

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

Daniel Vinícius Mistura

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ADESÃO CELULAR DE UMA NOVA CLASSE
DE HIDROGÉIS INJETÁVEIS, TERMO SENSÍVEIS E BIODEGRADÁVEIS**

SOROCABA

2014

Daniel Vinícius Mistura

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ADESÃO CELULAR DE UMA NOVA CLASSE
DE HIDROGÉIS INJETÁVEIS, TERMO SENSÍVEIS E BIODEGRADÁVEIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciência dos Materiais para a
obtenção do título de Mestre em Ciência dos
Materiais.

Orientação: Prof^ª Dr^ª Eliana Aparecida de
Rezende Duek.

SOROCABA

2014

M678s Mistura, Daniel Vinícius.
Síntese, caracterização e adesão celular de uma nova classe de hidrogéis injetáveis, termo sensíveis e biodegradáveis / Daniel Vinícius Mistura. -- 2014.
80 f. : 28 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, *Campus* Sorocaba, Sorocaba, 2014
Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek
Banca examinadora: Walter Ruggeri Waldman, Sônia Maria Malmonge
Bibliografia

1. Polímeros. 2. Materiais biomédicos. I. Título. II. Sorocaba-Universidade Federal de São Carlos.

CDD 668.9

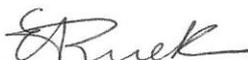
FOLHA DE APROVAÇÃO

DANIEL VINÍCIUS MISTURA

**“SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ADESÃO CELULAR DE UMA NOVA
CLASSE DE HIDROGÉIS INJETÁVEIS, TERMO SENSÍVEIS E
BIODEGRADÁVEIS”.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais - PPGCM, para obtenção do título de mestre em Ciência dos Materiais. Área de concentração Materiais Funcionais e Polímeros de Fontes Renováveis, da Universidade Federal de São Carlos. Sorocaba, 10 de março de 2014.

Orientador(a)



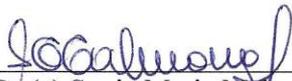
Prof (a). Dr. (a) Eliana Aparecida de Rezende Duek
PUC/SP – Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, campus Sorocaba

Examinador(a)



Prof (a). Dr.(a) Walter Ruggeri Waldman
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba

Examinador(a)



Prof (a). Dr.(a) Sonia Maria Malmonge
UFABC – Universidade Federal do ABC



DEDICATÓRIA

À minha mãe Margaret, por toda a confiança depositada ao longo destes anos; ao meu pai Wilson por acreditar em minha capacidade; ao meu irmão Rafael, por sempre pensar em mim como alguém inteligente; e a minha amada avó Maria in memoriam, que se mantém comigo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha orientadora Eliana Duek, mesmo eu esquecendo dela no primeiro slide da apresentação ela continuou me apoiando para conquistar esse título, por toda a confiança deposita, obrigado;

À Dr^a. Adriana Motta, por toda ajuda despendida no decorrer deste trabalho;

À minha querida Bruna Mas, além de me ensinar muitas coisas de biologia, me ensinou o mais importante, ser um pessoa melhor;

À Clau, que disponibilizou seu tempo para as análises de MEV;

Aos grandes e velhos amigos da Tigre, em especial ao Guilherme Lutti por toda a força e ajuda dispendidos,

Ao grande amigo Sandro Silva que sempre esteve me dando os conselhos mais valiosos possíveis;

Aos amigos de laboratório, Vini, Gi, Ju e principalmente ao André que sempre esteve com seu tempo disponível;

Enfim, à todos que torceram por este trabalho, meu MUITO OBRIGADO!!!!

*Eu posso não ter ido onde eu pretendia ir, mas
eu acho que acabei terminando onde eu
pretendia estar.*

Douglas Adams

RESUMO

MISTURA, Daniel Vinícius, *Síntese, Caracterização e Adesão Celular de uma Nova Classe de Hidrogéis Injetáveis, Termo Sensíveis e Biodegradáveis*, Sorocaba, Universidade Federal de São Carlos, 2014. Dissertação (Mestrado).

A classe de hidrogéis vem sendo amplamente estudada, principalmente como materiais injetáveis para aplicações como biomateriais. Estes hidrogéis podem possuir características de termo sensibilidade próximos à temperatura corporal (LCST – *Lower Critical Solution Temperature* – em torno de 37°C), solidificarem rapidamente, carregarem fármacos, células ou fatores de crescimento celular. O desafio atual é tornar esses hidrogéis biodegradáveis e com propriedades mecânicas otimizadas à sua utilização. O objetivo deste estudo foi sintetizar hidrogéis de poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) a partir de uma nova classe de macrômero composto por 2-hidróxiethyl metacrilato (HEMA), poli(L-co-D,L ácido láctico) e trimetileno carbonato (PLDLA-co-TMC), a fim de conferir ao hidrogel características de biodegradação e propriedades mecânicas adequadas para futuras aplicações em engenharia tecidual cardíaca. Os hidrogéis foram sintetizados através da polimerização via radical livre, com concentrações do macrômero variando de 5%, 10% e 15% (m/m) visando avaliar a influência nas propriedades químicas, mecânicas e térmicas do hidrogel sintetizado. A avaliação macroscópica mostrou que os hidrogéis apresentam características de materiais injetáveis e termo sensíveis. Os ensaios de intumescimento apontaram hidrogéis com absorção de 20, 29 e 63% de água para as composições estudadas. As análises de ressonância magnética nuclear (RMN ^{13}C e ^1H) comprovaram a copolimerização do HEMA com o PLDLA-co-TMC bem como a copolimerização do hidrogel de PNIPAAm-co-AAc-co-HEMAPLDLA-co-TMC. As análises de espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) corroborou os dados encontrados na técnica de RMN ^{13}C e ^1H . A técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) apontou temperaturas de transição vítrea dos hidrogéis 114°C, 130°C e 98°C próximas as encontradas na literatura, além disso, mostrou o comportamento LCST para as amostras nas temperaturas de 29°C, 30°C e 24°C, temperaturas sendo menores que 37°C, indicando que as mesmas podem ser utilizadas no organismo. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) apontou hidrogéis com poros sem interconectividade. Os ensaios mecânicos de tração apontaram hidrogéis com módulo de elasticidade de 531, 922 e 725 kPa e deformações superiores a 500% em todas as composições sintetizadas. A degradação dos materiais foi medida pela perda de massa, bem

como por cromatografia de permeação em gel (GPC) apontou estabilidade dos hidrogéis nas primeiras 4 semanas, e após 10 semanas houve o início da perda de massa. Por fim, os ensaios de interação biológica apontaram o material como citocompatível e não tóxico às células Vero. Sendo assim, os hidrogéis sintetizados são materiais promissores para futuras aplicações em sistemas de carregamento celular para engenharia tecidual.

Palavras-chave: Biomaterial, Hidrogel, Termo sensível, Biodegradável, Citocompatível, Polímero.

ABSTRACT

MISTURA, Daniel Vinícius, *Synthesis, Characterization and Cell Adhesion of a New Class of Hydrogels Injectable, Thermosensitive and Biodegradable*, Sorocaba, Universidade Federal de São Carlos, 2014. Dissertação (Mestrado).

Hydrogels have been widely studied, especially as injectable materials for applications as biomaterials. These hydrogels may possess thermosensitive features near body temperature (LCST – Lower Critical Solution Temperature – around 37°C), rapid gelation, carry drugs, cells or cell growth factors. The current challenge is to make these materials biodegradable and mechanical properties optimized for their use in cardiac tissue engineering. The aim of this study was to synthesize hydrogels of poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) from a new class of macromer consisting of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), poly(L-co-D,L lactic acid) and trimethylene carbonate (PLDLA-co-TMC) in order to give the hydrogel biodegradation characteristics and mechanical properties suitable for future applications in cardiac tissue engineering. Hydrogels were synthesized by free radical polymerization, the macromer having concentrations ranging from 5%, 10% and 15% (w/w) to evaluate the influence in chemical, mechanical and thermal properties. Macroscopic evaluation showed that the hydrogels exhibit characteristics of injectable and thermosensitivity. Swelling tests showed swelling hydrogels with absorption of 20, 29 and 63% of water for compositions. Nuclear Magnetic Resonance (NMR ^{13}C e ^1H) confirmed the copolymerization of HEMA with PLDLA-co-TMC as well as the copolymerization of hydrogel PNIPAAm-co-AAc-co-HEMAPLDLA-co-TMC. Infrared spectroscopy (FTIR) corroborated the data found in (NMR ^{13}C e ^1H). Differential Scanning Calorimetry (DSC) showed a glass transition temperature of 114°C, 130°C and 98°C for hydrogels, near those found in literature, moreover, showed the LCST for samples at 29°C, 30°C and 24°C, temperatures being lower than 37°C, indicating these hydrogels may be used in the human body. Scanning electron microscopy (SEM) showed hydrogels without interconnected pores. Mechanical tensile tests showed hydrogels with Young's Modulus of 531, 922 and 725 kPa, and over 500% strain in all synthesized compositions. Degradation of materials followed by weight loss and gel permeation chromatography (GPC) demonstrated stability of hydrogel during first 4 weeks and after 10 weeks showed the onset of weight loss. Finally, the biological interactions assays showed the material as cytocompatible and non-toxic to Vero cells. Thus, the synthesized hydrogels are promising for future applications in cells carriers for tissue engineering.

Keywords: Biomaterial, Hydrogel, Thermosensitive, Biodegradable, Cytocompatible, Polymer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da rota metabólica e processo de reabsorção dos poli (α - hidroxí ácidos) (BARBANTI <i>et al.</i> , 2005).	28
Figura 2 - Esquema dos métodos de formação dos hidrogéis químicos e físicos (adaptado de Hoffman, 2012).	29
Figura 3 - Aplicações clínicas de hidrogéis (adaptado de KIRSCHNER & ANSETH, 2013)	30
Figura 4 - Diagrama de fases do sistema LCST e UCST (ALMEIDA, 2010).	31
Figura 5 - Estrutura da PNIPAAm (DIMITROV <i>et al.</i> , 2007).....	33
Figura 6 - Transição de fase induzida por temperatura da PNIPAAm (DIMITROV <i>et al.</i> , 2007).....	33
Figura 7 – Organograma da metodologia empregada na síntese e caracterização dos hidrogéis.	35
Figura 8 - Representação esquemática para o HEMAPLDLA- <i>co</i> -TMC e o copolímero poli(NIPAAm- <i>co</i> -AAc- <i>co</i> -HEMAPLDLA- <i>co</i> -TMC).....	37
Figura 9 - Propriedades de solificação do hidrogel de Poli(NIPAAm- <i>co</i> -AAc- <i>co</i> -HEMAPLDLA- <i>co</i> -TMC) 10% w/w. (a) Solução a 4°C; (b) Hidrogel após 10 s em banho termo estabilizado a 37°C; (c) Hidrogel formado após 15 minutos; (d) alongamento do hidrogel após 15 minutos; (e) injeção através de agulha de 26 gauge a 4°C.....	43
Figura 10 – Esquema da estrutura qu do macrômero composto de HEMAPLDLA- <i>co</i> -TMC	45
Figura 11 - Espectro de RMN de H1 para o macrômero obtido na literatura	45
Figura 12 – Estrutura química do fragmento I do macrômero	46
Figura 13 - Comparação entre o espectro do macrômero (sintetizado no trabalho) (A) e do macrômero (HEMA-PLDLA) (B)	47
Figura 14 – Estrutura química do fragmento II do macrômero.....	48
Figura 15 - Comparação entre o espectro de RMN de ^1H “H” referente ao copolímero PLDLA (Motta, 2007) e o espectro “I” referente à síntese do terpolímero PLDLA-TMC, com as regiões ampliadas que são características dos prótons do TMC.	49
Figura 16 - Comparação entre o espectro de RMN ^1H J referente ao copolímero PLDLA-TMC e o espectro K referente à síntese do macrômero HEMAPLDLA- <i>co</i> -TMC.....	50
Figura 17 - Comparação entre o espectro RMN ^{13}C , L referente ao HEMA (FUJITA, 2005) e do espectro M referente ao macrômero.	51
Figura 18 - Comparação entre o espectro RMN ^{13}C , N referente ao PLDLA-TMC (MOTTA, 2013) e ao espectro O referente ao macrômero.....	52

Figura 19 - Representação estrutural do hidrogel sintetizado	53
Figura 20 - Comparação entre o espectro RMN ¹³ C. “a” referente ao PNIPAAm (GONZALEZ, 2008) e ao espectro “b” referente ao poli(NIPAAm-co-AAc-co-HEMAPLDDLA-co-TMC).	54
Figura 21 - Representação das estruturas dos monômeros NIPAAm e AAC.	55
Figura 22 - Comparação entre o espectro RMN ¹ H “a” referente ao macrômero HEMAPLDDLA-co-TMC e “b” referente ao espectro do hidrogel de poli(NIPAAm-co-AAc-co-HEMAPLDDLA-co-TMC).	56
Figura 23 - Comparação entre o espectro de RMN de ¹³ C “e” referente ao macrômero HEMAPLDDLA-co-TMC e “f” referente ao espectro do hidrogel de poli(NIPAAm-co-AAc-co-HEMAPLDDLA-co-TMC).	57
Figura 24 – Estrutura química do monômero NIPAAm com os carbonos correspondentes a 131 ppm (a) e 126 ppm (b).	58
Figura 25 - Espectro de RMN C13 do polímero PNIPAN “b” e “a” do monômero NIPAM onde se nota a ausência dos picos situados em 131 e 126 ppm no polímero PNIPAM (ZHOU <i>et al.</i> ,1994).	58
Figura 26 - Espectro de absorção no infravermelho para o macrômero sintetizado.	59
Figura 27 - Espectro de absorção na região do infravermelho para os hidrogéis sintetizados.	61
Figura 28 - Termogramas indicando as T _g 's dos hidrogéis.	61
Figura 29 - Termograma do comportamento LCST dos Hidrogéis.	63
Figura 30 - Micrografias dos Hidrogéis 5% com ampliação de (a) 1000X e (b) 3000X	64
Figura 31 - Micrografias dos Hidrogéis 10% com ampliação de (a) 200X e (b) 100X	64
Figura 32 - Micrografias dos Hidrogéis 15% com ampliação de (a) 200X e (b) 100X	65
Figura 33 - Comportamento mecânico dos hidrogéis.	66
Figura 34 – Variação da perda de massa em função do tempo de degradação para as amostras dos hidrogéis.	68
Figura 35 - Crescimento celular de fibroblastos cultivados sobre as amostras de poli(NIPAAm-co-AAc-co-HEMAPLDDLA-co-TMC contendo diferentes porcentagens de macrômero, ao longo de 21 dias.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados obtidos a partir da análise de RMN ^{13}C para o macrômero e comparados à literatura.....	53
Tabela 2 - Temperatura de Transição Vítrea para os Hidrogéis sintetizados.	62
Tabela 3 - Valores de Tensão Máxima, Deformação e Módulo de Elasticidade para os hidrogéis obtidos.	66
Tabela 4 - Valores de Mn e Mw obtidos por GPC dos hidrogéis sintetizados.	67
Tabela 5 - Valores de Mn e Mw encontrados por GPC após 10 semanas de degradação.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAc	Ácido Acrílico
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
FTIR	Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier
GPC	Cromatografia de permeação em Gel
HEMA	2-hidroxietil metacrilato
IP	Índice de Polidispersão
LCST	Lower Critical Solution Temperature
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mn	Massa molar média
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo de tetrazólio
Mw	Massa molar ponderal média
NIPAAm	N-ispropilacrilamida
PBS	Solução Tampão de Fosfato
PLDLA- <i>co</i> -TMC	Poli(L- <i>co</i> -D,L ácido lático)- <i>co</i> -trimetileno carbonato
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
T _g	Temperatura de Transição Vítreas
THF	Tetrahidrofurano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 OBJETIVOS	20
1.1.1 Objetivo Geral	20
1.1.2 Objetivos específicos	20
2 BIOMATERIAIS	21
3 ENGENHARIA TECIDUAL	22
4 POLÍMEROS BIORREABSORVÍVEIS E HIDROLÍTICAMENTE DEGRADÁVEIS	25
5 HIDROGÉIS	28
5.1 HIDROGÉIS INTELIGENTES	30
5.1.1 Poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm).....	32
5.1.2 PLDLA- <i>co</i> -TMC	34
6 MATERIAIS E MÉTODOS	35
6.1 MATERIAIS	35
6.2 SÍNTESE DO MACRÔMERO HEMA-POLI(L- <i>co</i> -D,L ÁCIDO LÁTICO – <i>co</i> – TRIMETILENO CARBONATO) (HEMAPDLA- <i>co</i> -TMC)	36
6.3 SÍNTESE DO POLI(NIPAAm- <i>co</i> -AAC- <i>co</i> -HEMAPDLA- <i>co</i> -TMC).....	36
6.4 GRAU DE INTUMESCIMENTO	37
6.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H E ^{13}C (RMN)	38
6.6 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	38
6.7 CROMATOGRAFIA DE PERMEÇÃO EM GEL (GPC)	38
6.8 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)	39
6.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	39
6.10 ENSAIOS MECÂNICOS DE TRAÇÃO	40
6.11 DEGRADAÇÃO DOS HIDROGÉIS	40
6.12 ESTUDO <i>IN VITRO</i> – INTERAÇÃO BIOLÓGICA	40
6.12.1 Cultura de células	40
6.12.2 Ensaio de Viabilidade e crescimento celular	41

6.12.3 Análise estatística.....	41
7 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	42
7.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA	42
7.2 GRAU DE INTUMESCIMENTO.....	44
7.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN DE ¹ H E ¹³ C) DO MACRÔMERO HEMAPLDLA- <i>co</i> -TMC.....	44
7.3.1 Ressonância Magnética RMN de ¹H.....	45
7.3.2 Ressonância Magnética RMN de ¹³C	51
7.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN DE ¹ H E ¹³ C) DO HIDROGEL POLI(NIPAA- <i>co</i> -AAC- <i>co</i> -HEMAPLDLA- <i>co</i> -TMC).....	53
7.4.1 Ressonância Magnética RMN de ¹H.....	53
7.4.2 Ressonância Magnética RMN de ¹³C	57
7.5 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	59
7.5.1 Análise do Macrômero.....	59
7.5.2 Análise dos Hidrogéis.....	60
7.6 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)	61
7.6.1 Comportamento LCST	62
7.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	64
7.8 ENSAIOS MECÂNICOS DE TRAÇÃO	66
7.9 CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (GPC).....	67
7.9.1 Degradação dos Hidrogéis.....	68
8 ESTUDO <i>IN VITRO</i> – INTERAÇÃO BIOLÓGICA	69
9 CONCLUSÃO.....	72
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1 INTRODUÇÃO

Hidrogéis são definidos como redes tridimensionais de homopolímeros ou copolímeros reticulados por vias químicas ou físicas que incham na presença de água (OVERSTREET *et al.*, 2012). Hidrogéis reticulados quimicamente possuem ligações covalentes entre as cadeias poliméricas para formar as reticulações, já hidrogéis reticulados fisicamente possuem ligações não covalentes entre as cadeias poliméricas, são ligados por forças intermoleculares, tais como forças eletrostáticas, hidrofóbicas ou ligações de hidrogênio (BAE *et al.*, 2013).

Hidrogéis injetáveis são candidatos promissores na área dos biomateriais, principalmente visando aplicações na engenharia tecidual, dadas suas características de absorção de quantidades de água e propriedades mecânicas semelhantes aos tecidos, capacidade de encapsulamento de drogas e células, propriedades físicas facilmente mutáveis, além de aplicações minimamente invasivas (TAN & MARRA, 2010; WANG *et al.*, 2010). Várias pesquisas apontam a utilização desta classe de hidrogéis em diversas aplicações, tais como, associação com fármacos, proteínas, fatores de crescimento e células, para auxiliarem na neoformação do tecido onde é implantado (PARK *et al.*, 2009; NGUYEN & LEE, 2010; MACAYA & SPECTOR, 2012).

A “solidificação” dos hidrogéis injetáveis (*gelation*) pode ser obtida envolvendo polimerização química, fotopolimerização e reticulação por vias térmicas (WANG *et al.*, 2010). No âmbito deste estudo, foi empregada a reticulação por vias térmicas, produzindo um hidrogel com características termo sensíveis.

Na classe de hidrogéis termo sensíveis a poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) tem sido amplamente estudada, porém, as maiores desvantagens destes hidrogéis residem nos seguintes aspectos: o fato de não apresentarem biodegradação, de possuírem baixas propriedades mecânicas além do fato de não poderem ser injetados (LI *et al.*, 2009). A fim de sanar tais deficiências, autores apontam a copolimerização de PNIPAAm com poliésteres biodegradáveis (GUAN *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2010; NI *et al.*, 2014) como uma das alternativas para esta classe de hidrogéis.

Neste trabalho foram sintetizados hidrogéis de poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) a partir de uma nova classe de macrômero composto por 2-hidróxi-etil metacrilato (HEMA), L-lactide, D,L-lactide e trimetileno carbonato (TMC) via abertura de anel. Não foram encontrados dados reportados na literatura, sendo este material o responsável

pelo aumento das propriedades mecânicas e características de degradação (segmentos ésteres) aos hidrogéis de PNIPAAm.

O novo hidrogel sintetizado (via radical livre) também possui comportamento LCST (*Lower Critical Solution Temperature*) onde, em temperaturas baixas se apresenta na forma de hidrogel em solução, passível de ser injetado em agulhas de 26 gauge, e quando há aumento na temperatura (valores próximos à temperatura corporal) o gel é formado.

Diante disso o trabalho teve como objetivo sintetizar um novo hidrogel injetável, termo sensível e com características biodegradáveis que possua propriedades mecânicas otimizadas, visando possíveis aplicações futuras na engenharia tecidual cardíaca. Para tanto, os hidrogéis foram caracterizados química, térmica e mecanicamente, bem como através da avaliação da citocompatibilidade e toxicidade do material cultivado com células Vero.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar o hidrogel injetável, termo sensível e biodegradável composto de poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), ácido acrílico (AAc) e o macrômero composto por 2-hidróxietil metacrilato (HEMA) e poli(L-*co*-D,L ácido lático)-*co*-trimetileno carbonato (HEMAPLDLA-*co*-TMC)

1.1.2 Objetivos específicos

Sintetizar um novo macrômero com segmentos ésteres hidrolisáveis composto de HEMAPLDLA-*co*-TMC por polimerização por abertura de anel éster, para modificação de propriedades nos hidrogéis de PNIPAAm.

Sintetizar um novo hidrogel com características injetáveis, termo sensíveis e com característica biodegradável.

Caracterizar os hidrogéis química, térmica e mecanicamente.

Avaliar a degradação *in vitro* e viabilidade celular do hidrogel.

2 BIOMATERIAIS

A Ciência dos Biomateriais compreende o estudo dos materiais e suas interações com o sistema biológico. Isso envolve temas relacionados à ciência dos materiais, incluindo propriedades mecânicas dos materiais, modificação de superfícies dos implantes bem como tópicos biológicos como imunologia, toxicologia e processos de cicatrização.

A definição de Biomateriais estabelecida na *Consensus Development Conference of the European Society for Biomaterials* é a de que “biomaterial é todo material não vivo usado em dispositivo médico, ou biomédico, objetivando a interação com o sistema biológico” (Williams, 1987).

O critério para seleção de um biomaterial deve levar em consideração sua eficiência que é determinada principalmente por duas características: “biocompatibilidade” e “biofuncionalidade”.

Segundo Williams (1987) *biocompatibilidade* é a “habilidade de um material desempenhar, com uma resposta tecidual apropriada em uma aplicação específica”

A medida que a área de pesquisa em Biomateriais foi crescendo, surgiu a necessidade de se redefinir os termos, buscando interação com as áreas aplicadas. Dessa forma, a redefinição de biocompatibilidade ficou como:

Segundo, Williams (2008, 1737-1738):

Habilidade de um biomaterial realizar sua função desejada em relação a uma determinada aplicação sem causar efeitos indesejáveis locais ou sistêmicos, mas gerando um benefício celular ou resposta tecidual apropriada para uma situação específica e otimizando um desempenho clínico relevante para o sucesso da terapia.

Essa definição englobou também o termo biofuncionalidade que segundo Vert *et al* (1992) é definido como a habilidade do material desempenhar uma função específica e apropriada dentro do organismo dependente das propriedades físicas, mecânicas e biológicas.

Embora o sucesso clínico e aplicação dos mais diversos tipos de dispositivos médicos atualmente disponíveis, tenha proporcionado a melhora da qualidade de vida de milhões de pessoas em todo o mundo, existem ainda consideráveis melhorias a serem realizadas. Ratner, (2007) ressalta que o desenvolvimento e aprimoramento de novos dispositivos deve estar fundamentado no princípio de que a natureza biológica é altamente específica, reativa, degradativa, cinética e dinâmica. Diante desta perspectiva, o autor propõe uma lista de idéias centrais “causa/efeito” na qual a nova geração de biomateriais deve buscar

atender a especificidade e funcionamento biológico dos tecidos, visando o desenvolvimento de biomateriais que proporcionem uma melhora satisfatória na forma de atuação com o organismo dos pacientes que necessitam desses dispositivos. (RATNER, 2007).

Entretanto, alguns fatores para a escolha e utilização dos biomateriais utilizados em dispositivos temporários devem ser levados em consideração como, por exemplo, remoção dos produtos da degradação destes materiais, tempo desta degradação no sistema e absorção dos produtos de degradação por rotas metabólicas convencionais. Estas análises são importantes para que não ocorra nenhum dano ao organismo receptor deste material.

O critério para seleção de um polímero para uso com biomaterial envolve dois fatores: as propriedades mecânicas e o tempo de degradação em função das necessidades de aplicação (MIDDLETON & TIPTON, 2000). O polímero ideal para o uso em biomaterial biorreabsorvível pelo organismo deve levar em consideração fatores como: não provocar respostas inflamatórias nos tecidos onde foi implantado, sofrer degradação no organismo somado ao fator bioabsorção, ou seja, o material ser metabolizado pelo organismo ao fim da utilização; ser processado facilmente no produto destinado ao tratamento e por último deve ser facilmente esterilizável (MOURA, 2007).

Polímeros biorreabsorvíveis baseados em rotas sintéticas de obtenção, geralmente mimetizam as moléculas naturais do organismo, como proteínas e polissacarídeos, pois, estes polímeros contêm ligações hidrolisáveis ao longo da cadeia, estas ligações são suscetíveis a biodegradação.

Dentre os principais grupos de biomateriais biorreabsorvíveis destaca-se os poli(α -hidróxi ácidos) devido aos excelentes resultados mecânicos e fisiológicos. Neste grupo o PLLA (poli(L-ácido lático)) e do PGA (poli(Ácido Glicólico)), o produto final da degradação destes polímeros são monômeros ácidos (ácido lático e ácido glicólico) que são convertidos enzimaticamente e cujos produtos participam do ciclo do ácido tricarboxílico. O produto final são ATP (adenosina trifosfato), água e CO₂ que são excretados pelos pulmões e rins (PEZZIN, 2001).

3 ENGENHARIA TECIDUAL

A engenharia tecidual constitui uma área de pesquisa interdisciplinar cuja abordagem mais ampla de seus objetivos inclui o desenvolvimento e manipulação de implantes artificiais, de tecidos gerados em laboratório ou células e moléculas capazes de substituir ou estimular

funcionalmente partes defeituosas ou lesadas do organismo (PLACE *et al.*, 2008; LENAS *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2010). Para tanto, existem três fatores fundamentais a serem considerados no sucesso do desenvolvimento tecidual: (i) a escolha apropriada do tipo celular, (ii) a escolha das propriedades físico-químicas e estrutural do material o qual desempenhará a função de suporte celular, (iii) a compreensão das interações célula/material (HASIRCI & YUCEL, 2007; MURUGAN & RAMAKRISHNA, 2007) .

Células, naturalmente, estão inseridas no tecido nativo em um microambiente tridimensional complexo cuja composição consiste de biomoléculas solúveis (citocinas e fatores de crescimento) e fatores não solúveis (matriz extracelular - MEC). O microambiente fornece não apenas, a integridade estrutural do tecido como também, controla e viabiliza inúmeros processos de transdução de sinais, progressão do ciclo celular e expressão de diferentes fenótipos (SHIN *et al.*, 2007).

A escolha do tipo celular, compreensão do mecanismo biológico de atuação no organismo a nível celular e molecular e exigências nutricionais e fisiológicas exercem influência direta sobre o grau de sucesso obtido na criação de novos tecidos biomiméticos funcionais e desenvolvimento de novos biomateriais (SALTZMAN *et al.*, 2000; KIRKPATRICK *et al.*, 2007; SABIR *et al.*, 2009).

Scaffolds são definidos como estruturas tridimensionais que desempenham a função de atuarem como suporte temporário no processo de cultivo de células e tecidos e, portanto, devem sumarizar as características de uma matriz extracelular (MEC) nativa bem como, atuarem de forma semelhante sob condições fisiológicas viabilizando a formação de um tecido específico com funções apropriadas, semelhantes às encontradas no organismo (MURUGAN & RAMAKRISHNA,2007).

Sabe-se que a escolha do material a ser empregado como suporte (“scaffold”) na engenharia tecidual depende, primeiramente, do tipo de tecido a ser reconstruído e fatores relacionados ao local de aplicação, tais como, viscosidade, tensão/deformação, desgaste mecânico e cisalhamento (MURUGAN & RAMAKRISHNA,2007; SABIR *et al.*,2009). Por exemplo, cerâmicas e compósitos são amplamente usados como arcabouços voltados a reconstrução de tecidos duros, enquanto que, polímeros são empregados na reconstrução de tecidos moles (MURUGAN & RAMAKRISHNA,2007; SABIR *et al.*,2009; LI & GUAN,2011).

Hidrogéis, polímeros hidrofílicos reticulados, representam uma importante classe de biomateriais poliméricos nos campos da biotecnologia e medicina regenerativa por, inicialmente, apresentar excelente biocompatibilidade, provocando respostas inflamatórias

mínimas, trombose e danos nos tecidos. Os hidrogéis também podem inchar, absorvendo grandes quantidades de água sem a dissolução do polímero devido à sua estrutura hidrofílica, mas reticulada estrutura, dando-lhes, assim, características físicas semelhantes às dos tecidos moles. Além disso, os hidrogéis possuem elevada permeabilidade para o oxigênio, nutrientes e outros metabolitos solúveis em água. (NAIR *et al.*, 2010).

Dentro dos princípios que regem a engenharia tecidual, a estratégias de aplicação dessa classe de materiais na forma injetável combinada ao pré cultivo de células têm sido amplamente investigada, proporcionando a obtenção de resultados bastante promissores. A principal vantagem dessa estratégia de aplicação do ponto de vista biológico deve-se à possibilidade de implantação do material na área do tecido lesionado através de procedimentos cirúrgicos minimamente invasivos (TAN *et al.*, 2010; LI & GUAN, 2011).

FUJIMOTO *et al.* (2009), demonstraram que a injeção de hidrogéis produzidos a partir da copolimerização de N-isopropilacrilamida (NIPAAm), ácido acrílico (AAc) e hidroxietil metacrilato e poli(trimetileno carbonato) (HEMAPTMC), previamente cultivados com células vasculares de músculo liso e implantados em corações infartados de ratos, proporcionaram uma melhora satisfatória da regeneração do tecido lesionado e, portanto, o melhoramento das funções do coração (FUJIMOTO *et al.*, 2009)

Outros autores ainda têm ressaltado o potencial de aplicação de hidrogéis injetáveis na reparação tecidual da cartilagem e defeitos osteocondrais, o que revela a versatilidade e benefícios do emprego desses materiais (SPILLER *et al.*, 2011; WENNINK *et al.*, 2013).

O estudo das interações biológicas célula-célula, bem como a influência e viabilidade do emprego do biomaterial sobre o desempenho celular são, freqüentemente, avaliados através de técnicas de cultivo celular. Embora experimentos *in vitro* não reproduzam uma completa gama de respostas celulares observadas a nível sistêmico *in vivo*, os mesmos proporcionam uma considerável compreensão sobre os mecanismos básicos de reconhecimento e interação célula-substrato (SALTZMAN *et al.*, 2000).

O processo de interação célula-biomaterial é altamente dinâmico e depende de vários parâmetros que influenciarão a neoformação tecidual (ANSELME *et al.*, 2000; BAKAKOVÁ *et al.*, 2004; MEYER *et al.*, 2005; von der MARK *et al.*, 2010). Todo o processo de bioreconhecimento pode ser dividido em dois eventos distintos: acelular (evento físico) e celular (evento biológico). A adsorção de proteínas é tida como o primeiro evento que ocorre após o contato de fluidos corpóreos à superfície do material e é governada por forças eletrostáticas não específicas tais como Van der Waals e formação passiva de ligações ligante-receptor. O segundo evento caracteriza-se pela ativa reorganização celular no qual o

recrutamento de receptores e sítios específicos viabilizam o processo de adesão celular e subsequente processo de proliferação, migração e diferenciação celular (BAKAKOVÁ *et al.*, 2004; MEYER *et al.*, 2005; von der MARK *et al.*, 2010).

Por se tratarem de materiais hidrofílicos, com presença de muitos grupos funcionais passíveis de interagirem com o meio aquoso e assim, permitirem a adsorção de proteínas e reconhecimento biológico, a citocompatibilidade e capacidade de materiais hidrogéis estimularem os eventos biológicos acima citados frequentemente é observado (TAN *et al.*, 2010). Contudo, o grau de afinidade celular é modulado pelas características físico-químicas e mecânicas intrínsecas da composição de cada material desenvolvido (LAVIK & LANGER, 2004; MURUGAN *et al.*, 2007).

4 POLÍMEROS BIORREABSORVÍVEIS E HIDROLITICAMENTE DEGRADÁVEIS

Materiais poliméricos biorreabsorvíveis e hidroliticamente degradáveis aplicados na Engenharia Tecidual podem ser definidos como sendo estruturas macromoleculares, que ao entrarem em contato com o fluido corpóreo são passíveis de sofrerem hidrólise e os produtos gerados, absorvidos e eliminados pelas vias metabólicas naturais do organismo (VERT, 2005; HUTMACHER, 2000).

Convencionalmente, todas as classes de polímeros sintéticos aplicados na Engenharia Tecidual e suscetíveis a sofrerem quebra de ligações primárias da cadeia principal, redução da massa molar e conseqüentemente uma mudança das propriedades físico-químicas são denominados polímeros biodegradáveis. No entanto, a nomenclatura amplamente empregada, não reflete os reais mecanismos de degradação nos sistemas biológicos, pois sugere que o processo de degradação dos materiais é promovido por células e não por hidrólise. E ainda, sugere que o fato de um polímero ser biodegradado enzimaticamente sob condições ambientais, ocorrerá *in vivo*. Os Poli(hidroxicanoatos) e a Policaprolactona são naturalmente biodegradados no meio ambiente, enquanto que no organismo, a degradação ocorre apenas pelo processo de hidrólise (VERT, 2005).

O emprego de materiais poliméricos hidroliticamente degradáveis visando aplicações terapêuticas deve-se às inúmeras vantagens inerentes da própria natureza química dos mesmos, dentre elas: apresentam adequada interação biológica, são fáceis de serem processados e moldados de acordo com o modelo de dispositivo e aplicação almejada,

apresentam comportamento viscoelástico e valores de módulo de elasticidade próximos aos dos tecidos em questão, são resistentes a corrosão e, principalmente, são passíveis de sofrerem degradação, o que viabiliza o processo de reconstrução tecidual (GUNATILLAKE & ADHIKARI, 2003; SABIR *et al.*, 2009).

Poliésteres alifáticos são membros de uma grande família de polímeros os quais podem ser obtidos naturalmente em processo de síntese bacteriana tais como os poli (hidroxi alcanatois) (PHAs), ou via síntese química, pela policondensação de hidroxí ácidos, diácidos e diálcool ou/bem como, polimerização de heterodímeros do tipo lactonas e glicolídeos. Os últimos representam uma versátil classe de materiais poliméricos, denominada de Poli (α -hidroxi ácidos), que possuem estrutura química linear com assimetria quiral do átomo de carbono em cada unidade de repetição. (Vert, 2005; Motta *et al.*, 2007). Conforme a escolha da proporção e tipo do monômero e ainda, a configuração espacial da estrutura molecular, estes polímeros exibem diferentes formas químicas estereo-isoméricas que proporcionam a obtenção de materiais com diversas propriedades físicas e mecânicas as quais são fundamentais, na resposta biológica quando aplicados a dispositivos biomédicos (YI *et al.*, 2009).

Dentre os principais polímeros biorreabsorvíveis e hidroliticamente degradáveis atualmente estudados e utilizados na área biomédica, encontram-se os poli(ácido láctico)-PLA, poli(ácido glicólico)-PGA, poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)-PLGA, poli(ϵ -caprolactona)-PCL e seus copolímeros (BARBANTI *et al.*, 2004; WAN *et al.*, 2005; KARAGEORGIU E KAPLAN, 2005, MOTTA *et al.*, 2007; ESPOSITO *et al.*, 2008). Sendo os poliésteres produzidos a partir dos monômeros do ácido láctico e glicólico mais amplamente utilizados devido à superior biocompatibilidade, maior controle sobre a taxa de degradação e histórico de aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) (WAN *et al.*, 2005; YU *et al.*, 2010).

O processo de degradação polimérica pode ser descrito como: em ambiente aquoso, a água penetra na amostra e ataca preferencialmente as ligações químicas da fase amorfa, diminuindo a cadeia polimérica. Regiões cristalinas permanecem e suportam temporariamente as propriedades físicas do dispositivo até serem atingido pela água. Quando tais polímeros, sintetizados à base de ácido láctico, entram em contato com o fluido corpóreo, a água penetra na amostra e inicia-se a cisão hidrolítica de ligações ésteres bem como autocatálise de regiões amorfas da cadeia polimérica, originando, portanto, produtos na forma de oligômeros (ou monômeros) solúveis e não tóxicos (BARBANTI *et al.*, 2005; VERT, 2005; HASIRCI & YUCEL, 2007).

A presença de terminais ácidos catalisa a reação de degradação. Inicialmente, o processo é homogêneo, gerando oligômeros solúveis em água em toda a extensão do material. Os produtos presentes na superfície da matriz são difundidos para o meio, entretanto, a baixa taxa de difusão dos produtos da reação no interior do material gera um acúmulo de ácidos, fazendo com que estruturas densas tenham uma erosão inicial na superfície, mas apresentando uma degradação mais acentuada no centro. É o chamado efeito autocatalítico dos poli (α -hidróxi ácidos). A degradação pode prosseguir por um processo biologicamente ativo (por enzimas dos fluidos orgânicos) ou pela simples clivagem hidrolítica passiva (BARBANTI, 2008).

Hidrofilicidade e regiões amorfas permitem o melhor acesso das moléculas de água e com isso, uma degradação mais rápida, como por exemplo, o grupo metil do PLLA faz com que ele seja hidrofóbico e mais resistente a hidrólise, se degradando mais lentamente quando comparado ao PGA, onde o grupo metil está ausente, fazendo com que este polímero seja hidrofílico e assim mais susceptível a hidrólise.

A taxa da degradação hidrolítica de biomateriais poliméricos é influenciada por múltiplos fatores, entre eles: local de implante, solicitação mecânica, massa molar, distribuição da massa molar, composição química/estereoisomérica, cristalinidade, morfologia, geometria do dispositivo desenvolvido, porosidade, rugosidade da superfície, energia livre de superfície, carga da superfície, pH e presença de aditivos na composição do material (BARBANTI *et al.*, 2005).

Há uma excelente biocompatibilidade dos poliésteres, pois os produtos da biodegradação metabólica do poli (ácido láctico) (CO_2 e H_2O) são reabsorvidos pelo organismo. Neste caso, a degradação metabólica do PLA segue o processo de oxidação do ácido láctico, que por sua vez é convertido em ácido pirúvico. Na presença da acetil-coenzima A (CoA), ocorrerá liberação de CO_2 e conseqüentemente a decomposição em citrato. Este citrato será então incorporado no ciclo dos ácidos tricarbóxicos, que no final eliminará novamente CO_2 e H_2O , conforme o esquema mostrado na Figura 1 (BOSTMAN, 1991).

O grau de cristalinidade determina a taxa de absorção de água pelo polímero, o que conseqüentemente irá influenciar na velocidade de degradação do material (VERT *et al.*, 1992).

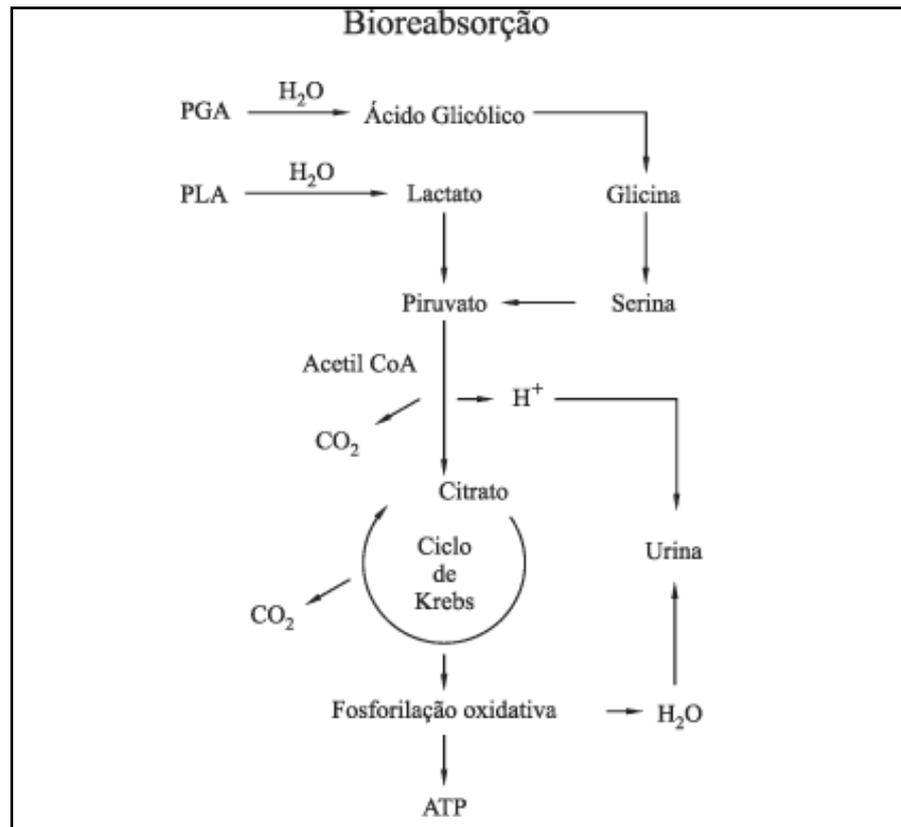


Figura 1 - Representação esquemática da rota metabólica e processo de reabsorção dos poli (α -hidroxi ácidos) (BARBANTI *et al.*, 2005).

5 HIDROGEIS

Hidrogéis podem ser definidos como estruturas poliméricas tridimensionais, hidrofílicas, cuja principal propriedade é absorver grandes quantidades de água ou fluídos biológicos (PEPPAS *et al.*, 2000). Podem ser quimicamente estáveis ou se degradarem, com o tempo podendo eventualmente desintegrar-se (HOFFMAN, 2012).

Estruturalmente são constituídos por uma ou mais redes poliméricas tridimensionalmente estruturadas, formadas por cadeias macromoleculares interligadas por ligações covalentes (reticulações) ou interações físicas (OVIEDO *et al.*, 2008) os quais incham na presença de água ou de fluídos corporais (CORTÉS *et al.*, 2011). quando as reticulações são produzidas por ligações covalentes entre as cadeias poliméricas são chamados hidrogéis químicos (BAE *et al.*, 2013) e quando são formadas por interações físicas ou ligações secundárias são chamados hidrogéis físicos. Estas estruturas poliméricas reticuladas incham em presença de água com ligações covalentes produzidas pela reação de um ou mais comônômeros, ligações reticuladas por emaranhamento de cadeias, associação de ligações moleculares incluindo pontes de hidrogênio ou fortes interações de van der Waals entre

cadeias e cristalitos reunindo duas ou mais cadeias macromoleculares (Figura 2) (PEPPAS *et al*, 2000).

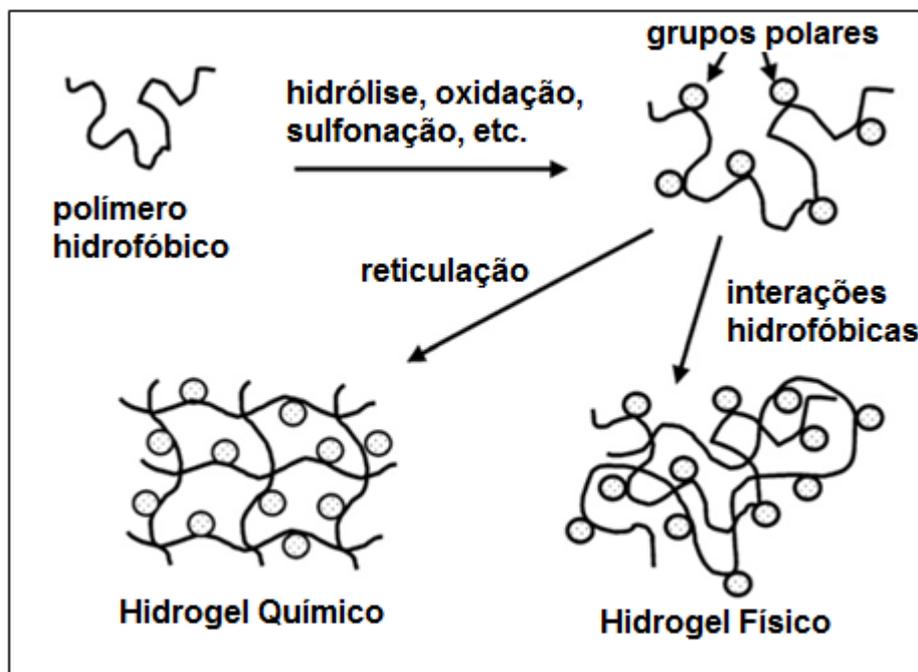


Figura 2 - Esquema dos métodos de formação dos hidrogéis químicos e físicos (adaptado de Hoffman, 2012).

O método de absorção de água num hidrogel foi estudado por diversos cientistas e pode ser facilmente descrito do seguinte modo: quando um hidrogel seco inicia o seu processo de absorção de água, as primeiras moléculas por ele absorvidas irão hidratar as moléculas mais polares da estrutura polimérica, levando a um primeiro tipo de ligação da água com as moléculas do polímero. À medida que estes grupos vão sendo hidratados, ocorre o aumento físico da estrutura polimérica, levando à exposição das moléculas mais hidrofóbicas, até então mais resguardadas no interior da matriz polimérica. Estas interagem com as moléculas de água, levando ao aparecimento de um segundo tipo de ligação das moléculas de água com os componentes mais hidrofóbicos do polímero (ALMEIDA, 2010).

Devido a essas características, os hidrogéis apresentam alta hidrofiliabilidade e insolubilidade. A hidrofiliabilidade dos hidrogéis pode ser controlada pela natureza dos grupamentos presentes em suas cadeias, tais como: - OH, -COOH, -CONH, -NH, -SOH (WATAYA, 2012).

A pesquisa dos hidrogéis como biomateriais remonta da década de 60, quando pesquisadores liderados por Otto Wichterle sintetizaram hidrogéis de poli(2-hidróxi-etil

metacrilato) pHEMA com aplicação em lentes de contato hidrofílicas (BAVARESCO et al., 2002). Desde então os hidrogéis tem se tornado alvo de estudo nas diferentes áreas relacionadas à biomateriais como, por exemplo, liberação de insulina (PENG *et al*, 2013), carregamento de células tronco e fatores de crescimento (WANG *et al*, 2010), liberação controlada de fármacos (ALMEIDA *et al*, 2011), dispositivos ortopédicos (GAHARWAR *et al*, 2011), regeneração de áreas infartadas (FUJIMOTO et al., 2009), entre outros. A Figura 3 ilustra várias aplicações dos hidrogéis no corpo humano.

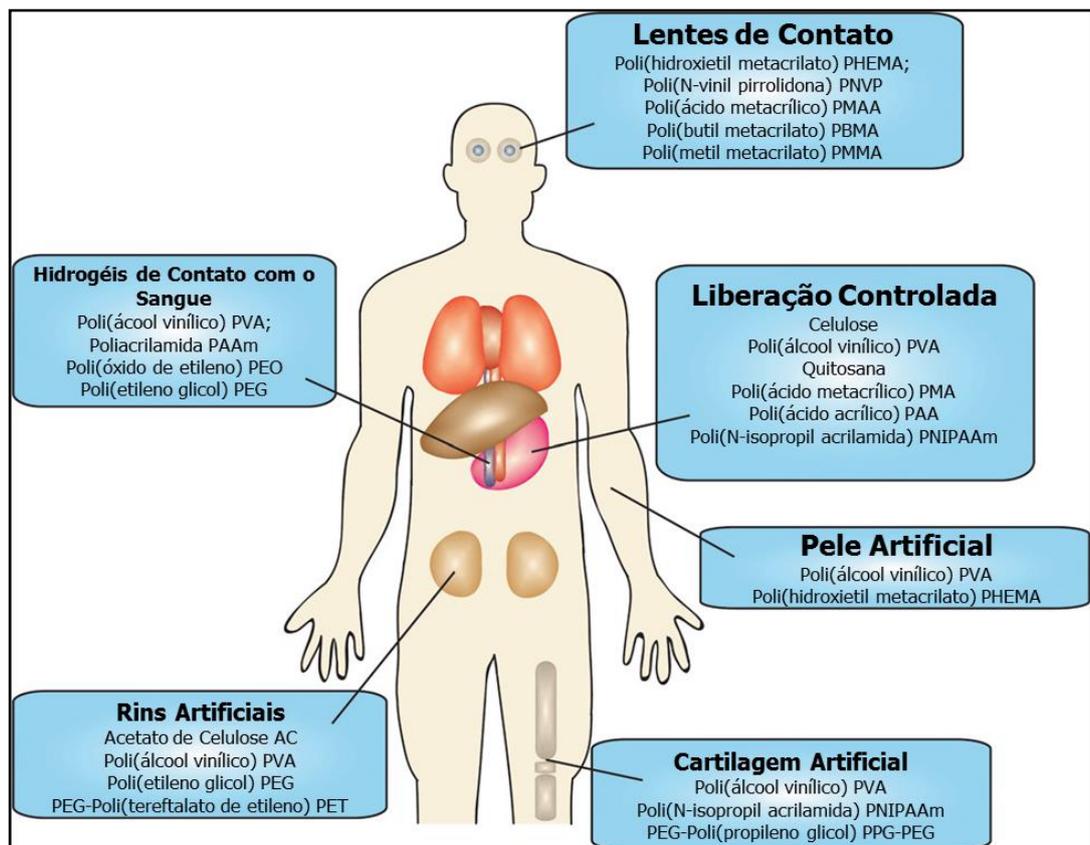


Figura 3 - Aplicações clínicas de hidrogéis (adaptado de KIRSCHNER & ANSETH, 2013)

5.1 HIDROGÉIS INTELIGENTES

Os hidrogéis podem ser divididos em duas classes: os hidrogéis convencionais e os hidrogéis responsivos, chamados de hidrogéis inteligentes. Os hidrogéis inteligentes possuem todas as características descritas para os hidrogéis convencionais, mas apresentam propriedade adicional de exibir variações em suas propriedades quando submetido à estímulos externos, tais como pH, variações de temperatura, variações de força iônica do meio, entre outros (QIU & PARK, 2001).

Uma das principais vantagens desta classe de hidrogéis é de que é possível controlar várias características adequando o material ao meio onde será aplicado (ALMEIDA, 2010).

Hidrogéis termossensíveis (alvo deste estudo), necessitam que pelo menos um de seus componentes possua esta característica, sendo, portanto, insolúvel ou solúvel acima de uma determinada temperatura, ou seja, apresentar uma temperatura de solução crítica inferior (LCST – *low critical solution temperature*) ou uma temperatura de solução crítica superior (UCST – *ultra critical solution temperature*). Para os hidrogéis com comportamento LCST, o volume é reduzido com o aumento da temperatura, onde ocorre a separação de fases. Já para o comportamento oposto, conforme a temperatura aumenta ocorre a contração do material. A Figura 4 apresenta os diagramas de fase para os sistemas LCST e UCST.

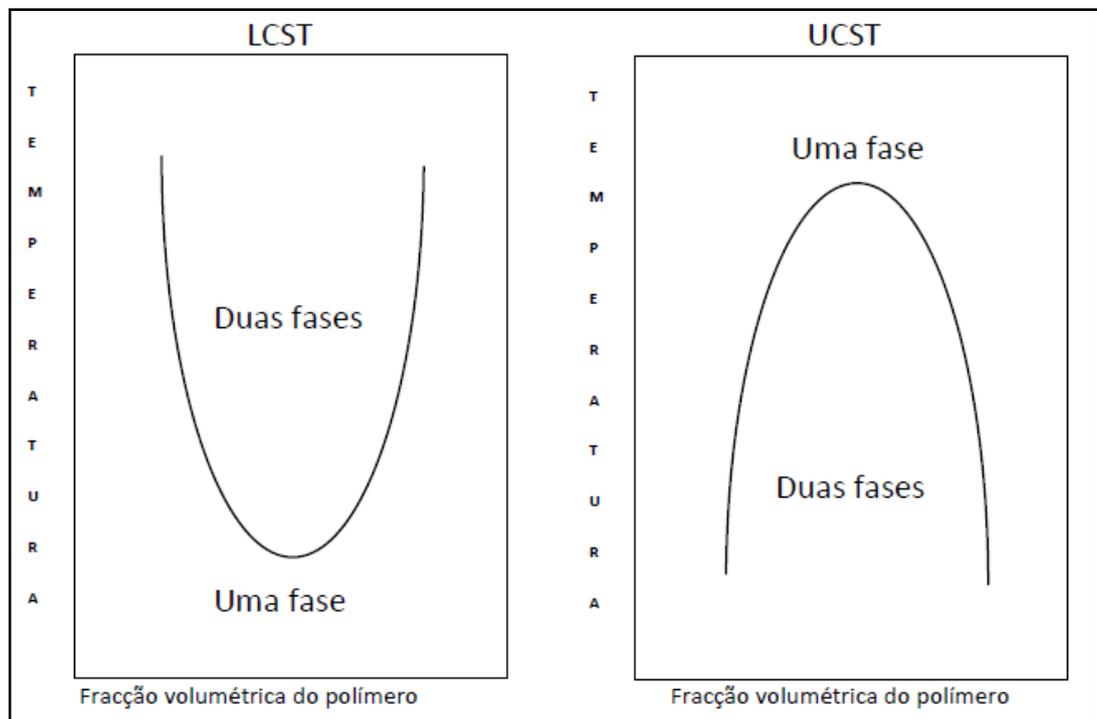


Figura 4 - Diagrama de fases do sistema LCST e UCST (ALMEIDA, 2010).

Nos hidrogéis termossensíveis com comportamento LCST, para temperaturas inferiores à temperatura crítica a solução apresenta apenas uma fase, tendo predominantemente ligações de hidrogênio formadas pelos segmentos hidrofílicos da rede polimérica e as moléculas de água. Conforme a temperatura se eleva as interações hidrofóbicas do sistema se tornam mais fortes e conseqüentemente as ligações de hidrogênio se enfraquecem resultando na contração do gel prevalecendo interações polímero-polímero e solvente-solvente. O comportamento LCST pode ser modificado ajustando-se a razão entre segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos no polímero (balanço anfifílico) (QIU & PARK, 2001).

Esse comportamento é de extrema importância para aplicações com liberação de fármacos ou carreamento celular onde polímeros mais células podem ser injetados na forma de uma solução fluída (sol), após a injeção o material solidifica na temperatura corporal (gel) (PEPPAS et al., 2000).

Existem algumas vantagens consideráveis na utilização destes materiais. Como por exemplo:

- a facilidade com a qual são introduzidos no organismo, não necessitando de procedimento cirúrgico, sendo que uma simples injeção é suficiente para administrar o material no corpo humano de maneira minimamente invasiva;
- a versatilidade de escolha de agentes terapêuticos podem ser incorporados neste material somente misturando na forma de solução;
- a facilidade com que os hidrogéis se adaptam às cavidades ou defeitos quando injetados, tendo em vista que tomarão a forma destes locais, diferentemente dos materiais com forma já definida (RUEL-GARIÉPY & LEROUX, 2004).

5.1.1 Poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm)

Dentre os polímeros termossensíveis um material que vem ganhando ênfase nos estudos é a poli(N-isopropilacrilamida) (EECKMAN *et al.*, 2004) doravante apresentada como PNIPAAm (Figura 5), possui LCST de entre 30 e 34°C (SCHMALJOHANN, 2006), ou seja, abaixo desta temperatura o hidrogel está em estado expandido com a água. Com a aproximação do LCST o gel sofre uma contração repentina expulsando água de seu interior. Este material pode ser modificado quando copolimerizado com monômeros mais hidrofílicos ou hidrofóbicos permitindo modificar a temperatura de transição para próximo da temperatura corporal (SCHILD, 1992). Sendo assim com a redução de temperatura o caráter hidrofílico se sobrepõe ao hidrofóbico, já com o aumento da temperatura o caráter hidrofóbico sobrepõe-se ao hidrofílico (LIU *et al.*, 2007) Para fins de ilustração um esquema da transição de fase da PNIPAAm será apresentado na Figura 6.

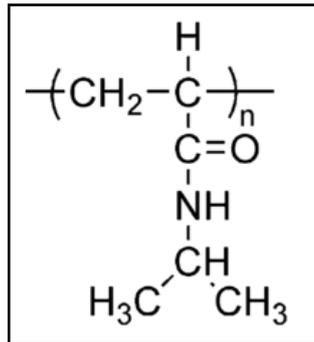


Figura 5 - Estrutura da PNIPAAm (DIMITROV *et al.*, 2007)

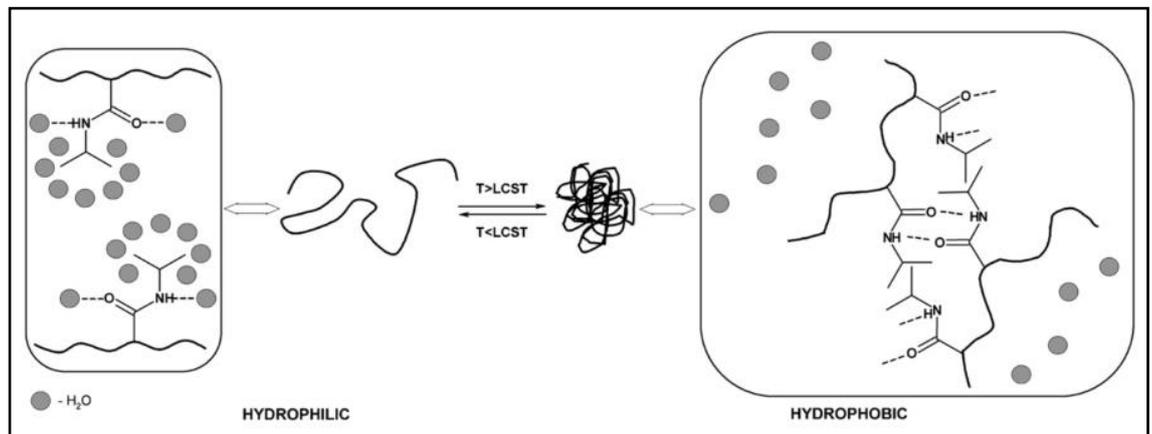


Figura 6 - Transição de fase induzida por temperatura da PNIPAAm (DIMITROV *et al.*, 2007)

A transição de fases da PNIPAAm se deve ao balanço entre os grupos hidrofóbicos e hidrofílicos presente nas cadeias poliméricas, assim sendo, estruturas e propriedades podem ser alterados, bastando somente modificar a quantidade destes grupos na cadeia principal do hidrogel (QIU & PARK, 2001; ALMEIDA, 2010). A PNIPAAm gelifica em temperaturas próximas de 32 °C, muito próximo à temperatura do organismo, graças a isso pode ser utilizada na forma de injeções em temperaturas baixas (líquida), criando um gel quando implantado no corpo humano (FEIL *et al.*, 1993).

A PNIPAAm é alvo de diversas pesquisas, desde liberação de fármacos (CHILKOTI *et al.*, 2002) até aplicação em área de infarto do miocárdio (FUJIMOTO *et al.*, 2009). As principais desvantagens deste material são o fato de não haver biodegradabilidade, biorreabsorção, ser altamente hidrofóbico e possuir baixíssimas propriedades mecânicas (WU *et al.*, 2010), desta forma a incorporação de outros monômeros como ácido acrílico (aumento de hidrofilicidade), poli(ácido láctico) (GUAN *et al.*, 2008), poli(trimetileno carbonato) (FUJIMOTO *et al.*, 2009) podem ser alternativas para tornar os hidrogéis de PNIPAAm degradáveis e otimizar suas propriedades químicas, térmicas e mecânicas.

5.1.2 PLDLA-*co*-TMC

Literaturas recentes reportam a necessidade de se utilizar polímeros do tipo elastoméricos biorreabsorvíveis, voltados para aplicação na área médica, como implantes ou como arcabouços porosos empregados na engenharia tecidual (PÊGO, 2003).

É válido informar que a eficiência na preparação de implantes biomédicos empregando TMC já foi previamente confirmada por estudos (WATANABE, 2008), validando assim sua escolha para fazer parte da cadeia do copolímero PLDLA.

A presença simultânea, na cadeia polimérica, de segmentos de L lactide, D,L lactide e TMC são novos na literatura, atualmente o que existe são cadeias poliméricas formadas por L- lactide/ TMC ou DL lactide/ TMC. A principal diferença do terpolímero proposto neste projeto para os copolímeros mencionados anteriormente é que, para o terpolímero o efeito que a incorporação das unidades de TMC terá numa cadeia polimérica já contendo em sua composição tanto o L-lactide quanto o D,L lactide, ou seja, que já tem sanado alguns problemas como alta cristalinidade e longo tempo de degradação (situação corrente quando somente o L-lactide faz parte da cadeia polimérica) poderá ser muito mais expressivo, em termos de melhorias nas propriedades mecânicas e de biorreabsorção.

A literatura (STOCK, 2001; WANG, 2002) reporta a necessidade em se usar polímeros do tipo elastoméricos biorreabsorvíveis, voltados para aplicação na área médica, como implantes ou como arcabouços porosos empregados na engenharia de tecidos.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo abordará a metodologia utilizada na síntese e caracterização macroscópica, química, morfológica, mecânica e biológica dos hidrogéis estudados.

A Figura 7 mostra um organograma resumido para melhor esclarecimento das etapas realizadas.

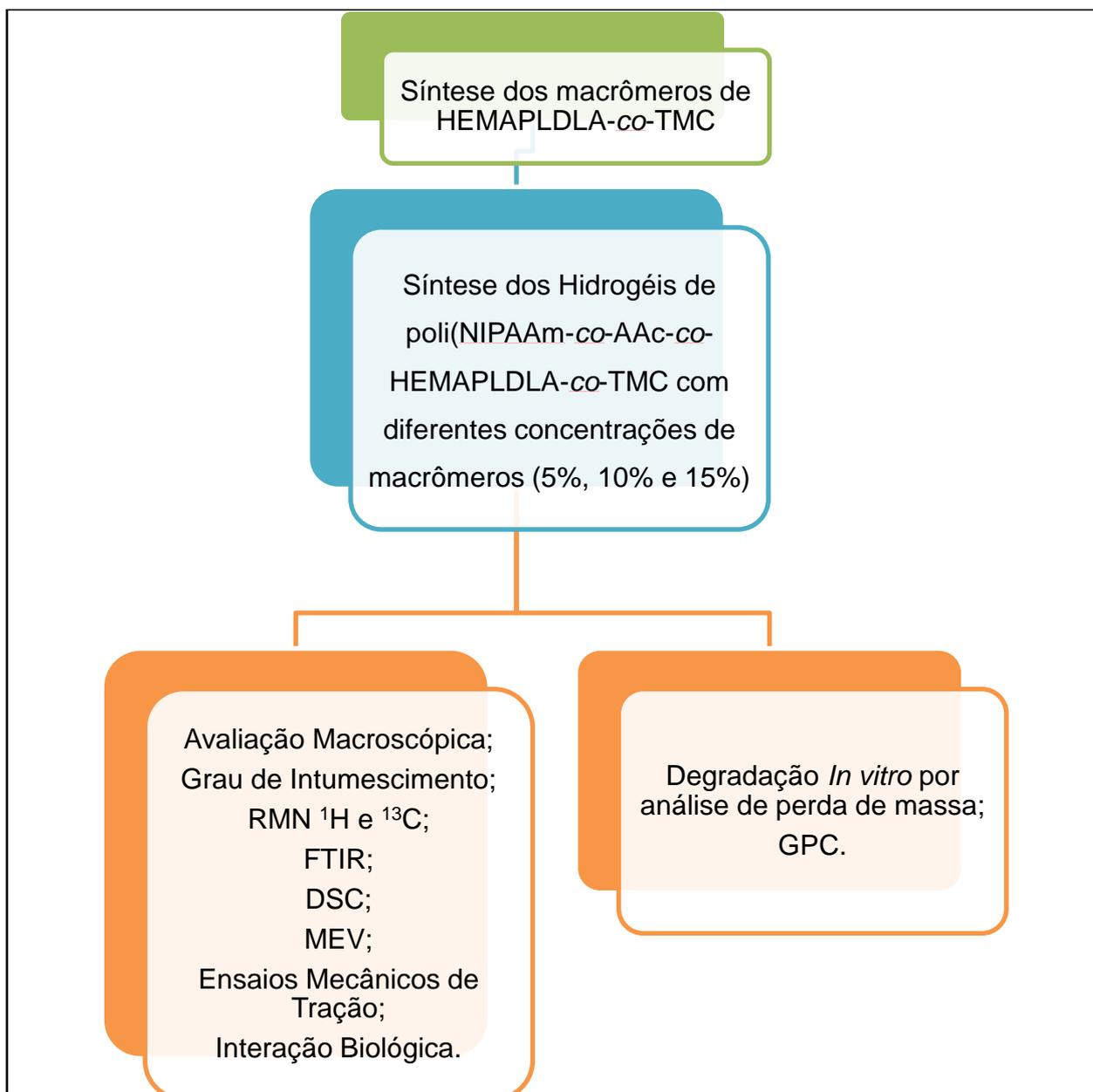


Figura 7 – Organograma da metodologia empregada na síntese e caracterização dos hidrogéis.

6.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados para a síntese do macrômero foram os monômeros de L-lactide (Purac), D,L-lactide (Purac), o trimetileno carbonato (TMC) (Boehringer Ingelheim), o

2-etilexanoato de estanho (SnOct_2) (Aldrich), o 2-hidróxiethyl metacrilato (HEMA – 99+%) (Aldrich). O macrômero foi purificado na presença dos reagentes tetraidrofurano (THF – 99,9%) (Aldrich), Acetato de Etila – 99,8% (Aldrich) e Sulfato de Magnésio seco (Dinâmica).

Para a síntese dos hidrogéis foram utilizados os monômeros de PNIPAAm – 97% (Aldrich), Ácido Acrílico (AAc) (Aldrich) catalisados com peróxido de benzoíla (BPO – 75%) (Aldrich), sendo purificado com os reagentes 1,4 dioxano (99,8%) (Aldrich), Hexano (95%) (Aldrich), tetraidrofurano (THF – 99,9%) (Aldrich) e di-etil éter (99,7%) (Aldrich).

6.2 SÍNTESE DO MACRÔMERO HEMA-POLI(L-CO-D,L ÁCIDO LÁTICO –CO-TRIMETILENO CARBONATO) (HEMAPLDLA-CO-TMC)

O macrômero foi sintetizado via polimerização por abertura de anel do L-lactide, D,L lactide e TMC na presença de 2-etilexanoato de estanho como catalisador (WU *et al*, 2010) de acordo com a (Figura 8). Quantidades estequiométricas dos monômeros e HEMA (razão molar 2:1) foram misturadas em um balão de três bocas com passagem de nitrogênio. A quantidade de catalisador utilizada foi de 1% em mol relacionado à quantidade de HEMA. A reação foi conduzida por 1 hora e meia à 130 °C. O macrômero resultante foi dissolvido em THF e precipitado em água gelada na relação 1:10. O precipitado foi liofilizado até total remoção da água residual, dissolvido em acetato de etila e seco à temperatura ambiente na presença de sulfato de magnésio em dessecador à temperatura ambiente *overnight*. A síntese do macrômero apresentou rendimento de 65% em massa dos reagentes inicialmente adicionados.

6.3 SÍNTESE DO POLI(NIPAAm-CO-AAC-CO-HEMAPLDLA-CO-TMC)

Os copolímeros foram sintetizados via polimerização por radical livre, utilizando peróxido de benzoíla como catalisador, conforme representação esquemática (Figura 8). A copolimerização foi conduzida em balão de três bocas com passagem de nitrogênio. Quantidades estequiométricas dos monômeros NIPAAm, AAc (ácido acrílico) e HEMAPLDLA-co-TMC foram dissolvidos em 1,4-dioxano até formar uma solução de 10% em massa de monômeros. O peróxido de benzoíla em quantidade de 1 mol/mol de monômero também dissolvido em 1,4-dioxano foi adicionado ao balão, a reação foi conduzida em atmosfera de nitrogênio à 70 °C por 24 horas (FUJIMOTO *et al.*, 2009). A solução polimérica

foi então resfriada a temperatura ambiente, precipitada em hexano e o material resultante foi dissolvido em THF e precipitado em di-etil éter. Em seguida o polímero foi seco à vácuo em temperatura ambiente por 24 horas.

A quantidade de macrômero utilizada foi variada em 5, 10 e 15% em massa verificando-se qual porcentagem confere melhor balanço de propriedades ao hidrogel.

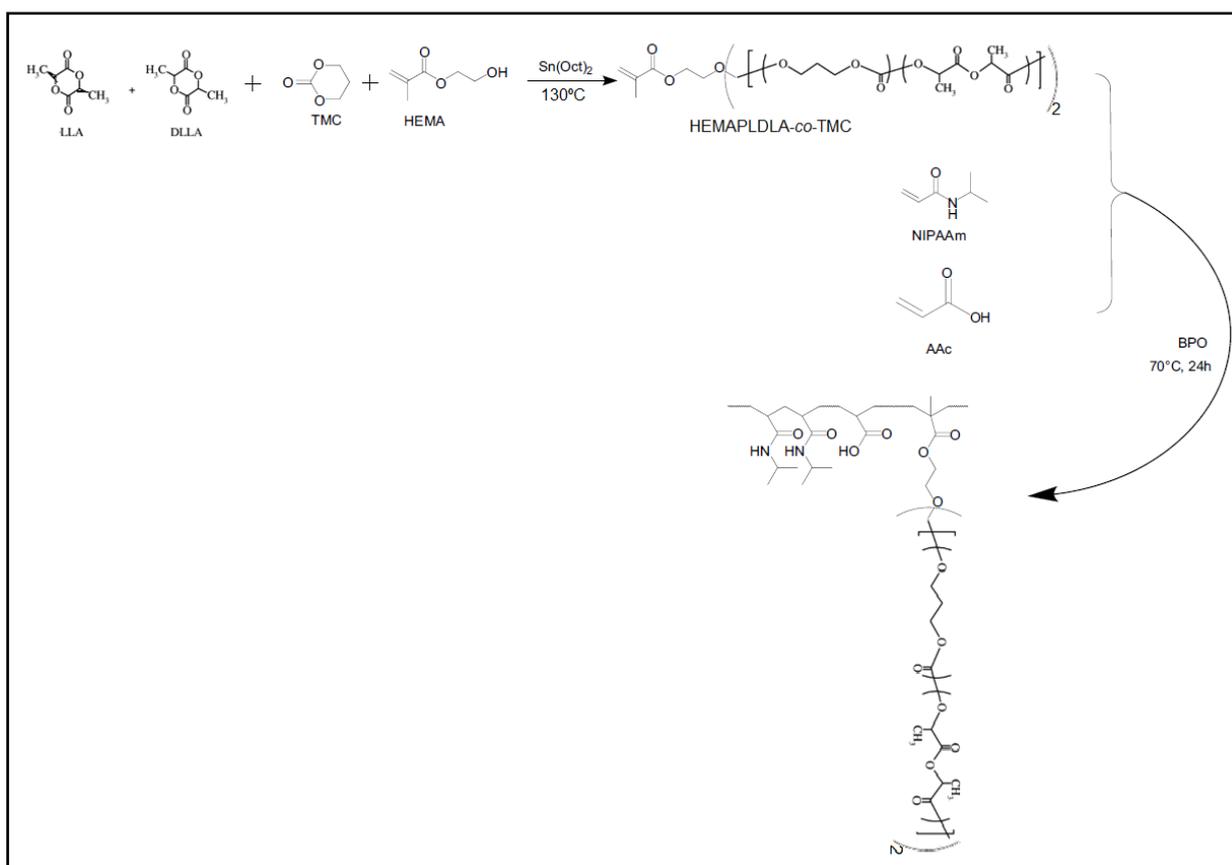


Figura 8 - Representação esquemática para o HEMAPLDLA-co-TMC e o copolímero poli(NIPAAm-co-AAc-co-HEMAPLDLA-co-TMC)

6.4 GRAU DE INTUMESCIMENTO

Soluções de hidrogel em PBS com 12% (m/v) foram colocados em banho termo estabilizado à 37°C durante 24 horas, os géis foram então retirados e secos com papel toalha a fim de retirar o excesso de água da superfície. O conteúdo de água dentro dos hidrogéis foi obtido pela diferença entre os hidrogéis molhados (P_2) e os hidrogéis secos (P_1) conforme a equação:

$$\text{Grau de intumescimento (\%)} = 100 \times (P_2 - P_1)/P_1$$

Ao menos quatro amostras de cada tipo de hidrogel foram intumescidas e pesadas (LI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010; KLOUDA *et al.*, 2011)

6.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H E ^{13}C (RMN)

Os espectros de RMN para o macrômero e para os copolímeros foram obtidos em um espectrofotômetro GEMINI 300BB operando a 75 MHz para RMN ^{13}C e 300 MHz para RMN ^1H . Foram utilizados tubos de vidro 5mm de diâmetro e clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente.

6.6 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A técnica de infravermelho com transformada de Fourier é utilizada na caracterização de hidrogéis, para caracterizar a presença de grupos específicos no material (MANSUR *et al.*, 2008). O macrômero foi sintetizado e avaliado após a síntese, já os hidrogéis contendo 5%, 10% e 15% (massa de macrômero) já sintetizados e intumescidos em solução (12% m/v) tiveram as medições de transmitância realizadas através do equipamento Spectrum 65 (Perkin Elmer) no Laboratório de Biomateriais da PUC-SP. Os espectros de absorção foram analisados na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} (TAN *et al.*, 2009).

6.7 CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (GPC)

A fim de determinar a degradação dos hidrogéis as massas molares numéricas médias (M_n), ponderal média (M_w) e o índice de polidispersão (IP) foram obtidos em um cromatógrafo de permeação em gel (GPC) da marca Waters. O tetrahidrofurano (THF), filtrado em membrana de 0,45 μm de porosidade, foi utilizado como fase móvel em um sistema constituído de bomba (Waters 1525), um par de colunas 7,8 x 300 mm com partículas de 5 μm (Styragel HR) aquecidas a 40 $^\circ\text{C}$ e detector de índice de refração (Waters 2414) a temperatura de 30 $^\circ\text{C}$. Amostras do hidrogel de 3,00 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram injetadas manualmente e percorreram o sistema a um fluxo de 1,00 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Padrões de poliestireno monodisperso,

aplicados sob mesma concentração e fluxo das amostras, foram utilizados para temperatura de 25°C e coluna C18 da Waters, utilizando o tetrahidrofurano (THF) como fase móvel, numa concentração de 20 mg.mL⁻¹. O padrão utilizado para calibração da curva foi o poliestireno monodisperso, aplicados sob mesma concentração e fluxo das amostras utilizando o detector de índice de refração Waters 410.

6.8 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

As análises de DSC foram realizadas em um equipamento modelo 2920 da TA Instruments. Amostras pesando aproximadamente 7-10 mg foram seladas em porta amostras de alumínio e aquecidas de 25°C a 200 °C a uma taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹ (primeiro aquecimento), e mantidas a esta temperatura por 5 min. Subsequentemente foram resfriadas a -100°C a uma taxa de 10°C.min⁻¹ e mantidas nessa temperatura por 5 min. Após, foram aquecidas novamente até 200°C a uma taxa de 10°C.min⁻¹ sob atmosfera de nitrogênio.

Para a análise de LCST a técnica de DSC também foi utilizada, porém, utilizada uma solução de 12% w/v de copolímero com taxa de aquecimento de 5 °C.min⁻¹ num range de 0 – 60 °C. A temperatura do máximo pico endotérmico pode ser considerada como o LCST (FEIL *et al*, 1993).

6.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A análise morfológica dos hidrogéis foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando um microscópio EVO MA15 (ZEISS) no laboratório de microscopia eletrônica na UNICAMP. Na preparação das amostras os hidrogéis de poli(NIPAAm-*co*-AAc-*co*-HEMAPLDLA-*co*-TMC) foram intumescidos por 24 horas até atingirem o equilíbrio, posteriormente congelados e liofilizados em -100°C por 24 horas em liofilizador Liotop L101. Após liofilização foi realizada a fratura das amostras dos hidrogéis, e foram depositados em porta-amostra (*stubs*). Em seguida, foram recobertos por uma fina camada de ouro através do metalizador Emitech K550 e visualizadas no microscópio (AOUADA *et al.*, 2009).

6.10 ENSAIOS MECÂNICOS DE TRAÇÃO

Foram realizadas análises utilizando a máquina universal de ensaios EMIC DL10000 com célula de carga de 200 N. As análises foram realizadas na empresa Tigre S.A. – Tubos e Conexões. Amostras com comprimento útil de 3,0 mm foram testadas após 5 horas em banho estabilizado à 37°C, com velocidade de ensaio de 50 mm.min⁻¹.

6.11 DEGRADAÇÃO DOS HIDROGÉIS

As amostras dos hidrogéis foram submetidas ao ensaio de degradação *in vitro*.

O ensaio foi conduzido de modo que as soluções (12% wt) de hidrogel em solução tampão de fosfato (PBS – pH 7.4) foram colocadas em banho termo estabilizado à 37 °C para solidificar e formar o gel, e foram assim mantidos por 24 horas, a água remanescente foi retirada e a degradação continuou a ser conduzida nas condições anteriores, amostras foram retiradas em intervalos de 1, 2, 3, 4, 5 e 10 semanas, sendo posteriormente lavadas com água destilada quente (50 °C) por três vezes e secas em estufa a vácuo sob temperatura de 60 °C durante dois dias, sendo pesadas em seguida (p2). A variação da massa molar foi acompanhada através da técnica de GPC, conforme descrito no item 6.6 e a perda de massa (%) foi calculada pela fórmula:

$$\text{Perda de massa (\%)} = 100 \times p2/p1$$

Onde p1 é a massa da amostra antes da degradação (WANG *et al*, 2010).

6.12 ESTUDO *IN VITRO* – INTERAÇÃO BIOLÓGICA

6.12.1 Cultura de células

Para o estudo da interação biológica foram utilizadas células fibroblásticas da linhagem Vero, provenientes do rim de Macaco Verde africano (*Cercopithecus aethiops*). As células foram cultivadas em frascos de cultura de poliestireno, contendo meio de cultivo DMEM padrão (Meio Eagle modificado por Dulbecco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 50 µg/mL de gentamicina e 5 µg/mL de anfotericina B. Os frascos contendo as células foram mantidos em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. O meio de cultura foi trocado cerca de 2 vezes na semana e os subcultivos foram realizados quando a os frascos atingiram cerca de 80% de confluência com tripsina EDTA 0,25%.

6.12.2 Ensaio de Viabilidade e crescimento celular

A citocompatibilidade das amostras e capacidade de sustentar o crescimento das células fibroblásticas após os tempos de 1, 7, 14 e 21 dias de cultivo foi avaliado pelo ensaio metabólico colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo de tetrazólio). Foram semeadas sobre as amostras concentrações de 1×10^4 células/mL. Após os tempos de cultivo o meio de cultivo foi removido e os poços contendo as amostras foram lavados 3 vezes com solução tampão PBS a 0,1M. Em seguida, foram adicionados a cada poço 100 μ L de meio DMEM contendo 10 μ L de MTT (5mg/mL). As amostras foram incubadas por 4 horas a 37°C, no escuro. Após esse tempo, a solução contendo MTT foi substituída por uma solução de 100 μ L de dimetil sulfóxido (DMSO) os quais, foram transferidos para uma nova placa. A absorbância do MTT foi mensurada em um leitor de microplacas Elx-800-UV (Bio-Tek Instruments, EUA), a 570 nm.

O teste do MTT é amplamente utilizado em estudos que visam avaliar a citocompatibilidade de biomateriais aplicados na engenharia tecidual. O método baseia-se na oxidação metabólica do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo de tetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983). Esse composto é absorvido dentro das células e através de uma redução da reação mitocondrial-dependente, produz o Formazan que se acumula dentro da célula. Impossibilitado de passar pelas membranas, esse composto apenas é liberado após a adição de algum solvente adequado e assim quantificado por colorimetria. Essa habilidade celular de reduzir o MTT indica integridade e viabilidade mitocondrial e, portanto, está diretamente relacionado à viabilidade celular (MOSMANN, 1983; BHATIA & YETTER, 2008).

6.12.3 Análise estatística

O ensaio de viabilidade e crescimento celular foi realizado em quadruplicata. Os valores de absorbância obtidos a partir do teste do MTT foram apresentados como média \pm erro padrão da média. Esses dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), complementados pelo teste-T com nível de significância de 0,1% ($p < 0,001$).

7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Esse capítulo apresenta os resultados e suas comprovações experimentais da síntese do macrômero e dos hidrogéis injetáveis e termo sensíveis visando aplicações como biomateriais. As principais características desse material são ser insolúvel acima de determinada temperatura, ou seja, apresentar uma temperatura de solução crítica inferior (LCST – *Low Critical Solution Temperature*) e a capacidade de ser injetável.

7.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

A Figura 9 mostra as imagens macroscópicas dos hidrogéis, a fim de exemplificar a transformação de fase presente nas amostras, com o intuito de exemplificar as características macroscópicas a concentração de 10% m/m foi escolhida.

Através das imagens é possível verificar o comportamento LCST do material, como já apresentado anteriormente a transição de fase dos polímeros com comportamento LCST pode ser alterada sensivelmente devido ao balanço hidrofóbico/hidrofílico dos materiais que compõe o polímero (QIU & PARK, 2001). Neste caso, percebemos que o hidrogel obtido é um material com o comportamento citado acima, pois, em baixas temperaturas (4°C) encontra-se em solução e próximo aos 37°C tem sua transformação em gel, este comportamento foi melhor abordado na seção 6.4.1.

A característica injetável do gel foi verificada com a injeção da solução 12% (m/v) a 4°C em uma agulha de 26 gauge (Figura 9e). Verifica-se que o hidrogel flui pela agulha, podendo ser considerado injetável. O critério utilizado para demonstrar que o hidrogel é injetável se baseia na necessidade de injetar o material da maneira menos invasiva, com agulhas de pequeno calibre (26 gauge) (FUJIMOTO et al., 2009; WANG et al., 2010).

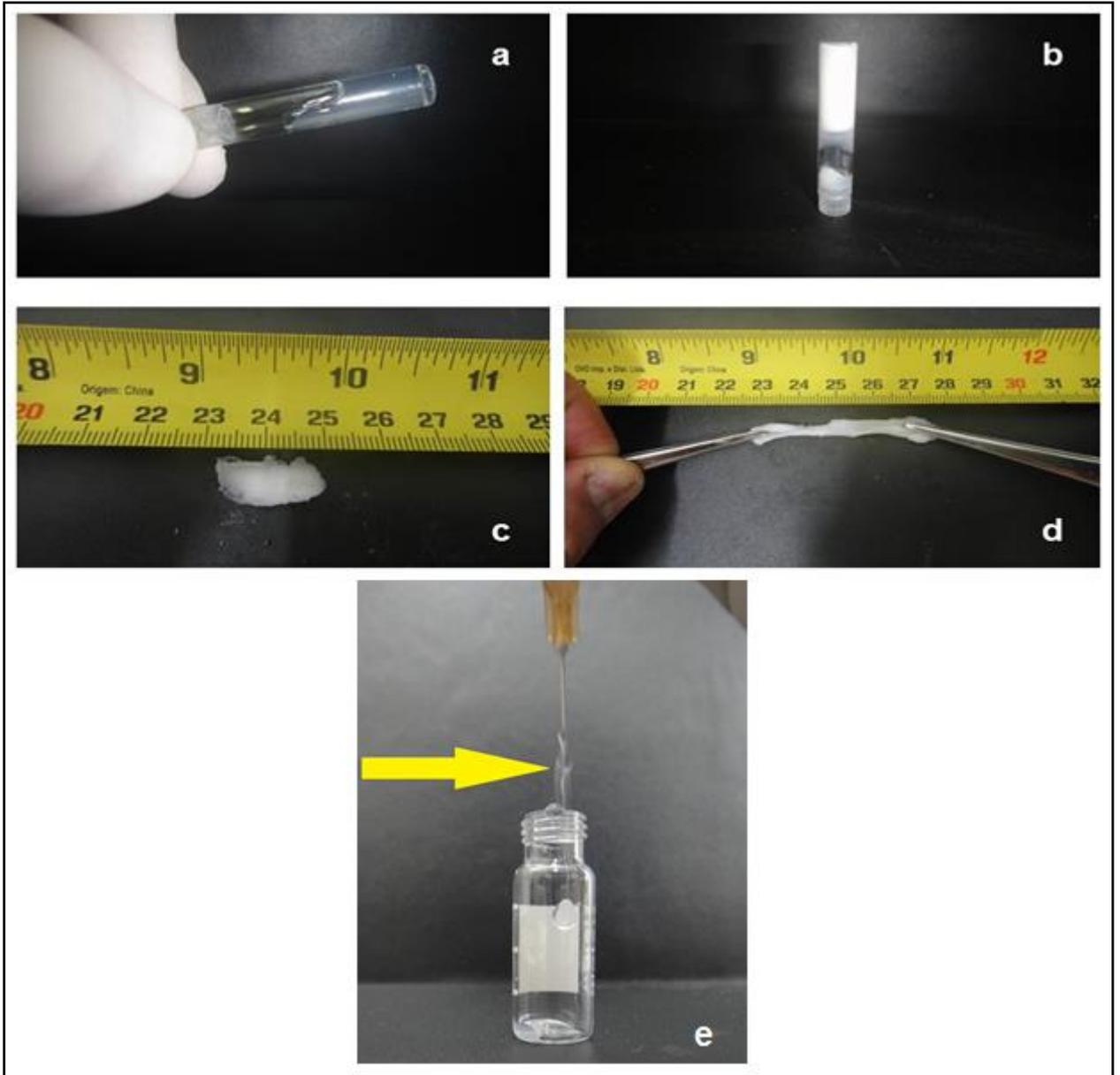


Figura 9 - Propriedades de gelificação do hidrogel de Poli(NIPAAm-co-AAc-co-HEMAPLDA-co-TMC) 10% w/w. (a) Solução a 4°C; (b) Hidrogel após 10 s em banho termo estabilizado a 37°C; (c) Hidrogel formado após 15 minutos; (d) alongamento do hidrogel após 15 minutos; (e) injeção através de agulha de 26 gauge a 4°C.

7.2 GRAU DE INTUMESCIMENTO

O grau de intumescimento dos hidrogéis, ou seja, a capacidade dos mesmos de absorver água foi calculada conforme descrito na seção 6.4. A Tabela 1 sumariza os valores calculados para as composições dos hidrogéis.

Tabela 1 - Grau de intumescimento dos hidrogéis sintetizados

% Macrômero	Grau de Intumescimento (%)
5%	19,8 ± 0,9
10%	29,2 ± 1,7
15%	63,5 ± 3,8

Verifica-se que o grau de intumescimento dos hidrogéis varia em função do aumento da quantidade de macrômero. Este efeito pode ser explicado considerando as ramificações produzidas durante a copolimerização do macrômero no hidrogel, as quais podem se enovelar no momento da transição sol-gel e esse enovelamento de segmentos extremamente longos tende a aprisionar moléculas de água no interior do hidrogel. Quando as ligações de hidrogênio (formando reticulações) são formadas no gel, a água que está no interior do material é repelida, dessa forma, conforme aumenta a concentração de macrômero, as ramificações aumentam em número e tamanho. Sendo assim, ocorre uma maior dificuldade na formação de ligações de hidrogênio e, conseqüentemente retém mais água no interior do hidrogel fazendo com que o grau de intumescimento do material aumente.

7.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN DE ^1H E ^{13}C) DO MACRÔMERO HEMAPL_{DLA}-CO-TMC

Uma das principais análises na caracterização de um polímero é fornecida pela técnica de RMN, tanto de ^1H como de ^{13}C , pois é essa análise que irá auxiliar no entendimento das unidades formadoras da cadeia do material, confirmando o êxito da síntese quanto à obtenção do polímero de interesse.

O esquema apresentado a seguir (Figura 10), refere-se a obtenção do macrômero HEMAPL_{DLA}-co-TMC, o qual identifica os fragmentos de HEMA (fragmento I) e de

PLDLA-*co*-TMC (fragmento II), portanto a análise apresentada a seguir foi efetuada analisando-se cada fragmento individualmente.

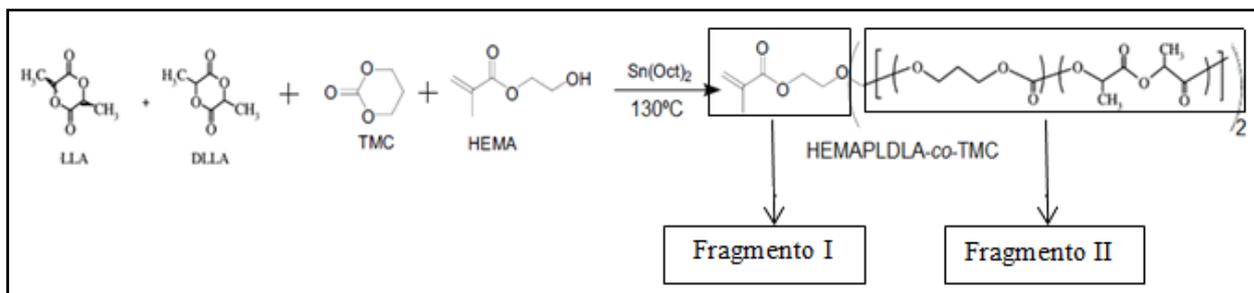


Figura 10 – Esquema da estrutura do macrômero composto de HEMAPLDLA-*co*-TMC

7.3.1 Ressonância Magnética RMN de ¹H

A Figura 11 mostra o espectro de RMN de H¹ para o macrômero obtido na 1^o etapa de síntese e será analisado por fragmentos (numerados como I e II, Figuras 12 e 14, respectivamente).

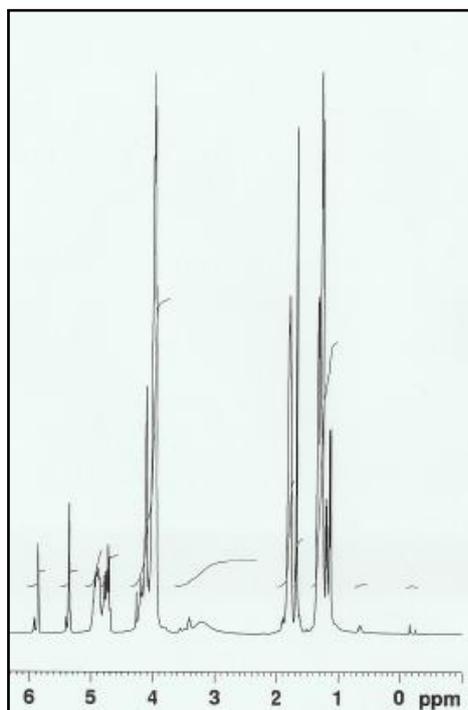


Figura 11 - Espectro de RMN de H1 para o macrômero obtido na literatura

O fragmento I do macrômero está representado a seguir:

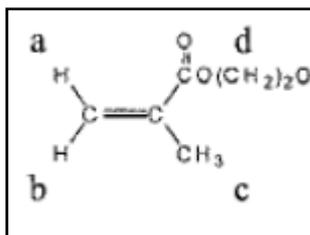


Figura 12 – Estrutura química do fragmento I do macrômero

De acordo com Lim *et al* (2000) e Atazeven (2006), os sinais que caracterizam a parte da estrutura referente ao HEMA são: δ 1,9 ppm (-CH₃) ; δ 4,2-4,4 ppm (O-CH₂); δ 5,6-6,2 ppm (CH₂=C). A Figura 13 mostra uma comparação entre espectro obtido para o macrômero sintetizado neste trabalho (HEMA-PLDLA-TMC) (A) e o espectro de um macrômero da literatura constituído por HEMA-PLDLA (B) (LIM *et al*, 2000).

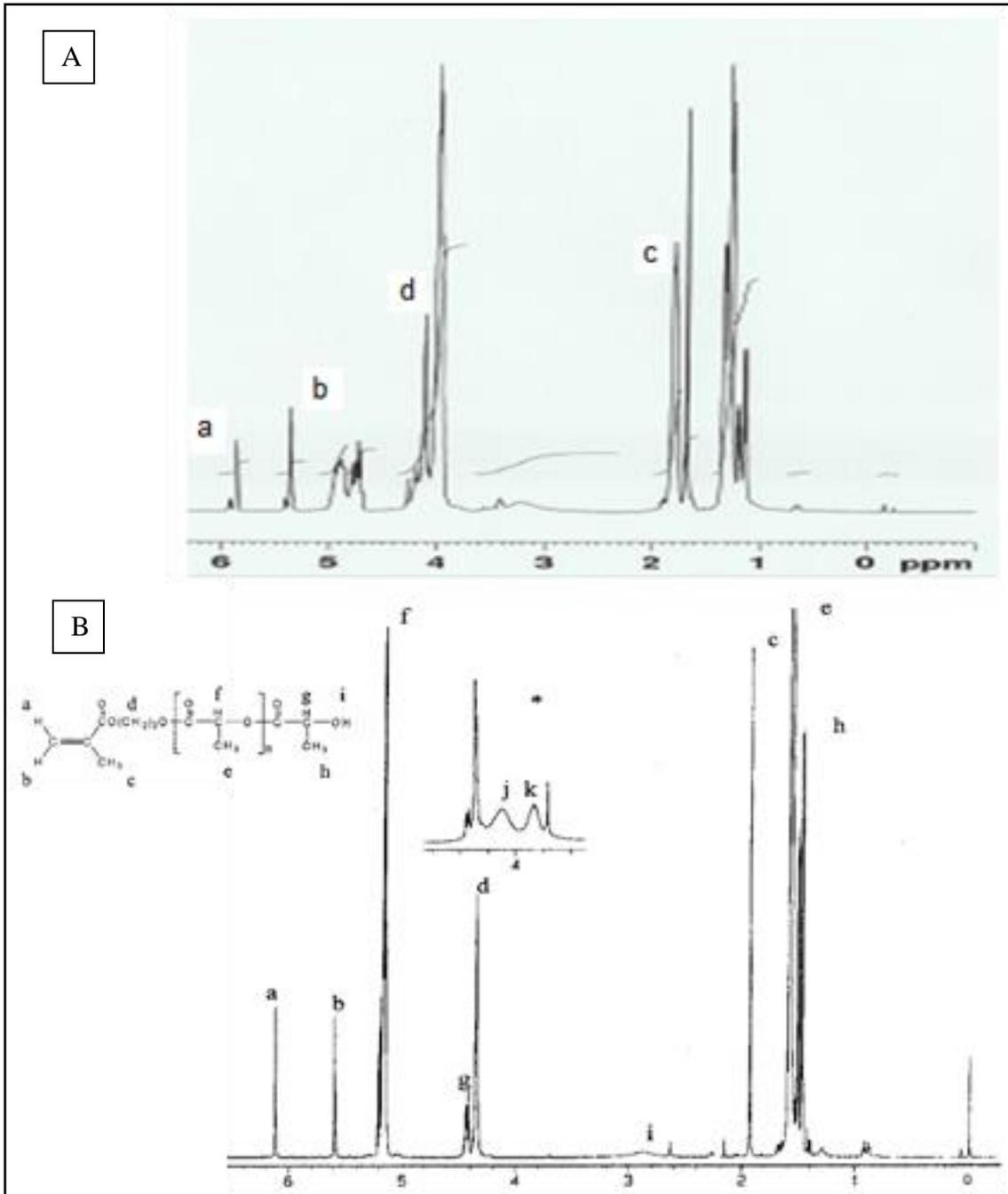


Figura 13 - Comparação entre o espectro do macrômero (sintetizado no trabalho) (A) e do macrômero (HEMA-PLDLA) (B)

É interessante para efeito de constatação da incorporação das unidades de HEMA na cadeia polimérica do macrômero que sejam comparados os RMN de ^1H do PLDLA-TMC com o RMN ^1H do HEMAPLDLA-TMC, o que será feito quando da análise do Fragmento II do macrômero.

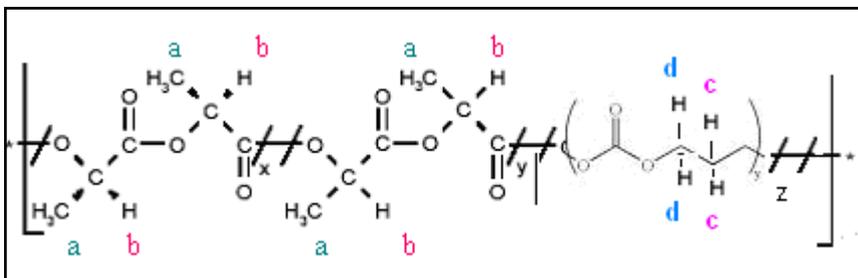


Figura 14 – Estrutura química do fragmento II do macrômero

Os sinais encontrados no RMN de ^1H para uma parte do macrômero são praticamente os mesmos encontrados para o copolímero poli (*L-co-D,L*-ácido láctico), diferindo apenas em dois deslocamentos que são característicos da presença do TMC, os quais de acordo com a literatura (POSPIECH, 2005) devem ser verificados em δ 2,05 ppm (CH_2 – TMC) e δ 4,24 ppm (OCH_2 – TMC). Para efeito de comparação serão mostrados tanto o espectro do copolímero PLDLA como o do terpolímero PLDLA-TMC (Figura 15). No espectro do copolímero, o múltiplo em 5,12-5,24 ppm é atribuído aos prótons CH (b), enquanto o quarteto em 1,55-1,59 ppm é atribuído aos prótons CH_3 (a).

No caso do segmento PLDLA-TMC, o tripleto em 2,05 ppm é atribuído aos prótons CH_2 (c), enquanto o tripleto em 4,24 é atribuído ao OCH_2 (d).

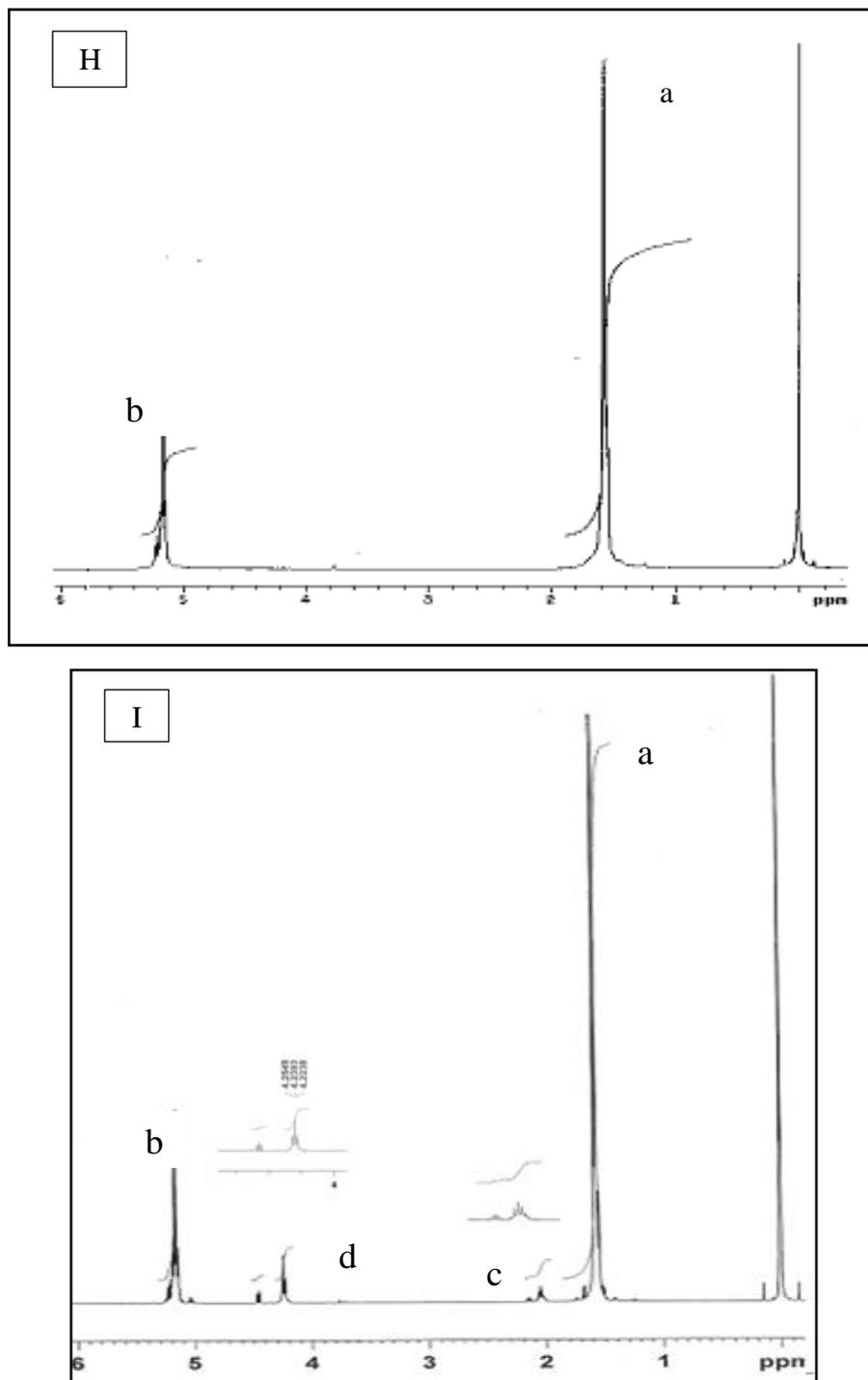


Figura 15 - Comparação entre o espectro de RMN de ¹H “H” referente ao copolímero PLDLA (Motta, 2007) e o espectro “I” referente à síntese do terpolímero PLDLA-TMC, com as regiões ampliadas que são características dos prótons do TMC.

É importante esta “construção” passo a passo da cadeia polimérica, para poder entender os sinais encontrados no RMN. A região do espectro que evidencia a presença do TMC na cadeia são duas: em δ 2,05 ppm (CH₂-TMC) e δ 4,24 ppm (OCH₂-TMC), os quais devem ser verificados no fragmento II do macrômero. A Figura 16 compara o espectro do PLDLA-TMC com o do monômero do trabalho em questão (HEMA-PLDLA-TMC).

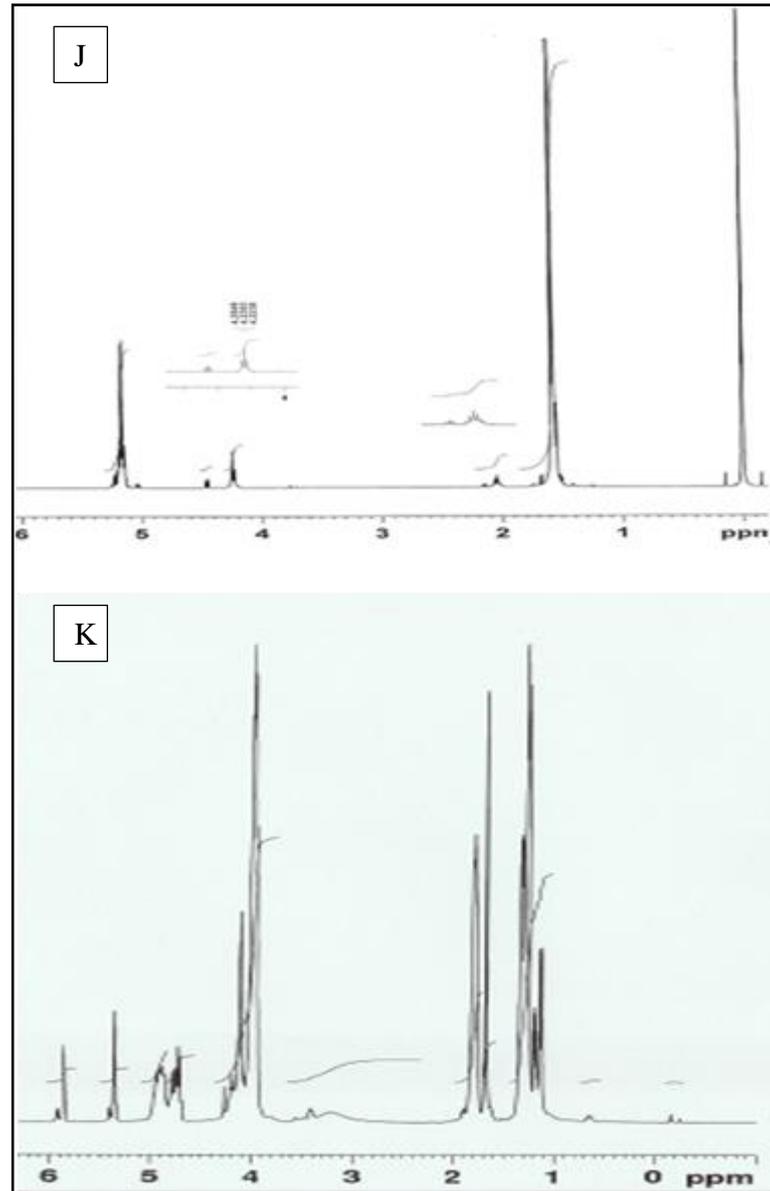


Figura 16 - Comparação entre o espectro de RMN ^1H J referente ao copolímero PLDLA-TMC e o espectro K referente à síntese do macrômero HEMAPDLA-co-TMC.

7.3.2 Ressonância Magnética RMN de ^{13}C

Novamente a análise será feita por fragmentos I e II (Figura 12 e 14, respectivamente). A Figura 17 mostra a comparação entre o espectro referente as unidades de HEMA e ao macrômero.

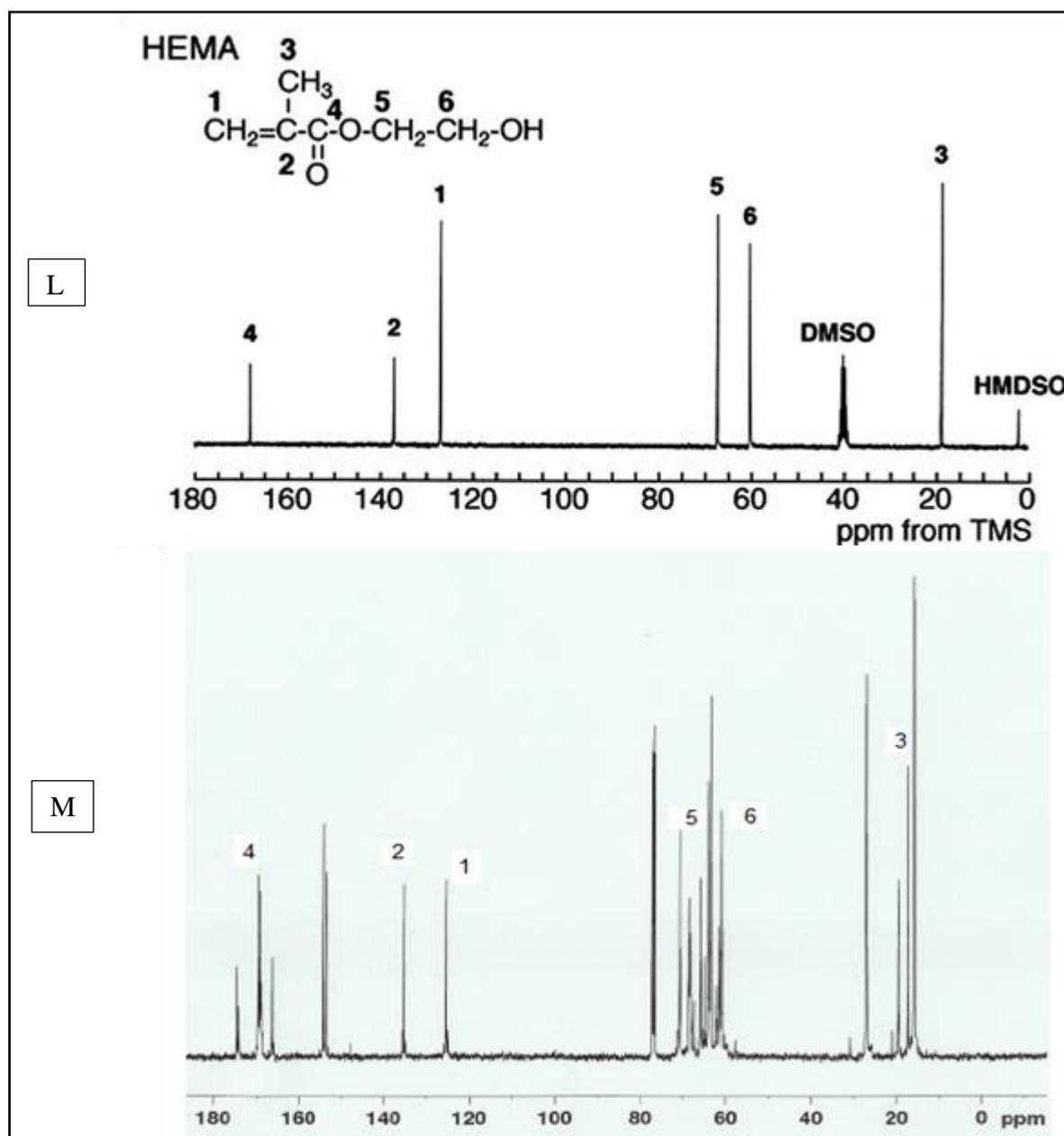


Figura 17 - Comparação entre o espectro RMN ^{13}C , L referente ao HEMA (FUJITA, 2005) e do espectro M referente ao macrômero.

Os sinais encontrados no RMN de ^{13}C para o HEMA e para o macrômero HEMAPLDLA-*co*-TMC, apresentam-se completamente de acordo com os sinais encontrados (Figura 17).

A análise das sequencias que constituem as unidades do PLDLA e do PLDLA-TMC, que vem a ser referente ao 2º fragmento do macrômero estão representadas na Figura 18.

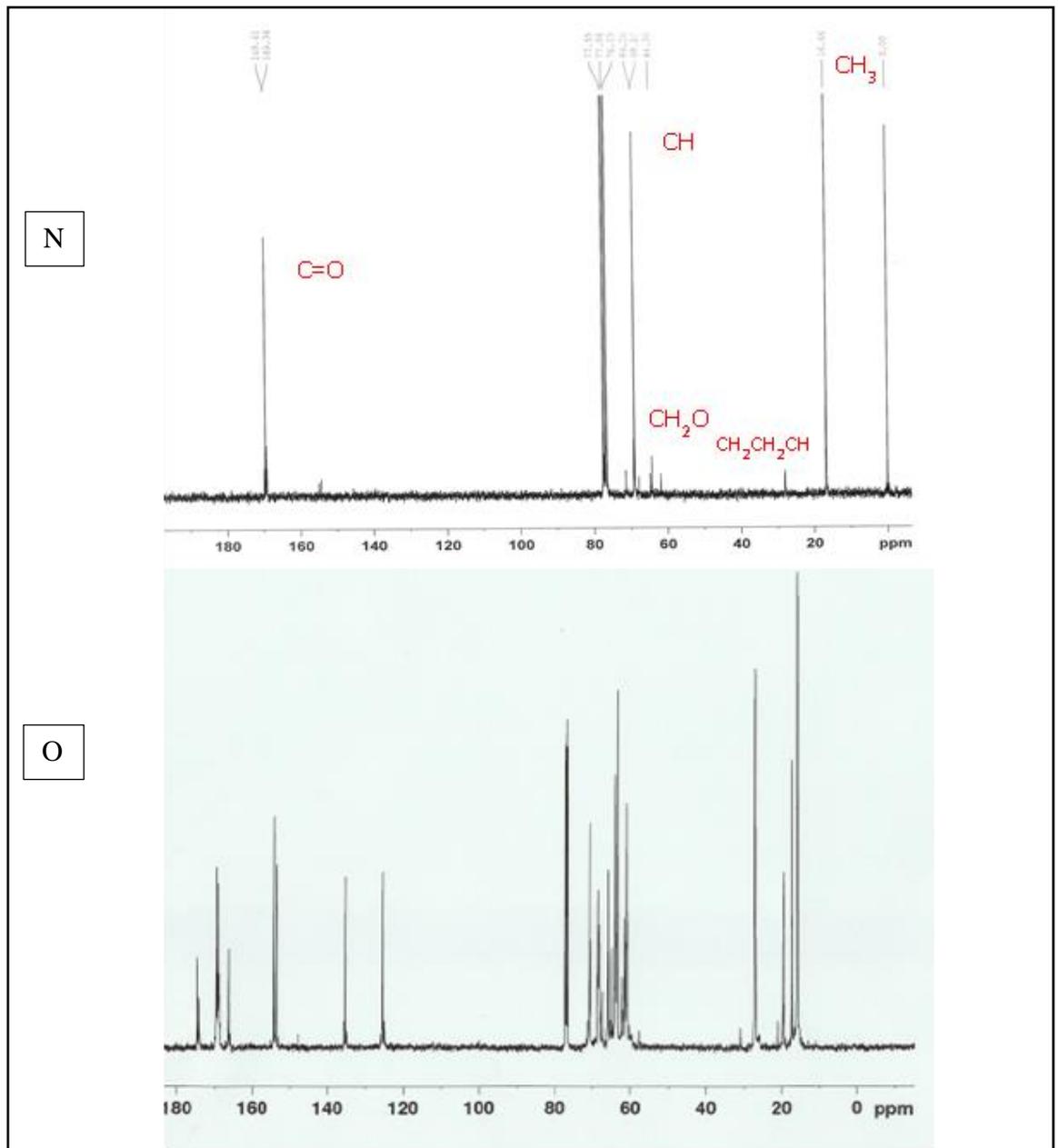


Figura 18 - Comparação entre o espectro RMN ^{13}C , N referente ao PLDLA-TMC (MOTTA, 2013) e ao espectro O referente ao macrômero.

Já os valores encontrados na literatura (MATSUMURA, 1999) e os do macrômero, encontram-se sumarizados na tabela 2.

Tabela 2 - Resultados obtidos a partir da análise de RMN ^{13}C para o macrômero e comparados à literatura

Sinais (ppm)	PLDLA			TMC		
	CH ₃	CH	C=O	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂	CH ₂ O	C=O
Macrômero	16,6	69	169,6	27,8	61,8 – 64,7	154,8
Literatura	16,7	69	169,6	27,9	61,8 – 64	154,4

7.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN DE ^1H E ^{13}C) DO HIDROGEL POLI(NIPAAM-*CO*-AAC-*CO*-HEMAPL*DLA*-*CO*-TMC)

7.4.1 Ressonância Magnética RMN de ^1H

Após a copolimerização para obtenção do hidrogel foram realizadas as análises de RMN de ^1H e ^{13}C para comprovar a inserção do segmento de N-isopropilacrilamida e ácido acrílico ao macrômero HEMAPL*DLA*-*co*-TMC.

A Figura 19 refere-se à estrutura do hidrogel obtido, sendo que a parte em destaque diz respeito ao segmento N-isopropilacrilamida.

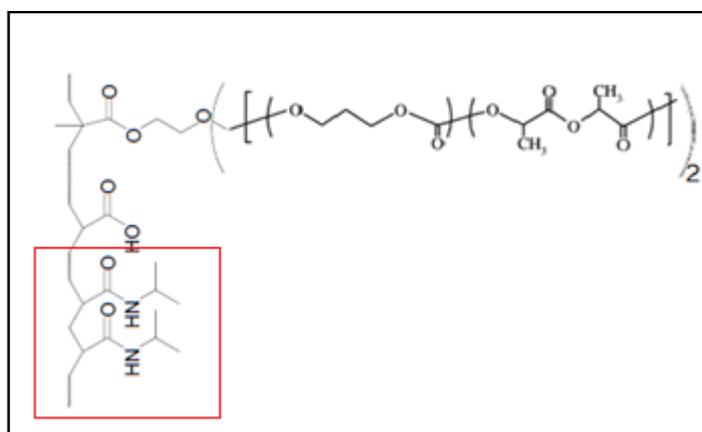


Figura 19 - Representação estrutural do hidrogel sintetizado

Segundo a literatura são esperados os seguintes sinais para o segmento n-isopropilacrilamida: (CH₃)-CH em 0,9 ppm; (CH₂)-CH em 1,4 ppm; (CH₂)-CH em 1,9 ppm; (CH₃)-CH em 3,8 ppm (Gonzalez, 2008).

A Figura 20 traz espectros do segmento Poli (N-isopropilacrilamida) da literatura (a) e o espectro do hidrogel sintetizado no trabalho em questão (b).

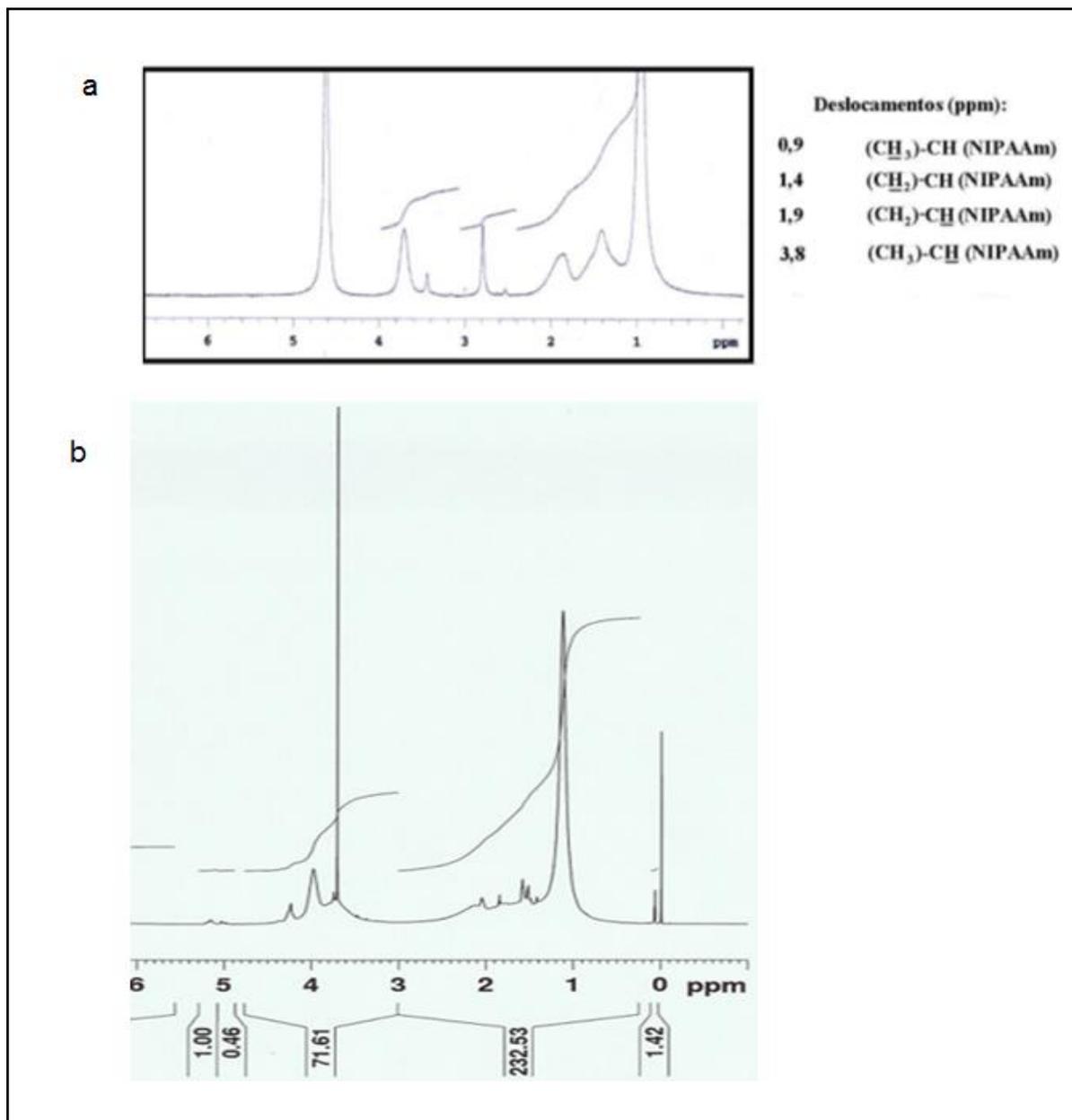


Figura 20 - Comparação entre o espectro RMN ¹H. “a” referente ao PNIPAAm (GONZALEZ, 2008) e ao espectro “b” referente ao poli(NIPAAm-co-AAc-co-HEMAPLDA-co-TMC).

Assim como relatado por GONZALEZ (2008), não se observou no hidrogel sinais de deslocamento para os ¹H correspondentes a duplas (5,5 a 6,4 ppm) as quais estão presentes nos monômeros NIPAAm e AAc, o que comprova a polimerização desses segmentos. As estruturas (Figura 21) desses monômeros (NIPAAm e AAc) estão representadas abaixo para visualização das duplas ligações mencionadas anteriormente.

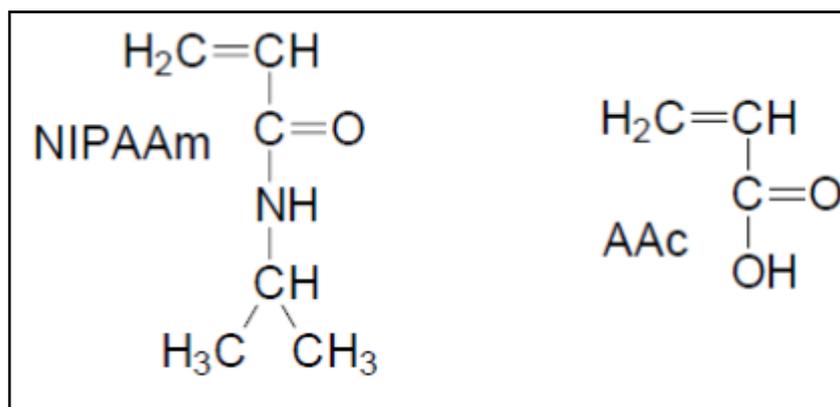


Figura 21 - Representação das estruturas dos monômeros NIPAAm e AAC.

Por fim, o espectro da Figura 22, traz uma comparação entre o espectro (a) referente ao macrômero HEMAPLDLA-co-TMC e (b) referente ao espectro do hidrogel de poli(NIPAAm-co-AAC-co-HEMAPLDLA-co-TMC), completando assim a análise do hidrogel sintetizado quanto ao RMN de prótons.

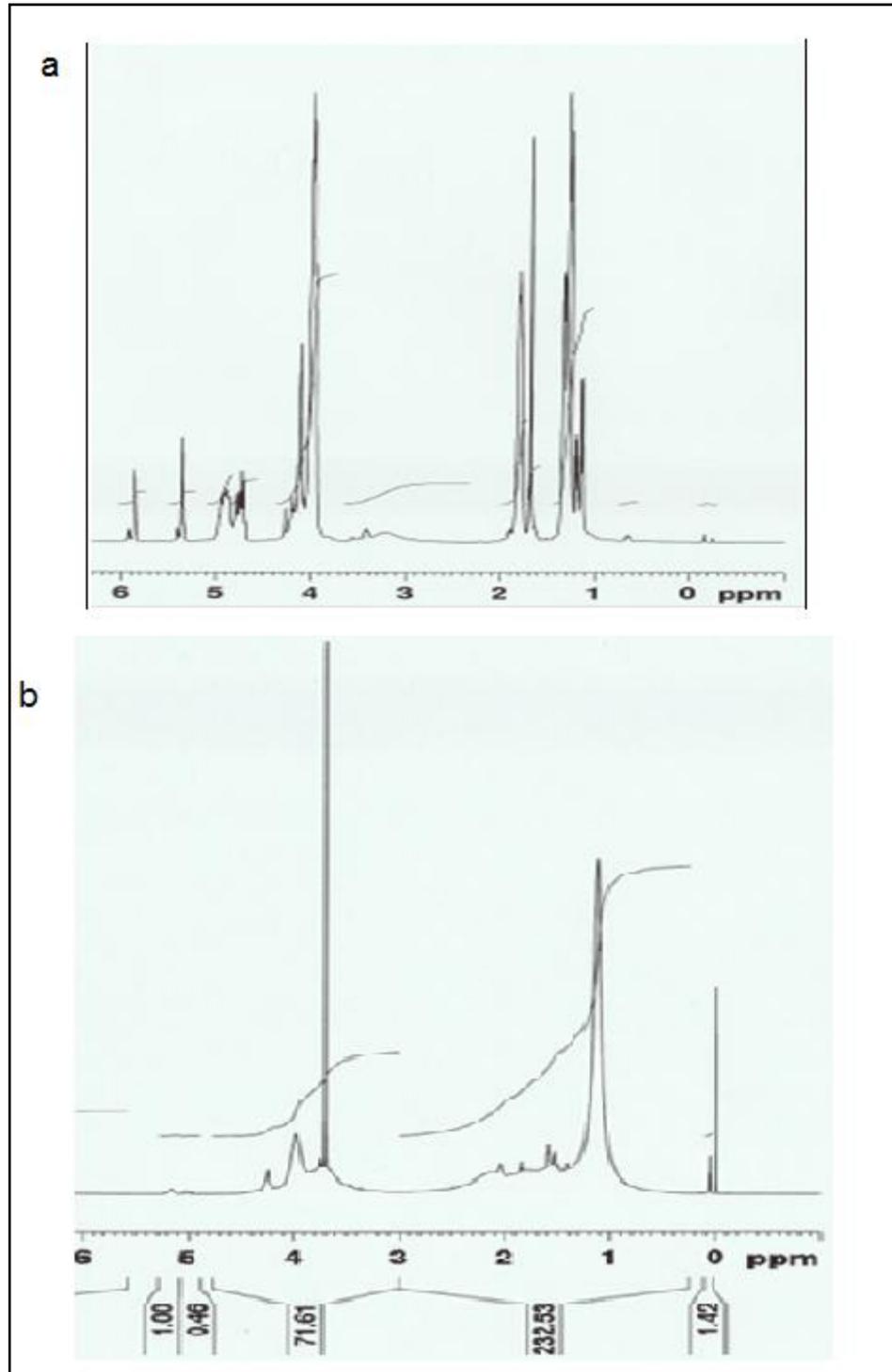


Figura 22 - Comparação entre o espectro RMN ^1H “a” referente ao macrômero HEMAPDLA-co-TMC e “b” referente ao espectro do hidrogel de poli(NIPAAm-co-AAc-co-HEMAPDLA-co-TMC).

7.4.2 Ressonância Magnética RMN de ^{13}C

Assim como executado na análise de RMN de ^1H para o hidrogel, o fragmento que nos interessa é aquele em destaque na Figura 19, o qual será comparado com os dados da literatura. A Figura 23 traz uma comparação entre o macrômero e o hidrogel sintetizado.

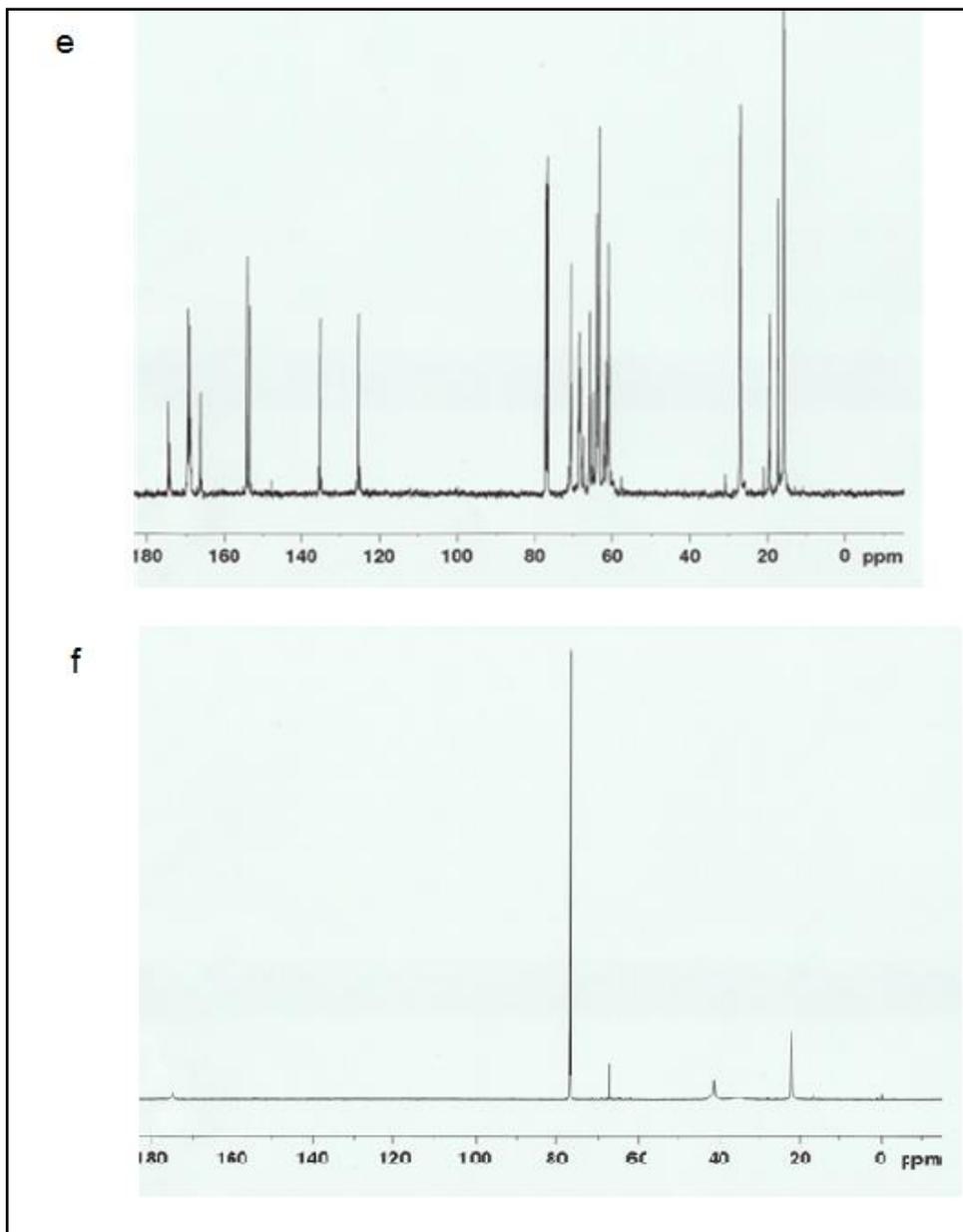


Figura 23 - Comparação entre o espectro de RMN de ^{13}C “e” referente ao macrômero HEMAPDLA-co-TMC e “f” referente ao espectro do hidrogel de poli(NIPAAm-co-AAc-co-HEMAPDLA-co-TMC).

Pode-se verificar que alguns sinais deixam de existir quando no espectro do hidrogel, como por exemplo, os sinais na região de 131 ppm e 126 ppm, que se referem respectivamente aos carbonos *a* e *b* da do fragmento vinílico do NIPAAm, cuja estrutura esta

representada na Figura 24. Dessa forma, evidencia-se a polimerização desse fragmento na inserção do macrômero HEMAPLDLA-*co*-TMC.

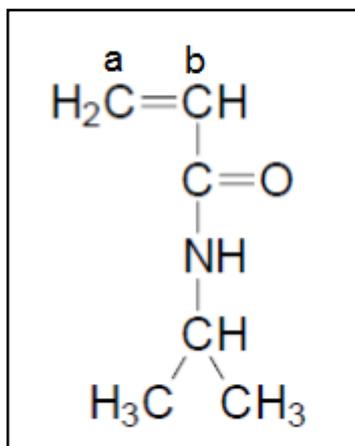


Figura 24 - Estrutura do monômero NIPAAm com os carbonos correspondentes a 131 ppm (a) e 126 ppm (b).

Essa mesma situação foi relatada por Zhou *et al* (1994), como pode ser verificado pelos espectros obtidos no trabalho destes autores (Figura 25).

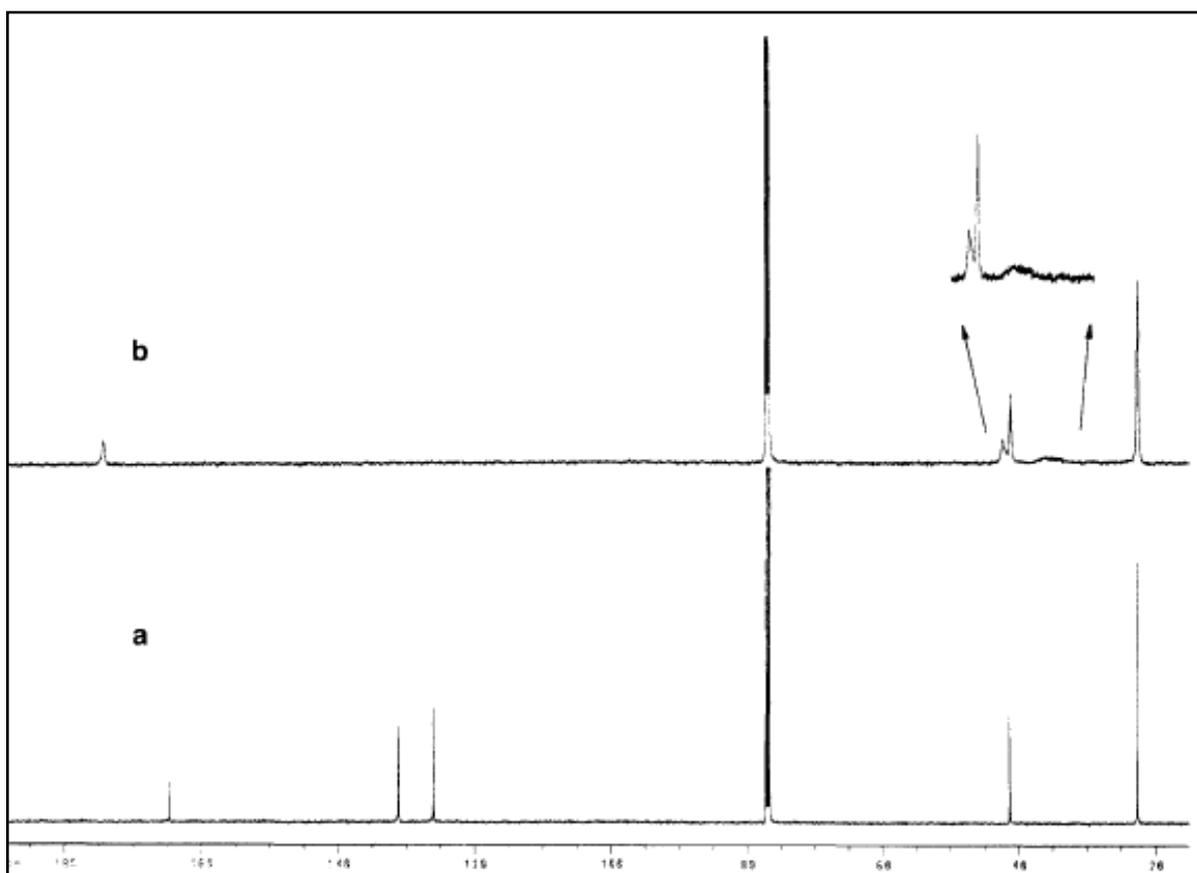


Figura 25 - Espectro de RMN C13 do polímero PNIPAM “b” e “a” do monômero NIPAM onde se nota a ausência dos picos situados em 131 e 126 ppm no polímero PNIPAM (ZHOU *et al.*,1994).

Assim sendo, diante desta análise, comprova-se que as estruturas poliméricas foram obtidas tanto para o macrômero quanto para o copolímero hidrogel que era proposto.

7.5 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

7.5.1 Análise do Macrômero

A análise de FTIR tem extrema importância na caracterização da amostra e certificação da presença dos grupos funcionais existentes no hidrogel sintetizado. Desta forma, foram obtidos espectros de absorção na região do Infravermelho tanto para o macrômero sintetizado (HEMA-PLDLA-*co*-TMC), como também para os hidrogéis obtidos com diferentes quantidades de macrômero empregado (5%, 10% e 15% w/w).

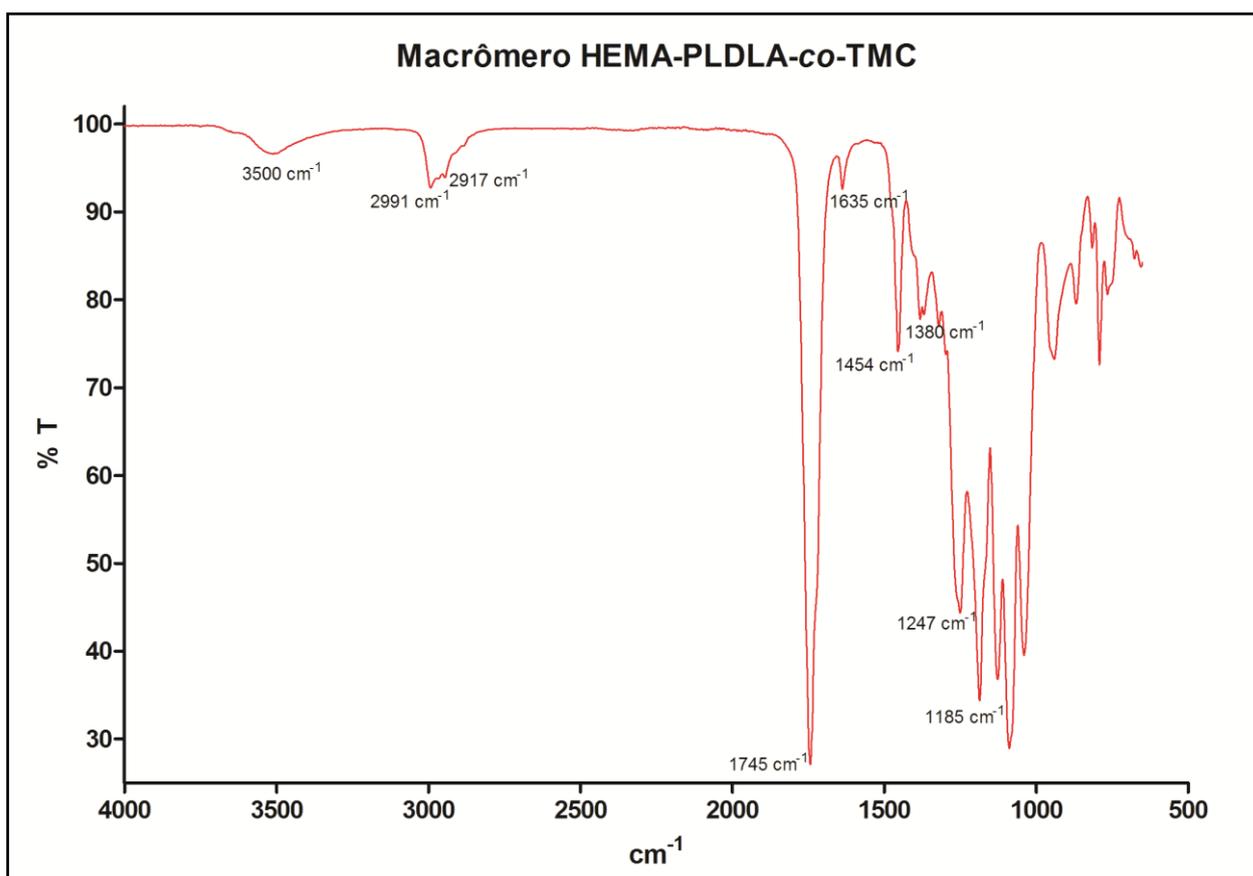


Figura 26 - Espectro de absorção no infravermelho para o macrômero sintetizado.

Na avaliação da estrutura do macrômero (Figura 27) foram encontradas as seguintes bandas: 1745 cm⁻¹ é atribuída ao estiramento C=O das unidades de PLDLA, TMC e HEMA,

1185 cm^{-1} é atribuída a ligação $-\text{C}-\text{C}-\text{O}$ das unidades PLDLA, 1247 cm^{-1} referente ao estiramento assimétrico $\text{O}-\text{C}-\text{O}$ (TMC). A banda localizada em 2991 cm^{-1} é referente ao estiramento CH_2 alifático. A presença do HEMA no macrômero é confirmada pelas seguintes bandas: a banda em 3500 cm^{-1} é referente ao estiramento OH, em 2917 cm^{-1} ao estiramento simétrico CH_2 (*stretching*); 1635 cm^{-1} a ligação $\text{C}=\text{C}$, em 1454 cm^{-1} é referente à vibração da ligação $=\text{CH}_2$, e a banda em 1381 cm^{-1} é referente à vibração simétrica das ligações CH_3 e CH_2 cm^{-1} (SULTAN, 2003; WANG, 2010).

7.5.2 Análise dos Hidrogéis

A Figura 27 apresenta o comparativo entre os espectros de infravermelho para os hidrogéis, contendo 5%, 10% e 15% (w/w) de macrômero. Uma banda bem pronunciada em 1630 cm^{-1} é referente a ligação $\text{C}=\text{O}$ da amida do PNIPAAm e se sobrepõem sobre a banda da AAc na faixa de 1610 – 1670 cm^{-1} (SILVA, 2007). A banda em 1550 cm^{-1} pode ser atribuída a vibração da ligação $\text{N}-\text{H}$ do PNIPAAm, assim como a banda larga na faixa entre 3600-3200 cm^{-1} corresponde a vibração da ligação $\text{N}-\text{H}$ (JIANG, 2010), a largura desta banda também está associada à água, tendo em vista que as análises das composições do hidrogel são feitas em solução.

Apesar de não ser possível observar nos espectros dos hidrogéis todas as bandas correspondentes ao macrômero, em função das sobreposições das bandas do hidrogel, pode ser notado que o aumento da concentração do macrômero (5%, 10% e 15%), causa um ligeiro aumento da banda em 1461 cm^{-1} que é referente à ligação $=\text{CH}_2$, uma das ligações que caracterizam um dos componentes do macrômero (HEMA), e que não está numa região de interferência do hidrogel.

A análise de espectroscopia de absorção no infravermelho tanto para o macrômero quanto para o hidrogel apresentaram as bandas características dos segmentos, denotando a presença dos grupos esperados.

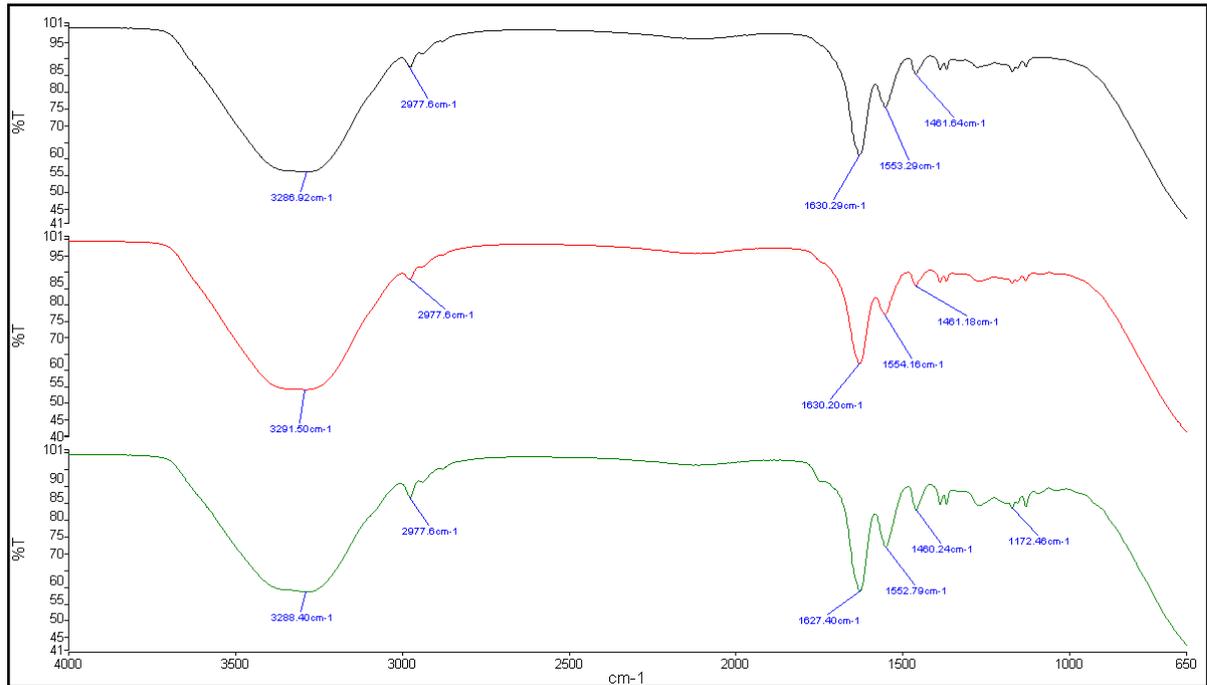


Figura 27 - Espectro de absorção na região do infravermelho para os hidrogéis 5, 10 e 15% respectivamente.

7.6 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

Os termogramas referentes ao segundo aquecimento dos hidrogéis de 5%, 10% e 15% estão apresentadas na Figura 28, nos quais podem ser verificadas as temperaturas de transição vítrea e cujos valores são sumarizados na Tabela 3.

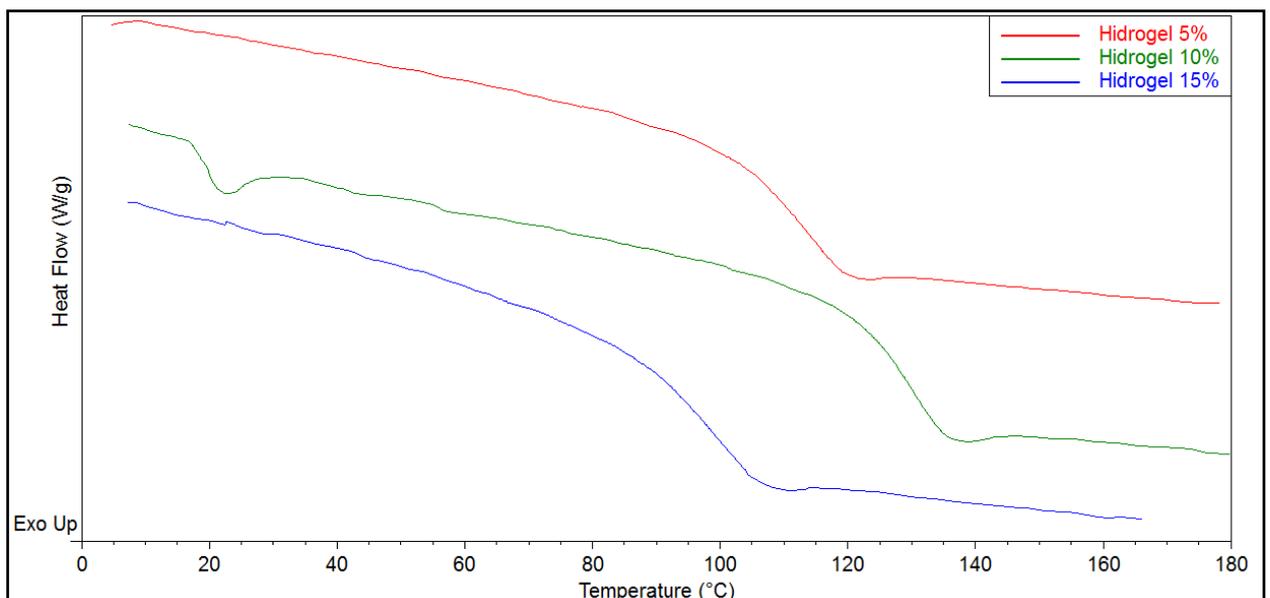


Figura 28 - Termogramas indicando as T_g 's dos hidrogéis.

Tabela 3 - Temperatura de Transição Vítrea para os Hidrogéis sintetizados.

% Macrômero	T _g (°C)
5	114
10	130
15	98

Os valores para T_g encontrados nos hidrogéis estão de acordo com a literatura, que reporta valores de T_g para PNIPAAm entre 85-145°C dependendo da composição do polímero (RIBEIRO, 2012).

Verifica-se que para um aumento de 5 a 10% de macrômero no hidrogel houve um aumento significativo na T_g do material, passando de 114°C para 130°C, o que pode estar associado a maior dificuldade na mobilidade da cadeia polimérica em função da adição de grandes ramificações, requerendo assim uma maior quantidade de energia para o início da movimentação molecular.

Já na situação em que 15% de macrômero a T_g sofreu uma queda expressiva. Uma possível hipótese para esse comportamento é que essa quantidade de macrômero produza grupos laterais tão grandes na cadeia que chegam a impedir a formação de ligações de hidrogênio responsáveis pelas reticulações no hidrogel intumescido, necessitando assim de menos energia para a movimentação molecular, em função da presença de menos ligações de hidrogênio geradas presente nesta composição. De acordo com Canevarolo (2002) “quaisquer fatores que levem à um aumento ou redução das forças intermoleculares secundárias levará ao aumento ou redução das T_m e T_g”.

Outro fato que deve ser considerado é a presença de somente uma transição vítrea o que indica a miscibilidade dos monômeros e consequentemente a copolimerização dos polímeros na síntese.

7.6.1 Comportamento LCST

Os termogramas obtidos para os hidrogéis a fim de avaliar o comportamento de LCST estão sumarizados na Figura 29.

O comportamento LCST é tido como a endoterma máxima obtido durante o aquecimento na técnica de DSC (FEIL et al., 1993; JEONG *et al.*, 2002). Conforme discutido

anteriormente, para géis com este comportamento, em temperaturas inferiores a crítica, apresentam somente uma fase onde as ligações de hidrogênio entre o polímero e o solvente (água) são predominantes, já em temperaturas superiores, as interações hidrofóbicas do sistema prevalecem e as ligações de hidrogênio entre o polímero e a água enfraquecem, originando uma contração do material, expulsando água de seu interior e conseqüentemente originando ligações de hidrogênio entre polímero-polímero (ALMEIDA, 2010).

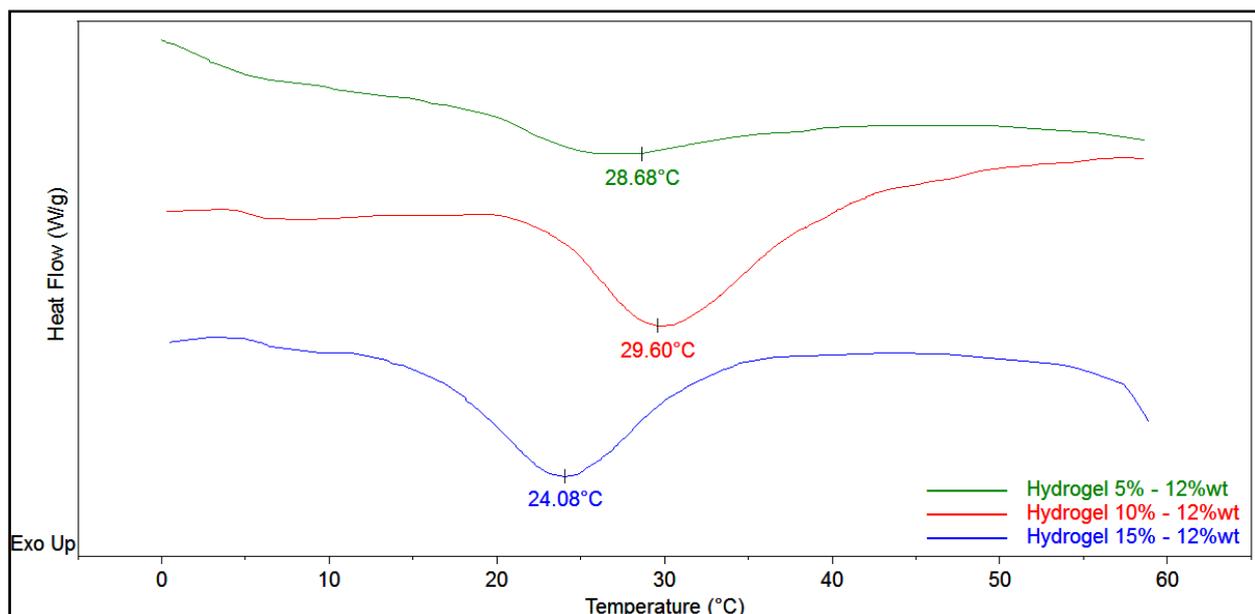


Figura 29 - Termograma do comportamento LCST dos Hidrogéis.

A presença de grupos hidrofílicos faz com que o comportamento LCST seja aumentado, ou seja, as temperaturas para a separação de fase são maiores, conseqüentemente conforme grupos hidrofóbicos são adicionados ao copolímero a temperatura de separação de fase torna-se menor (SCHILD, 1992; QIU & PARK, 2001).

Este efeito é verificado no termograma apresentado anteriormente, tendo em vista a característica altamente hidrofóbica dos poliésteres empregados na síntese gera uma redução nas temperaturas de transição LCST (GUAN, 2008), tendo em vista que a temperatura LCST da PNIPAAm é de aproximadamente 32°C (KLOUDA & MIKOS, 2008) e as temperaturas absolutas encontradas são de 29°C, 30°C e 24°C para os hidrogéis com quantidades de macrómero de 5%, 10% e 15% respectivamente.

Estas mudanças são reversíveis, ou seja, a transição entre sol/gel e gel/sol pode ser repetida infinitamente durante o tempo útil do gel (sem degradação), autores apontam um número próximo a 500, número este que representa quanto o hidrogel pode executar a transição de fases mantendo as propriedades estáveis (ALMEIDA, 2010).

É importante salientar que mesmo com temperaturas abaixo dos 37°C (temperatura do organismo) estes hidrogéis podem ser utilizados *in vivo*, pois, na temperatura corporal já estarão na forma de gel, com estruturas e propriedades adequadas à utilização necessária.

7.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica de varredura dos hidrogéis contendo 5%, 10% e 15% (w/w) de macrômero estão apresentadas nas Figuras 30 a 32. Nas micrografias podem ser visualizadas as estruturas poliméricas que caracterizam os polímeros reticulados, neste caso os hidrogéis.

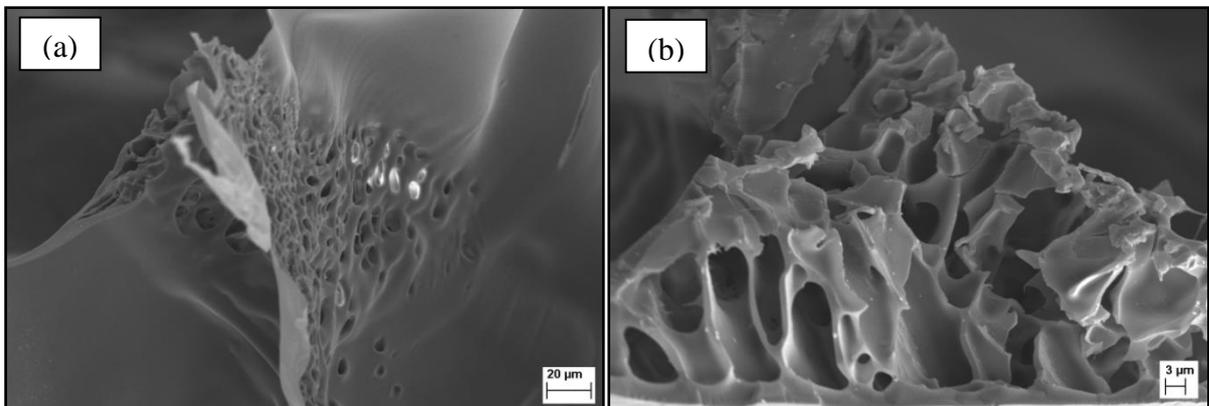


Figura 30 - Micrografias dos Hidrogéis 5% com ampliação de (a) 1000X e (b) 3000X

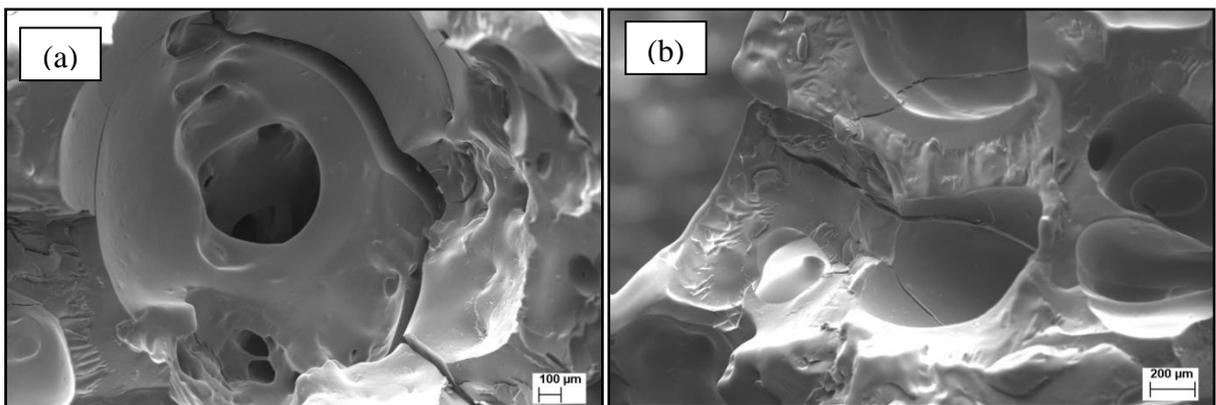


Figura 31 - Micrografias dos Hidrogéis 10% com ampliação de (a) 200X e (b) 100X

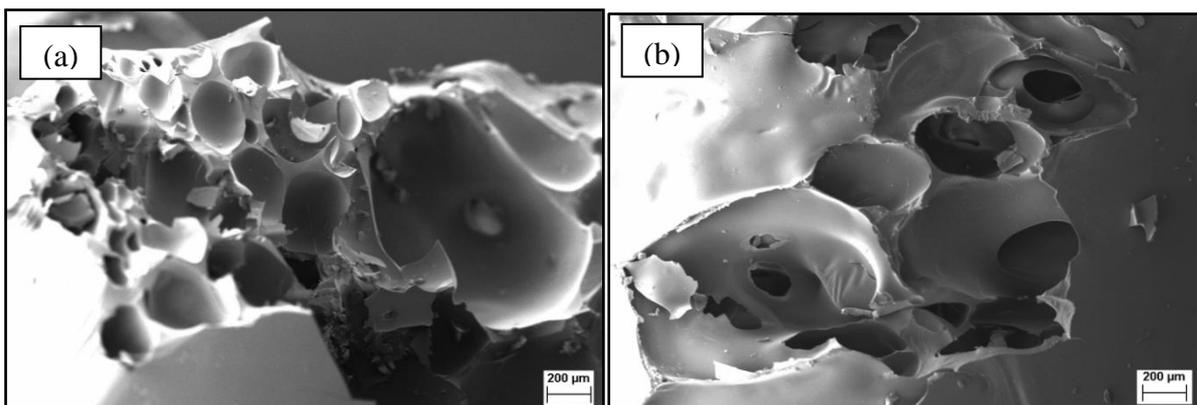


Figura 32 - Micrografias dos Hidrogéis 15% com ampliação de (a) 200X e (b) 100X

Percebe-se que nenhum dos hidrogéis apresentados possui poros totalmente interconectados, o único hidrogel que apresenta essa característica foi o de 5%, neste caso a quantidade de macrômero foi menor, o que possibilitou certa interconectividade dos poros, devido as ligações de hidrogênio formadoras das reticulações, tal fato foi discutido na seção de DSC. Nos outros dois casos percebe-se que não há interconectividade nem uniformidade de poros, o que pode ser atribuído à duas hipóteses:

1. As ramificações deste material são polímeros, ou seja, cadeias moleculares extremamente longas e, quando são adicionadas a tendência é aumentar o número de ramificações na cadeia principal, isso gera um enovelamento das moléculas destas ramificações, e conseqüentemente impede que poros uniformes e interconectados sejam formados;
2. Este hidrogel é reticulado fisicamente, ou seja, ligações de hidrogênio entre as cadeias de N-isopropilacrilamida são formadas, e conforme já discutido, se formam quando o material passa pela sua temperatura crítica de solução inferior, expulsando água de seu interior e prevalecendo as ligações polímero-polímero. Porém, antes de ser feita a análise de MEV, as amostras são liofilizadas, as amostras são liofilizadas, de forma que a diminuição da temperatura no liofilizador pode gerar um enfraquecimento das ligações polímero-polímero dando lugar às ligações polímero solvente. Mesmo que isso ocorra de maneira rápida, certamente há a perda de poros no material, independentemente de haver, antes do processo de liofilização, mais poros formados e interconectados.

Os poros vistos nas amostras de 10% e 15% são somente os poros de onde a água foi retirada no momento do processo de liofilização.

7.8 ENSAIOS MECÂNICOS DE TRAÇÃO

A Figura 33 apresenta o gráfico de tensão *versus* deformação dos hidrogéis compostos de 5%, 10% e 15% de macrômero. Já a Tabela 4 sumariza os dados de Módulo de Elasticidade (kPa), Tensão Máxima (kPa) e Deformação (%).

As análises foram feitas de maneira qualitativa, tendo em vista a dificuldade de manter a uniformidade nas dimensões dos corpos de prova, servindo como comparação apenas entre os hidrogéis apresentados.

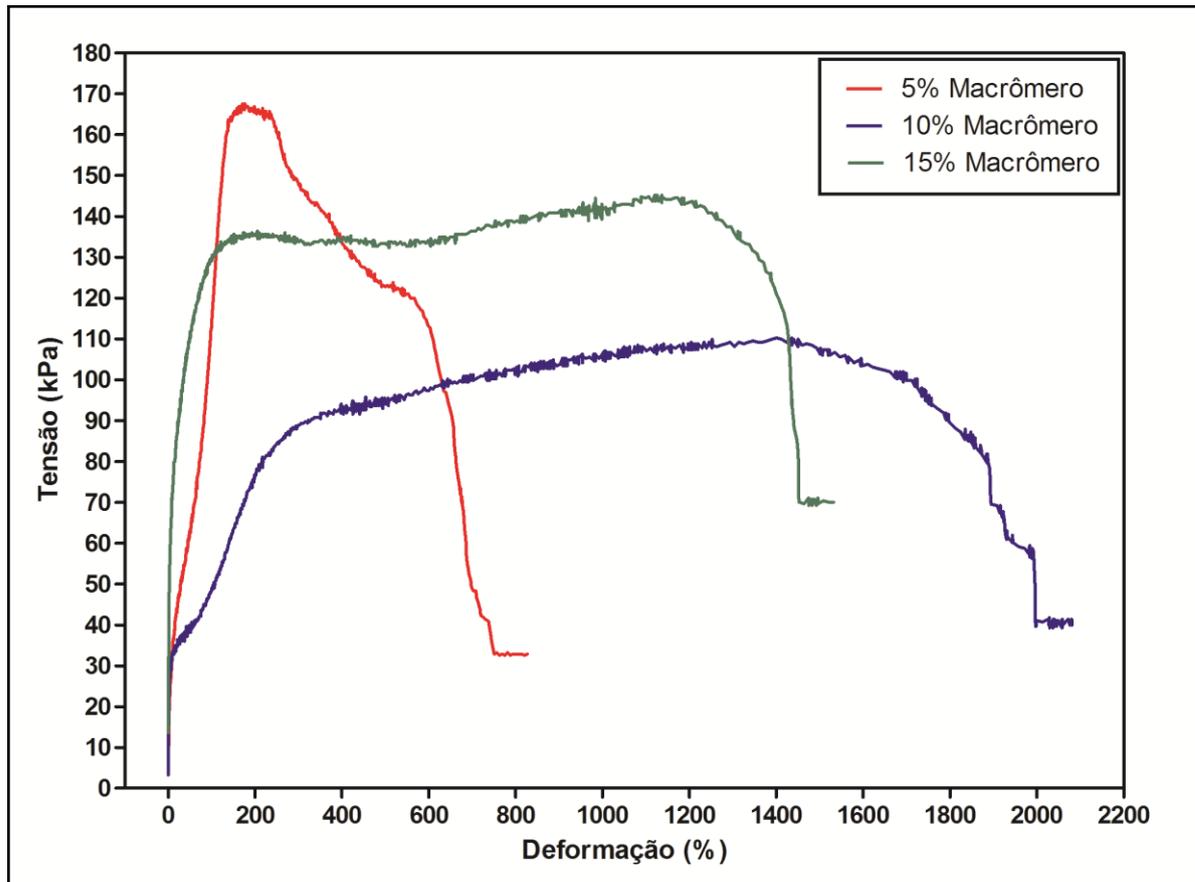


Figura 33 - Comportamento mecânico dos hidrogéis.

Tabela 4 - Valores de Tensão Máxima, Deformação e Módulo de Elasticidade para os hidrogéis obtidos.

% Macrômero	Tensão Máxima (kPa)	Deformação (%)	Módulo de Elasticidade (kPa)
5%	166 ± 12	808 ± 13	531 ± 32
10%	108 ± 15	2070 ± 45	922 ± 27
15%	144 ± 18	1520 ± 30	725 ± 30

Pode-se verificar que todas as composições dos hidrogéis apresentam comportamento extremamente flexível com alongamentos superiores a ordem de 500%. Essa característica é conferida principalmente pelo componente PLDLA-*co*-TMC que possui comportamento elastomérico muito acentuado (POSPIECH *et al.*, 2005) o que explica a deformação menor nas amostras com 5% de macrômero, conseqüentemente gerando menor característica elástica ao material. Na composição de 10% percebe-se grande aumento quando se diz respeito à deformação, esse fato pode ser descrito como um limite ótimo dessa concentração de macrômero na composição do hidrogel.

Os módulos de elasticidade, descrito como a habilidade do material em resistir à uma deformação sob uma força (SUN *et al.*, 2007) também se comportam de maneira semelhante às medidas de deformação, sendo maiores em 10% de macrômero e menores em 5%.

Os valores de tensão máxima demonstram leve decréscimo, porém, todos os valores estão dentro de resultados encontrados na literatura (GUAN *et al.*, 2008; FUJIMOTO *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010) que apontam valores de tensão máxima e módulo na casa das centenas de kPa.

A maior dificuldade encontrada neste tipo de caracterização foi inicialmente a falta de uniformidade dos corpos de prova, tendo em vista seu comportamento LCST qualquer pequena alteração na temperatura ambiente provocava alteração nos corpos de prova e conseqüentemente nos resultados.

7.9 CROMATOGRAFIA DE PERMEACÃO EM GEL (GPC)

Os hidrogéis apresentaram resultados de massas molares numérica média (Mn, ponderal média (Mw) conforme Tabela 5:

Tabela 5 - Valores de Mn e Mw obtidos por GPC dos hidrogéis sintetizados.

PNIPAAm-<i>co</i>-AAc-<i>co</i>-PLDLA-<i>co</i>-TMC	Mn (Da)	Mw (Da)
5% Macrômero	14766	31218
10% Macrômero	27051	62565
15% Macrômero	18663	45053

Alguns autores apontam que a baixa massa molar dos hidrogéis está intimamente ligada a facilidade com que os remanescentes da degradação sejam solubilizados pelo organismo (HOFFMAN, 2001; LI *et al.*, 2009; DOBIĆ *et al.*, 2012).

7.9.1 Degradação dos Hidrogéis

A Figura 34 apresenta a massa remanescente do material quando em degradação *in vitro* durante um período de 1, 2, 3, 4, 5 e 10 semanas.

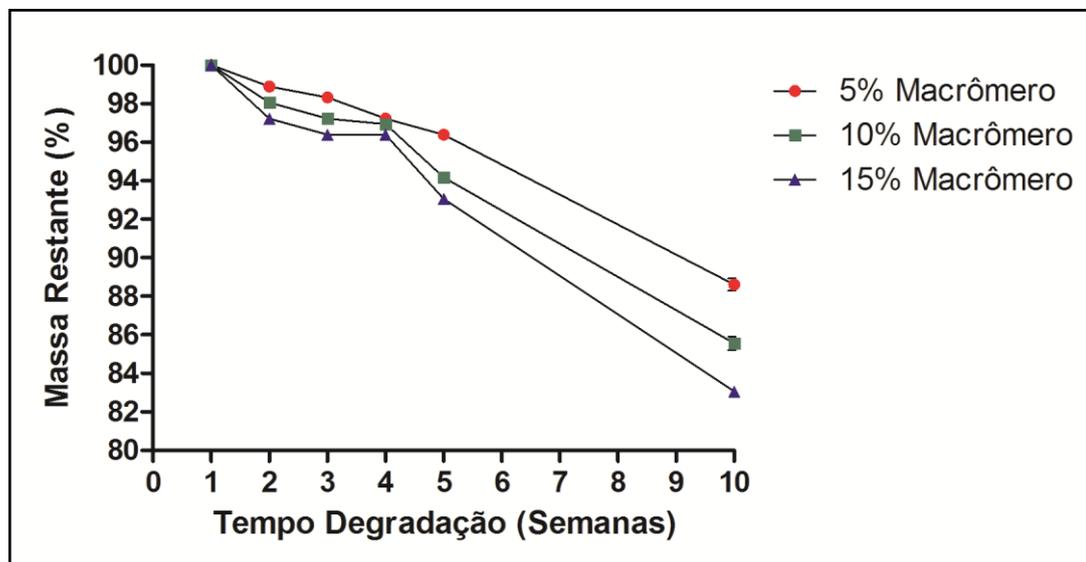


Figura 34 – Variação da perda de massa em função do tempo de degradação para as amostras dos hidrogéis

Todos os hidrogéis apresentam uma perda de massa progressiva durante a degradação, sendo que, conforme a quantidade de macrômero é aumentada a perda de massa também é evidenciada, esse fenômeno é dado pela capacidade de cisão hidrolítica das cadeias de éster, sendo assim, quando maior a quantidade dos macrômeros mais acentuada será a perda de massa. Wang (2010) reporta tempos de degradação superiores à 5 meses para perdas de massa superiores à 85% em hidrogéis com macrômeros compostos por HEMAPTMC, já Guan (2008) aponta tempos inferiores à 20 dias para a degradação (perda de massa em torno de 85%) de hidrogéis compostos por macrômeros de HEMAPLA, tendo em vista estes estudos, os valores de degradação encontrados nos macrômeros de HEMAPLDLA-*co*-TMC estão dentro da faixa de valores encontrados na literatura, onde seriam necessários um maior tempo de degradação para a verificação da completa dissolução destes hidrogéis. É possível perceber que as amostras começam sua variação, ou seja, iniciam a degradação a partir das quatro semanas, esse fato se deve às grandes ramificações dos segmentos ésteres que levam mais tempo para hidrolisar, iniciando a degradação em tempos mais tardios.

Para corroborar o início de degradação dos hidrogéis no tempo de 10 semanas, a Tabela 6 sumariza os valores obtidos por GPC de M_w e M_n para as composições de hidrogéis.

Tabela 6 - Valores de Mn e Mw encontrados por GPC após 10 semanas de degradação.

PNIPAAm-co-AAc-co-HEMA-co- PLDLA-co-TMC	T = 0 semanas		T = 10 semanas	
	Mn (Da)	Mw (Da)	Mn (Da)	Mw (Da)
5% Macrômero	14766	31218	12975	30602
10% Macrômero	27051	62565	25064	47081
15% Macrômero	18663	45053	16226	38771

Todas as composições de hidrogéis apresentaram redução nas massas molares médias e ponderais médias, o que comprova que houve cisão e início de degradação do material no tempo de 10 semanas.

8 ESTUDO *IN VITRO* – INTERAÇÃO BIOLÓGICA

Na Figura 35 são apresentados os valores médios de absorvância obtidos pelo ensaio metabólico do MTT o qual, demonstra a viabilidade e crescimento de células fibroblásticas da linhagem Vero, cultivadas ao longo de 21 dias sobre as amostras de poli(NIPAAm-co-AAc-co-HEMAPLDLA-co-TMC), contendo porcentagens variáveis de 5%, 10% e 15% de macrômero.

O fenômeno da adesão celular é uma etapa fundamental no processo de interação célula-biomaterial e está, comumente, associada à capacidade das células em reconhecer, se ligar e interagir com um substrato, portanto, apresentarem afinidade celular. Somente depois de aderidas, as células iniciam seu processo de espraiamento, proliferação, produção de matriz extracelular nova e manutenção do fenótipo celular (YANG *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2004; BARBANTI *et al.*, 2005).

Nesse sentido, pode se observar que após 1 dia de cultivo, todas as amostras, independente da porcentagem de macrômero em sua composição, foram citocompatíveis, capazes de promover a adesão dos fibroblastos em sua superfície de forma estatisticamente semelhante entre si ($p > 0,001$) bem como, em relação ao controle, onde os fibroblastos foram cultivados na própria placa de cultivo de poliestireno.

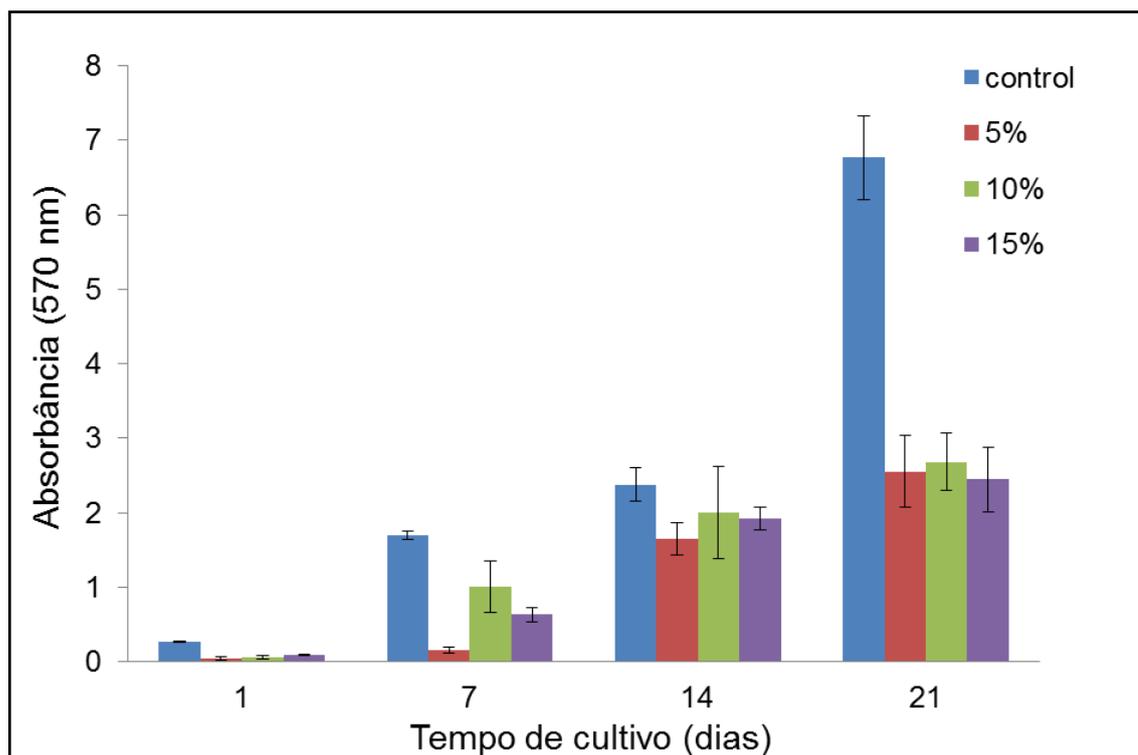


Figura 35 - Crescimento celular de fibroblastos cultivados sobre as amostras de poli(NIPAAm-co-AAc-co-HEMAPLDLA-co-TMC contendo diferentes porcentagens de macrômero, ao longo de 21 dias.

Após 7 dias de cultivo, observa-se que embora todas as amostras tenham sustentado a adesão e estimulado a proliferação celular, a amostra contendo 10% de macrômero proporcionou uma maior afinidade celular, estimulando um crescimento celular significativamente superior em relação às amostras contendo 5% e 15% de HEMAPLDLA-co-TMC ($p < 0,001$) e semelhante ao encontrado no controle ($p > 0,001$).

Sabe-se que a micro estrutura física e composição química da superfície de dispositivos aplicados na Engenharia Tecidual são fundamentais para que uma série de reações a nível celular e molecular ocorram na interface dos biomateriais com tecidos receptores. Alguns parâmetros são frequentemente avaliados tais como: hidrofiliicidade, rugosidade superficial, porosidade e presença de grupos químicos funcionais ativos capazes de estimularem e induzirem respostas biológicas específicas (JIAO & CUI, 2007).

Sendo assim, dois fatores relevantes e complementares da composição das amostras de hidrogel podem ter contribuído para que a amostra contendo 10% de macrômero tenha promovido uma maior afinidade e interação biológica entre os fibroblastos-material durante os estágios iniciais do cultivo, sendo eles: a hidrofiliicidade e intumescimento prévio do material no meio de cultivo celular DMEM.

Paralelamente, esse balanço hidrofílico/hidrofóbico da amostra 10% pode ter contribuído para uma melhor interação entre o material e meio de cultivo DEMEM durante o procedimento de pré-intumescimento das amostras. Devido a composição rica em aminoácidos e sais essenciais a manutenção biológica das células, a presença dessas macromoléculas na superfície do material, podem ter atuado como sítios ativos de ligação e reconhecimento celular natural (JIAO & CUI, 2007; ROACH et al., 2008).

Uma nítida progressão do crescimento celular foi observada após 14 dias de cultivo, onde a média dos valores de absorbância relativos à quantia de células fibroblastos presentes nas amostras apresentaram valores semelhantes entre si e ao controle, evidenciando, portanto, a viabilidade de aplicação dos hidrogéis avaliados no presente estudo tanto do ponto de vista da citocompatibilidade, ou seja, serem atóxicos, como também, da capacidade de sustentar e estimular a proliferação celular.

Após 21 dias de cultivo, uma notável diferença significativa entre a quantia de células presente no grupo controle e amostras foi encontrada ($p < 0,001$). A mesma pode ser facilmente justificada pela dificuldade de difusão do reagente MTT, usado na avaliação das células metabolicamente ativas, para o interior do material ou partes morfológicamente irregulares do material que apresentavam células em processo de migração e proliferação celular (NG *et al.*, 2005). Sendo assim, o crescimento encontrado não pode ser interpretado como uma perda da citocompatibilidade ou instabilidade das amostras durante o período de cultivo.

Em relação ao crescimento e quantia de células presentes nas amostras, a análise estatística dos resultados revelou que apenas a amostra 5% apresentou uma taxa de proliferação significativa em relação ao tempo anterior de 14 dias de cultivo. Contudo, a quantia de células viáveis presente nas amostras contendo 5%, 10% e 15% de macrômero foi similar, confirmando assim, a adequada citocompatibilidade das amostras.

9 CONCLUSÕES

Um novo macrômero biodegradável foi sintetizado e utilizado como elemento modificador de propriedades de um hidrogel de N-isopropilacrilamida. As características dominantes do hidrogel foram sua capacidade de ser injetável, ter resposta às mudanças de temperatura e possuir segmentos biodegradáveis acoplados ao hidrogel.

A avaliação macroscópica aponta a característica do material ser injetável em agulhas de 26 gauge, esse tamanho de agulha foi escolhido tendo em vista que procedimentos pouco invasivos no coração necessitam desta dimensão de agulhas. Nas características macroscópicas é possível notar o baixo tempo que o material necessita para gelificar e consequentemente adquirir suas propriedades.

A técnica de RMN apontou a copolimerização de todos os monômeros envolvidos na polimerização tanto do macrômero quanto do hidrogel, assim sendo, a síntese mostrou-se efetiva para este tipo de material.

Os espectros de FTIR também indicaram a presença de todos os grupamentos químicos pertencentes aos monômeros envolvidos na síntese auxiliando a corroborar a técnica de RMN.

A caracterização térmica por DSC mostrou os hidrogéis como materiais com temperatura de transição vítrea muito próxima às temperaturas apontadas em literatura e como característica mais importante o comportamento LCST dos hidrogéis, comportamento este responsável pelas características termo sensíveis do material.

Com as micrografias obtidas pode-se perceber a presença de poros no material, mesmo que poros sem interconectividade, também apontam uma estrutura tridimensional característica dessa classe de materiais.

As propriedades mecânicas puderam ser mensuradas e demonstraram valores na ordem dos kPa, indicativo de boas propriedades mecânicas e grandes deformações suportadas pelos hidrogéis.

Os ensaios de degradação apontam o macrômero como passível de clivagem hidrolítica em seu segmento éster, com perda de massa de aproximadamente 20% em todas as composições de hidrogel em 10 semanas, estes resultados nos apontam para a biodegradabilidade dos hidrogéis.

Por fim, os ensaios de interação biológica, mostram todos os materiais sendo citocompatíveis e não tóxicos às células onde foram cultivadas, sendo recomendados assim para o uso na engenharia tecidual.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Estudo *in vivo* dos materiais desenvolvidos;
- Avaliar a degradação dos hidrogéis em tempos mais longos;
- Avaliar o LCST dos materiais quando da completa degradação dos segmentos ésteres;
- Efetuar ensaios de reologia nos hidrogéis;
- Avaliar suas características termomecânicas pelo ensaio de TMA;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.S.F.L. Preparação e Caracterização de Hidrogéis para Aplicações Biomédicas.2010, 308 f. (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

ALMEIDA, J. F.; FERREIRA, P.; LOPES, A.; GIL, M. H. International Journal of Biological Macromolecules Photocrosslinkable biodegradable responsive hydrogels as drug delivery systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 49, n. 5, p. 948–954, 2011.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, v. 21, n. 7, p. 667-81, 2000.

AOUADA, F.A.; MUNIZ, E. C.; CARLOS, M.P.; MOTTOSO, L.H.C. Correlação entre parâmetros da cinética de intumescimento com características estruturais e hidrofílicas de hidrogéis de poliacrilamida e metilcelulose. *Química Nova*, v. 32, p. 1482-1490, 2009.

ATAZEVEN, H.O., GURDAG G., GURKAYNAK M., Copolymerization of hydroxyethyl methacrylate with butyl acrylate. *Chimica Acta Turica*, v. 34, p. 27-37, 2006.

BAKAKOVÁ, L.; FILOVÁ, E.; RYPACEK, F.; SVORCIK, V.; STARÝ, V. Cell Adhesion on Artificial Materials for Tissue Engineering. *Physiological Res*, v. 53, n. 1, p. 35-45, 2004.

BAE, K. H.; WANG, L.-S.; KURISAWA, M. Injectable biodegradable hydrogels: progress and challenges. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 1, n. 40, p. 5371, 2013.

BAVARESCO, V. P.; ZAVAGLIA, C. A. C.; MALMONGE, S. M.; REIS, M. C. Viability of pHEMA hydrogels as coating in human synovial joint prosthesis. *Materials Research*, v. 5, n. 4, p. 481–484, 2002.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de tecidos. *Polímeros*, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

BARBANTI, S. H., ZAVAGLIA, C. A. C., DUEK, E. A. R.; Effect of Salt Leaching on PCL and PLGA(50/50) Resorbable Scaffolds. *Materials Research*, v. 11, 75-80, 2008.

BATHIA, S.; YETTER, A. B. Correlation of visual in vitro cytotoxicity ratings of biomaterials with quantitative in vitro cell viability measurements. *Cell Biol Toxicol*, v.24, n.4, p. 315–319, 2008.

BOSTMAN, O. M.; Osteolytic Changes Accompanying Degradation Of Absorbable Fixation Implants. *J Bone Joint Surgery Br*, v.73, p.679-82, 1991.

CANEVAROLO, S.V. Ciência dos Polímeros: Um texto básico para tecnólogos e engenheiros. São Paulo: Artliber, 2002. 183 p.

CARVALHO, A. C. A.; PEREIRA, E. S. C.; COSTA, C.; BARRETO, I. C.; MADUREIRA, L. C.; PAIM, F. R. Estratégias regenerativas da bioengenharia tecidual e aspectos éticos. *R Ci méd biol*, v. 9, n.1, p. 20-27, 2010.

CHILKOTI, A.; DREHER, M. R.; MEYER, D. E.; RAUCHER, D. Targeted drug delivery by thermally responsive polymers. *Advanced drug delivery reviews*, v. 54, n. 5, p. 613–30, 2002.

CORTÉS, J.A., PUIG, J.E., MORALES, J.A., MENDIZÁBAL, E. Thermosensitive nanostructured hydrogels synthesized by inverse microemulsion polymerization. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, v. 10, n. 3, p. 513-520, 2011.

DIMITROV, I.; TRZEBICKA, B.; MÜLLER, A. H. E.; DWORAK, A.; TSVETANOV, C. B. Thermosensitive water-soluble copolymers with doubly responsive reversibly interacting entities. *Progress in Polymer Science*, v. 32, n. 11, p. 1275–1343, 2007.

DOBIĆ, S. N.; FILIPOVIĆ, J. M.; TOMIĆ, S. L. Synthesis and characterization of poly(2-hydroxyethyl methacrylate/itaconic acid/poly(ethylene glycol) dimethacrylate) hydrogels. *Chemical Engineering Journal*, v. 179, p. 372–380, 2012.

EECKMAN, F.; MOËS, A J.; AMIGHI, K. Poly(N-isopropylacrylamide) copolymers for constant temperature controlled drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, v. 273, n. 1-2, p. 109–19, 2004.

FEIL, H.; BAE, Y. H.; FEIJEN, J.; KIM, S. W. Effect of comonomer hydrophilicity and ionization on the lower critical solution temperature of N-isopropylacrylamide copolymers. *Macromolecules*, v. 26, n. 10, p. 2496–2500, 1993.

FUJIMOTO, K. L.; MA, Z.; NELSON, D. M.; et al. Synthesis, characterization and therapeutic efficacy of a biodegradable, thermoresponsive hydrogel designed for application in chronic infarcted myocardium. *Biomaterials*, v. 30, n. 26, p. 4357–68, 2009.

GAHARWAR, A. K.; RIVERA, C. P.; WU, C.-J.; SCHMIDT, G. Transparent, elastomeric and tough hydrogels from poly(ethylene glycol) and silicate nanoparticles. *Acta biomaterialia*, v. 7, n. 12, p. 4139–48, 2011.

GONZALEZ, R. S., Preparação, caracterização morfológica e aplicações de hidrogéis de P(N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico) 2008, 133 f. (Doutorado em Química) – Instituto Química, UNICAMP, 2008.

GUAN, J.; HONG, Y.; MA, Z.; WAGNER, W. R. Protein-reactive, thermoresponsive copolymers with high flexibility and biodegradability. *Biomacromolecules*, v. 9, n. 4, p. 1283-92, 2008.

GUNATILLAKE, P. A.; ADHIKARI, R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater*, v.20, n.5, p. 1-16, 2003.

HASIRCI, V & YUCEL, D. Polymers used in tissue Engineering. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, v.1, n.1, p. 1–17, 2007.

HOFFMAN, A S. Hydrogels for biomedical applications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 944, p. 62–73, 2001.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, p. 18–23, 2012.

HUTMACHER, D.W. Regenerative medicine will impact, but not replace, the medical device industry. *Expert Rev Med Devices*, v.3, n.4, p.409-412, 2006.

JEONG, B.; KIM, S.; BAE, Y. Thermosensitive sol–gel reversible hydrogels. *Advanced drug delivery reviews*, v. 54, p. 37–51, 2002.

JIANG , L. Preparation and Swelling Behavior of Poly(N- isopropylacrylamide-co-acrylic acid derivative L- phenylalanine) hydrogels, *Internation Journal of Biology*, v. 2, n1, 2010.

JIAO, Y.P & CUI, F. Z. Surface modification of polyester biomaterials for tissue engineering. *Biomed Mater*, v.2. n. 4, p. 24-37, 2007.

KIRKPATRICK, C. J.; FUCHS, S.; HERMMANS, M. I.; PETERS, K.; UNGER, R. E. Cell culture models of higher complexity in tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials*, v. 28, n. 34, p. 5193–5198, 2007.

KIRSCHNER, C. M.; ANSETH, K. S. Hydrogels in healthcare: From static to dynamic material microenvironments. *Acta Materialia*, v. 61, n. 3, p. 931–944, 2013.

KLOUDA, L.; MIKOS, A. G. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, v. 68, n. 1, p. 34–45, 2008.

KLOUDA, L.; PERKINS, K. R.; WATSON, B. M.; et al. Thermoresponsive, in situ cross-linkable hydrogels based on N-isopropylacrylamide: fabrication, characterization and mesenchymal stem cell encapsulation. *Acta biomaterialia*, v. 7, n. 4, p. 1460–7, 2011.

LAVIK, E.; LANGER, R. Tissue engineering: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.65, n. 1, p. 1-8,2004.

LENAS, P.; MOOS, M.; LUYTEN, F. P. Developmental Engineering: A New Paradigm for the Design and Manufacturing of Cell-Based Products. *Tissue Eng: part B*, v.15, n.4, p.381-94, 2009.

LI, Z.; WANG, F.; ROY, S.; SEN, C. K.; GUAN, J. Injectable, highly flexible, and thermosensitive hydrogels capable of delivering superoxide dismutase. *Biomacromolecules*, v. 10, n. 12, p. 3306–16, 2009.

LI, Z.; GUAN, J. Hydrogels for cardiac tissue engineering. *Polymers*, v. 3, n. 2, p. 740-761, 2011.

LIM, D.W.; GHOI, S.H.; PARK, T.G., A new class of biodegradable hydrogels stereocomplexed by enantiomeric oligo(lactide) side chains of poly(HEMA-g-OLA)s, *Macromol. Rapid Commun.* v. 21, p. 464–471 , 2000.

LIU, Y.; PARK, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, v. 53, n. 3, p. 321–39, 2001.

LIU, C.; GONG, C.; PAN, Y.; et al. Synthesis and characterization of a thermosensitive hydrogel based on biodegradable amphiphilic PCL-Pluronic (L35)-PCL block copolymers☆. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 302, n. 1-3, p. 430–438, 2007.

MACAYA, D.; SPECTOR, M. Injectable hydrogel materials for spinal cord regeneration: a review. *Biomedical materials (Bristol, England)*, v. 7, n. 1, p. 012001, 2012.

MANSUR, H. S.; SADAHIRA, C. M.; SOUZA, A. N.; MANSUR, A. A. P. FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Materials Science and Engineering: C*, v. 28, n. 4, p. 539–548, 2008.

MATSUMURA, S., TSUKADA, K., TOSHIMA, K. Novel lipase-catalyze ring-opening copolymerization of lactide and trimethylene carbonate forming poly(ester carbonate)s. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 25, p. 161-167, 1999.

MEYER,U.; BUCHTER, A.; WIESMANN, H. P.; JOOS, U.; JONES, D. B. Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces. *Eur Cells Mater*, v. 26, n.9, p.39-49, 2005.

MIDDLETON, J. C., TIPTON, A.J.; Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*, v.21, p. 2335-2346, 2000.

MOSMANN,T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*,v.65, n.1- 2, p.55-63.1983.

MOTTA, A.C.; DUEK, E.A.R. Síntese e caracterização do copolímero poli (L-co-D,L Ácido Láctico). *Polímeros*, v.17, n. 2, p. 123-129, 2007.

MOURA, L. A.; Utilização de membranas de Poli (L-ácido láctico) em Regeneração Tecidual Guiada para Periodontia. 2007. 67 f. (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia Mecânica, UNICAMP, 2007.

MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Design Strategies of Tissue Engineering Scaffolds with Controlled Fiber Orientation. *Tissue Eng*, v.13, n.8, p.1845-1865, 2007.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T.; TANDON, M. Injectable hydrogels as biomaterials. John Wiley & Sons: Hoboken, 2010.

NG, K. W.; LEONG, D. T. W.; HUTMACHER, D. W. The challenge to measure cell proliferation in two and three dimensions. *Tissue engineering*, v. 11, n. 1-2, p. 182-191, 2005.

NGUYEN, M. K.; LEE, D. S. Injectable biodegradable hydrogels. *Macromolecular bioscience*, v. 10, n. 6, p. 563–79, 2010.

NI, P.; DING, Q.; FAN, M.; et al. Injectable thermosensitive PEG-PCL-PEG hydrogel/acellular bone matrix composite for bone regeneration in cranial defects. *Biomaterials*, v. 35, n. 1, p. 236–48, 2014.

OVERSTREET, D. J.; DUTTA, D.; STABENFELDT, S. E.; VERNON, B. L. Injectable hydrogels. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, v. 50, n. 13, p. 881–903, 2012.

OVIEDO, I. R.; MENDEZ, N. A. N.; GOMEZ, M. P. G.; RODRIGUEZ, H. C.; MARTINEZ, A. R. Design of a physical and nontoxic crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogel. *International Journal of Polymeric Materials*, v. 57, p. 1095-1103, 2008.

PARK, H.; GUO, X.; TEMENOFF, J. S.; et al. Effect of swelling ratio of injectable hydrogel composites on chondrogenic differentiation of encapsulated rabbit marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Biomacromolecules*, v. 10, n. 3, p. 541–6, 2009.

PÊGO, A.P.; POOT, A.A; GRIJPM, D.W.; FEIJEN, J. Physical properties of high molecular weight 1,3-trimethylene carbonate and D,L-lactide copolymers. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 14, n. 9, p. 767-773, 2003

PENG, Q.; SUN, X.; GONG, T.; et al. Injectable and biodegradable thermosensitive hydrogels loaded with PHBHHx nanoparticles for the sustained and controlled release of insulin. *Acta biomaterialia*, v. 9, n. 2, p. 5063–9, 2013.

PEPPAS, N. A; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, v. 50, n. 1, p. 27–46, 2000.

PLACE, E. S.; GEORGE, J. H.; WILLIAMS, C. K. Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering. *Chemical Society Review*, v. 38, n.4, p. 1139–51, 2008.

POSPIECH, D.; KOMBER, H.; JEHNICHEN, D. Multiblock copolymers of L-lactide and trimethylene carbonate. *Biomacromolecules*, v. 6, n. 1, p. 439–46, 2005.

QIU, Y.; PARK, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 53, n. 3, p. 321-339, 2001.

ROACH, P.; EGLIN, D.; ROHDE, K.; PERRY, C. C. Modern biomaterials: a review—bulk properties and implications of surface modifications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.18, n. 7, p. 1263–77, 2008.

RUEL-GARIÉPY, E.; LEROUX, J.-C. In situ-forming hydrogels--review of temperature-sensitive systems. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, v. 58, n. 2, p. 409–26, 2004.

SABIR, M. I. ; XU, E. X.; LI, L. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *J Mater Sci*, v.44, n.21, p. 5713-5724, 2009.

SALTZMAN, W. M. Cell interactions with polymers. In: LANZA, R.; CHICK, W. L.; LANGER, R. Principles of Tissue Engineering. New York: Academic Press, 2000. Cap. 19, p. 221-235.

SANTOS, A. R.; FERREIRA, B. M. P.; DUEK, E. A. R.; DOLDER, H.; WADA, R. S.; WADA, M. L. F. Differentiation Pattern of Vero Cells Cultured on Poly(L-lactic acid)/Poly(Hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) Blends. *Artificial Organs*, v. 28, n. 4, p. 381-389, 2004.

SCHILD, H. G. POLY (N-ISOPROPYLACRYLAMIDE): experiment, theory and application been appearing in the literature with increasing frequency. *Prog. Polym. Sci.*, v. 17, p. 163–249, 1992.

SCHMALJOHANN, D. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, v. 58, n. 15, p. 1655–70, 2006.

SILVA, R. OLIVEIRA M., Effect of the cross-linking degree on the morphology of poly (NIPAAm-co-AAC) hydrogels, *Polymer*, 48, p.4114-4122, 2007.

SPILLER, K. L.; MAHER, S. A.; LOWMAN, A. M. Hydrogels for the repair of articular cartilage defects. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, v. 17, n. 4, p. 281-299, 2011.

STOCK, U.A., VACANTI, J.P., Tissue engineering: Current state and prospects. *Annual. Medicine Review*, v. 52, p. 443, 2001.

SULTAN, M. Synthesis and Characterization of Polyurethane Acrylate Copolymer. 2011, 202 f. (Doutorado em Química) – Faculty of Sciences, Faisalabad, 2011.

SUN, G.; ZHANG, X.-Z.; CHU, C.-C. Formulation and characterization of chitosan-based hydrogel films having both temperature and pH sensitivity. *Journal of materials science. Materials in medicine*, v. 18, n. 8, p. 1563–77, 2007.

TAN, H.; CHU, C. R.; PAYNE, K. A.; MARRA, K. G. Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, v. 30, n. 13, p. 2499–506, 2009.

TAN, H.; MARRA, K. G. Injectable, Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Materials*, v. 3, n. 3, p. 1746–1767, 2010.

VERT, M., LI, M. S., SPENLEHAUER, G., GUERIN, P.; Bioresorbability And Biocompatibility Of Aliphatic Polyesters. *Journal of Materials Science*, v.3, 432-436, 1992.

VERT, M. Aliphatic Polyesters: Great Degradable Polymers That Cannot Do Everything. *Biomacromolecules*, v.6, n. 2, p. 538-546, 2005.

von der MARK, K.; PARK, J.; BAUER, S.; SCHMUKI, P. Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix. *Cell Tissue Res*, v. 339, n. 1 p. 131-153, 2010.

WAN, Y.; WANG, Y.; LIU, Z.; QU, X.; HAN, B.; BEI, J.; WANG, S. Adhesion and proliferation of OCT-1 osteoblast-like cells on micro and nano-scale topography structured poly(L-lactide). *Biomaterials*, v. 26, n. 21, p. 4453-4459, 2005.

WANG, Y.; AMMER, G. A.; SHEPPARD, B. J.; LANGER, R., A. A tough biodegradable elastomer. *National Biotechnology*, v. 20, n. 6, p. 602-606, 2002.

WANG, F.; LI, Z.; KHAN, M.; et al. Injectable, rapid gelling and highly flexible hydrogel composites as growth factor and cell carriers. *Acta biomaterialia*, v. 6, n. 6, p. 1978-91, 2010.

WANG, X., Y. HU, L. SONG, W. XING, H. LU, P. LV AND G. JIE. Effect of antimony doped tin oxide on behaviors of waterborne polyurethane acrylate nanocomposite coatings. *Surf. Coat. Technol.* v.20, n.5, p.1864-1869, 2010.

WATANABE, J.; AMEMORI, S.; AKASHI, M., Disparate polymerization facilitates the synthesis of versatile block copolymers from poly(trimethylene carbonate). *Polymer*, v.49, p. 3709-3715, 2008.

WATAYA, C. H. Desenvolvimento de menisco de poli (álcool vinílico) (PVA) personalizado com auxílio da prototipagem rápida. 2012, 109 f. (Doutorado em Engenharia Mecânica), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

WENNINK, J. W. H. et al. Injectable Hydrogels for Articular Cartilage Tissue Engineering. *Biodegradable Hydrogels by Physical and Enzymatic Crosslinking of Biomacromolecules*, p. 9, 2013.

WILLIAMS, D.F. Definitions in Biomaterials: Biomedical Engineering, Elsevier, v.4, Cap. 1, 1987.

WILLIAMS, D.F.; The Mechanisms of Biocompatibility. *Biomaterials*, v. 29, p. 1737-1738, 2008.

WU, L.; WANG, L.; WANG, X.; XU, K. Synthesis, characterizations and biocompatibility of novel biodegradable star block copolymers based on poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and poly(epsilon-caprolactone). *Acta biomaterialia*, v. 6, n. 3, p. 1079-89, 2010.

YANG, J.; BEI, J.; WANG, S. Enhanced cell affinity of poly(D,L-Lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage. *Biomaterials*, v.23, n. 12, p.2607-2614, 2002.

YI, Q.; WEN, X.; LI, L.; HE, B.; NIE, Y.; WU, Y.; ZHANG, Z.; GU, Z. The chiral effects on the responses of osteoblastic cells to the polymeric substrates. *Eur Polym J.* v. 45, n. 7, p. 1970-1978, 2009.

YU, N.Y.C.; SCHINDELER, A.; LITTLE, D.G.; RUYS, A.J. Biodegradable Poly(alpha-hydroxy acid) Polymer Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *J Biomed Mater Res*, v.93, n.1, p. 285-295, 2010.

ZHOU S., FAN S., STEVE C. F. AU-YEUNG; CHI W. Light-scattering studies of poly(N-isopropylacrylamide) in tetrahydrofuran and aqueous solution, *Polymer*, v.36, p.1341-1346, 1994.