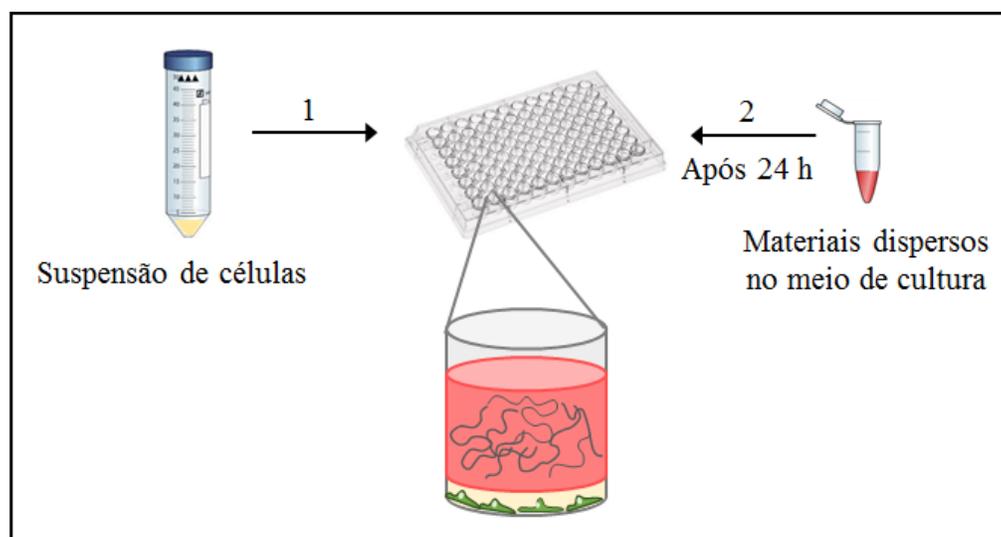


FIGURA 5.57 - Representação do cultivo celular bidimensional na presença de dispersões poliméricas para o ensaio de citotoxicidade.

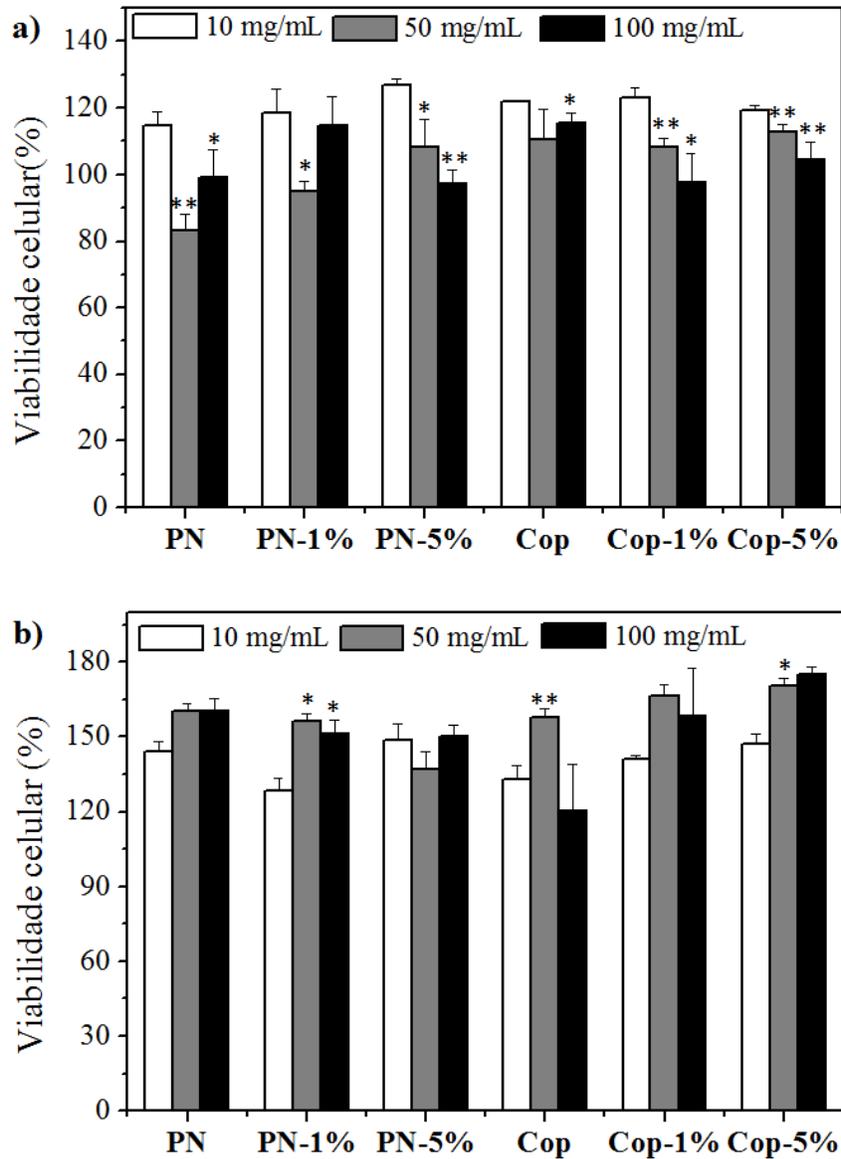


FIGURA 5.58 - Viabilidade celular avaliada via ensaio com alamarBlue® após 1 (a) e 3 dias (b) de cultivo de CTMs na presença de suspensões poliméricas em diferentes concentrações. PN-1 % e PN-5 % representam nanocompósitos de PNVCL com 1 % e 5 % de SiO₂-MPS, Cop representa PN-10 % PVAc e Cop-1 % e Cop-5 % representam os nanocompósitos de PN-10 % PVAc com 1 % e 5 % de SiO₂-MPS. *,** indicam significância estatística ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) versus material correspondente com concentração de 10 mg/mL.

Após o primeiro dia de incubação, os materiais apresentaram viabilidade celular acima de 80 % de acordo com a concentração dos componentes. Para a concentração de 10 mg mL⁻¹, a viabilidade celular foi superior a 100 % para todos os materiais, indicando atividade metabólica superior ao grupo controle (incubados apenas em meio de cultura), geralmente resultante da proliferação celular^{231,232}. Após 3 dias do cultivo de CTMs na presença dos sistemas poliméricos, a viabilidade celular foi superior a 100 % e independente da concentração, indicando a citocompatibilidade de materiais à base de PNVCL modificados com PVAc e nanofibras de sílica em distintas concentrações. Uma possível e importante característica desses materiais poliméricos na placa de cultura é a criação de um sistema tridimensional de crescimento celular, enquanto que CTMs cultivadas apenas no meio só cresciam bidimensionalmente na placa de cultura. Se essas estruturas fossem formadas, explicaria o aumento da atividade metabólica relacionada a proliferação celular comparada ao grupo controle.

Com o intuito de investigar o comportamento celular em *scaffolds* tridimensionais, CTMs foram encapsuladas nos materiais PNVCL, PN-10 % PVAc e PN-1 % SiO₂ para avaliar o efeito dos diferentes componentes e concentrações (5, 10 e 20 % massa/volume). As células sedimentadas, após sua remoção das placas de cultura celular e centrifugação, foram ressuspensas nas suspensões poliméricas previamente dispersas em meio de cultura e pipetadas em moldes pré-fabricados (Figura 5.59) inseridos em placas de cultura com 24 poços. A viabilidade celular foi determinada por meio do kit de coloração de células vivas e mortas após 0 (após a injeção em moldes), 1 e 3 dias de cultura, e analisada em um microscópio confocal (Figuras 5.60, 5.61 e 5.62).

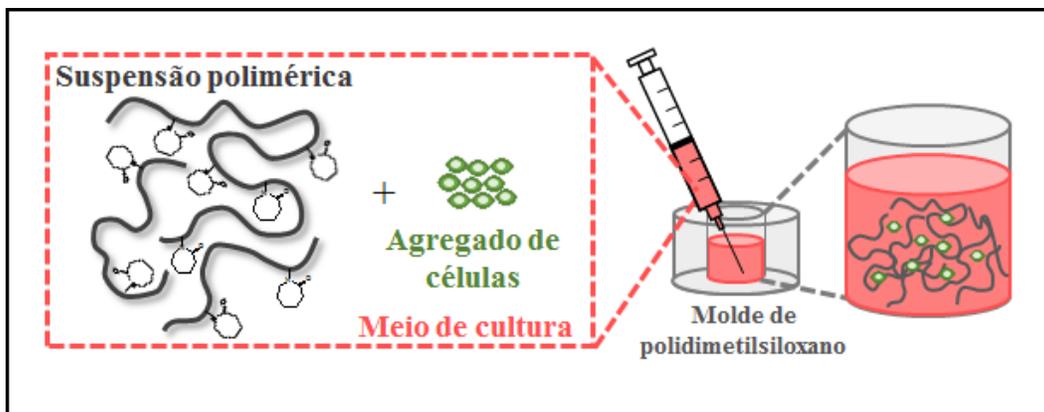


FIGURA 5.59 - Representação do sistema tridimensional formado entre os polímeros e nanocompósitos e as células em moldes para cultura.

Nos dias 0 e 1, células vivas foram observadas especialmente para PNVCL e PN-1 % SiO₂ nas concentrações de 5 e 10 %, enquanto que no dia 3 PN-10 % PVAc e PNVCL-1 % SiO₂ apresentaram poucas células, porém viáveis. Nota-se que para os hidrogéis na concentração de 20 % são observadas poucas células. Este resultado pode ser consequência da etapa de substituição do meio de cultura (no dia 1) em que hidrogéis encapsulados ficaram temporariamente expostos à temperatura ambiente e, de acordo com sua transição sol-gel reversível com a temperatura, poderiam temporariamente solvatar e liberar as células no meio de cultura. O encapsulamento de células em polímeros termossensíveis é ditado de acordo com a natureza anfifílica desses materiais. Acima da LCST, as cadeias poliméricas agregam e colapsam em meio aquoso devido às interações hidrofóbicas predominantes, formando uma conformação globular, cujo tamanho é dependente da massa molecular do PNVCL. Em condições fisiológicas, essas interações hidrofóbicas têm a capacidade de interagir com as células e manter as conexões célula-célula já existentes²³³. Se o sistema for levado a temperaturas abaixo da LCST, as cadeias poliméricas de PNVCL irão solvatar no meio aquoso por interações hidrofílicas predominantes com moléculas de água e separar as células encapsuladas. No caso dos hidrogéis na concentração de 5 e 10 % um maior número de células foi

observado pois elas provavelmente sedimentaram no interior do molde devido a baixa viscoelasticidade desses sistemas para reter as células encapsuladas.

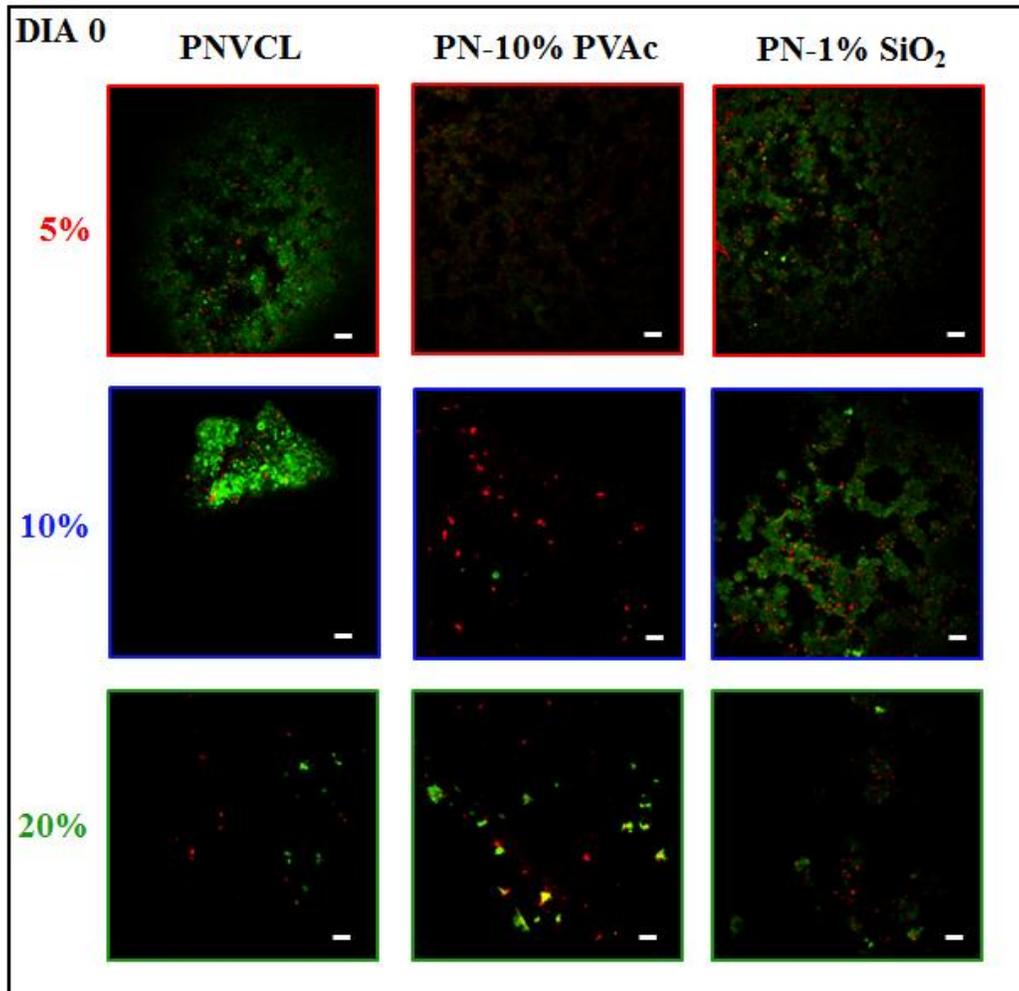


FIGURA 5.60 - Imagens obtidas por microscopia confocal para avaliar a viabilidade de CTMs encapsuladas em hidrogéis de PNVCL, PN-10 % PVAc e PN-1 % SiO₂ nas concentrações de 5, 10 e 20 % m/v no dia do encapsulamento, dia 0 (barras de escala, 100 μ m).

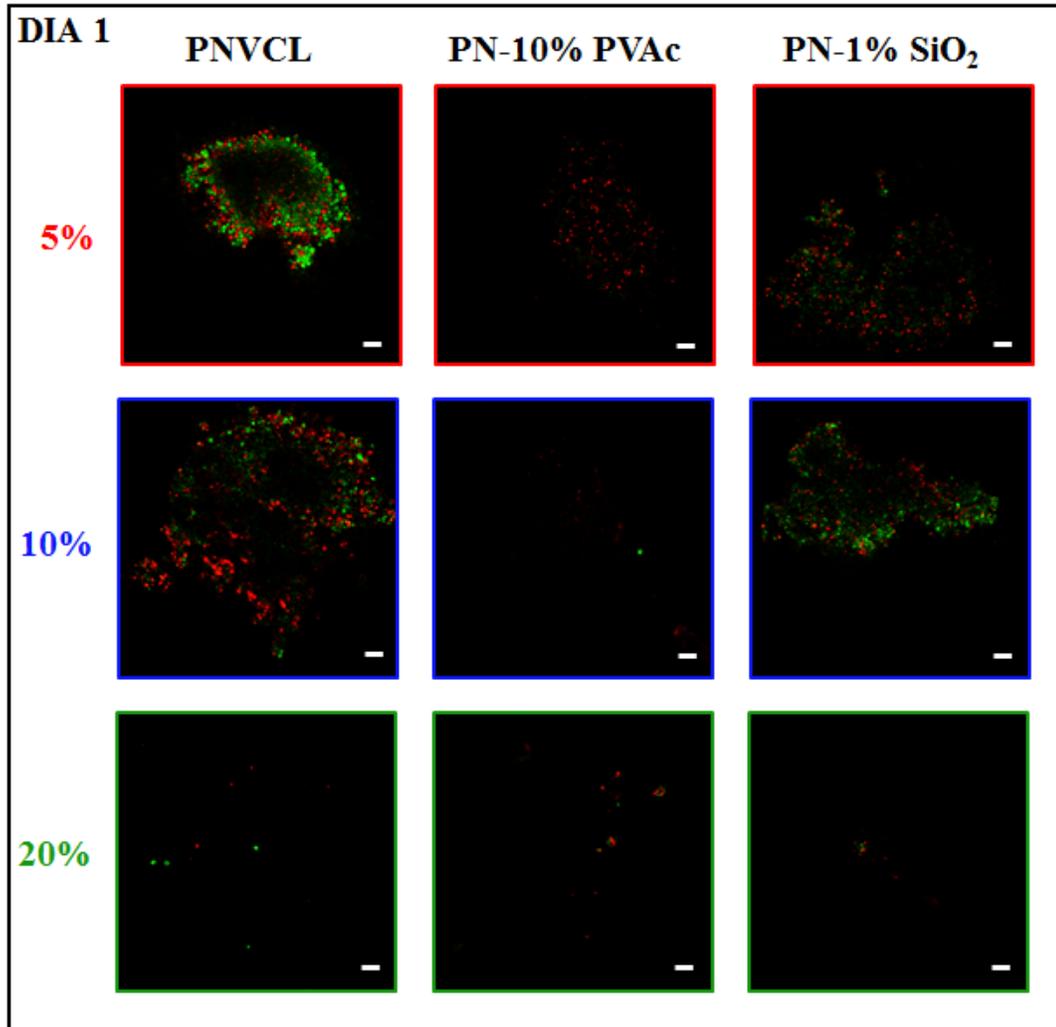


FIGURA 5.61 - Imagens obtidas por microscopia confocal para avaliar a viabilidade de CTMs encapsuladas em hidrogéis de PNVCL, PN-10 % PVAc e PN-1 % SiO₂ nas concentrações de 5, 10 e 20 % m/v após 1 dia de cultura (barras de escala, 100 μ m).

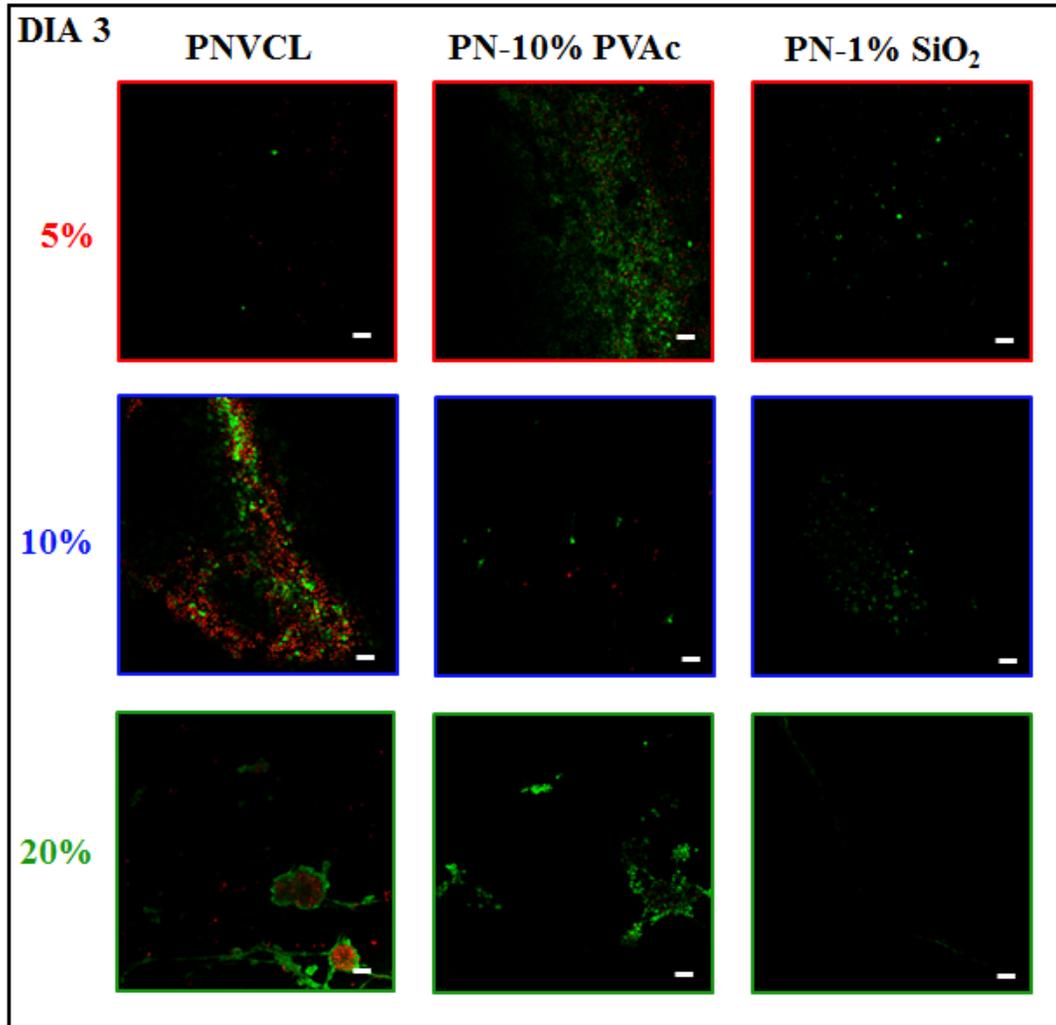


FIGURA 5.62 - Imagens obtidas por microscopia confocal para avaliar a viabilidade de CTMs encapsuladas em hidrogéis de PNVCL, PN-10 % PVAc e PN-1 % SiO₂ nas concentrações de 5, 10 e 20 % m/v após 3 dias de cultura (barras de escala, 100 μ m).

Para investigar a capacidade dos hidrogéis encapsulados de suportar a condrogênese de CTMs e a síntese de componentes da matriz da cartilagem, eles foram cultivados por 7 semanas na presença de meio condrogênico suplementado com 10 ng mL⁻¹ de TGF- β 3. Estudos sobre *scaffolds* cultivados *in vitro* com CTMs observaram que a estimulação com TGF- β 3 ajuda a manter o fenótipo de condrócitos nativos, melhora a composição bioquímica e as propriedades funcionais da

neocartilagem, e promove o desenvolvimento de implantes que exibem relações estrutura-função semelhantes à cartilagem articular nativa ^{214,234,235}.

Um dos principais componentes avaliados na formação de neocartilagem é o conteúdo de GAG produzido por amostra pelo ensaio com DMMB. Pela Figura 5.63 observa-se que PNVCL e PN-10 % PVAc produziram similar quantidade de GAG independentemente da concentração da amostra e para PNVCL-1 % SiO₂ a quantidade foi semelhante para as concentrações de 5 e 20 %. Adicionalmente, o PNVCL e o PN-1 % SiO₂ mostraram uma tendência para produzir mais GAG do que o copolímero. Portanto, observa-se que os hidrogéis a partir de PNVCL e na presença de nanofibras de sílica são potenciais *scaffolds* para suportar a condrogênese das CTMs e a síntese da neocartilagem.

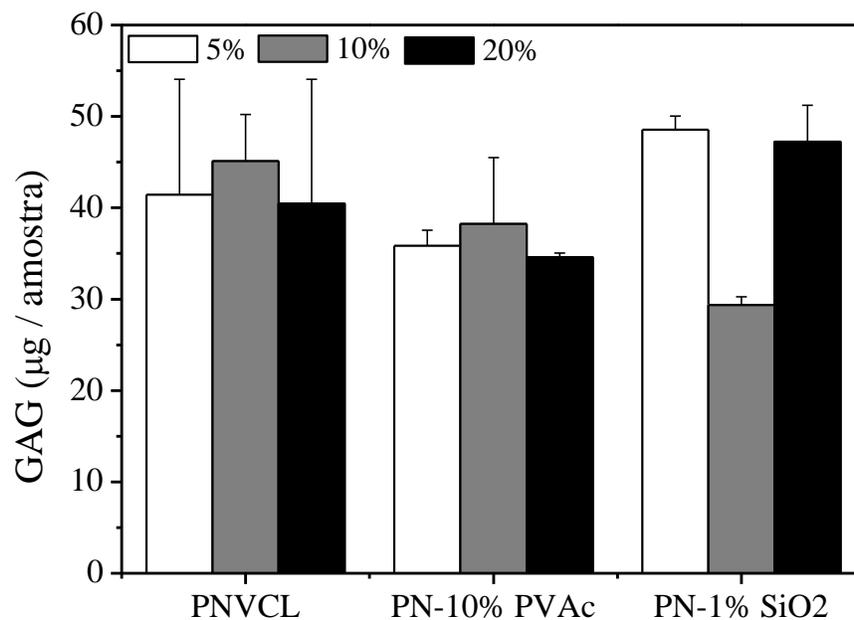


FIGURA 5.63 - Quantidade de GAG por amostra (volume = 50 µL) de hidrogéis de PNVCL, PN-10 % PVAc e PN-1 % SiO₂ nas concentrações de 5, 10 e 20 % m/v, encapsulados com CTMs e cultivados *in vitro* durante 7 semanas.

O tempo de cultura celular utilizado para avaliar os componentes da neocartilagem varia entre os trabalhos publicados na literatura e geralmente envolve períodos entre dias até poucas semanas. Dependendo do tipo e da natureza do hidrogel ^{119,236}, das condições de cultura ²³⁷ como a presença de diferentes indutores condrogênicos e a variação da suplementação ²³⁴, e da origem e maturidade das CTMs ^{238,239}, a quantidade produzida de GAG será diferente.

Uma vez que o conteúdo de GAG por amostra foi independente da concentração do hidrogel para PNVCL, hidrogéis na concentração de 20 % foram escolhidos para os ensaios com cultivo tridimensional, uma vez que nessa concentração os materiais apresentaram maiores propriedades reológicas. Novas imagens por microscopia confocal foram então obtidas dos materiais PNVCL e PN-1 % SiO₂ nas concentrações de 20 % massa/volume encapsulados com CTMs. Dessa vez os materiais foram inseridos nos moldes por uma seringa com agulha hipodérmica 21 G, e cultivados a 37 °C por 3 dias. Os hidrogéis foram avaliados como mostrado na Figura 5.64 ao longo da sua profundidade, sem a presença de células sedimentadas no fundo dos moldes. Um maior número de células vivas estavam distribuídas pela matriz do hidrogel, indicando que a injeção dos hidrogéis com uma seringa não contribuiu para a redução da viabilidade celular. No entanto, observa-se aglomerações celulares principalmente para PNVCL, tornando inviável a quantificação de células vivas e mortas. Após o terceiro dia de cultura, novamente observa-se a redução no número de células, provavelmente devido a liberação de células para o meio de cultura durante a substituição do meio.

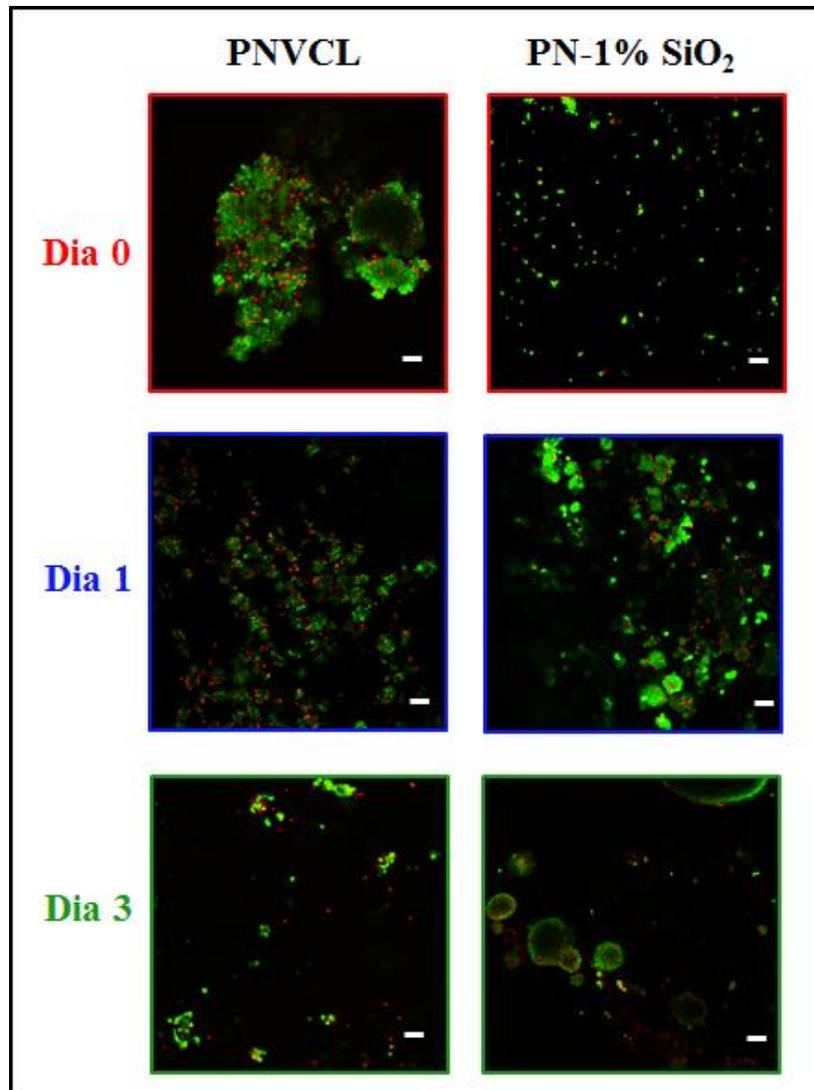


FIGURA 5.64 - Imagens obtidas pela microscopia confocal para avaliar a viabilidade de CTMs encapsuladas em hidrogéis de PNVCL e PN-1 % SiO₂ na concentração de 20% m/v no dia do encapsulamento, dia 0 e após 1 e 3 dias (barras de escala, 100 μm).

5.4.2- Ensaios com condrócitos bovinos (CDs)

Para obter um número suficiente de condrócitos para o desenvolvimento de *scaffolds* para a engenharia de tecidos cartilagosos, como na implantação de

condrócitos autólogos, as células são tipicamente expandidas em cultura de monocamada. Como resultado, os condrócitos perdem seu fenótipo condrogênico na dediferenciação. Esse fenômeno pode ser revertido no processo de rediferenciação após sua transferência para um ambiente tridimensional. SCHUH *et al.*²⁴⁰ observaram que hidrogéis com um maior número de sítios de adesão celular e rígidos não induzem a rediferenciação, enquanto que hidrogéis com baixas propriedades reológicas revertem o processo de dediferenciação com o aumento da proliferação celular e produção de GAG e colágeno tipo II. Desse modo, a biocompatibilidade de PNVCL e PN-1 % SiO₂ com CDs foi avaliada, como também a viabilidade tridimensional desses materiais e a produção de componentes da matriz cartilaginosa ao longo de 8 semanas.

Avaliou-se a citocompatibilidade das dispersões poliméricas nas concentrações de 0,001, 0,01, 0,1 e 1 mg mL⁻¹ pelo ensaio com alamarBlue® utilizando o leitor de placas, como mostrado na Figura 5.65. As concentrações poliméricas adicionadas foram menores do que anteriormente utilizadas para a análise de CTMs pois CDs se mostraram mais sensíveis a variação da concentração polimérica. Além disso, reduzindo a quantidade inserida de polímero evita a redução da viabilidade celular pela limitação da difusão de nutrientes e oxigênio para as células. Após o primeiro dia de incubação, os materiais apresentaram viabilidade celular acima de 90 % e independente da concentração dos componentes. Já após 3 dias de incubação, a viabilidade celular foi superior para PNVCL (acima de 86 %) e diminuiu com o aumento da concentração da dispersão polimérica utilizada. Esse efeito foi mais acentuado para os grupos do nanocompósito, cuja viabilidade celular foi acima de 77 % nas concentrações de 0,1 e 1 mg mL⁻¹. Apesar dessa variação na viabilidade celular, os materiais são biocompatíveis, porém a crescente concentração de PNVCL e PN-1 % SiO₂ na camada superior às células pode ter contribuído na

redução da sua atividade celular devido a alteração da difusão de nutrientes e oxigênio para as células.

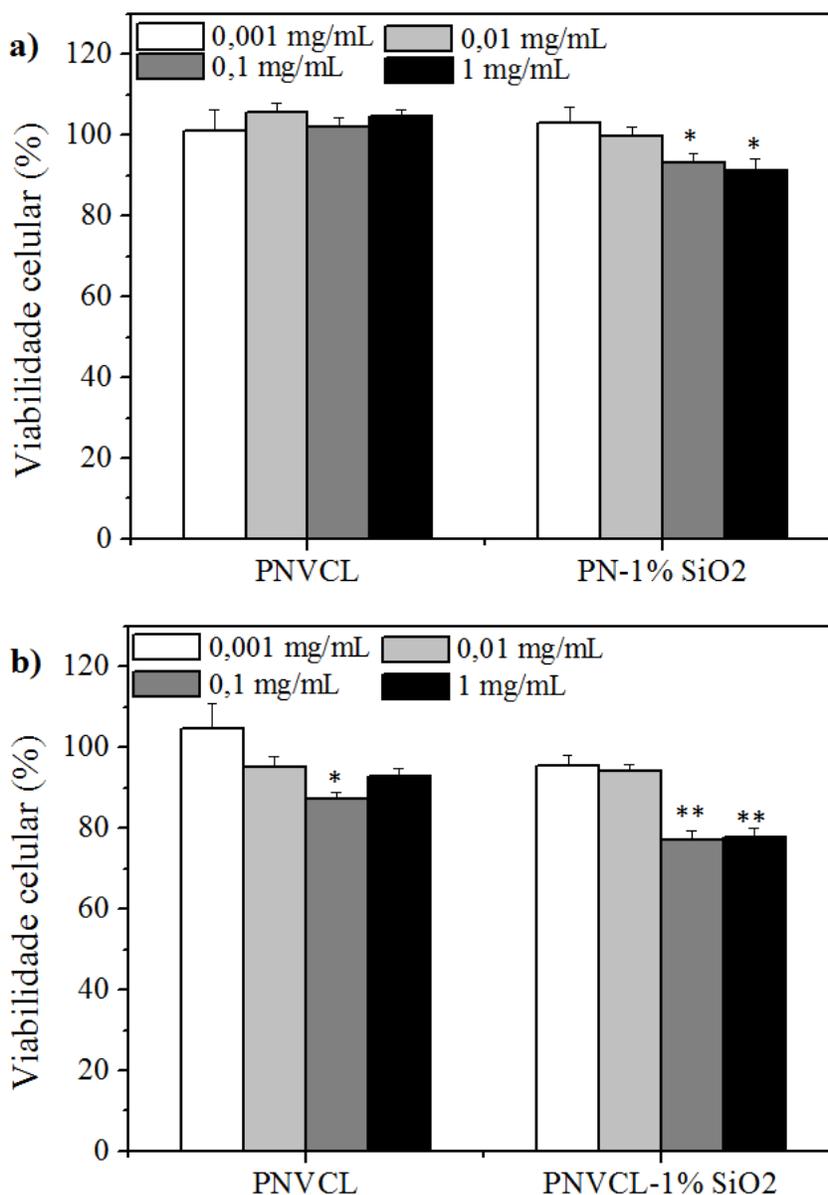


FIGURA 5.65 - Viabilidade celular avaliada via ensaio com alamarBlue® após 1 (a) e 3 dias (b) de cultivo de CDs na presença de suspensões poliméricas de PN-VCL e PN-1 % SiO₂ em diferentes concentrações. *,** indicam significância estatística ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) versus material correspondente com concentração de 0,001 mg/mL.

Posteriormente, CDs foram encapsulados em hidrogéis de PNVCL e PN-1 % SiO₂ na concentração de 20 % massa/volume pela mistura das suspensões poliméricas com as células sedimentadas, e inseridos nos moldes empregando agulhas hipodérmicas 21 G. A viabilidade celular foi determinada por um kit de coloração de células vivas e mortas no dia do encapsulamento das células e após 3 dias de cultura em meio condrogênico. A Figura 5.66 mostra as imagens obtidas por microscopia confocal dos hidrogéis encapsulados no dia da injeção e após 3 dias de cultura celular. Condrócitos viáveis foram homogeneamente distribuídos no sistema tridimensional para PNVCL e PN-1 % SiO₂, diferentemente do que foi observado previamente para os hidrogéis encapsulados com CTMs, resultando na aglomeração celular. Estas diferenças na distribuição das células na matriz polimérica demonstraram a influência da interação do *scaffold* com diferentes fenótipos de células²⁴¹. No terceiro dia, o número de células diminuiu em comparação com o dia 0 para ambos os sistemas poliméricos, similarmente como observado para os hidrogéis encapsulados com CTMs.

Uma vez que as células se distribuíram individualmente e homogeneamente nos hidrogéis foi possível determinar a viabilidade celular nos dois dias utilizando agulhas com diferentes calibres. A injeção de células dispersas em solução tampão é comumente acompanhada por uma baixa taxa de células vivas (entre 1 e 32 %) no pós-transplante¹⁹⁵. Além da diferença entre os microambientes vivenciado pelas células quando inseridas *in vivo*, a ruptura mecânica das células durante o processo de injeção é uma das responsáveis pelo dano celular e baixa viabilidade¹⁹⁵. AGUADO *et al.*¹⁹⁵ demonstraram que a encapsulação das células em um material viscoelástico como o hidrogel alginato protege as células das forças mecânicas prejudiciais experimentadas durante o fluxo pela agulha da seringa. Dessa forma, a viabilidade celular de hidrogéis encapsulados com CDs foi investigada após

a injeção com seringas e agulhas hipodérmicas com três diâmetros diferentes (18 G, 21 G e 27 G), mostrada na Figura 5.67.

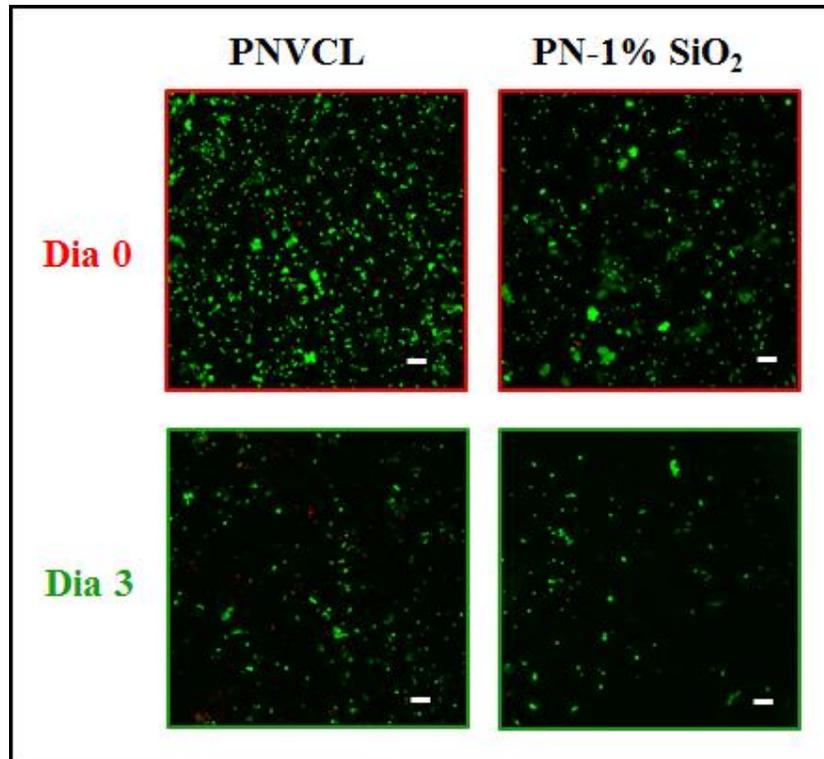


FIGURA 5.66 - Imagens obtidas por microscopia confocal para avaliar a viabilidade de CDs encapsulados em hidrogéis de PNVCL e PN-1 % SiO₂ na concentração de 20 % m/v no dia do encapsulamento, dia 0, e após 3 dias (barras de escala, 100 μ m).

Para o PNVCL a viabilidade dos condrócitos manteve-se superior a 80 % até o dia 3, sem diferença significativa entre os dias e o calibre da agulha. Apenas para o dia 0 e 27 G observou-se uma ligeira redução na viabilidade celular, provavelmente devido ao impacto mecânico imposto às células durante a injeção através de uma agulha com menor diâmetro ¹⁹⁵.

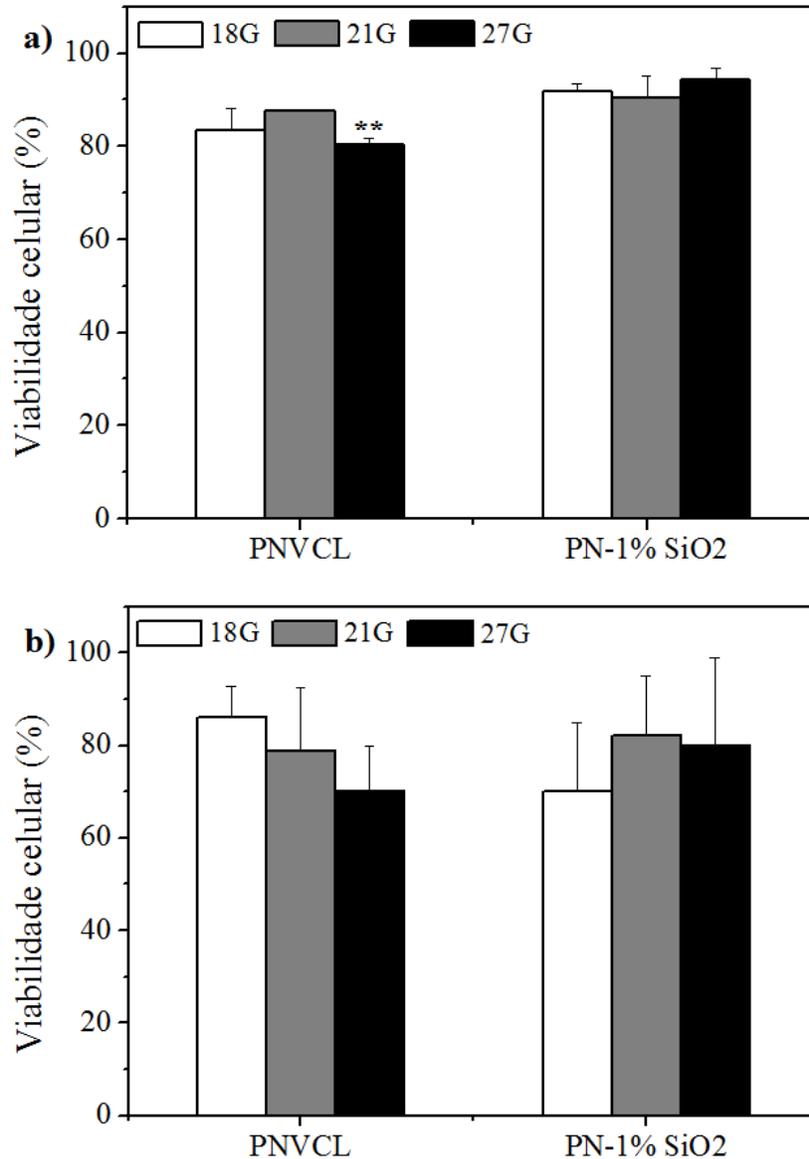


FIGURA 5.67 - Viabilidade celular no dia da preparação (a) e após 3 dias (b) de cultivo de CDs encapsulados em hidrogéis PNVCL e PN-1 % SiO₂ (20 % m/v) injetados com três agulhas diferentes (18 G, 21 G e 27 G). ** indica significância estatística ($p < 0,01$) versus material correspondente injetado com agulha 18 G.

Por outro lado, a viabilidade dos CDs encapsulados nos hidrogéis de PN-1 % SiO₂ foi superior a 90 % no dia 0 e acima de 70 % no dia 3. Essa redução pode estar associada à variação das propriedades viscoelásticas do nanocompósito

termossensível, que pode alterar a difusão de nutrientes e oxigênio, especialmente quando cercado pelo molde que dificulta a difusão do meio ^{230,242}. Além disso, nenhuma diferença significativa na viabilidade celular foi obtida para distintos calibres das agulhas. Deste modo, ambos PNVCL e PN-1 % SiO₂ suportam condrócitos viáveis e os transportam com alta viabilidade celular independente do tamanho da agulha utilizada neste estudo.

Os *scaffolds* destinados à reparação e regeneração da cartilagem devem manter o fenótipo dos condrócitos e expressar as funções celulares em uma matriz tridimensional ^{225,243}. A partir da cultura *in vitro* dos hidrogéis de PNVCL e PN-1 % SiO₂ encapsulados com CDs em meio condrogênico sem suplementação com TGF-β3 ao longo de 4 e 8 semanas, determinou-se os conteúdos formados de GAG e colágeno por amostra pelos ensaios com DMMB e OHP, respectivamente. Na Figura 5.68a, similares quantidades produzidas de GAG foram obtidas para ambos materiais, com um pequeno acréscimo para PN-1 % SiO₂. O aumento do tempo de cultura não resultou no acréscimo significativo de GAG para PNVCL enquanto que para PN-1 % SiO₂ é possível notar uma maior produção de GAG. Comparando esses resultados ao conteúdo de GAG produzido pelos hidrogéis encapsulados com CTMs após cultura *in vitro* por 7 semanas (Figura 5.63), nota-se maior quantidade de GAG nos materiais cultivados com CTMs.

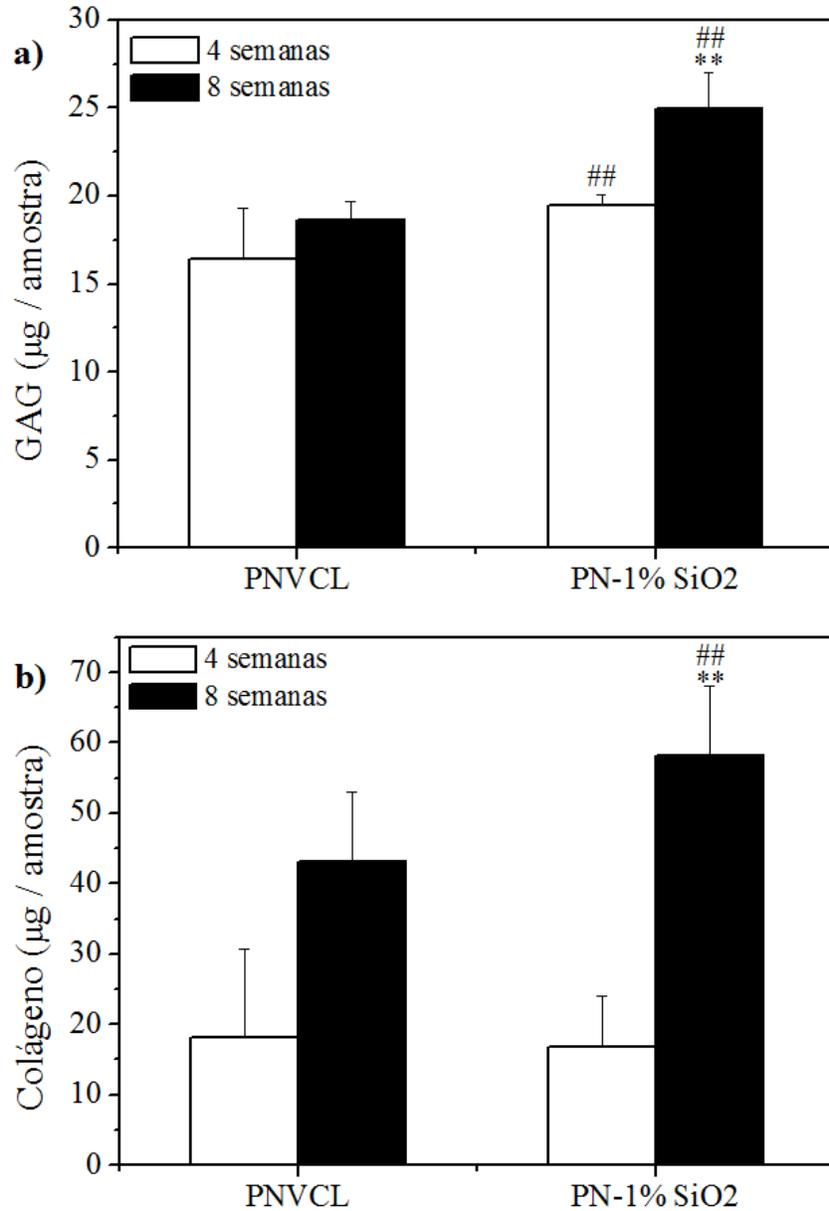


FIGURA 5.68 - Quantidade de GAG (a) e colágeno (b) por amostra (volume = 50 μ L) de hidrogéis de PNVCL e PN-1 % SiO₂ na concentração de 20 % m/v, encapsulados com CDs e cultivados *in vitro* durante 4 e 8 semanas. **, ## indicam significância estatística ($p < 0,01$) versus material correspondente em 4 semanas, e versus PNVCL no mesmo tempo de cultura, respectivamente.

ERICKSON *et al.*²⁴⁴ observaram comportamento similar para hidrogéis de ácido hialurônico ou peptídeos, cuja quantidade de GAG produzido ao longo de

56 dias foi superior quando cultivados com CTMs. Eles notaram que CDs e a produção de GAG se mostram dependentes da matriz tridimensional encapsulada, enquanto CTMs tiveram comportamento similar em distintos hidrogéis. Porém, eles não observaram nenhuma correlação com a natureza e as propriedades dos hidrogéis com os resultados obtidos ²⁴⁴. Entre possíveis fatores que contribuíram para a diferença entre a quantidade produzida de GAG, destaca-se uma baixa rediferenciação dos condrócitos nas matrizes poliméricas, e a presença de aglomerados celulares nos hidrogéis encapsulados com CTMs. O contato entre as células e sua condensação devem ocorrer para a diferenciação condrogênica ²⁴⁵. Enquanto CTMs estavam presentes em aglomerados celulares nos hidrogéis encapsulados, CDs estavam individualmente dispersos na matriz polimérica. Esta aproximação entre as células pode ter contribuído para a diferenciação condrogênica de CTMs e assim para a maior produção de GAG.

O conteúdo similar de GAG produzido para os hidrogéis em ambas 4 e 8 semanas pode estar relacionado à liberação de células e GAG para os meios de cultura que eram substituídos 3x por semana. NEUMANN *et al.* ²⁴⁶ observaram a liberação entre 5 e 25% do total de GAG produzido ao longo de 4 semanas de cultura *in vitro* de hidrogéis de polietilenoglicol. Está difusão de GAG para o meio de cultura foi atribuída a possibilidade de GAG ser encontrado não apenas em agregados de agrecan (espécie predominante de proteoglicanos), mas também em monômeros de agrecan e seus produtos degradados. Enquanto os agregados são macromoléculas volumosas com difusão restrita, os monômeros de agrecan e os subprodutos da degradação são moléculas menores e propensas a difundir através do hidrogel.

A variação da densidade celular ao longo do tempo é possível de ser avaliada pela quantificação do DNA dos condrócitos presentes pelo ensaio com *Picogreen* realizado no dia seguinte do preparo das amostras (1º dia) e após a cultura *in vitro* por 4 e 8 semanas (Figura 5.69). Uma vez que os hidrogéis são encapsulados

com a mesma quantidade de células, o teor de DNA deveria ser similar para ambas amostras inicialmente, e ao longo do tempo aumentar conforme a proliferação celular. No primeiro dia, a quantidade de DNA foi inferior para PNVCL em comparação a PN-1 % SiO₂, demonstrando o aumento da retenção celular inicial para o nanocompósito com superiores propriedades reológicas. No entanto após 4 semanas, a densidade celular reduziu em 85 % e 87 % para PNVCL e PN-1% SiO₂ respectivamente, e sofreu um leve aumento após 8 semanas. Essa queda abrupta na quantidade de DNA pode ser o resultado da redução da viabilidade celular ao longo do tempo, mas principalmente indica a liberação de células durante a troca do meio de cultura e a exposição temporária das amostras à temperatura ambiente.

Já a Figura 5.68b mostra o conteúdo de colágeno nos hidrogéis após 4 e 8 semanas seguindo as mesmas tendências observadas para a produção de GAG. Para PNVCL observa-se o aumento da quantidade de colágeno com o tempo, porém não foi significativo. Já para PN-1 % SiO₂ maior quantidade de colágeno é observada após 8 semanas comparada a quantidade produzida até 4 semanas. Essas variações entre as amostras provavelmente se deve a diferenças nas propriedades viscoelásticas, estruturais e morfológicas entre elas. Uma vez que PN-1 % SiO₂ apresentou maiores propriedades reológicas e fase globular entre nanopartículas e cadeias poliméricas interligadas acima de 37 °C, favorecendo a retenção das nanopartículas e o suporte para o crescimento dos componentes da matriz extracelular de cartilagem.

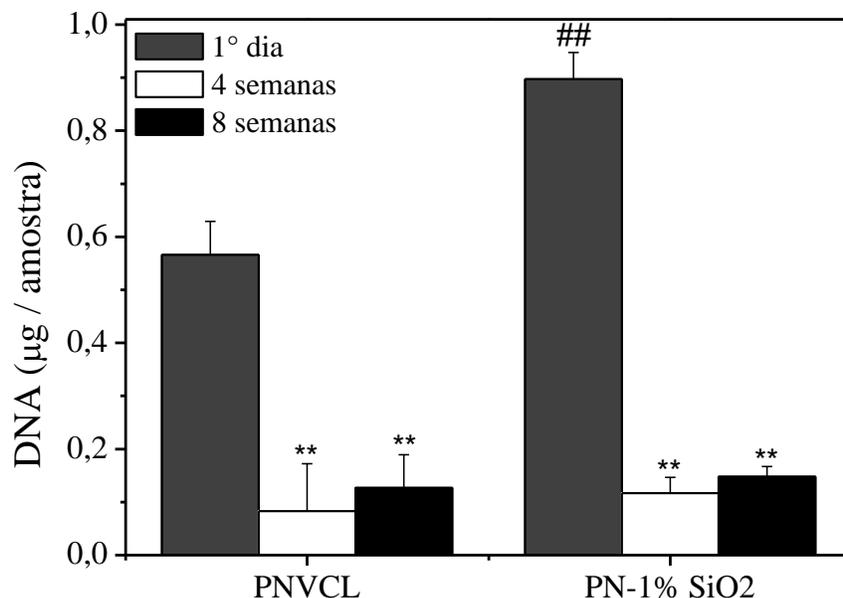


FIGURA 5.69 - Quantidade de DNA por amostra ($V = 200$ mL) de hidrogéis de PN-VCL e PN-1 % SiO₂ (20 % m/v) encapsulados com CDs após 1 dia e 4 e 8 semanas da cultura *in vitro*. ** Indica significância estatística ($p < 0,01$) entre 1 dia e 4 e 8 semanas para o mesmo material. ## Indica significância estatística ($p < 0,01$) entre PN-VCL e PN-1 % SiO₂ no 1° dia.

Assim, apesar de alguns estudos com hidrogéis injetáveis para engenharia de tecidos cartilagosos também demonstrarem a formação da neocartilagem^{194,247-249}, algumas características como longos períodos de gelificação, instabilidade da amostra e baixa produção de matriz podem ser observadas^{55,226,250-253}. Neste estudo, materiais a base de PN-VCL foram obtidos com distintas propriedades reológicas, rápida gelificação ao estímulo da temperatura, biocompatíveis com CTMs e CDs e induziram a formação dos componentes da neocartilagem quando cultivados *in vitro*. Embora os ensaios reológicos dos materiais demonstraram que eles se comportam como líquidos viscosos e não como tradicionais hidrogéis reticulados quimicamente com alto valor de G' , materiais com baixa propriedade reológica melhoraram a condrogênese de CTMs e a produção de

matriz extracelular por CDs, induzidas pela melhora na difusão de nutrientes, distribuição de matriz de cartilagem sintetizada e interação entre as células ^{119,240}.

6- CONCLUSÕES

Nanocompósitos a base de PNVCL e de PN-10% PVAc com nanofibras mesoporosas de sílica foram sintetizados pela primeira vez por meio de uma polimerização *in situ* na forma de *bulk*. Esse estudo demonstrou a variedade de aplicações e propriedades que os sistemas termossensíveis podem alcançar além das tradicionais aplicações na entrega controlada de fármacos. Além das ajustáveis propriedades termossensíveis, morfológicas, estruturais, reológicas e térmicas, esses materiais são biocompatíveis e apresentam grande potencialidade de aplicação como *scaffolds* no campo biomédico, como na reconstrução de tecidos cartilagosos por técnicas minimamente invasivas. De acordo com os resultados e discussão anteriormente descritos, pode se concluir também que:

- Nanofibras mesoporosas de sílica funcionalizadas tiveram seus poros internos e externos modificados com o organossilano MPS em um teor de 15 % em massa, possibilitando a sua interação com os monômeros a serem polimerizados.
- O polímero termossensível PNVCL foi obtido pela polimerização radicalar, com LCST abaixo da temperatura fisiológica (34 °C), transição reversível e com variação da transmitância com temperatura com alta reprodutibilidade.
- Copolímeros de PNVCL e PVAc com 3 concentrações de comonômeros foram sintetizados e apresentaram um teor menor de VAc do que inicialmente adicionado ao meio reacional devido a diferenças entre as razões de reatividade dos monômeros. Os valores de LCST foram inferiores (até 13,5 °C) do que o encontrado para o PNVCL, devido ao caráter mais hidrofóbico do PVAc e da sua composição no copolímero.
- Nanocompósitos a base de PNVCL e PN-10% PVAc foram sintetizados *in situ* na presença de 1 e 5 % de nanofibras mesoporosas de SiO₂-MPS e apresentaram

similares valores de LCST (igual ou até 1 °C a mais) em comparação aos polímeros puros correspondentes, porém a transição de fase foi difusa.

- As interações entre as nanofibras de SiO₂ e as matrizes poliméricas de PNVCL e PN-10 % PVAc foram diferentes e resultaram em um sistema interconectado de matriz polimérica e nanofibras inorgânicas com distintos centros de espalhamento, graus de solvatação, fase globular acima da LCST, contribuição entálpica por unidade monomérica como demonstrado nas análises de espectrofotometria de UV-vis, DLS, MEV e TGA.
- Pela análise de microscopia eletrônica de varredura, as nanofibras de SiO₂ integraram e se distribuíram homogeneamente nos glóbulos poliméricos formados quando os nanocompósitos foram aquecidos acima da LCST.
- A presença do comonômero VAc e das nanofibras de SiO₂ contribuíram para o aumento dos módulos de armazenamento e de perda em cerca de até 5 vezes a mais do que a matriz pura de PNVCL. Os materiais apresentaram propriedades ajustáveis conforme a concentração da suspensão polimérica, e em uma faixa de temperatura adequada para aplicações como biomateriais. No entanto nas condições avaliadas todos materiais se comportaram como líquidos viscosos ($G'' > G'$).
- A presença das nanofibras mesoporosas de sílica aumentou a Tg das matrizes poliméricas em cerca de até 10 °C devido a redução da mobilidade das cadeias poliméricas pela presença das nanofibras de SiO₂.
- O PNVCL, PN-10% PVAc e seus nanocompósitos correspondentes foram biocompatíveis na presença de células-tronco mesenquimais humanas e condrócitos bovinos. Especialmente os hidrogéis PNVCL e PN-1% SiO₂ na concentração de 20% m/v promoveram a diferenciação condrogênica de CTMs e a rediferenciação de CDs, e induziram a formação de componentes da matriz extracelular da cartilagem *in vitro* em curtos e longos períodos de tempo.

- O hidrogel de PN-1% SiO₂ encapsulado com CDs apresentou maior acúmulo dos componentes da neocartilagem, provavelmente segundo sua maior propriedade reológica que contribuiu para reter as células encapsuladas e exibiu estrutura morfológica e mecânica mais favorável para o suporte de CDs.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. RAMAKRISHNA, S.; MAYER, J.; WINTERMANTEL, E. & LEONG, K. W. "Biomedical applications of polymer-composite materials: a review". *Compos. Sci. Technol.*, **61** (9): 1189, 2001.
2. TEO, A. J. T.; MISHRA, A.; PARK, I.; KIM, Y.-J.; PARK, W.-T. & YOON, Y.-J. "Polymeric Biomaterials for Medical Implants and Devices". *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **2** (4): 454, 2016.
3. REZAIE, H. R.; BAKHTIARI, L. & ÖCHSNER, A. *Biomaterials and Their Applications* Springer International Publishing, 2015, p.
4. LANGER, R. "Perspectives and Challenges in Tissue Engineering and Regenerative Medicine". *Adv. Mater.*, **21** (32-33): 3235, 2009.
5. PERALE, G.; ROSSI, F.; SUNDSTROM, E.; BACCHIEGA, S.; MASI, M.; FORLONI, G. & VEGLIANESE, P. "Hydrogels in spinal cord injury repair strategies". *ACS Chem Neurosci*, **2** (7): 336, 2011.
6. GONTIJO, S. *Envelhecimento Ativo: Uma Política de Saúde*; 1 ed., 2005, 62 p.
7. LIANG, Y.; LI, L.; SCOTT, R. A. & KIICK, K. L. "50th Anniversary Perspective: Polymeric Biomaterials: Diverse Functions Enabled by Advances in Macromolecular Chemistry". *Macromolecules*, **50** (2): 483, 2017.
8. GU, L.; GAO, Y.; QIN, Y.; CHEN, X.; WANG, X. & WANG, F. "Biodegradable poly(carbonate-ether)s with thermoresponsive feature at body temperature". *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **51** (2): 282, 2013.
9. HAGGERTY, A. E. & OUDEGA, M. "Biomaterials for spinal cord repair". *Neurosci Bull*, **29** (4): 445, 2013.
10. MACAYA, D. & SPECTOR, M. "Injectable hydrogel materials for spinal cord regeneration: a review". *Biomed Mater*, **7** (1): 012001, 2012.
11. ENGEL, E.; MICHIARDI, A.; NAVARRO, M.; LACROIX, D. & PLANELL, J. A. "Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side". *Trends Biotechnol.*, **26** (1): 39, 2008.
12. MERINO, S.; MARTÍN, C.; KOSTARELOS, K.; PRATO, M. & VÁZQUEZ, E. "Nanocomposite Hydrogels: 3D Polymer–Nanoparticle Synergies for On-Demand Drug Delivery". *ACS Nano*, **9** (5): 4686, 2015.
13. VASHIST, A.; VASHIST, A.; GUPTA, Y. K. & AHMAD, S. "Recent advances in hydrogel based drug delivery systems for the human body". *Journal of Materials Chemistry B*, **2** (2): 147, 2014.
14. SIEGEL, R. A. "Stimuli sensitive polymers and self regulated drug delivery systems: A very partial review". *J. Controlled Release*, **190** 337, 2014.
15. NICHOLSON, J. "Current trends in biomaterials". *Mater. Today*, **1** (2): 6, 1998.

16. PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K. & MORAES, Â. M. "BIOMATERIAIS: TIPOS, APLICAÇÕES E MERCADO". *Quim. Nova*, **38** 957, 2015.
17. KHAN, F.; TANAKA, M. & AHMAD, S. R. "Fabrication of polymeric biomaterials: a strategy for tissue engineering and medical devices". *Journal of Materials Chemistry B*, **3** (42): 8224, 2015.
18. GUVENDIREN, M. & BURDICK, J. A. "Engineering synthetic hydrogel microenvironments to instruct stem cells". *Curr. Opin. Biotechnol.*, **24** (5): 841, 2013.
19. MONZACK, E. L.; RODRIGUEZ, K. J.; MCCOY, C. M.; GU, X. & MASTERS, K. S. In *Biomaterials for Tissue Engineering Applications: A Review of the Past and Future Trends*; Burdick, J. A., Mauck, R. L., Eds.; Springer Vienna: Vienna, 2011 Number of 209p.
20. SHOICHET, M. S. "Polymer Scaffolds for Biomaterials Applications". *Macromolecules*, **43** (2): 581, 2009.
21. MEHROTRA, S.; LYNAM, D.; MALONEY, R.; PAWELEC, K. M.; TUSZYNSKI, M. H.; LEE, I.; CHAN, C. & SAKAMOTO, J. "Time Controlled Protein Release from Layer-by-Layer Assembled Multilayer Functionalized Agarose Hydrogels". *Adv. Funct. Mater.*, **20** (6), 2010.
22. WICHTERLE, O. & LÍM, D. "Hydrophilic Gels for Biological Use". *Nature*, **185** 117, 1960.
23. CHANG, C.; DUAN, B.; CAI, J. & ZHANG, L. "Superabsorbent hydrogels based on cellulose for smart swelling and controllable delivery". *Eur. Polym. J.*, **46** (1): 92, 2010.
24. LAFTAH, W. A.; HASHIM, S. & IBRAHIM, A. N. "Polymer Hydrogels: A Review". *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, **50** (14): 1475, 2011.
25. ROORDA, W. E.; BODDÉ, H. E.; DE BOER, A. G. & JUNGINGER, H. E. "Synthetic hydrogels as drug delivery systems". *Pharmaceutisch Weekblad*, **8** (3): 165, 1986.
26. BUWALDA, S. J.; BOERE, K. W. M.; DIJKSTRA, P. J.; FEIJEN, J.; VERMONDEN, T. & HENNINK, W. E. "Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials". *J. Controlled Release*, **190** 254, 2014.
27. VEGA, S. L.; KWON, M. Y. & BURDICK, J. A. "Recent advances in hydrogels for cartilage tissue engineering". *Eur Cell Mater*, **33** 59, 2017.
28. NGUYEN, Q. V.; HUYNH, D. P.; PARK, J. H. & LEE, D. S. "Injectable polymeric hydrogels for the delivery of therapeutic agents: A review". *Eur. Polym. J.*, **72** 602, 2015.
29. VAN TOMME, S. R.; STORM, G. & HENNINK, W. E. "In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications". *Int. J. Pharm.*, **355** (1): 1, 2008.

30. YU, L. & DING, J. "Injectable hydrogels as unique biomedical materials". *Chem. Soc. Rev.*, **37** (8): 1473, 2008.
31. TAN, H. & MARRA, K. G. "Injectable, Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications". *Materials*, **3** (3): 1746, 2010.
32. ULERY, B. D.; NAIR, L. S. & LAURENCIN, C. T. "Biomedical applications of biodegradable polymers". *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, **49** (12): 832, 2011.
33. BURDICK, JASON A.; MAUCK, ROBERT L. & GERECHT, S. "To Serve and Protect: Hydrogels to Improve Stem Cell-Based Therapies". *Cell Stem Cell*, **18** (1): 13, 2016.
34. DEMETS, G. J.-F. "Cucurbiturilas". *Quim. Nova*, **30** 1313, 2007.
35. JEONG, B. & GUTOWSKA, A. "Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications". *Trends Biotechnol.*, **20** (7): 305, 2002.
36. MEDEIROS, S. F. Síntese e Caracterização do Copolímero Poli(N-vinilcaprolactama-co-Ácido acrílico) quanto à Temperatura Crítica Inferior de Solubilização (LCST) tendo em vista sua Utilização na Encapsulação de Princípios Ativos. Lorena, Escola de Engenharia de Lorena - USP, 2006. Dissertação de mestrado, 113 p.
37. LI, X.; ZHAN, Z.-J.; PENG, G.-R. & WANG, W.-K. "Comprehensive high-performance epoxy nanocomposites co-reinforced by organo-montmorillonite and nano-SiO₂". *J. Appl. Polym. Sci.*, **123** (6): 3503, 2012.
38. KLOUDA, L. & MIKOS, A. G. "Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **68** (1): 34, 2008.
39. VIHOLA, H.; LAUKKANEN, A.; HIRVONEN, J. & TENHU, H. "Binding and release of drugs into and from thermosensitive poly(N-vinyl caprolactam) nanoparticles". *Eur. J. Pharm. Sci.*, **16** (1–2): 69, 2002.
40. PENG, S. & WU, C. "Surfactant Effect on pH and Temperature Sensitivities of Poly(N-vinylcaprolactam-co-sodium acrylate) Microgels". *Macromolecules*, **34** (3): 568, 2001.
41. PONCE-VARGAS, S. M.; CORTEZ-LEMUS, N. A. & LICEA-CLAVERÍE, A. "Preparation of Poly(N-Vinylcaprolactam) (NVCL) and Statistical Copolymers of NVCL with Variable Cloud Point Temperature by Using A Trithiocarbonate RAFT Agent". *Macromolecular Symposia*, **325-326** (1): 56, 2013.
42. KUCKLING, D.; ADLER, H.-J. P.; ARNDT, K.-F.; LING, L. & HABICHER, W. D. "Temperature and pH dependent solubility of novel poly(N-isopropylacrylamide)-copolymers". *Macromol. Chem. Phys.*, **201** (2): 273, 2000.

43. ZHANG, J.-T.; BHAT, R. & JANDT, K. D. "Temperature-sensitive PVA/PNIPAAm semi-IPN hydrogels with enhanced responsive properties". *Acta Biomater.*, **5** (1): 488, 2009.
44. ZHANG, L. & WEBSTER, T. J. "Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration". *Nano Today*, **4** (1): 66, 2009.
45. RAMOS, J.; IMAZ, A. & FORCADA, J. "Temperature-sensitive nanogels: poly(N-vinylcaprolactam) versus poly(N-isopropylacrylamide)". *Polymer Chemistry*, **3** (4): 852, 2012.
46. LIANG, X.; KOZLOVSKAYA, V.; CHEN, Y.; ZAVGORODNYA, O. & KHARLAMPIEVA, E. "Thermosensitive Multilayer Hydrogels of Poly(N-vinylcaprolactam) as Nanothin Films and Shaped Capsules". *Chem. Mater.*, **24** (19): 3707, 2012.
47. BEIJA, M.; MARTY, J. D. & DESTARAC, M. "Thermoresponsive poly(N-vinyl caprolactam)-coated gold nanoparticles: sharp reversible response and easy tunability". *Chem Commun (Camb)*, **47** (10): 2826, 2011.
48. CORTEZ-LEMUS, N. A. & LICEA-CLAVERIE, A. "Poly(N-vinylcaprolactam), a comprehensive review on a thermoresponsive polymer becoming popular". *Prog. Polym. Sci.*, **53** 1, 2016.
49. SANNA, R.; FORTUNATI, E.; ALZARI, V.; NUVOLI, D.; TERENCEZI, A.; CASULA, M.; KENNY, J. & MARIANI, A. "Poly(N-vinylcaprolactam) nanocomposites containing nanocrystalline cellulose: a green approach to thermoresponsive hydrogels". *Cellulose*, **20** (5): 2393, 2013.
50. CHEE, C. K.; RIMMER, S.; SOUTAR, I. & SWANSON, L. "Fluorescence investigations of the conformational behaviour of Poly(N-vinylcaprolactam)". *React. Funct. Polym.*, **66** (1): 1, 2006.
51. MAKHAEVA, E. E.; TENHU, H. & KHOKHLOV, A. R. "Behavior of Poly(N-vinylcaprolactam-co-methacrylic acid) Macromolecules in Aqueous Solution: Interplay between Coulombic and Hydrophobic Interaction". *Macromolecules*, **35** (5): 1870, 2002.
52. PICH, A.; BOYKO, V.; LU, Y.; RICHTER, S.; ADLER, H. J. & ARNDT, K. F. "Preparation of PEGMA-functionalized latex particles. 2. System styrene/N-vinylcaprolactam". *Colloid. Polym. Sci.*, **281** (10): 916, 2003.
53. LINN, M.; COLLNOT, E.-M.; DJURIC, D.; HEMPEL, K.; FABIAN, E.; KOLTER, K. & LEHR, C.-M. "Soluplus® as an effective absorption enhancer of poorly soluble drugs in vitro and in vivo". *Eur. J. Pharm. Sci.*, **45** (3): 336, 2012.
54. LOOS, W.; VERBRUGGHE, S.; GOETHALS, E. J.; DU PREZ, F. E.; BAKEEVA, I. V. & ZUBOV, V. P. "Thermo-Responsive Organic/Inorganic Hybrid Hydrogels based on Poly(N-vinylcaprolactam)". *Macromol. Chem. Phys.*, **204** (1): 98, 2003.

55. LYNCH, B.; CRAWFORD, K.; BARUTI, O.; ABDULAHAD, A.; WEBSTER, M.; PUETZER, J.; RYU, C.; BONASSAR, L. J. & MENDENHALL, J. "The effect of hypoxia on thermosensitive poly(N-vinylcaprolactam) hydrogels with tunable mechanical integrity for cartilage tissue engineering". *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, n/a, 2016.
56. 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** (10): 3409, 2014.
57. ODIAN, G. *Principles of Polymerization*; 4th ed., Wiley, 2004, 832 p.
58. KOZANOĞLU, S. *Polymerization and Characterization of N-Vinylcaprolactam*. Turquia, The Graduate School of Natural and Applied Sciences - Middle East Technical University, 2008. Tese de doutorado, 89 p.
59. SU, W.-F. In *Principles of Polymer Design and Synthesis*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013 Number of 137p.
60. NAKABAYASHI, K. & MORI, H. "Recent progress in controlled radical polymerization of N-vinyl monomers". *Eur. Polym. J.*, **49** (10): 2808, 2013.
61. ETCHENASIA, L.; KHOUKH, A.; DENIAU LEJEUNE, E. & SAVE, M. "RAFT/MADIX emulsion copolymerization of vinyl acetate and N-vinylcaprolactam: towards waterborne physically crosslinked thermoresponsive particles". *Polymer Chemistry*, **8** (14): 2244, 2017.
62. SINGH, P.; SRIVASTAVA, A. & KUMAR, R. "Synthesis of amphiphilic poly(N-vinylcaprolactam) using ATRP protocol and antibacterial study of its silver nanocomposite". *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **50** (8): 1503, 2012.
63. HURTTGEN, M.; LIU, J.; DEBUIGNE, A.; JEROME, C. & DETREMBLEUR, C. "Synthesis of thermo-responsive poly(N-vinylcaprolactam)-containing block copolymers by cobalt-mediated radical polymerization". *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **50** (2): 400, 2012.
64. WANG, Y.; WANG, J.; WANG, T.; XU, Y.; SHI, L.; WU, Y.; LI, L. & GUO, X. "Pod-Like Supramicelles with Multicompartment Hydrophobic Cores Prepared by Self-Assembly of Modified Chitosan". *Nano-Micro Letters*, **8** (2): 151, 2016.
65. GARCÍA-OLAIZ, G. D.; MONTOYA-VILLEGAS, K. A.; LICEA-CLAVERIE, A. & CORTEZ-LEMUS, N. A. "Synthesis and characterization of four- and six-arm star-shaped poly(ϵ -caprolactone)-b-poly(N-vinylcaprolactam): Micellar and core degradation studies". *React. Funct. Polym.*, **88** 16, 2015.
66. MEDEIROS, S. F.; SANTOS, A. M.; FESSI, H. & ELAISSARI, A. "Synthesis of biocompatible and thermally sensitive poly(N-vinylcaprolactam) nanogels

- via inverse miniemulsion polymerization: Effect of the surfactant concentration". *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **48** (18): 3932, 2010.
67. MAEDA, Y.; NAKAMURA, T. & IKEDA, I. "Hydration and Phase Behavior of Poly(N-vinylcaprolactam) and Poly(N-vinylpyrrolidone) in Water". *Macromolecules*, **35** (1): 217, 2002.
 68. POPESCU, I.; PRISACARU, A. I.; SUFLET, D. M. & FUNDUEANU, G. "Thermo- and pH-sensitivity of poly(N-vinylcaprolactam-co-maleic acid) in aqueous solution". *Polym. Bull.*, **71** (11): 2863, 2014.
 69. OKHAPKIN, I. M.; NASIMOVA, I. R.; MAKHAEVA, E. E. & KHOKHLOV, A. R. "Effect of Complexation of Monomer Units on pH- and Temperature-Sensitive Properties of Poly(N-vinylcaprolactam-co-methacrylic acid)". *Macromolecules*, **36** (21): 8130, 2003.
 70. SALA, R. L.; KWON, M. Y.; KIM, M.; GULLBRAND, S. E.; HENNING, E. A.; MAUCK, R. L.; CAMARGO, E. R. & BURDICK, J. A. "Thermosensitive Poly(N-vinylcaprolactam) Injectable Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering". *Tissue Engineering Part A*, **23** (17-18): 935, 2017.
 71. 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". *J. Appl. Polym. Sci.*, **118** (1): 229, 2010.
 72. WAN, Y. & WEN, D. "Preparation and characterization of porous conducting poly(dl-lactide) composite membranes". *J. Membr. Sci.*, **246** (2): 193, 2005.
 73. FENG, Q. L.; CUI, F. Z.; WANG, H.; KIM, T. N. & KIM, J. O. "Influence of solution conditions on deposition of calcium phosphate on titanium by NaOH-treatment". *J. Cryst. Growth*, **210** (4): 735, 2000.
 74. KUMAR, A.; SRIVASTAVA, A.; GALAEV, I. Y. & MATTIASSON, B. "Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications". *Prog. Polym. Sci.*, **32** (10): 1205, 2007.
 75. LIU, J.; DEBUIGNE, A.; DETREMBLEUR, C. & JÉRÔME, C. "Poly(N-vinylcaprolactam): A Thermoresponsive Macromolecule with Promising Future in Biomedical Field". *Advanced Healthcare Materials*, **3** (12): 1941, 2014.
 76. LAUKKANEN, A.; VALTOLA, L.; WINNIK, F. M. & TENHU, H. "Formation of Colloidally Stable Phase Separated Poly(N-vinylcaprolactam) in Water: A Study by Dynamic Light Scattering, Microcalorimetry, and Pressure Perturbation Calorimetry". *Macromolecules*, **37** (6): 2268, 2004.
 77. VIHOLA, H.; LAUKKANEN, A.; VALTOLA, L.; TENHU, H. & HIRVONEN, J. "Cytotoxicity of thermosensitive polymers poly(N-isopropylacrylamide), poly(N-vinylcaprolactam) and amphiphilically modified poly(N-vinylcaprolactam)". *Biomaterials*, **26** (16): 3055, 2005.

78. CHOI, C. S.; PARK, B. J. & CHOI, H. J. "Electrical and rheological characteristics of poly(vinyl acetate)/multi-walled carbon nanotube nanocomposites". *Diamond Relat. Mater.*, **16** (4): 1170, 2007.
79. HEDIR, G. G.; ARNO, M. C.; LANGLAIS, M.; HUSBAND, J. T.; O'REILLY, R. K. & DOVE, A. P. "Poly(oligo(ethylene glycol) vinyl acetate)s: A Versatile Class of Thermoresponsive and Biocompatible Polymers". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **56** (31): 9178, 2017.
80. GAJRIA, A. M.; DAVÉ, V.; GROSS, R. A. & P. MCCARTHY, S. "Miscibility and biodegradability of blends of poly(lactic acid) and poly(vinyl acetate)". *Polymer*, **37** (3): 437, 1996.
81. RADHAKUMARY, C.; NAIR, P. D.; REGHUNADHAN NAIR, C. P. & MATHEW, S. "Chitosan-graft-poly(vinyl acetate) for hemodialysis applications". *J. Appl. Polym. Sci.*, **125** (3): 2022, 2012.
82. JEONG, H.-G.; KIM, Y.-E. & KIM, Y.-J. "Fabrication of poly(vinyl acetate)/polysaccharide biocomposite nanofibrous membranes for tissue engineering". *Macromolecular Research*, **21** (11): 1233, 2013.
83. NOVOA, G. A. G.; HEINÄMÄKI, J.; MIRZA, S.; ANTIKAINEN, O.; IRAIZOZ COLARTE, A.; SUZARTE PAZ, A. & YLIRUUSI, J. "Physical solid-state properties and dissolution of sustained-release matrices of polyvinylacetate". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **59** (2): 343, 2005.
84. ABDAL-HAY, A.; HAMDY, A. S.; KHALIL, K. A. & LIM, J. H. "A novel simple one-step air jet spinning approach for deposition of poly(vinyl acetate)/hydroxyapatite composite nanofibers on Ti implants". *Materials Science and Engineering: C*, **49** 681, 2015.
85. KUMAR, S.; SARITA; NEHRA, M.; DILBAGHI, N.; TANKESHWAR, K. & KIM, K.-H. "Recent advances and remaining challenges for polymeric nanocomposites in healthcare applications". *Prog. Polym. Sci.*, **80** 1, 2018.
86. ROZENBERG, B. A. & TENNE, R. "Polymer-assisted fabrication of nanoparticles and nanocomposites". *Prog. Polym. Sci.*, **33** (1): 40, 2008.
87. NEMATI HAYATI, A.; REZAIE, H. R. & HOSSEINALIPOUR, S. M. "Preparation of poly(3-hydroxybutyrate)/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering". *Mater. Lett.*, **65** (4): 736, 2011.
88. NEMATI HAYATI, A.; HOSSEINALIPOUR, S. M.; REZAIE, H. R. & SHOKRGOZAR, M. A. "Characterization of poly(3-hydroxybutyrate)/nano-hydroxyapatite composite scaffolds fabricated without the use of organic solvents for bone tissue engineering applications". *Materials Science and Engineering: C*, **32** (3): 416, 2012.
89. LEE, K. Y. & MOONEY, D. J. "Hydrogels for Tissue Engineering". *Chem. Rev.*, **101** (7): 1869, 2001.

90. GRIFFITH, L. G. & NAUGHTON, G. "Tissue Engineering--Current Challenges and Expanding Opportunities". *Science*, **295** (5557): 1009, 2002.
91. GRIFFITH, L. G. "Polymeric biomaterials". *Acta Mater.*, **48** (1): 263, 2000.
92. CHOI, D.; MARRA, K. G. & KUMTA, P. N. "Chemical synthesis of hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) composites". *Mater. Res. Bull.*, **39** (3): 417, 2004.
93. CHO, Y. & BORGENS, R. B. "Polymer and nano-technology applications for repair and reconstruction of the central nervous system". *Exp. Neurol.*, **233** (1): 126, 2012.
94. PAN, L.; PEI, X.; HE, R.; WAN, Q. & WANG, J. "Multiwall carbon nanotubes/polycaprolactone composites for bone tissue engineering application". *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, **93** 226, 2012.
95. KOSHY, S. T.; ZHANG, D. K. Y.; GROLMAN, J. M.; STAFFORD, A. G. & MOONEY, D. J. "Injectable nanocomposite cryogels for versatile protein drug delivery". *Acta Biomater.*, **65** 36, 2018.
96. STÖBER, W.; FINK, A. & BOHN, E. "Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range". *J. Colloid Interface Sci.*, **26** (1): 62, 1968.
97. ZHANG, Y.; WANG, Q.; WANG, C. & WANG, T. "High-strain shape memory polymer networks crosslinked by SiO₂". *J. Mater. Chem.*, **21** (25): 9073, 2011.
98. RAMBAUD, F.; VALLÉ, K.; THIBAUD, S.; JULIÁN-LÓPEZ, B. & SANCHEZ, C. "One-Pot Synthesis of Functional Helicoidal Hybrid Organic-Inorganic Nanofibers with Periodically Organized Mesoporosity". *Adv. Funct. Mater.*, **19** (18): 2896, 2009.
99. BUCHTOVA, N.; RETHORE, G.; BOYER, C.; GUICHEUX, J.; RAMBAUD, F.; VALLE, K.; BELLEVILLE, P.; SANCHEZ, C.; CHAUVET, O.; WEISS, P. & LE BIDEAU, J. "Nanocomposite hydrogels for cartilage tissue engineering: mesoporous silica nanofibers interlinked with siloxane derived polysaccharide". *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **24** (8): 1875, 2013.
100. WANG, S. "Ordered mesoporous materials for drug delivery". *Microporous Mesoporous Mater.*, **117** (1–2): 1, 2009.
101. PERCY, M. J. A., J. I.; RANDALL, D. P.; ARMES, S. P. In *Langmuir* 2004; Vol. 20, p 2184.
102. BORSACCHI, S.; GEPPI, M.; VERACINI, C. A.; FALLANI, F.; RICCI, L. & RUGGERI, G. "Improving compatibility in LDPE-silica dispersions by photo-grafting reaction. Preparation and solid state NMR investigation". *J. Mater. Chem.*, **16** (47): 4581, 2006.
103. BOURGEAT-LAMI, E. & LANG, J. "Encapsulation of Inorganic Particles by Dispersion Polymerization in Polar Media: 1. Silica Nanoparticles Encapsulated by Polystyrene". *J. Colloid Interface Sci.*, **197** (2): 293, 1998.

104. LIU, G.; LI, L.; YANG, X. & DAI, Z. "Preparation of silica/polymer hybrid microspheres and the corresponding hollow polymer microspheres with functional groups". *Polym. Adv. Technol.*, **19** (12): 1922, 2008.
105. SALA, R. L.; ARANTES, T. M.; LONGO, E.; LEITE, E. R.; PARANHOS, C. M. & CAMARGO, E. R. "Evaluation of modified silica nanoparticles in carboxylated nitrile rubber nanocomposites". *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects*, **462** (0): 45, 2014.
106. CHANG, B.; CHEN, D.; WANG, Y.; CHEN, Y.; JIAO, Y.; SHA, X. & YANG, W. "Bioresponsive Controlled Drug Release Based on Mesoporous Silica Nanoparticles Coated with Reductively Sheddable Polymer Shell". *Chem. Mater.*, **25** (4): 574, 2013.
107. SANNA, R.; SANNA, D.; ALZARI, V.; NUVOLI, D.; SCOGNAMILLO, S.; PICCININI, M.; LAZZARI, M.; GIOFFREDI, E.; MALUCELLI, G. & MARIANI, A. "Synthesis and characterization of graphene-containing thermoresponsive nanocomposite hydrogels of poly(N-vinylcaprolactam) prepared by frontal polymerization". *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **50** (19): 4110, 2012.
108. ESTEVES, A. C. C. T., A. B.; TRINDADE, T. "Nanocompósitos de Matriz Polimérica: Estratégias de Síntese de Materiais Híbridos". *Quim. Nova*, **27** 798, 2004.
109. ZOU, H.; WU, S. & SHEN, J. "Polymer/Silica Nanocomposites: Preparation, Characterization, Properties, and Applications". *Chem. Rev.*, **108** (9): 3893, 2008.
110. SENGUPTA, R.; CHAKRABORTY, S.; BANDYOPADHYAY, S.; DASGUPTA, S.; MUKHOPADHYAY, R.; AUDDY, K. & DEURI, A. S. "A short review on rubber/clay nanocomposites with emphasis on mechanical properties". *Polymer Engineering & Science*, **47** (11): 1956, 2007.
111. XU, X. & ASHER, S. A. "Synthesis and Utilization of Monodisperse Hollow Polymeric Particles in Photonic Crystals". *J. Am. Chem. Soc.*, **126** (25): 7940, 2004.
112. WAN, J.; WANG, J. H.; LIU, T.; XIE, Z.; YU, X. F. & LI, W. "Surface chemistry but not aspect ratio mediates the biological toxicity of gold nanorods in vitro and in vivo". *Sci Rep*, **5** 11398, 2015.
113. WANG, S.; LU, W.; TOVMACHENKO, O.; RAI, U. S.; YU, H. & RAY, P. C. "Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes". *Chem. Phys. Lett.*, **463** (1): 145, 2008.
114. SHARIF, F.; PORTA, F.; MEIJER, A. H.; KROS, A. & RICHARDSON, M. K. "Mesoporous silica nanoparticles as a compound delivery system in zebrafish embryos". *Int J Nanomedicine*, **7** 1875, 2012.

115. ZHAO, Y.; SHEN, Y. & BAI, L. "Effect of chemical modification on carbon dioxide adsorption property of mesoporous silica". *J. Colloid Interface Sci.*, **379** (1): 94, 2012.
116. RAMPERSAD, S. N. "Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays". *Sensors*, **12** (9): 12347, 2012.
117. PAGE, B.; PAGE, M. & NOEL, C. "A new fluorimetric assay for cytotoxicity measurements in vitro". *Int. J. Oncol.*, **3** (3): 473, 1993.
118. PALMA, P. R. Avaliação da Anexina V e Calceína AM como Marcadores de Apoptose em Linfócitos. Florianópolis, Programa de Pós-Graduação em Farmácia - UFSC, 2005. Programa de Pós-Graduação em Farmácia 91 p.
119. BIAN, L.; HOU, C.; TOUS, E.; RAI, R.; MAUCK, R. L. & BURDICK, J. A. "The influence of hyaluronic acid hydrogel crosslinking density and macromolecular diffusivity on human MSC chondrogenesis and hypertrophy". *Biomaterials*, **34** (2): 413, 2013.
120. FARNDALE, R. W.; BUTTLE, D. J. & BARRETT, A. J. "Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **883** (2): 173, 1986.
121. MCGOWAN, K. B.; KURTIS, M. S.; LOTTMAN, L. M.; WATSON, D. & SAH, R. L. "Biochemical quantification of DNA in human articular and septal cartilage using PicoGreen® and Hoechst 33258". *Osteoarthritis and Cartilage*, **10** (7): 580, 2002.
122. STEGEMANN, H. & STALDER, K. "Determination of hydroxyproline". *Clin. Chim. Acta*, **18** (2): 267, 1967.
123. KIM, M.; ERICKSON, I. E.; CHOUDHURY, M.; PLESHKO, N. & MAUCK, R. L. "Transient exposure to TGF-3 improves the functional chondrogenesis of MSC-laden hyaluronic acid hydrogels". *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, **11** 92, 2012.
124. KIRSTEIN, J.; PLATSCHEK, B.; JUNG, C.; BROWN, R.; BEIN, T. & BRÄUCHLE, C. "Exploration of nanostructured channel systems with single-molecule probes". *Nature Materials*, **6** 303, 2007.
125. HUO, Q.; MARGOLESE, D. I.; CIESLA, U.; FENG, P.; GIER, T. E.; SIEGER, P.; LEON, R.; PETROFF, P. M.; SCHÜTH, F. & STUCKY, G. D. "Generalized synthesis of periodic surfactant/inorganic composite materials". *Nature*, **368** 317, 1994.
126. HOFFMANN, F.; CORNELIUS, M.; MORELL, J. & FRÖBA, M. "Silica-Based Mesoporous Organic-Inorganic Hybrid Materials". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45** (20): 3216, 2006.

127. YANG, S.; ZHAO, L.; YU, C.; ZHOU, X.; TANG, J.; YUAN, P.; CHEN, D. & ZHAO, D. "On the Origin of Helical Mesostructures". *J. Am. Chem. Soc.*, **128** (32): 10460, 2006.
128. PRAVAZ, O.; DROZ, B.; SCHURTENBERGER, P. & DIETSCH, H. "The influences of the transfer method and particle surface chemistry on the dispersion of nanoparticles in nanocomposites". *Nanoscale*, **4** (21): 6856, 2012.
129. BHATTACHARJEE, S. "DLS and zeta potential – What they are and what they are not?". *J. Controlled Release*, **235** 337, 2016.
130. COLLINS, A. M. In *Nanotechnology Cookbook*; Collins, A. M., Ed.; Elsevier: Oxford, 2012 Number of 17p.
131. KRESGE, C. T.; LEONOWICZ, M. E.; ROTH, W. J.; VARTULI, J. C. & BECK, J. S. "Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism". *Nature*, **359** 710, 1992.
132. ZELENÁK, V.; BADANIČOVÁ, M.; HALAMOVÁ, D.; ČEJKA, J.; ZUKAL, A.; MURAFKA, N. & GOERIGK, G. "Amine-modified ordered mesoporous silica: Effect of pore size on carbon dioxide capture". *Chem. Eng. J.*, **144** (2): 336, 2008.
133. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. & KIEMLE, D. *The Spectrometric Identification of Organic Compounds*; 7th ed., John Wiley & Sons, 2005, 502 p.
134. PARIDA, S. K.; DASH, S.; PATEL, S. & MISHRA, B. K. "Adsorption of organic molecules on silica surface". *Adv. Colloid Interface Sci.*, **121** (1): 77, 2006.
135. MCDONALD, C. J.; BOUCK, K. J.; CHAPUT, A. B. & STEVENS, C. J. "Emulsion Polymerization of Voided Particles by Encapsulation of a Nonsolvent". *Macromolecules*, **33** (5): 1593, 2000.
136. BAUER, F.; ERNST, H.; DECKER, U.; FINDEISEN, M.; GLÄSEL, H.-J.; LANGGUTH, H.; HARTMANN, E.; MEHNERT, R. & PEUKER, C. "Preparation of scratch and abrasion resistant polymeric nanocomposites by monomer grafting onto nanoparticles, 1 FTIR and multi-nuclear NMR spectroscopy to the characterization of methacryl grafting". *Macromol. Chem. Phys.*, **201** (18): 2654, 2000.
137. ACRES, R. G.; ELLIS, A. V.; ALVINO, J.; LENAHAN, C. E.; KHODAKOV, D. A.; METHA, G. F. & ANDERSSON, G. G. "Molecular Structure of 3-Aminopropyltriethoxysilane Layers Formed on Silanol-Terminated Silicon Surfaces". *The Journal of Physical Chemistry C*, **116** (10): 6289, 2012.
138. PERRUCHOT, C.; KHAN, M. A.; KAMITSI, A.; ARMES, S. P.; WATTS, J. F.; VON WERNE, T. & PATTEN, T. E. "XPS characterisation of core-shell silica-polymer composite particles synthesised by atom transfer radical polymerisation in aqueous media". *Eur. Polym. J.*, **40** (9): 2129, 2004.

139. PREGHENELLA, M.; PEGORETTI, A. & MIGLIARESI, C. "Thermo-mechanical characterization of fumed silica-epoxy nanocomposites". *Polymer*, **46** (26): 12065, 2005.
140. BRACHO, D.; DOUGNAC, V. N.; PALZA, H.; QUIJADA, R. & #XFA. "Functionalization of Silica Nanoparticles for Polypropylene Nanocomposite Applications". *Journal of Nanomaterials*, **2012** 8, 2012.
141. ABDOLLAHI, M. & ROUHANI, M. "Hydrophilic polymer/fumed silica hybrid nanoparticles synthesized via surface-initiated redox polymerization". *Journal of Polymer Research*, **19** (11), 2012.
142. KULKARNI, S. A.; OGALE, S. B. & VIJAYAMOHANAN, K. P. "Tuning the hydrophobic properties of silica particles by surface silanization using mixed self-assembled monolayers". *J. Colloid Interface Sci.*, **318** (2): 372, 2008.
143. BOSQ, N.; GUIGO, N.; VINCENT, L. & SBIRRAZZUOLI, N. "Thermomechanical behavior of a novel biobased poly(furfuryl alcohol)/silica nanocomposite elaborated by smart functionalization of silica nanoparticles". *Polym. Degrad. Stab.*, **118** 137, 2015.
144. ABDELAAL, H. M. "Fabrication of hollow silica microspheres utilizing a hydrothermal approach". *Chin. Chem. Lett.*, **25** (4): 627, 2014.
145. HAUL, R. "S. J. Gregg, K. S. W. Sing: Adsorption, Surface Area and Porosity. 2. Auflage, Academic Press, London 1982. 303 Seiten, Preis: \$ 49.50". *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, **86** (10): 957, 1982.
146. SPERLING, L. H. *Introduction to Physical Polymer Science*; 4th ed., John Wiley & Sons, 2005, 845 p.
147. KALUGIN, D. I.; TALYZENKOV, Y. A. & LACHINOV, M. B. "Radical polymerization of N-vinylcaprolactam in benzene solutions in a wide conversion range". *Polymer Science Series B*, **50** (11): 299, 2008.
148. PATENAUDE, M. & HOARE, T. "Injectable, Degradable Thermoresponsive Poly(N-isopropylacrylamide) Hydrogels". *ACS Macro Letters*, **1** (3): 409, 2012.
149. CHARLET, G.; DUCASSE, R. & DELMAS, G. "Thermodynamic properties of polyolefin solutions at high temperature: 2. Lower critical solubility temperatures for polybutene-1, polypentene-1 and poly(4-methylpentene-1) in hydrocarbon solvents and determination of the polymer-solvent interaction parameter for PB1 and one ethylene-propylene copolymer". *Polymer*, **22** (9): 1190, 1981.
150. KIRSH, Y. E.; YANUL, N. A. & KALNINSH, K. K. "Structural transformations and water associate interactions in poly-N-vinylcaprolactam–water system". *Eur. Polym. J.*, **35** (2): 305, 1999.
151. KERMAGORET, A.; FUSTIN, C.-A.; BOURGUIGNON, M.; DETREMBLEUR, C.; JEROME, C. & DEBUIGNE, A. "One-pot controlled

- synthesis of double thermoresponsive N-vinylcaprolactam-based copolymers with tunable LCSTs". *Polymer Chemistry*, **4** (8): 2575, 2013.
152. ETCHENAUSIA, L.; RODRIGUES, A. M.; HARRISSON, S.; DENIAU LEJEUNE, E. & SAVE, M. "RAFT Copolymerization of Vinyl Acetate and N-Vinylcaprolactam: Kinetics, Control, Copolymer Composition, and Thermoresponsive Self-Assembly". *Macromolecules*, **49** (18): 6799, 2016.
 153. 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)". *Carbohydr. Polym.*, **134** 92, 2015.
 154. LI, H.; ZHANG, Y. M.; XUE, M. Z. & LIU, Y. G. "Amphiphilic Block Copolymers of Polyvinyl Alcohol and Polystyrene and Their Surface Properties". *Polym. J.*, **37** (11): 841, 2005.
 155. BOYKO, V.; PICH, A.; LU, Y.; RICHTER, S.; ARNDT, K.-F. & ADLER, H.-J. P. "Thermo-sensitive poly(N-vinylcaprolactam-co-acetoacetoxyethyl methacrylate) microgels: 1—synthesis and characterization". *Polymer*, **44** (26): 7821, 2003.
 156. ARANHA, I. B. & LUCAS, E. F. "Poli(Álcool Vinílico) Modificado com Cadeias Hidrocarbônicas: Avaliação do Balanço Hidrófilo/Lipófilo". *Polímeros*, **11** 174, 2001.
 157. CANEVAROLO, S. V. *Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros Artliber*, 2002, p.
 158. WU, P.-P.; ZHAO, D.-M.; LI, L.-X.; WANG, H.-S. & LIU, G.-D. "Preparation of blends of poly(methyl methacrylate) copolymers with high glass transition temperatures and low hydrophilicity". *Polymer Engineering & Science*, **53** (11): 2370, 2013.
 159. KALOGERAS, I. M. & BROSTOW, W. "Glass transition temperatures in binary polymer blends". *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, **47** (1): 80, 2009.
 160. BROSTOW, W.; CHIU, R.; KALOGERAS, I. M. & VASSILIKOU-DOVA, A. "Prediction of glass transition temperatures: Binary blends and copolymers". *Mater. Lett.*, **62** (17): 3152, 2008.
 161. BI, Y.; YAN, C.; SHAO, L.; WANG, Y.; MA, Y. & TANG, G. "Well-defined thermoresponsive dendritic polyamide/poly(N-vinylcaprolactam) block copolymers". *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **51** (15): 3240, 2013.
 162. PARK, J.-H.; LEE, Y.-H. & OH, S.-G. "Preparation of Thermosensitive PNIPAm-Grafted Mesoporous Silica Particles". *Macromol. Chem. Phys.*, **208** (22): 2419, 2007.
 163. KARESOJA, M.; MCKEE, J.; KARJALAINEN, E.; HIETALA, S.; BERGMAN, L.; LINDEN, M. & TENHU, H. "Mesoporous silica particles

- grafted with poly(ethyleneoxide-block-N-vinylcaprolactam)". *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **51** (23): 5012, 2013.
164. LI, M.; SONG, X.; ZHANG, T.; ZENG, L. & XING, J. "Aggregation induced emission controlled by a temperature-sensitive organic-inorganic hybrid polymer with a particular LCST". *RSC Advances*, **6** (89): 86012, 2016.
 165. CHUNG, P.-W.; KUMAR, R.; PRUSKI, M. & LIN, V. S. Y. "Temperature Responsive Solution Partition of Organic–Inorganic Hybrid Poly(N-isopropylacrylamide)-Coated Mesoporous Silica Nanospheres". *Adv. Funct. Mater.*, **18** (9): 1390, 2008.
 166. PACE, C. N. "Conformational stability of globular proteins". *Trends Biochem. Sci.*, **15** (1): 14, 1990.
 167. ALF, M. E.; HATTON, T. A. & GLEASON, K. K. "Insights into Thin, Thermally Responsive Polymer Layers Through Quartz Crystal Microbalance with Dissipation". *Langmuir*, **27** (17): 10691, 2011.
 168. TIKTOPULO, E. I.; BYCHKOVA, V. E.; RICKA, J. & PTITSYN, O. B. "Cooperativity of the Coil-Globule Transition in a Homopolymer: Microcalorimetric Study of Poly(N-isopropylacrylamide)". *Macromolecules*, **27** (10): 2879, 1994.
 169. FUCIÑOS, C.; FUCIÑOS, P.; MÍGUEZ, M.; KATIME, I.; PASTRANA, L. M. & RÚA, M. L. "Temperature- and pH-Sensitive Nanohydrogels of Poly(N-Isopropylacrylamide) for Food Packaging Applications: Modelling the Swelling-Collapse Behaviour". *PLoS ONE*, **9** (2): e87190, 2014.
 170. SHIBAYAMA, M.; MIZUTANI, S.-Y. & NOMURA, S. "Thermal Properties of Copolymer Gels Containing N-Isopropylacrylamide". *Macromolecules*, **29** (6): 2019, 1996.
 171. DUBOVİK, A. S.; MAKHAEVA, E. E.; GRINBERG, V. Y. & KHOKHLOV, A. R. "Energetics of Cooperative Transitions of N-Vinylcaprolactam Polymers in Aqueous Solutions". *Macromol. Chem. Phys.*, **206** (9): 915, 2005.
 172. JIA, F.; WANG, S.; ZHANG, X.; XIAO, C.; TAO, Y. & WANG, X. "Amino-functionalized poly(N-vinylcaprolactam) derived from lysine: a sustainable polymer with thermo and pH dual stimuli response". *Polymer Chemistry*, **7** (46): 7101, 2016.
 173. ZUBER, S.; LANDFESTER, K.; CRESPIY, D. & POPA, A.-M. "Temperature responsive copolymers of N-vinylcaprolactam and di(ethylene glycol) methyl ether methacrylate and their interactions with drugs". *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **51** (15): 3308, 2013.
 174. FISSAN, H.; RISTIG, S.; KAMINSKI, H.; ASBACH, C. & EPPLE, M. "Comparison of different characterization methods for nanoparticle dispersions before and after aerosolization". *Analytical Methods*, **6** (18): 7324, 2014.

175. STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A. & PATEL, T. R. "Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences". *Biophysical Reviews*, **8** (4): 409, 2016.
176. HIEMENZ, P. C. & RAJAGOPALAN, R. *Principles of Colloid and Surface Chemistry*; Third Edition ed., Marcel Dekker, Inc, 1997, 650 p.
177. ÖZKAHRAMAN, B.; ACAR, I.; GÖK, M. K. & GÜÇLÜ, G. "N-vinylcaprolactam-based microgels: synthesis, characterization and drug release applications". *Res. Chem. Intermed.*, **42** (6): 6013, 2016.
178. PICH, A.; TESSIER, A.; BOYKO, V.; LU, Y. & ADLER, H.-J. P. "Synthesis and Characterization of Poly(vinylcaprolactam)-Based Microgels Exhibiting Temperature and pH-Sensitive Properties". *Macromolecules*, **39** (22): 7701, 2006.
179. POPESCU, I. & SUFLET, D. M. "Poly(N-vinyl caprolactam-co-maleic acid) microparticles for cationic dye removal". *Polym. Bull.*, **73** (5): 1283, 2016.
180. LIAO, W.; ZHANG, Y.; GUAN, Y. & ZHU, X. X. "Gelation Kinetics of Thermosensitive PNIPAM Microgel Dispersions". *Macromol. Chem. Phys.*, **212** (18): 2052, 2011.
181. 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** (73): 69156, 2016.
182. ZUIDEMA, J. M.; RIVET, C. J.; GILBERT, R. J. & MORRISON, F. A. "A protocol for rheological characterization of hydrogels for tissue engineering strategies". *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **102** (5): 1063, 2014.
183. DURKUT, S. & ELÇİN, Y. M. "Synthesis and characterization of thermosensitive poly(N-vinylcaprolactam)-g-collagen". *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, **45** (8): 1665, 2017.
184. THOMASSIN, J.-M.; MATHIEU, K.; KERMAGORET, A.; FUSTIN, C.-A.; JÉRÔME, C. & DEBUIGNE, A. "Double thermo-responsive hydrogels from poly(vinylcaprolactam) containing diblock and triblock copolymers". *Polymer Chemistry*, **6** (10): 1856, 2015.
185. BOERE, K. W. M.; SOLIMAN, B. G.; RIJKERS, D. T. S.; HENNINK, W. E. & VERMONDEN, T. "Thermoresponsive Injectable Hydrogels Cross-Linked by Native Chemical Ligation". *Macromolecules*, **47** (7): 2430, 2014.
186. ROSALES, A. M.; VEGA, S. L.; DELRIO, F. W.; BURDICK, J. A. & ANSETH, K. S. "Hydrogels with Reversible Mechanics to Probe Dynamic Cell Microenvironments". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **56** (40): 12132, 2017.

187. RODELL, C. B.; KAMINSKI, A. L. & BURDICK, J. A. "Rational Design of Network Properties in Guest–Host Assembled and Shear-Thinning Hyaluronic Acid Hydrogels". *Biomacromolecules*, **14** (11): 4125, 2013.
188. RODELL, C. B.; MACARTHUR, J. W.; DORSEY, S. M.; WADE, R. J.; WANG, L. L.; WOO, Y. J. & BURDICK, J. A. "Shear-Thinning Supramolecular Hydrogels with Secondary Autonomous Covalent Crosslinking to Modulate Viscoelastic Properties In Vivo". *Adv. Funct. Mater.*, **25** (4): 636, 2015.
189. GUVENDIREN, M. & BURDICK, J. A. "Stiffening hydrogels to probe short- and long-term cellular responses to dynamic mechanics". *Nat Commun*, **3** 792, 2012.
190. CHAUDHURI, O.; GU, L.; KLUMPERS, D.; DARNELL, M.; BENCHERIF, S. A.; WEAVER, J. C.; HUEBSCH, N.; LEE, H.-P.; LIPPENS, E.; DUDA, G. N. & MOONEY, D. J. "Hydrogels with tunable stress relaxation regulate stem cell fate and activity". *Nature Materials*, **15** 326, 2015.
191. FERRY, J. D. & FERRY, J. D. *Viscoelastic Properties of Polymers* Wiley, 1980, p.
192. OKAY, O. & OPPERMANN, W. "Polyacrylamide–Clay Nanocomposite Hydrogels: Rheological and Light Scattering Characterization". *Macromolecules*, **40** (9): 3378, 2007.
193. THOMAS, S. & GEORGE, A. "Dynamic mechanical properties of thermoplastic elastomers from blends of polypropylene with copolymers of ethylene with vinyl acetate". *Eur. Polym. J.*, **28** (11): 1451, 1992.
194. REN, K.; HE, C.; XIAO, C.; LI, G. & CHEN, X. "Injectable glycopolyptide hydrogels as biomimetic scaffolds for cartilage tissue engineering". *Biomaterials*, **51** 238, 2015.
195. AGUADO, B. A.; MULYASASMITA, W.; SU, J.; LAMPE, K. J. & HEILSHORN, S. C. "Improving Viability of Stem Cells During Syringe Needle Flow Through the Design of Hydrogel Cell Carriers". *Tissue Engineering Part A*, **18** (7-8): 806, 2011.
196. HALLIGAN, S. C.; DALTON, M. B.; MURRAY, K. A.; DONG, Y.; WANG, W.; LYONS, J. G. & GEEVER, L. M. "Synthesis, characterisation and phase transition behaviour of temperature-responsive physically crosslinked poly (N-vinylcaprolactam) based polymers for biomedical applications". *Materials Science and Engineering: C*, **79** 130, 2017.
197. CARASTAN, D. J.; DEMARQUETTE, N. R.; VERMOGEN, A. & MASENELLI-VARLOT, K. "Linear viscoelasticity of styrenic block copolymers–clay nanocomposites". *Rheol. Acta*, **47** (5): 521, 2008.
198. NUSSER, K.; SCHNEIDER, G. J.; PYCKHOUT-HINTZEN, W. & RICHTER, D. "Viscosity Decrease and Reinforcement in Polymer–Silsesquioxane Composites". *Macromolecules*, **44** (19): 7820, 2011.

199. XU, D.; BHATNAGAR, D.; GERSAPPE, D.; SOKOLOV, J. C.; RAFAILOVICH, M. H. & LOMBARDI, J. "Rheology of Poly(N-isopropylacrylamide)–Clay Nanocomposite Hydrogels". *Macromolecules*, **48** (3): 840, 2015.
200. JIANG, Z.; CAO, X.; LI, Z. & GUO, L. "Rheological behaviors and secondary networks of polyacrylamide hydrogel filled with silica". *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology*, **6** (1): 93, 2016.
201. PATENAUDE, M.; SMEETS, N. M. B. & HOARE, T. "Designing Injectable, Covalently Cross-Linked Hydrogels for Biomedical Applications". *Macromol. Rapid Commun.*, **35** (6): 598, 2014.
202. FITARONI, L. B.; DE LIMA, J. A.; CRUZ, S. A. & WALDMAN, W. R. "Thermal stability of polypropylene–montmorillonite clay nanocomposites: Limitation of the thermogravimetric analysis". *Polym. Degrad. Stab.*, **111** 102, 2015.
203. KOZANOGLU, S.; OZDEMIR, T. & USANMAZ, A. "Polymerization of N-Vinylcaprolactam and Characterization of Poly(N-Vinylcaprolactam)". *Journal of Macromolecular Science: Pure & Applied Chemistry*, **48** (6): 467, 2011.
204. LEVCHIK, S. V.; LEVCHIK, G. F.; BALABANOVICH, A. I.; CAMINO, G. & COSTA, L. "Mechanistic study of combustion performance and thermal decomposition behaviour of nylon 6 with added halogen-free fire retardants". *Polym. Degrad. Stab.*, **54** (2): 217, 1996.
205. PRAMODA, K. P.; LIU, T.; LIU, Z.; HE, C. & SUE, H.-J. "Thermal degradation behavior of polyamide 6/clay nanocomposites". *Polym. Degrad. Stab.*, **81** (1): 47, 2003.
206. HOLLAND, B. J. & HAY, J. N. "The thermal degradation of poly(vinyl acetate) measured by thermal analysis–Fourier transform infrared spectroscopy". *Polymer*, **43** (8): 2207, 2002.
207. LIU, P.; GONG, K.; XIAO, P. & XIAO, M. "Preparation and characterization of poly(vinyl acetate)-intercalated graphite oxide nanocomposite". *J. Mater. Chem.*, **10** (4): 933, 2000.
208. MAURIN, M. B.; DITTERT, L. W. & HUSSAIN, A. A. "Thermogravimetric analysis of ethylene-vinyl acetate copolymers with Fourier transform infrared analysis of the pyrolysis products". *Thermochim. Acta*, **186** (1): 97, 1991.
209. SINHA RAY, S. & OKAMOTO, M. "Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing". *Prog. Polym. Sci.*, **28** (11): 1539, 2003.
210. FUKUSHIMA, K.; TABUANI, D.; ABBATE, C.; ARENA, M. & RIZZARELLI, P. "Preparation, characterization and biodegradation of biopolymer nanocomposites based on fumed silica". *Eur. Polym. J.*, **47** (2): 139, 2011.

211. JI, X.; HAMPSEY, J. E.; HU, Q.; HE, J.; YANG, Z. & LU, Y. "Mesoporous Silica-Reinforced Polymer Nanocomposites". *Chem. Mater.*, **15** (19): 3656, 2003.
212. CHUNG, C. & BURDICK, J. A. "Engineering cartilage tissue". *Adv. Drug Del. Rev.*, **60** (2): 243, 2008.
213. ERICKSON, I. E.; HUANG, A. H.; SENGUPTA, S.; KESTLE, S.; BURDICK, J. A. & MAUCK, R. L. "Macromer density influences mesenchymal stem cell chondrogenesis and maturation in photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels". *Osteoarthritis and Cartilage*, **17** (12): 1639, 2009.
214. MAKRIS, E. A.; GOMOLL, A. H.; MALIZOS, K. N.; HU, J. C. & ATHANASIOU, K. A. "Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage". *Nat Rev Rheumatol*, **11** (1): 21, 2015.
215. SIVASHANMUGAM, A.; ARUN KUMAR, R.; VISHNU PRIYA, M.; NAIR, S. V. & JAYAKUMAR, R. "An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering". *Eur. Polym. J.*, **72** 543, 2015.
216. TEMENOFF, J. S. & MIKOS, A. G. "Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage". *Biomaterials*, **21** (5): 431, 2000.
217. REZENDE, M. U. O.; HERNANDEZ, A. J.; CAMANHO, G. L. & AMATUZZI, M. M. "Cartilagem Articular e Osteoartrose". *Acta Ortopédica Brasileira*, **8** 100, 2000.
218. VELOSA, A. P. P.; TEODORO, W. R. & YOSHINARI, N. H. "Colágeno na cartilagem osteoartrótica". *Revista Brasileira de Reumatologia*, **43** 160, 2003.
219. IZADIFAR, Z.; CHEN, X. & KULYK, W. "Strategic Design and Fabrication of Engineered Scaffolds for Articular Cartilage Repair". *Journal of Functional Biomaterials*, **3** (4): 799, 2012.
220. CRUZ, I. B. M. D.; SEVERO, A. L.; AZZOLIN, V. F.; GARCIA, L. F. M.; KUHN, A. & LECH, O. "Regenerative potential of the cartilaginous tissue in mesenchymal stem cells: update, limitations, and challenges". *Revista Brasileira de Ortopedia*, **52** 2, 2017.
221. JIANG, Y. & TUAN, R. S. "Origin and function of cartilage stem/progenitor cells in osteoarthritis". *Nature Reviews Rheumatology*, **11** 206, 2014.
222. GONZÁLEZ-CRUZ, R. D.; FONSECA, V. C. & DARLING, E. M. "Cellular mechanical properties reflect the differentiation potential of adipose-derived mesenchymal stem cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109** (24): 9234, 2012.
223. HUANG, B. J.; HU, J. C. & ATHANASIOU, K. A. "Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage". *Biomaterials*, **98** 1, 2016.
224. BIAN, L.; GUVENDIREN, M.; MAUCK, R. L. & BURDICK, J. A. "Hydrogels that mimic developmentally relevant matrix and N-cadherin interactions

- enhance MSC chondrogenesis". Proceedings of the National Academy of Sciences, **110** (25): 10117, 2013.
225. KIM, I. L.; MAUCK, R. L. & BURDICK, J. A. "Hydrogel design for cartilage tissue engineering: A case study with hyaluronic acid". Biomaterials, **32** (34): 8771, 2011.
 226. PARK, K. M.; LEE, S. Y.; JOUNG, Y. K.; NA, J. S.; LEE, M. C. & PARK, K. D. "Thermosensitive chitosan–Pluronic hydrogel as an injectable cell delivery carrier for cartilage regeneration". Acta Biomater., **5** (6): 1956, 2009.
 227. REJINOLD, N. S.; CHENNAZHI, K. P.; NAIR, S. V.; TAMURA, H. & JAYAKUMAR, R. "Biodegradable and thermo-sensitive chitosan-g-poly(N-vinylcaprolactam) nanoparticles as a 5-fluorouracil carrier". Carbohydr. Polym., **83** (2): 776, 2011.
 228. MARKVICHEVA, E. A.; TKACHUK, N. E.; KUPTSOVA, S. V.; DUGINA, T. N.; STRUKOVA, S. M.; KIRSSH, Y. E.; ZUBOV, V. P. & RUMISH, L. D. "Stabilization of proteases by entrapment in a new composite hydrogel". Appl. Biochem. Biotechnol., **61** (1): 75, 1996.
 229. SRIVASTAVA, A. & KUMAR, A. "Thermoresponsive poly(N-vinylcaprolactam) cryogels: synthesis and its biophysical evaluation for tissue engineering applications". J. Mater. Sci. Mater. Med., **21** (11): 2937, 2010.
 230. MELLATI, A.; VALIZADEH KIAMAHALLEH, M.; DAI, S.; BI, J.; JIN, B. & ZHANG, H. "Influence of polymer molecular weight on the in vitro cytotoxicity of poly (N-isopropylacrylamide)". Materials Science and Engineering: C, **59** 509, 2016.
 231. BERTOLDI, S.; FARÈ, S.; HAUGEN, H. J. & TANZI, M. C. "Exploiting novel sterilization techniques for porous polyurethane scaffolds". J. Mater. Sci. Mater. Med., **26** (5): 1, 2015.
 232. WILLIAMS, C. G.; MALIK, A. N.; KIM, T. K.; MANSON, P. N. & ELISSEEFF, J. H. "Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation". Biomaterials, **26** (11): 1211, 2005.
 233. LEE, B.; JIAO, A.; YU, S.; YOU, J. B.; KIM, D.-H. & IM, S. G. "Initiated chemical vapor deposition of thermoresponsive poly(N-vinylcaprolactam) thin films for cell sheet engineering". Acta Biomater., **9** (8): 7691, 2013.
 234. BIAN, L.; ZHAI, D. Y.; TOUS, E.; RAI, R.; MAUCK, R. L. & BURDICK, J. A. "Enhanced MSC chondrogenesis following delivery of TGF- β 3 from alginate microspheres within hyaluronic acid hydrogels in vitro and in vivo". Biomaterials, **32** (27): 6425, 2011.
 235. O'CONNOR, C. J.; LEDDY, H. A.; BENEFIELD, H. C.; LIEDTKE, W. B. & GUILAK, F. "TRPV4-mediated mechanotransduction regulates the metabolic response of chondrocytes to dynamic loading". Proceedings of the National Academy of Sciences, **111** (4): 1316, 2014.

236. PARK, H.; TEMENOFF, J. S.; TABATA, Y.; CAPLAN, A. I. & MIKOS, A. G. "Injectable biodegradable hydrogel composites for rabbit marrow mesenchymal stem cell and growth factor delivery for cartilage tissue engineering". *Biomaterials*, **28** (21): 3217, 2007.
237. HUNG, K.-C.; TSENG, C.-S.; DAI, L.-G. & HSU, S.-H. "Water-based polyurethane 3D printed scaffolds with controlled release function for customized cartilage tissue engineering". *Biomaterials*, **83** 156, 2016.
238. ERICKSON, I. E.; VAN VEEN, S. C.; SENGUPTA, S.; KESTLE, S. R. & MAUCK, R. L. "Cartilage Matrix Formation by Bovine Mesenchymal Stem Cells in Three-dimensional Culture Is Age-dependent". *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, **469** (10): 2744, 2011.
239. NADERI-MESHKIN, H.; ANDREAS, K.; MATIN, M. M.; SITTINGER, M.; BIDKHORI, H. R.; AHMADIANKIA, N.; BAHRAMI, A. R. & RINGE, J. "Chitosan-based injectable hydrogel as a promising in situ forming scaffold for cartilage tissue engineering". *Cell Biol. Int.*, **38** (1): 72, 2014.
240. SCHUH, E.; HOFMANN, S.; STOK, K.; NOTBOHM, H.; MÜLLER, R. & ROTTER, N. "Chondrocyte redifferentiation in 3D: The effect of adhesion site density and substrate elasticity". *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **100A** (1): 38, 2012.
241. CHEN, J.-P. & CHENG, T.-H. "Thermo-Responsive Chitosan-graft-poly(N-isopropylacrylamide) Injectable Hydrogel for Cultivation of Chondrocytes and Meniscus Cells". *Macromol. Biosci.*, **6** (12): 1026, 2006.
242. KUMAR, D.; LYNESS, A.; GERGES, I.; LENARDI, C.; FORSYTH, N. R. & LIU, Y. "Stem Cell Delivery with Polymer Hydrogel for Treatment of Intervertebral Disc Degeneration: From 3D Culture to Design of the Delivery Device for Minimally Invasive Therapy". *Cell Transplant*, 2016.
243. ELISSEEFF, J. "Injectable cartilage tissue engineering". *Expert Opinion on Biological Therapy*, **4** (12): 1849, 2004.
244. ERICKSON, I. E.; HUANG, A. H.; CHUNG, C.; LI, R. T.; BURDICK, J. A. & MAUCK, R. L. "Differential Maturation and Structure–Function Relationships in Mesenchymal Stem Cell- and Chondrocyte-Seeded Hydrogels". *Tissue Engineering Part A*, **15** (5): 1041, 2009.
245. CAO, B.; LI, Z.; PENG, R. & DING, J. "Effects of cell–cell contact and oxygen tension on chondrogenic differentiation of stem cells". *Biomaterials*, **64** 21, 2015.
246. NEUMANN, A. J.; QUINN, T. & BRYANT, S. J. "Nondestructive evaluation of a new hydrolytically degradable and photo-clickable PEG hydrogel for cartilage tissue engineering". *Acta Biomater.*, **39** 1, 2016.
247. WANG, L.-S.; DU, C.; TOH, W. S.; WAN, A. C. A.; GAO, S. J. & KURISAWA, M. "Modulation of chondrocyte functions and stiffness-

- dependent cartilage repair using an injectable enzymatically crosslinked hydrogel with tunable mechanical properties". *Biomaterials*, **35** (7): 2207, 2014.
248. YUAN, L.; LI, B.; YANG, J.; NI, Y.; TENG, Y.; GUO, L.; FAN, H.; FAN, Y. & ZHANG, X. "Effects of Composition and Mechanical Property of Injectable Collagen I/II Composite Hydrogels on Chondrocyte Behaviors". *Tissue Engineering Part A*, **22** (11-12): 899, 2016.
249. PARK, K.-H.; LEE, D. H. & NA, K. "Transplantation of poly(N-isopropylacrylamide-co-vinylimidazole) hydrogel constructs composed of rabbit chondrocytes and growth factor-loaded nanoparticles for neocartilage formation". *Biotechnol. Lett.*, **31** (3): 337, 2009.
250. PEROGLIO, M.; GRAD, S.; MORTISEN, D.; SPRECHER, C. M.; ILLIEN-JÜNGER, S.; ALINI, M. & EGLIN, D. "Injectable thermoreversible hyaluronan-based hydrogels for nucleus pulposus cell encapsulation". *European Spine Journal*, **21** (6): 839, 2012.
251. PEROGLIO, M.; EGLIN, D.; BENNEKER, L. M.; ALINI, M. & GRAD, S. "Thermoreversible hyaluronan-based hydrogel supports in vitro and ex vivo disc-like differentiation of human mesenchymal stem cells". *The Spine Journal*, **13** (11): 1627, 2013.
252. TAGUCHI, T.; XU, L.; KOBAYASHI, H.; TANIGUCHI, A.; KATAOKA, K. & TANAKA, J. "Encapsulation of chondrocytes in injectable alkali-treated collagen gels prepared using poly(ethylene glycol)-based 4-armed star polymer". *Biomaterials*, **26** (11): 1247, 2005.
253. PARK, H.; CHOI, B.; HU, J. & LEE, M. "Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering". *Acta Biomater.*, **9** (1): 4779, 2013.