

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

**SÍNTESE E FUNCIONALIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE  
POLI (ÁLCOOL VINÍLICO)**

**Gisele Marschner Rasia**

**Dissertação de Mestrado**

**Porto Alegre, maio de 2014.**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

**SÍNTESE E FUNCIONALIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE  
POLI (ÁLCOOL VINÍLICO)**

**Gisele Marschner Rasia**

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosane Michele Duarte Soares e apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.

Porto Alegre

2014

Dedico este trabalho aos meus pais Vera e Adroaldo, meus irmãos Cléber e Alexandre, por terem sempre me apoiado, mesmo estando longe estiveram presentes, não somente nessa caminhada como em todas as etapas da minha vida. Em especial à minha mãe por ser essa pessoa maravilhosa.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Prof<sup>a</sup> Leandra F. Campo pela ajuda na escolha de um orientador, sem ela eu não estaria no Laboratório K208-A. Além da indicação de orientador também agradeço pela orientação, apoio, conversas e incentivo ao longo da minha graduação.

A Professora Rosane M. D. Soares agradeço pela oportunidade de realização desse trabalho, pela confiança depositada, tanto em mim como no projeto, pela paciência, pelo incentivo para o meu crescimento profissional e pessoal, pelas várias conversas sobre inúmeros assuntos, pelos ensinamentos e, acima de tudo, pela orientação.

Ao Professor Ricardo Oliveira pela ajuda em determinadas etapas do trabalho, muito obrigada pela prestatividade e pelos ensinamentos. Agradeço também ao Professor Fabiano Rodembush pelos espectros de UV-Vis e pelos ensinamentos e orientação desde a época da graduação. Agradeço ao Professor Valter Stefani por ser meu orientador na Iniciação Científica e por ter me mostrado, direta ou indiretamente, a conduzir um projeto de pesquisa.

Ao Prof. Marcos Leite e principalmente ao seu aluno José Augusto pelo uso da lâmpada policromática. A Professora Joana Lea Meira Silveira da UFPR e a aluna Heide Koop pela receptividade em seu laboratório e pela ajuda no reômetro.

Agradeço a Camila Correa, não somente pelo HCA, mas pela sua amizade, carinho e paciência. A Monique pela amizade, companheirismo, apoio e por todos os momentos que passamos. Gurias, a graduação fez nós nos conhecermos e criar uma amizade, mas nossa amizade não parou por aí, né! Muito obrigada por tudo! Agradeço também a minha prima-amiga Viviane, por estar presente na minha vida e me fazer companhia desde o início da minha chegada em Porto Alegre, assim como a Cristiane.

Um agradecimento mais do que especial para o meu namorado Fabiano, por fazer parte da minha vida e acrescentar mais felicidade a ela. Muito obrigada por ser essa pessoa incrível, que me apoia, até mesmo quando acho que não deveria... que me entende (e/ou se esforça muito para que isso seja possível), pela amizade, compreensão e por dividir os momentos da sua vida comigo. Agradeço pela paciência em me escutar e também aturar as minhas reclamações, principalmente nos últimos tempos. Muito, muito e muito obrigada por tudo! Te Amo!!!

A todo o pessoal do laboratório K208-A, pelo carinho, ajuda, troca de experiências, prestatividade e companheirismo nestes dois anos. Em especial agradeço a Gislene pela disponibilidade em sempre me ajudar, juntamente com a Joice, pela paciência, mas acima de tudo pela valiosa amizade! Florzinhas, vocês são muito especiais!!! A Andressa, Jéssica e Josiane pela amizade, companheirismo, carinho, conversas e alegrias divididas. Pela companhia nas aulas de Química de Polímeros e nos inúmeros RMNs, infravermelhos e reações! Adoro vocês gatas! Ao Felipe por ser essa pessoa tranquila e querida e pela companhia nas minhas reações demoradas. Aos alunos de iniciação científica, Jônatas, Rodrigo e Ketlyn um obrigada especial e também aos demais ex-colegas e colegas, Johnny, César, Eliane, Luciano e Nataly.

Agradeço ao Aldo e Dolourdes, que eu adotei como “os meus pais portoalegrenses”, por serem essas pessoas formidáveis, por me acolherem e fazer eu me sentir em casa.

Gostaria de agradecer novamente aos melhores pais do mundo, Vera e Adroaldo, pois nunca é demais agradecer essas duas pessoas que sempre acreditaram em mim e fazem o possível e quase o impossível para me ajudar e me ver feliz. Amo muito vocês e sou muito grata por ser filha de vocês dois e também por tudo que me proporcionaram. Agradeço a minha avó Elvira que sempre acreditou em mim e me apoiou. Obrigada por existir e por eu não ter que dividir com mais nenhuma neta, só com os meus dois irmãos Cléber e Alexandre, os quais agradeço pelo apoio, pela amizade e até pelas implicâncias comigo, mas agradeço principalmente por estarem perto dos nossos pais e sempre prontos para ajudar no que for preciso. Amo vocês! Agradeço a minha cunhada Carine, por ser essa pessoa forte e admirável.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho e que eu possa ter esquecido de citar, o meu muito obrigada.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A CAPES pela bolsa de estudo.

A Deus, por sempre me dar forças e me iluminar.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

(Arthur Schopenhauer)

*“Podes dizer-me, por favor, que caminho devo seguir para sair daqui?”*

*Isso depende muito de para onde queres ir - respondeu o gato.*

*Preocupa-me pouco aonde ir - disse Alice.*

*Nesse caso, pouco importa o caminho que sigas - replicou o gato”.*

Lewis Carroll (Alice no País das Maravilhas)

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS .....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO .....	xviii
ABSTRACT .....	xix
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>05</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	05
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	05
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>06</b>
3.1 HIDROGÉIS .....	06
3.1.1 Classificação dos Hidrogéis .....	07
3.1.2 Métodos de Reticulação .....	09
3.1.2.1 Hidrogéis reticulados fisicamente .....	09
3.1.2.2 Hidrogéis reticulados quimicamente .....	12
3.1.3 Água em Hidrogéis.....	20
3.1.4 Propriedades dos Hidrogéis.....	21
3.1.5 Caracterização de Hidrogéis.....	23
3.2 POLI (ÁLCOOL VINÍLICO) .....	26
3.2.1 Hidrogéis de Poli (álcool vinílico) .....	27
3.3 INTERAÇÃO BIOMATERIAL E MEIO BIOLÓGICO .....	29
3.3.1 Matriz Extracelular (MEC) .....	29
3.3.1 Sequência Peptídica RGD .....	30
<b>4 PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>34</b>
4.1 MATERIAIS .....	34
4.2 MÉTODOS .....	34
4.2.1 Hidrogéis Fotoreticulados .....	34
4.2.1.1 Introdução de Grupos Metacrilóila ao PVA (Reação de Modificação 1) ...	35
4.2.1.2 Introdução de Grupos Amina ao PVA (Reação de Modificação 2).....	36
4.2.1.3 Síntese dos Hidrogéis Fotoreticulados .....	37
4.2.1.4 Funcionalização dos Hidrogéis Fotoreticulados .....	38
4.3.1 Hidrogéis Quimicamente Reticulados.....	39

4.3.1.1	Reação de Modificação do PVA .....	40
4.3.1.2	Síntese dos hidrogéis: reticulação com ácido cítrico .....	40
4.3.1.3	Síntese dos hidrogéis: reticulação com ácido butano 1,2,3,4,- tetracarboxílico.....	41
4.3.1.4	Funcionalização com RGDS dos hidrogéis reticulados quimicamente .....	41
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS DE PVA MODIFICADOS E FUNCIONALIZADOS.....	43
4.4.1	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR).....	44
4.4.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN- <sup>1</sup> H) .....	44
4.4.3	Análise Hierárquica por Agrupamentos (HCA).....	44
4.4.4	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	45
4.4.5	Estudo Reológico .....	45
4.4.6	Teste de Intumescimento.....	45
4.4.7	Citotoxicidade e Adesão Celular.....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	47
5.1	HIDROGÉIS FOTORETICULADOS.....	47
5.1.1	Síntese e Caracterização Espectroscópica.....	47
5.1.1.1	PVA modificado com grupos metacrilóíla.....	47
5.1.1.2	PVA modificado com grupos amina .....	51
5.1.1.3	Hidrogéis fotoreticulados .....	55
5.1.1.4	Hidrogéis funcionalizados com RGDS .....	57
5.1.2	Perfil de Intumescimento .....	60
5.1.3	Propriedades Reológicas .....	64
5.1.3.1	Efeito do teor de agente reticulante.....	64
5.1.3.2	Efeito da concentração do PVA .....	68
5.1.3.3	Efeito da massa molecular do PVA.....	72
5.1.4	Propriedades Térmicas .....	73
5.1.4.1	Efeito da funcionalização com RGDS .....	73
5.1.4.2	Efeito do teor de agente reticulante.....	75
5.1.5	Citotoxicidade e Adesão Celular.....	76
5.2	HIDROGÉIS RETICULADOS QUIMICAMENTE.....	78
5.2.1	Síntese e Caracterização Espectroscópica.....	78



5.2.1.1 PVA modificado com grupos amina .....	78
5.2.1.2 Hidrogéis reticulados com ácido cítrico.....	80
5.2.1.3 Hidrogéis reticulados com BTCA: .....	82
5.2.1.3 Hidrogéis reticulados quimicamente e funcionalizados .....	83
5.2.2 Perfil de Intumescimento .....	83
5.2.3 Propriedades Térmicas.....	86
6 CONCLUSÕES .....	86
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	87
8 ANEXOS.....	97

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aplicação de alguns hidrogéis na área da saúde.....	02
Figura 2: Necessidade estimada e número de transplantes realizados no Brasil em 2013. .....	03
Figura 3: Número absoluto anual de transplantes. ....	03
Figura 4: Principais áreas de pesquisa sobre hidrogéis. ....	07
Figura 5: Classificação dos Hidrogéis .....	08
Figura 6: Métodos para a formação de um complexo coacervado .....	10
Figura 7: Reticulação por interação iônica entre os grupos aniônicos do alginato (COO <sup>-</sup> ) com íons metálicos divalentes (Ca <sup>+2</sup> ). ....	10
Figura 8: Formação da rede do hidrogel devido à ligação de hidrogênio intermolecular na CMC em pH baixo.....	11
Figura 9: Representação de agregação de cadeias poliméricas por cristalização.....	11
Figura 10: Esquema de métodos para a formação de ligações cruzadas em hidrogéis por reação de condensação de reagentes multifuncionais.....	12
Figura 11: Reticulação de polímero contendo grupos hidroxilas com glutaraldeído em meio ácido .....	13
Figura 12: Fotopolimerização de monômeros vinílicos .....	17
Figura 13: Fotoreticulação de macrômeros contendo grupos vinílicos.....	17
Figura 14: Estruturas químicas dos fotoiniciadores: (a) Irgacure®184 (b) Irgacure®651 e (c) Irgacure®2959.....	17
Figura 15: Geração de radicais reativos por fotodegradação do Irgacure®184. ....	18
Figura 16: Geração de radicais reativos por fotodegradação do Irgacure®651. ....	18
Figura 17: Geração de radicais reativos por fotodegradação do Irgacure®2959. ....	18
Figura 18: Forças presentes em hidrogéis intumescidos .....	20
Figura 19: Cinética de intumescimento em hidrogéis .....	21
Figura 20: Propriedades de intumescimento e composição de hidrogéis.....	22
Figura 21: Relação entre densidade de reticulação e propriedades do hidrogel.....	22
Figura 22: Reações de obtenção do poli (álcool) vinílico. ....	26
Figura 23: Reação de degradação do PVA.....	27
Figura 24: Representação esquemática da adesão entre o polímero funcionalizado com RGD e a MEC, mediada pelas integrinas .....	30
Figura 25: Estrutura molecular do peptídeo RGD.....	32

Figura 26: Reação do peptídeo RGD com polímeros contendo: (a) grupos carboxila e (b) grupos amina.....	33
Figura 27: Identificação dos produtos obtidos nas reações de modificação, fotoreticulação e funcionalização do PVA.....	35
Figura 28: Reação de obtenção do PVA modificado com grupo metacrilóila.....	36
Figura 29: Reação de obtenção do PVA modificado com grupos amina.....	36
Figura 30: Reação de obtenção dos hidrogéis fotoreticulados.....	37
Figura 31: Reação de obtenção dos hidrogéis fotoreticulados funcionalizados com RGDS.....	38
Figura 32: Identificação dos produtos obtidos na reação de modificação, reticulação química e funcionalização do PVA.....	38
Figura 33: Reação de obtenção do PVA modificado com grupos amina.....	40
Figura 34: Reação de obtenção dos hidrogéis reticulados com ácido cítrico.....	41
Figura 35: Reação de obtenção dos hidrogéis reticulados com BTCA.....	41
Figura 36: Reação de obtenção dos hidrogéis reticulados com ácido cítrico funcionalizados com RGDS.....	42
Figura 37: Reação de obtenção dos hidrogéis reticulados com BTCA funcionalizados com RGDS.....	42
Figura 38: Análises utilizadas para caracterizar os hidrogéis fotoreticulados.....	43
Figura 39: Análises utilizadas para caracterizar os hidrogéis reticulados quimicamente.....	44
Figura 40: Espectros na região do infravermelho para: (a) PVA, (b) polímero modificado obtido (10) e (c) reagente de modificação (2-ICEMA).....	48
Figura 41: Espectros na região entre 3800-2900 $\text{cm}^{-1}$ do infravermelho, em absorbância, para o polímero puro (PVA) e os polímeros modificados obtidos (1, 2, 5 e 10).....	49
Figura 42: Espectro de RMN- $^1\text{H}$ do polímero modificado 10 em $\text{D}_2\text{O}$ .....	50
Figura 43: Espectros na região do infravermelho para: (a) PVA, (b) polímero modificado obtido (10A) e (c) reagente de modificação (4-ABA).....	52
Figura 44: Espectros na região entre 3800-3000 $\text{cm}^{-1}$ do infravermelho, em absorbância, (a) 1 e 1A; (b) 2 e 2A; (c) 5 e 5A; (d) 10 e 10A.....	53
Figura 45: Espectro de RMN- $^1\text{H}$ do polímero modificado 10A em $\text{D}_2\text{O}$ .....	54
Figura 46: Espectro na região do infravermelho para: (a) o polímero modificado 10A, (b) o polímero reticulado 10B.....	56
Figura 47: Espectro de RMN- $^1\text{H}$ do polímero reticulado 10B em $\text{D}_2\text{O}$ .....	57

Figura 48: Espectro na região do infravermelho para: (a) o polímero reticulado 10B, (b) o polímero reticulado e funcionalizado 10C. ....	58
Figura 49: Dendrograma dos hidrogéis sem RGDS (1B, 2B e 10B) e dos hidrogéis com RGDS (1C, 2C e 10C). ....	60
Figura 50: Perfil de intumescimento para: (a) 1C, (b) 2C, (c) 5C e (d) 10C na concentração de 3% m/v. ....	61
Figura 51: Perfil de intumescimento para: os hidrogéis (a) 1C, (b) 2C, (c) 5C e (d) 10C na concentração de 2% m/v. ....	62
Figura 52: Grau de intumescimento após 48 horas para os hidrogéis 1C, 2C, 5C e 10C nas concentrações de 2 e 3% m/v. ....	64
Figura 53: Símbolos fechados ( $G'$ ) e símbolos abertos ( $G''$ ) para os hidrogéis : (a) 1C (b) 2C (c) 5C e (d) 10C na concentração de 3% m/v. ....	65
Figura 54: Módulo de Armazenamento e Perda no intervalo de baixas frequências para os hidrogéis na concentração de 3% m/v com diferentes teores de agente reticulante. .	66
Figura 55: Símbolos fechados ( $G'$ ) e símbolos abertos ( $G''$ ) para os hidrogéis : (a) 1C (b) 2C (c) 5C e (d) 10C na concentração de 2% m/v. ....	67
Figura 56: Módulo de Armazenamento e Perda no intervalo de baixas frequências para os hidrogéis na concentração de 2% m/v com diferentes teores de agente reticulante. .	68
Figura 57: Módulo de Armazenamento e Perda no intervalo de baixas frequências para os hidrogéis 1C nas concentrações de 2 e 3% m/v. ....	69
Figura 58: Módulo de Armazenamento e Perda no intervalo de baixas frequências para os hidrogéis 2C nas concentrações de 2 e 3% m/v. ....	69
Figura 59: Módulo de Armazenamento e Perda no intervalo de baixas frequências para os hidrogéis 5C nas concentrações de 2 e 3% m/v. ....	71
Figura 60: Módulo de Armazenamento e Perda no intervalo de baixas frequências para os hidrogéis 10C nas concentrações de 2 e 3% m/v. ....	72
Figura 61: Módulo de Armazenamento e Perda no intervalo de baixas frequências para os hidrogéis 5C na concentração de 3% m/v. PVA-1: 31.000-50.000 Da e PVA-2: 85.000-124.000 Da. ....	73
Figura 62: Termograma de DSC para o hidrogel não funcionalizado (10B) em preto e para o hidrogel funcionalizado (10C) em vermelho. ....	75
Figura 63: Termograma de DSC para os hidrogéis não funcionalizados 5B (em preto) e 10B (em vermelho). ....	76
Figura 64: Microscopia óptica com aumento de 400 vezes do hidrogel 1B. ....	76

Figura 65: Microscopia óptica com aumento de 400 vezes do hidrogel 1C.....	78
Figura 66: Espectro na região do infravermelho para: (a) PVA, (b) PVA-a e (c) 4-ABA. .....	79
Figura 67: Espectro de RMN- <sup>1</sup> H do PVA modificado com grupos amina (PVA-a) em D <sub>2</sub> O.....	80
Figura 68: Espectro na região do infravermelho para: (a) PVA-a, (b) PVA-b e (c) ácido cítrico.....	81
Figura 69: Espectro na região do infravermelho entre 1500-2000 cm <sup>-1</sup> para o PVA-a em preto e para o PVA-b (em vermelho). ....	81
Figura 70: Espectro na região do infravermelho para: (a) PVA-a, (b) PVA-d e (c) BTCA. ....	82
Figura 71: Espectro na região do infravermelho entre 1500-2000 cm <sup>-1</sup> para o PVA-a em preto e para o PVA-d (em vermelho). ....	82
Figura 72: Termograma de DSC para o PVA-b (em preto) e para o PVA-c (em vermelho).....	84
Figura 73: Termograma de DSC para o PVA-d (em preto) e para o PVA-e (em vermelho).....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação das bandas do PVA obtidas por espectrofotometria de infravermelho. .....	47
Tabela 2: Grau de substituição para a reação de modificação 1 do PVA e número de reticulações por cadeia para os polímeros modificados 1, 2, 5 e 10.....	51
Tabela 3: Grau de substituição para a reação de modificação 2 do PVA.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABTO	Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
ATR	Reflectância Total Atenuada
BTCA	Ácido butano 1,2,3,4-tetracarboxílico
CDI	carbonil diimidazola
células A549	adenocarcinoma humano de células epiteliais basais alveolares
células HeLa	Célula hela. Linha de células imortais
cm <sup>2</sup>	Unidade de área
CMC	Carboximetil celulose
D <sub>2</sub> O	Óxido de Deutério ou Água Deuterada
Da	Dalton
DCC	diciclo-hexilcarbodiimida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTBMP	2-6-di-tert-butil-4-metilfenol
EDC	hidrocloro de <i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N</i> '-etilcarbodiimida
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
G'	Módulo de Armazenamento ou Módulo Elástico
G''	Módulo de Perda ou Módulo Viscoso
GAP	espaçamento entre as placas do reômetro
GHK	glicil-L-histidil-L-lisina
GRGDSP	glicina-arginina-glicina-aspartato-serina-prolina ou gly-arg-gly asp-ser-pro
GS	Grau de substituição
GS <sub>1</sub>	Grau de substituição da reação de modificação 1
GS <sub>2</sub>	Grau de substituição da reação de modificação 2
h	Horas
Hz	Unidade de frequência
HCA	análise de Grupamentos Hierárquicos
HCl	Ácido Clorídrico
Irgacure <sup>®</sup> 2959	2-hidroxi-4'-(2-hidroxi-2-oxo-1-propil)-2-metilpropilfenona
Irgacure <sup>®</sup> 184	1-hidroxi-ciclo-hexil-fenil-cetona

Irgacure <sup>®</sup> 651	2,2-dimetoxi-1,2-difeniletanona
Ivalon <sup>®</sup>	poli (álcool vinílico) comercial
LSCT	<i>Lower critical solution temperature</i>
mg	10 <sup>-3</sup> gramas
min	Minutos
mm	10 <sup>-3</sup> metros
m/v	massa/volume
mW	10 <sup>-3</sup> Watts
mol·L <sup>-1</sup>	Unidade de Concentração Molar
M <sub>c</sub>	Massa Molecular entre Reticulações
MEC	Matriz Extracelular
MES	ácido 2-morfolinoetanosulfônico
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MM	Massa Molecular
MWCO	Massa Molecular de Corte
NaOH	Hidróxido de sódio
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NHS	N-hidroxisuccinimida
NH <sub>4</sub> OH	Hidróxido de amônio
PAAm	Poliacrilamida
PBMA	Poli (metacrilato de butila)
PCA	Análise de Componentes Principais
PEG	poli (etileno glicol)
PEG-PET	Poli (etileno glicol)-poli (etileno tereftalato)
PEG-PPG	Poli (etileno glicol)-poli (propileno glicol)
PEO	Poli (óxido de etileno)
pH	Potencial de hidrogênio
pHEMA	Poli (metacrilato de hidroxietila)
PI	elétrons $\pi$ -conjugados do fotoiniciador
PI*	orbital de mais alta energia do fotoiniciador
pK <sub>a</sub>	Constante de acidez
PLA-g-PEG	Poli (álcool vinílico) graftizado com Poli (etileno glicol)
PMAA	Poli (ácido metacrílico)
PMMA	Poli (metacrilato de metila)



PNIPAAm	Poli (N-isopropil acrilamida)
PNVP	Poli (N-vilnil pirrolidona)
ppm	Parte por milhão
PVA	Poli (álcool vinílico) ou álcool polivinílico
RGD	arginina-glicina-aspartato ou arg-gly-asp
RGDS	arginina-glicina-aspartato-serina ou arg-gly-asp-ser
RMN- <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Segundos
S	Serina ou ser
SDA	<i>Stepwise discriminant analysis</i>
semi-IPN	Redes semi-interpenetradas
sulfo-NHS	sulfo <i>N</i> -hidroxisuccinimida
T <sub>g</sub>	Temperatura de transição vítrea
T <sub>m</sub>	Temperatura de fusão
UCST	<i>Upper critical solution temperature</i>
UR	Unidade repetitiva
W	Unidade de Potência
2-ICEMA	metacrilato de 2-isocianato de etila
4-ABA	4,4-dietoxibutilamina
<i>hν</i>	radiação eletromagnética
μg	10 <sup>-6</sup> gramas
μseg	10 <sup>-6</sup> segundos
[I•]	radicais
[I <sup>+</sup> /I <sup>-</sup> ]	íons
α	alfa
β	beta
ξ	dimensão na malha
°C	Graus Celsius
°C min <sup>-1</sup>	Taxa de aquecimento

## RESUMO

Este trabalho apresenta a síntese, a caracterização e o estudo reológico de hidrogéis de poli (álcool vinílico) funcionalizados. A partir da fotoreticulação de soluções de PVA modificado foi possível obter novos hidrogéis. O estudo de intumescimento mostra que, o grau de modificação do PVA pela inserção de grupos metacrilóila altera a absorção de água dos hidrogéis. Foi observado um maior intumescimento para menores graus de modificação do PVA, mostrando assim que a densidade de reticulação é inversamente proporcional à quantidade de água absorvida pelo hidrogel. Os resultados de reologia mostram que hidrogéis com maiores graus de modificação apresentam maiores módulos de armazenamento e perda. O valor do módulo de armazenamento apresentou-se acima do valor do módulo de perda em todos os hidrogéis, evidenciando o comportamento elástico dos hidrogéis sintetizados. Os resultados obtidos no intumescimento dos hidrogéis de PVA reticulados com ácido cítrico e BTCA mostram que a densidade de reticulação desses hidrogéis é bastante baixa.

## ABSTRACT

This work presents the synthesis, characterization and rheological study of poly (vinyl alcohol) functionalized hydrogels. Starting from the photocrosslinking modified PVA solutions were obtained new hydrogels. The swelling study showed that the modification degree of the PVA by insertion of methacryloyl groups changed the water absorption of hydrogels. It was observed higher swelling for smaller modification degree of the PVA, thus indicating the crosslinking density is inversely proportional to the amount of water absorbed by the hydrogel. The rheological results showed that of higher modification degree in the hydrogels showed higher storage and loss modulus. The value of the storage modulus was showed above to the value of loss modulus at all hydrogels, showing the elastic behavior of the synthesized hydrogels. The results of the swelling degree of PVA hydrogels crosslinked with citric acid and BTCA showed that the crosslink density of these hydrogels was quite low.

# 1 INTRODUÇÃO

Uma das definições mais amplamente empregadas para biomaterial é aquela dada pelo Instituto Nacional Americano de Saúde a qual descreve o biomaterial como *“qualquer substância ou combinação de substâncias, com exceção dos medicamentos, sintéticos ou de origem natural, o qual pode ser utilizado durante qualquer período de tempo, que aumente ou substitua parcialmente ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo, a fim de manter ou melhorar a qualidade de vida do indivíduo”*<sup>1</sup>.

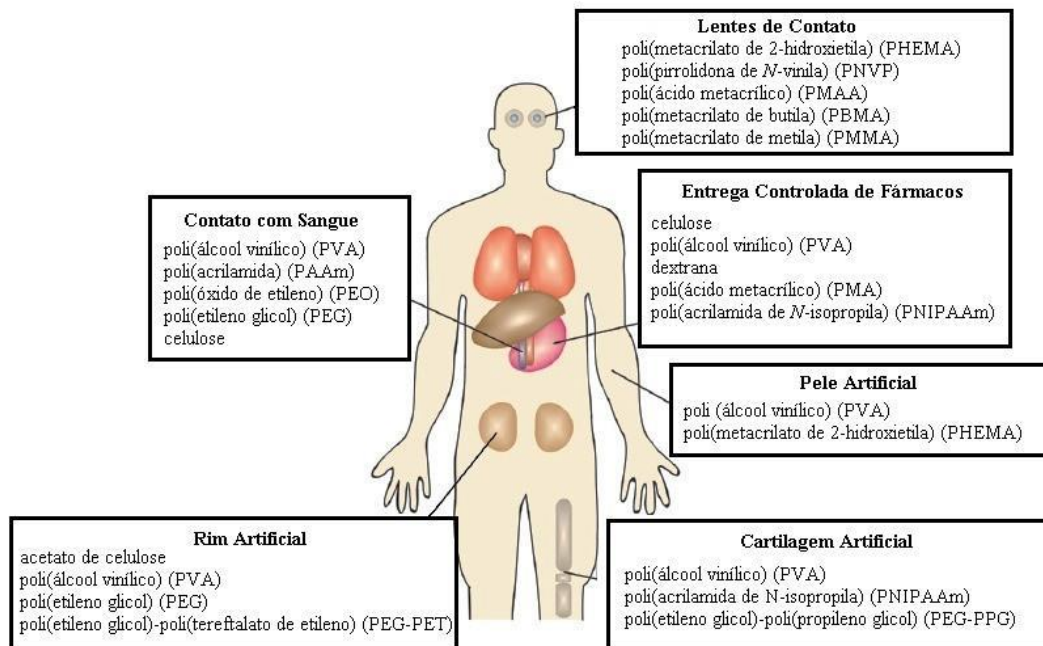
Os biomateriais criaram uma interface entre a química, ciência dos materiais, engenharia mecânica, biologia e medicina. Esse campo multidisciplinar tem passado por um crescimento considerável desde o seu início, além da introdução constante de novas ideias e tecnologias. Alguns exemplos de avanços significativos na área de biomateriais podem ser vislumbradas na área de liberação controlada de fármacos e na engenharia de tecidos<sup>2</sup>.

Veículos de entrega de fármacos, plataformas de cultura de células e *scaffolds* (arcabouços) com resposta (bioresponsivos) utilizam redes de polímeros hidrofílicos, ou hidrogéis. Os hidrogéis são polímeros com ligações cruzadas, que absorvem extensivamente água ou fluídos biológicos mantendo sua estrutura tridimensional<sup>3</sup>. O desenvolvimento de lentes de contato foi a primeira aplicação dos hidrogéis como biomaterial.. Em 1936, o optometrista Willian Feinbloom introduziu as primeiras lentes de plástico, o que deu início a primeira geração de biomateriais<sup>4</sup>.

Após a Segunda Guerra Mundial, novos metais, cerâmicas e materiais poliméricos estavam disponíveis, e os cirurgiões começaram a implantar biomateriais precoces, tais como o Teflon<sup>®</sup>, nylon, polímeros de metacrilato, aço inoxidável e ligas a base de titânio em procedimentos de alto risco. Estes materiais foram selecionados com o objetivo de alcançar as propriedades mecânicas adequadas e toxicidade mínima, porque os materiais ainda não tinham sido projetados especificamente para aplicações biomédicas.

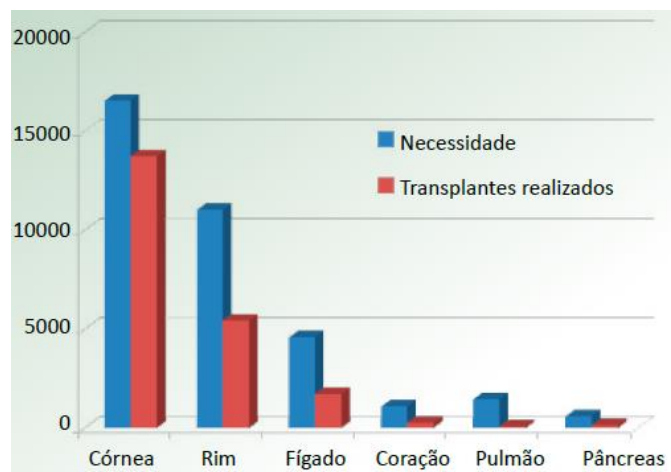
O primeiro hidrogel sintetizado especificamente para aplicações biomédicas foi o poli (metacrilato de 2-hidroxietila) (pHEMA), em 1960, e foi rapidamente incorporado e patenteado para lentes de contato gelatinosas. Desde então os hidrogéis evoluíram de materiais bioinertes estáticos para microambientes bioativos, que podem ser utilizados para dirigir respostas biológicas específicas, tais como o crescimento

celular, cicatrização de feridas ou entrega de agentes terapêuticos<sup>1-3</sup>. A Figura 1 ilustra as aplicações de hidrogéis na área da saúde.

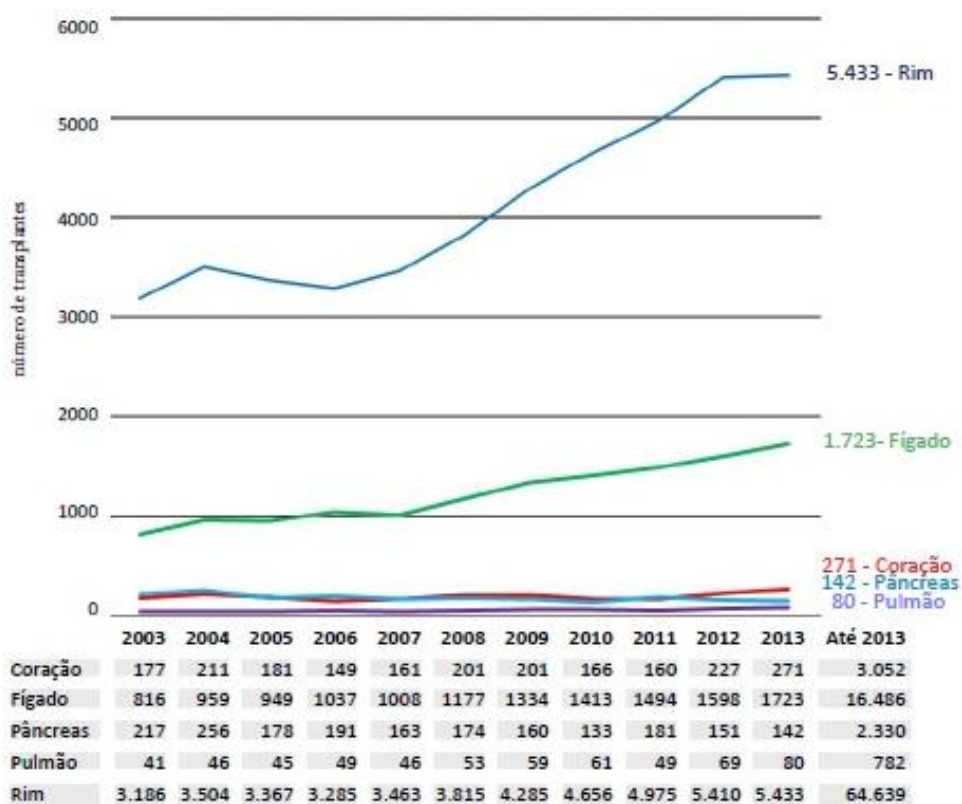


**Figura 1:** Aplicação de alguns hidrogéis na área da saúde. Estes exemplos abrangem hidrogéis que foram empregados para atender às necessidades clínicas. Figura adaptada<sup>3</sup>.

O uso de hidrogéis na engenharia de tecidos, mais especificamente na regeneração de tecidos e órgãos, é uma opção para o transplante de órgãos. Segundo dados da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO), ocorreu um crescimento no número de transplantes, mas ainda não atende a demanda prevista pela população brasileira. Esses números podem ser visualizados nas Figuras 2 e 3.



**Figura 2:** Necessidade estimada e número de transplantes realizados no Brasil em 2013<sup>5</sup>.



**Figura 3:** Número absoluto anual de transplantes<sup>5</sup>.

Como observado na Figura 1, o hidrogel de PVA é empregado em diversas aplicações para órgãos e tecidos do corpo humano, porém o PVA não possui propriedades de adesão celular, o que é um pré-requisito na engenharia tecidual para

que seja possível o crescimento e proliferação de células e, posterior regeneração do tecido. Uma das maneiras mais eficazes de introduzir propriedades de adesão celular é a incorporação de peptídeos funcionais em cadeias poliméricas<sup>6-10</sup>. A menor sequência peptídica conhecida por ser capaz de interagir com componentes da matriz extracelular e promover adesão celular é a sequência arginina-glicina-aspartato (RGD)<sup>11</sup>.

Levando em consideração as propriedades dos hidrogéis e sua aplicação como biomaterial, juntamente com a possibilidade de modificação química do PVA, esta dissertação visa o desenvolvimento de hidrogéis de poli (álcool vinílico) funcionalizados com a sequência tetrapeptídica arginina-glicina-aspartato-serina (RGDS) para aplicação em engenharia tecidual.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar e caracterizar hidrogéis de poli (álcool vinílico) funcionalizados com a sequência tetrapeptídica RGDS visando sua aplicação como biomaterial.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar hidrogéis a partir do poli(álcool) vinílico modificado com grupos laterais amina através da reação de fotoreticulação;
- Sintetizar hidrogéis a partir do poli(álcool vinílico) modificado com grupos laterais amina através de reticulação química com dois tipos de agentes reticulantes: ácido cítrico e o ácido butano 1,2,3,4,-tetracarboxílico;
- Funcionalizar os hidrogéis obtidos tanto através da fotoreticulação, quanto os hidrogéis obtidos por reticulação química, com a sequência tetrapeptídica RGDS;
- Caracterizar os hidrogéis obtidos por ambos os métodos: fotoreticulação e reticulação química através das técnicas de espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-<sup>1</sup>H) e análise de Grupamentos Hierárquicos (HCA);
- Avaliar a capacidade de absorção de água dos hidrogéis fotoreticulados e reticulados quimicamente através de testes de intumescimento;
- Avaliar o comportamento reológico dos hidrogéis fotoreticulados através de experimentos oscilatórios sob tensão controlada;
- Avaliar a estabilidade térmica dos hidrogéis fotoreticulados e reticulados quimicamente através da técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC);
- Avaliar a citotoxicidade e adesão celular dos hidrogéis fotoreticulados e reticulados quimicamente contendo a sequência peptídica RGDS em células do complexo *cumulus oophorus*;



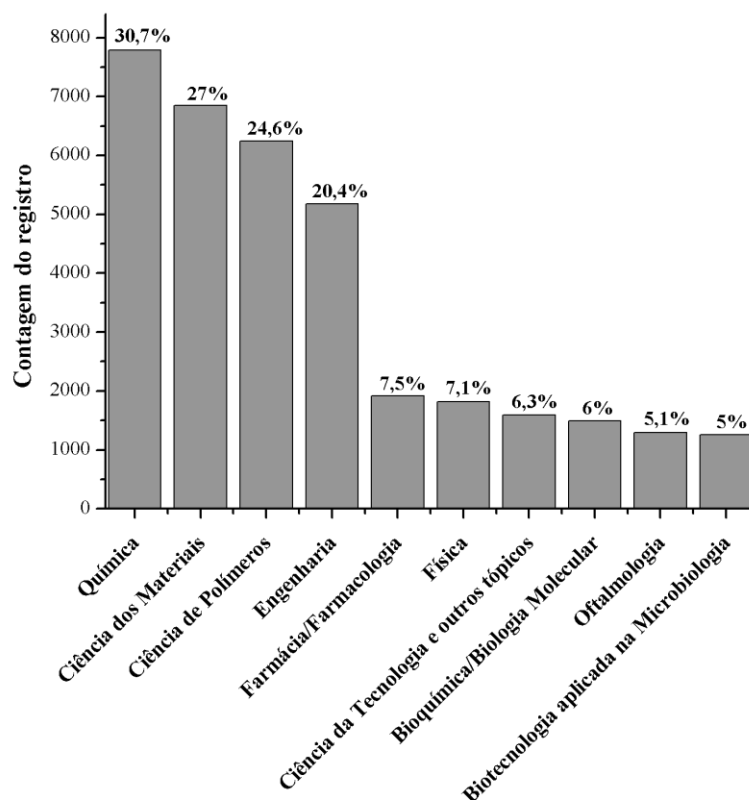
## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 HIDROGÉIS

Hidrogéis são redes tridimensionais formadas a partir de homopolímeros, copolímeros ou macrômeros reticulados que exibem a habilidade de reter uma grande quantidade de água sem alterar sua estabilidade dimensional<sup>12-14</sup>. As propriedades dos hidrogéis são determinadas pela natureza da cadeia polimérica e a densidade de reticulação. Por exemplo, o caráter hidrofílico é devido à presença de grupos polares na cadeia principal ou lateral do polímero, como: -OH, -COOH, -CONH<sub>2</sub>, -CONH, -SO<sub>3</sub>H. Já a conservação da estabilidade dimensional em presença de água é garantida pela estrutura reticulada<sup>15</sup>.

Os hidrogéis abrangem diversas áreas de pesquisa tendo destaque a química e a ciência dos materiais (Figura 4). Além disso, podem ser encontrados em cosméticos<sup>16, 17</sup>, produtos de higiene pessoal<sup>3</sup> e na agricultura. Um exemplo da utilização dos hidrogéis é na agricultura, principalmente como reservatórios de água<sup>18, 19</sup> para otimização dos recursos hídricos na horticultura e também na liberação controlada de fertilizantes<sup>20</sup>, onde a exigência de biocompatibilidade não é exigida.

Os hidrogéis apresentam características únicas que os tornam atraentes na área médica. Em primeiro lugar, são biocompatíveis devido, principalmente, ao seu alto teor de água e semelhança estrutural com matrizes extracelulares naturais. Em segundo lugar, a natureza flexível dos hidrogéis minimiza irritações mecânicas e danos ao tecido circundante. E, em terceiro lugar, eles têm excelente permeabilidade para o transporte de nutrientes e metabólitos, o que favorece a sobrevivência e crescimento de células<sup>21, 22</sup>. A maior desvantagem é a baixa resistência mecânica. Isto pode ser superado pela reticulação<sup>23</sup>, formação de redes interpenetradas<sup>24</sup> ou por cristalização<sup>25</sup> que induzem um reforço na estrutura do hidrogel.



**Figura 4:** Principais áreas de pesquisa sobre hidrogéis. Fonte: Web of Science utilizando *hydrogel* como palavra-chave. \*98 valor (es) de áreas de pesquisa além das opções de exibição. 5 registros (0,020%) não contêm dados nos campos. % a partir de 25350 registros. Período entre 2005 a 2013.

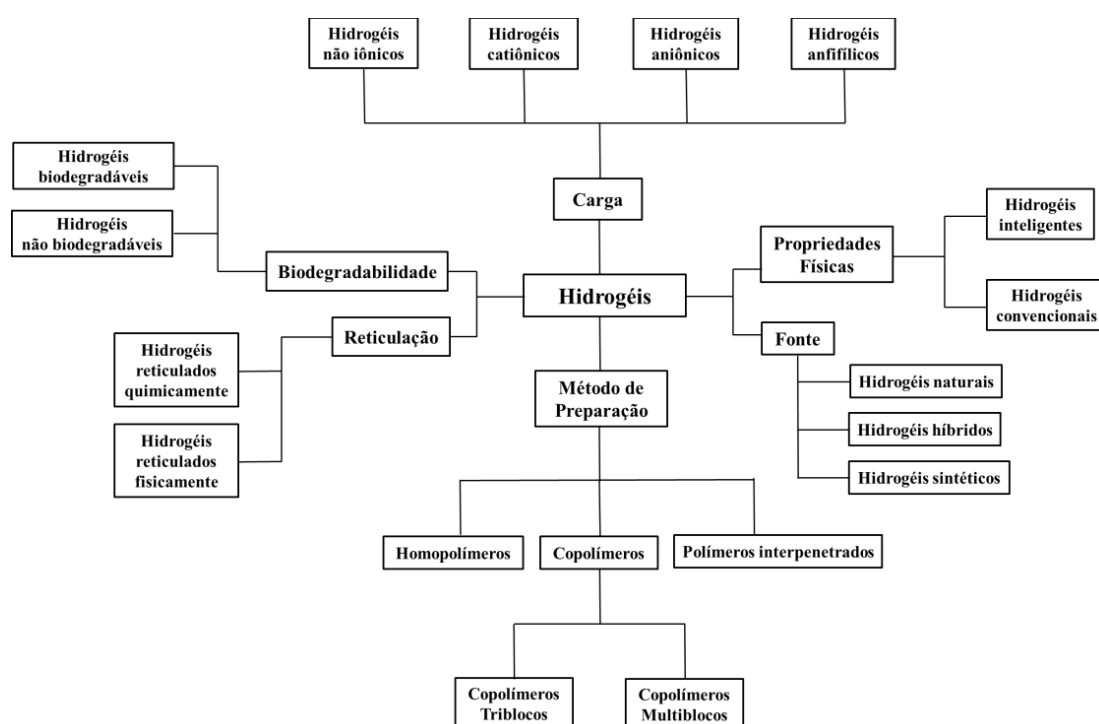
### 3.1.1 Classificação dos Hidrogéis

Os hidrogéis podem ser classificados de várias maneiras, dependendo do seu método de preparação, carga iônica, fontes, propriedades físicas (intumescimento), taxa de biodegradação ou a natureza da reticulação<sup>26</sup>. A Figura 5 apresenta uma classificação detalhada dos hidrogéis.

A variação de volume nos hidrogéis pode ser induzida pelo solvente, nessa classe se enquadram os hidrogéis convencionais. Porém, a variação de volume também pode ser produzida por mudanças no ambiente em que o hidrogel se encontra, como: temperatura<sup>27, 28</sup>, pH<sup>29, 30</sup>, campo elétrico<sup>31, 32</sup>, luz<sup>33</sup> entre outros. Os géis que possuem essa transição de fases em resposta a um estímulo externo são conhecidos como hidrogéis inteligentes<sup>34</sup>. Nesta categoria, os hidrogéis que mais tem chamado atenção para aplicação biomédica são aqueles com resposta ao pH e temperatura.

Hidrogéis que possuem grupos funcionais iônicos respondem ao pH do meio. O comportamento do intumescimento do hidrogel depende dos valores de  $pK_a$  de grupos

funcionais ácidos, por exemplo, ácido carboxílico e ácido sulfônico, ou de grupos básicos como sais de amônio. Esses grupos aceitam ou liberam prótons em resposta a mudança do pH do meio<sup>35</sup>. Kozlovskaya *et al.* em trabalho recente<sup>36</sup> sintetizaram um hidrogel com propriedades de resposta ao pH para a entrega de drogas específicas para o tratamento do câncer. O hidrogel contendo poli (ácido metacrílico), óxido de manganês mesoporoso e poli (N-vinilpirrolidona) liberou doxorubicina e o seu efeito anti-cancerígeno foi demonstrado pela diminuição significativa da viabilidade das células de cancro A549 e HeLa.



**Figura 5:** Classificação dos Hidrogéis<sup>34</sup>.

Os hidrogéis que apresentam variação no grau de expansão em função da temperatura são chamados de hidrogéis termossensíveis. Para se obter um gel que mude seu grau de expansão com a mudança de temperatura, um dos componentes do gel deve ser insolúvel, acima ou abaixo de determinada temperatura, ou seja, deve ser um sistema de solução de temperatura crítica inferior (LSCT – *lower critical solution temperature*) ou superior (UCST – *upper critical solution temperature*), respectivamente. Géis que possuem um comportamento LCST reduzem seu volume com o aumento da temperatura. Já os géis que se contraem com a redução da temperatura possuem um comportamento de sistema UCST<sup>37</sup>.

A aplicação mais estudada dos hidrogéis termossensíveis é na liberação controlada de drogas<sup>38</sup>, porém estes hidrogéis também são utilizados na área de engenharia de tecidos, um exemplo é o trabalho de Lin<sup>39</sup> e colaboradores, onde o hidrogel composto por PLA-g-PEG contendo hidroxiapatita apresenta características potenciais para ser aplicado em regeneração óssea.

### 3.1.2 Métodos de Reticulação

Conforme o método de reticulação empregado os hidrogéis podem ser classificados em dois grandes grupos: hidrogéis reticulados fisicamente e hidrogéis reticulados quimicamente.

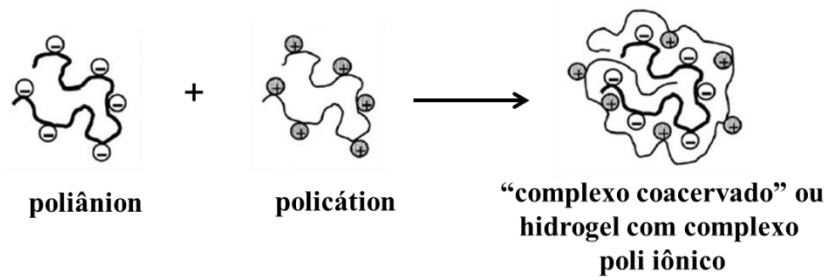
#### 3.1.2.1 Hidrogéis reticulados fisicamente

Hidrogéis físicos, também chamados de pseudo-hidrogéis, são redes tridimensionais contínuas e desordenadas formadas por forças associativas capazes de criar ligações cruzadas não covalentes. Estas ligações são formadas por interações fracas e podem ser reversíveis. As interações incluem ligações de hidrogênio, interação iônica, associação hidrofóbica ou segmento cristalino<sup>40, 41</sup>. Essas interações fazem com que as cadeias poliméricas associem-se e induzam a formação de uma estrutura estável pela formação de uma zona de junção. A estrutura formada na zona de junção não é covalentemente ligada, então a quebra da rede pode ocorrer devido a uma mudança no ambiente, como temperatura, pH ou adição de sais (fenômenos reversíveis)<sup>15</sup>.

A reticulação física possui a vantagem da reversibilidade e a ausência de reações químicas que podem ser potencialmente prejudiciais para a integridade de agentes bioativos incorporados ou células. Por outro lado a sua estabilidade *in vivo* pode ser afetada por interações com funções corpóreas, tanto fisiológicas quanto mecânicas. Por exemplo, em ossos e articulações esses hidrogéis podem apresentar resistência mecânica insuficiente<sup>42</sup>.

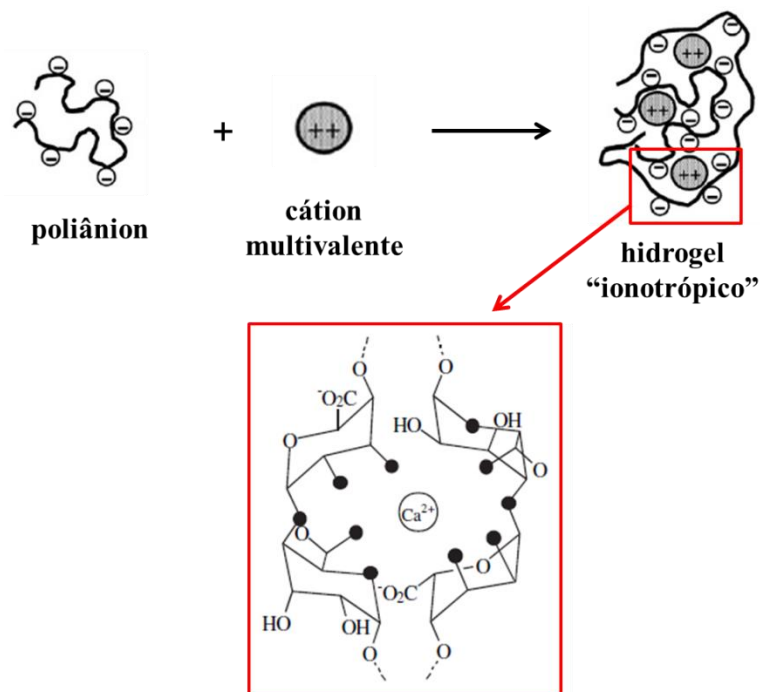
Vários métodos são descritos na literatura para obter hidrogéis reticulados fisicamente, dentre eles destaca-se:

- **Complexo coacervado:** são formados pela mistura de um polícatión com um poliânion. O princípio fundamental deste método é que os polímeros com cargas opostas se unem e formam complexos solúveis ou insolúveis, dependendo da concentração e pH das respectivas soluções<sup>43</sup> (Figura 6).



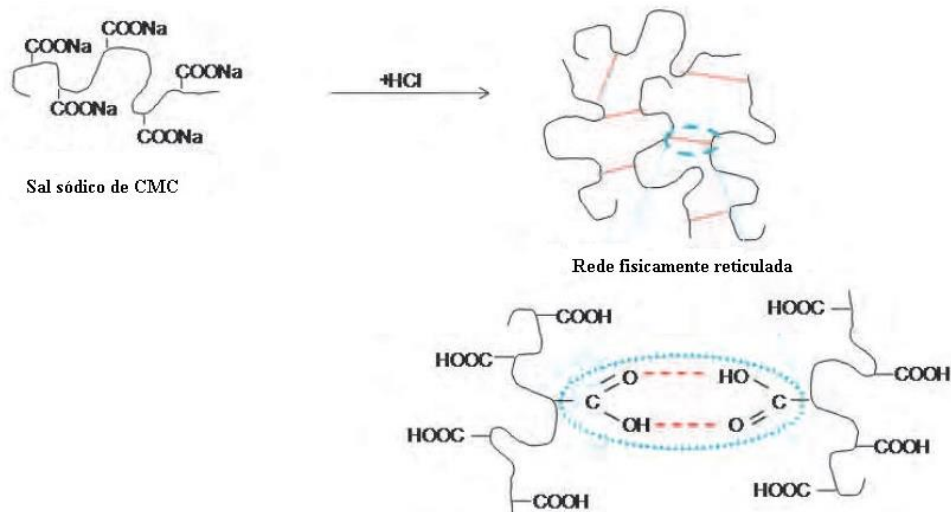
**Figura 6:** Métodos para a formação de um complexo coacervado. Figura adaptada<sup>41</sup>.

- **Interação iônica:** os polímeros iônicos podem ser reticulados pela adição de contra íons di ou trivalentes. Um exemplo é a reticulação do alginato com íons cálcio<sup>44</sup> (Figura 7).



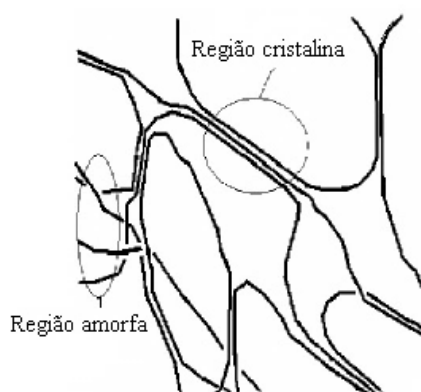
**Figura 7:** Reticulação por interação iônica entre os grupos aniônicos do alginato ( $\text{COO}^-$ ) com íons metálicos divalentes ( $\text{Ca}^{+2}$ ). Figura adaptada<sup>41, 44</sup>.

- **Ligações de Hidrogênio:** hidrogéis contendo ligações de hidrogênio podem ser obtidos reduzindo o pH da solução de polímeros que apresentam grupos carboxílicos. Um exemplo é a rede de carboximetil celulose (CMC) formada pela dispersão de CMC em solução aquosa 0,1M de HCl<sup>45</sup>. O mecanismo envolve a substituição do sódio presente na CMC, pelo hidrogênio da solução do ácido para promover a ligação de hidrogênio (Figura 8). As ligações de hidrogênio induzem uma diminuição na solubilidade da CMC o que resulta na formação de um hidrogel elástico.



**Figura 8:** Formação da rede do hidrogel devido à ligação de hidrogênio intermolecular na CMC em pH baixo. Figura adaptada<sup>45</sup>.

- **Ciclos de congelamento-descongelamento (*freeze-thawing*):** a reticulação física de um polímero para formar um hidrogel pode ser conseguida através de ciclos repetitivos de congelamento e descongelamento. O mecanismo envolve a formação de microcristais na estrutura do polímero (Figura 9). A microestrutura dos hidrogéis produzidos é fortemente regulada por parâmetros de processamento, ou seja, a composição, número de ciclos de congelamento e descongelamento e temperatura<sup>46</sup>.



**Figura 9:** Representação de agregação de cadeias poliméricas por cristalização<sup>46</sup>.

O hidrogel obtido por *freeze-thawing* mais estudado é o poli (álcool vinílico). Zhang e colaboradores<sup>47</sup> obtiveram hidrogéis de PVA auto-reparáveis na temperatura ambiente sem a necessidade de qualquer estímulo ou agente de cura. Millon e colaboradores<sup>48</sup> funcionalizaram o hidrogel de PVA obtido por *freeze-thawing* com fibronectina para

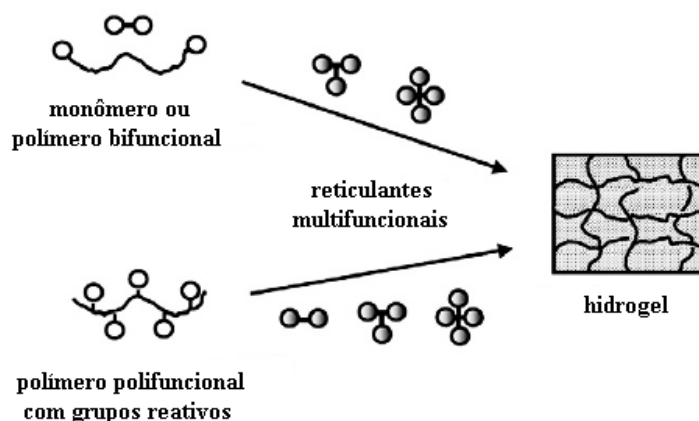
aplicação em tecido cardiovascular. Já Gupta<sup>49</sup> e colaboradores estudaram a influência da concentração do polímero para um dado número de ciclos de congelamento e descongelamento sobre a adesão celular em substrato de poli(álcool vinílico) e verificaram que a máxima fixação de células ocorreu em hidrogéis com propriedades mecânicas, cristalinidade e densidade de reticulação elevadas. Hidrogéis com essas características são obtidos com as maiores concentrações de PVA.

### 3.1.2.2 Hidrogéis reticulados quimicamente

Hidrogéis químicos, também chamados de hidrogéis permanentes, apresentam ligações covalentes entre as cadeias poliméricas. A reticulação química permite a formação de hidrogéis com resistência mecânica superior e estabilidade fisiológica controlável quando comparados com os hidrogéis preparados por reticulação física<sup>42, 50</sup>.

As ligações cruzadas nos hidrogéis químicos podem ser geradas através da adição de um agente reticulante, por radiação ou uso de enzimas.

- **Reticulação utilizando agentes reticulantes:** um agente reticulante é uma molécula de massa molecular muito menor que as cadeias poliméricas envolvidas e que deverá possuir pelo menos dois grupos funcionais reativos de modo a permitir a formação de “pontes” entre as cadeias poliméricas<sup>51</sup>. A Figura 10 mostra a formação de ligações cruzadas em hidrogéis pela reação de condensação com reticulantes multifuncionais.

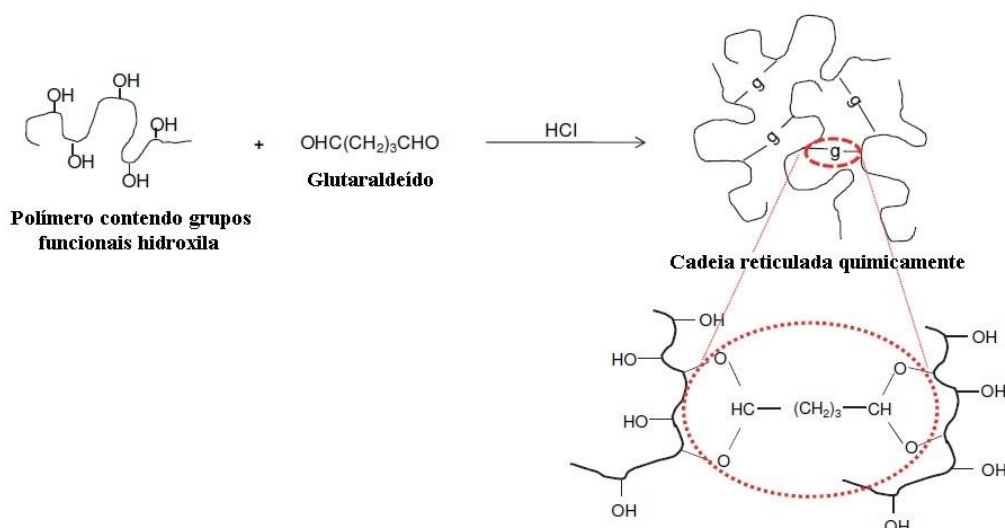


**Figura 10:** Esquema de métodos para a formação de ligações cruzadas em hidrogéis por reação de condensação de reagentes multifuncionais.

A reticulação de polímeros naturais ou sintéticos pode ser realizada através da reação dos seus grupos funcionais (tais como OH, COOH e NH<sub>2</sub>) com agentes de reticulação<sup>43</sup>. Exemplos incluem as reações entre: isocianatos e aminas ou álcoois, para

formar ligações uretânicas, amins ou tióis e grupos vinil para formar amins ou sulfitos por adições de Michael, amins e ésteres ativos tais como *N*-hidroxi-succinimida, para formar amidas, ácidos ou cloretos de ácidos e álcoois, para formar ésteres e aldeídos e amins para formar bases de Schiff, etc<sup>41</sup>.

O reticulante químico mais citado é o glutaraldeído (Figura 11) e o polímero com grupos hidroxila mais utilizado é o poli (álcool vinílico). Reinhart e Peppas<sup>52</sup> utilizaram glutaraldeído e formaldeído para reticular o PVA e estudar a influência da reticulação nas propriedades de difusão. Varshosaz e Koopaie<sup>53</sup> em 2002 utilizaram PVA e glutaraldeído para estudar o comportamento de intumescimento e de liberação de fármaco. Trabalhos mais recentes<sup>54,55,56</sup> também utilizam glutaraldeído como reticulante em sistemas biomédicos. A epiclorigrina também é um reticulante utilizado para formar estruturas reticuladas no PVA<sup>57</sup> e em outros polímeros, como xantana<sup>58</sup> e quitosana<sup>59</sup>.



**Figura 11:** Reticulação de polímero contendo grupos hidroxilas com glutaraldeído em meio ácido<sup>43</sup>.

Os hidrogéis reticulados com agentes químicos oferecem propriedades desejáveis, mas a biocompatibilidade de diversos agentes de ligação cruzada é desconhecida, enquanto que outros foram considerados relativamente tóxicos, como o glutaraldeído. Além disso, o destino de muitas destas moléculas no corpo não foi estabelecido. Para evitar quantidades de agentes reticulantes que não reagiram, os hidrogéis sintetizados devem ser submetidos a purificações antes da sua administração. Além disso, os agentes de reticulação podem reagir com a carga de hidrogel, desativando ou limitando a liberação terapêutica. No momento, a escolha de um agente



reticulante biocompatível é limitada, o que representa o principal inconveniente dos hidrogéis químicos<sup>21, 51, 60</sup>.

Um novo agente de reticulação que se mostrou biocompatível é a genipina. A genipina é obtida a partir da geniposide, um glicosídeo iridóide isolado dos frutos de *Genipa americana* e *Gardenia jasminoides Ellis* que se mostrou eficaz como agente de ligação cruzada em polímeros que apresentam grupos amina, por exemplo, a quitosana, e é muito menos citotóxico que o glutaraldeído<sup>60, 61</sup>.

Sistemas que utilizam ácido cítrico como agente reticulante também não apresentam toxicidade, uma vez que o ácido cítrico é um produto metabólico do corpo (ciclo de Krebs)<sup>62</sup>. Devido a sua atoxicidade o ácido cítrico é utilizado em aplicações médicas e farmacêuticas, como liberação de fármacos<sup>63</sup> e compostos iônicos<sup>64</sup>. Um exemplo destas aplicações é o trabalho de Taguchi e co-autores<sup>65</sup>, onde o ácido cítrico foi modificado para obter grupos ésteres ativos e assim ser possível a incorporação ao colágeno para obter um novo adesivo tecidual. Com o mesmo objetivo, obter um novo adesivo tecidual, Taguchi<sup>66</sup> desenvolveu géis de gelatina reticulados com ácido cítrico contendo grupos ésteres ativos.

Em outro trabalho<sup>67</sup> Taguchi e co-autores preparam géis de colágeno pH responsivos com reticulante a base de derivados de ácidos di ou tricarbóxicos (ácido cítrico e ácido málico). O gel preparado com ácido cítrico apresenta características potenciais para aplicação em sistemas de liberação de drogas e engenharia tecidual, já o gel preparado com ácido málico não apresentou grau de intumescimento relevante para ser aplicado como gel pH responsivo.

Hidrogéis reticulados com ácido cítrico também podem ser aplicados em áreas diferentes da biomédica, o trabalho de Demitri e colaboradores<sup>68</sup> é um exemplo, onde o hidrogel superabsorvente de celulose reticulado com ácido cítrico possui aplicação em produtos de cuidados pessoais, como fraldas e absorventes e também na agricultura como sistema para armazenamento de água e liberação controlada de fertilizantes. Outro exemplo é o trabalho de Gorgieva e Kokol<sup>69</sup>, onde o hidrogel termosensível de hidroxietilcelulose e carboximetilcelulose reticulado com ácido cítrico apresenta aplicação na área de tecidos inteligentes.

Outros ácidos carbóxicos polifuncionais também são utilizados como agentes reticulantes, embora se encontre poucos trabalhos na literatura. Seidel *et al.*<sup>70</sup> utilizou ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido malônico, ácido succínico, ácido glutárico e ácido adípico e avaliou a influência destes sobre a estrutura e propriedades

mecânicas de derivados de amido. O gel que apresentou maior módulo de armazenamento, e assim, propriedades mecânicas superiores foi o gel reticulado com ácido cítrico.

Levando em consideração o resultado do trabalho de Seidel e a existência de poucos trabalhos utilizando ácido cítrico para reticular hidrogéis preparados a partir de polímeros sintéticos optou-se em utilizar neste trabalho o ácido cítrico como agente de ligação das cadeias do PVA. Outro poliácido também foi utilizado como agente reticulante, o ácido butano 1,2,3,4-tetracarboxílico (BTCA).

O BTCA é utilizado principalmente para reticular o algodão. Em trabalho utilizando o BTCA e o ácido cítrico como reticulantes da mistura de algodão e quitosana, Hsieh produziu estruturas capazes de absorver metais tóxicos presentes em processos industriais<sup>71</sup>. Já Orhan utilizou BTCA e ácido cítrico juntamente com triclosano para criar atividade antibacteriana no algodão<sup>72</sup>. Zhou<sup>73</sup> utilizou o BTCA para incorporar PVA ao algodão e assim melhorar a resistência à abrasão do tecido.

Em 1989 o BTCA foi indicado para testes de carcinogenicidade com prioridade moderada a alta pelo *National Cancer Institute (NCI)*. Este composto foi nomeado devido ao aumento da sua potencial utilização como um substituto para reticulantes a base de formaldeído na indústria têxtil. A nomeação foi levada ao conhecimento do NCI em 1988 pelo *National Cotton Council of America and the U.S. Department of Agriculture*<sup>74, 75</sup>. Porém, não foram encontrados dados sobre a disposição química, aguda, pré-crônica, crônica/cancerígenas e efeitos reprodutivos ou teratogênicos do BTCA em humanos<sup>75</sup>.

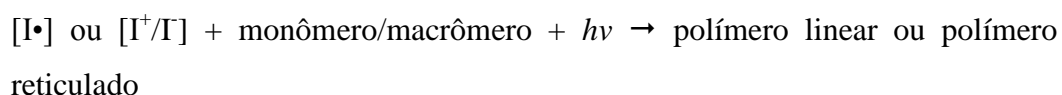
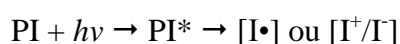
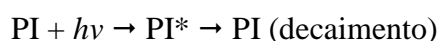
Um exemplo de aplicação do BTCA como reticulante para materiais na área médica é o trabalho de Çay e Miraftab<sup>76</sup>. Eles sintetizaram hidrogéis de PVA contendo nanofibras por *electrospinning* que possuem aplicação como curativos. O BTCA foi escolhido para ser utilizado neste trabalho devido a dois fatos: ser um reticulante não tóxico e pela existência de apenas um trabalho utilizando esse reticulante para materiais com aplicação na área biomédica.

- **Reticulação utilizando radiação:** a reticulação por radiação é uma técnica amplamente utilizada, uma vez que não envolve a utilização de agentes reticulantes químicos que muitas vezes são tóxicos, assim a biocompatibilidade do polímero é mantida. Antes de falar sobre o processo de reticulação é necessário distinguir os conceitos de fotopolimerização, fotoreticulação e fotoenxeria.

Fotopolimerização refere-se à polimerização de pequenos monômeros ou oligômeros polimerizáveis via métodos fotoreativos para produzir estruturas macromoleculares lineares. Fotoreticulação é o processo no qual os grupos funcionais de um macrômero linear ou ramificado se cruzam para formar uma rede tridimensional. Em termos gerais, fotopolimerização descreve tanto polimerização linear quanto fotoreticulação.

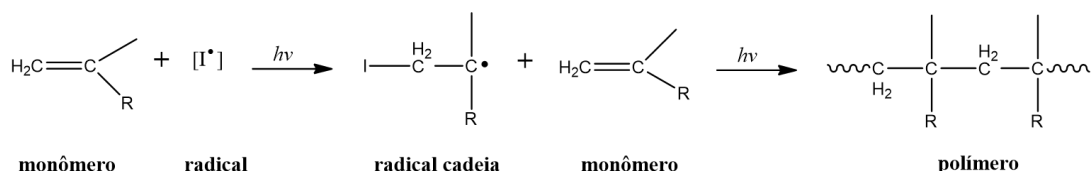
Já a fotoenxertia descreve o procedimento de incorporação covalente de moléculas a uma matriz polimérica ou superfície utilizando um mecanismo induzido por luz. Fotoenxertia é uma modalidade importante para a modificação de superfícies de biomateriais<sup>77</sup>.

A fotopolimerização requer três elementos essenciais: radiação eletromagnética ( $h\nu$ ), fotoiniciador e monômero ou macrômero contendo insaturações<sup>78</sup>. O sucesso da fotopolimerização depende da efetividade da iniciação e propagação. Os fótons irradiados com frequência adequada são absorvidos pelos elétrons  $\pi$ -conjugados do fotoiniciador (PI) que são simultaneamente promovidos para um orbital de mais alta energia (PI\*). Esse estado quântico excitado possui uma meia vida inferior a microssegundos ( $\mu\text{seg}$ ). Eles rapidamente decaem ao seu estado original induzindo emissão de luz. Muitos PI\* também podem se decompor quimicamente em fragmentos reativos, como radicais [I•] ou íons [I<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>]. Como intermediários reativos esses fragmentos são mais estáveis e podem iniciar polimerizações radicalares ou aniônica/catiônica<sup>77</sup> (Eq.1).

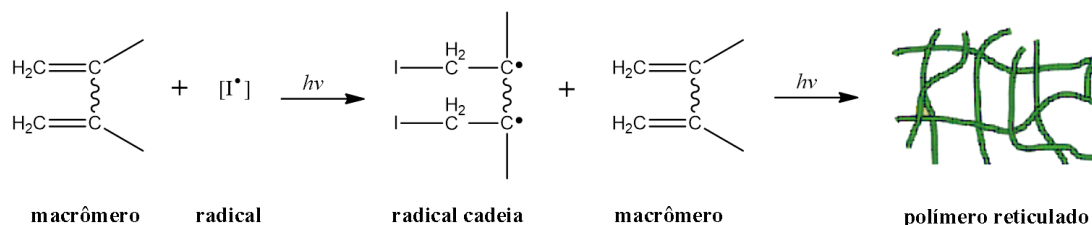


**Equação 1:** Excitação de fotoiniciadores e processo de fotopolimerização.

Para muitas aplicações médicas o mecanismo por radicais livres é o utilizado para iniciar a polimerização de monômeros ou macrômeros contendo grupos vinila<sup>79</sup> (Figura 12 e Figura 13).



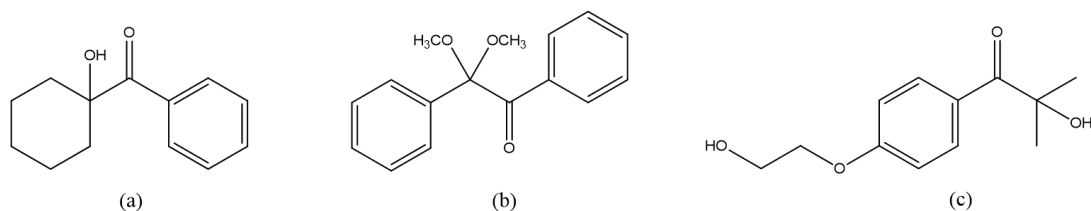
**Figura 12:** Fotopolimerização de monômeros vinílicos<sup>77</sup>.



**Figura 13:** Fotoreticulação de macrômeros contendo grupos vinílicos<sup>77</sup>.

Muitas vezes o polímero não apresenta grupos susceptíveis à fotopolimerização em sua estrutura original, sendo necessário realizar reações de modificação. A reação mais utilizada para essa finalidade é a incorporação de moléculas vinílicas. Um exemplo é o trabalho de Martens e Anseth<sup>80</sup>, onde o PVA foi modificado com grupos acrilato para após fotoreticular a estrutura. Já Sun e colaboradores<sup>81</sup> utilizaram anidrido metacrílico para incorporar ao alginato de sódio grupos susceptíveis à fotoreticulação.

Além da efetividade do fotoiniciador em gerar espécies ativas outros fatores devem ser considerados na sua escolha, tais como: solubilidade em água, biocompatibilidade, estabilidade e citotoxicidade. Willians e colaboradores<sup>82</sup> avaliaram a compatibilidade biológica dos fotoiniciadores com seis linhagens celulares distintas. Testaram três diferentes fotoiniciadores comerciais: Irgacure<sup>®</sup>2959, Irgacure<sup>®</sup>184 e Irgacure<sup>®</sup>651 e concluíram que o Ir2959<sup>®</sup> causa a menor toxicidade.

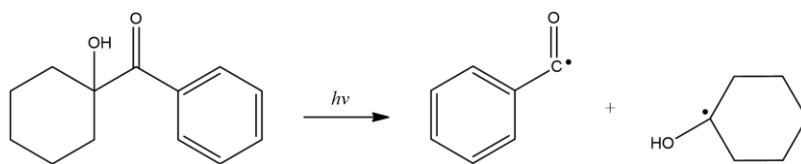


**Figura 14:** Estruturas químicas dos fotoiniciadores: (a) Irgacure<sup>®</sup>184 (b) Irgacure<sup>®</sup>651 e (c) Irgacure<sup>®</sup>2959.

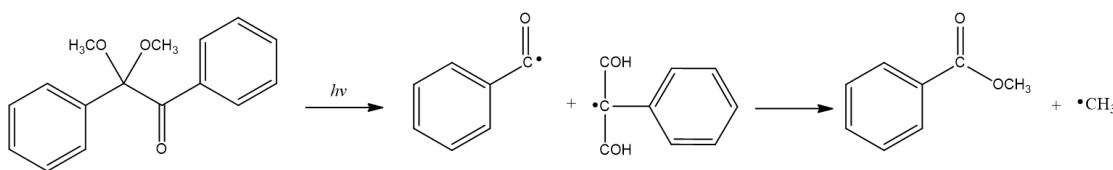
Os fotoiniciadores são geralmente divididos em duas classes, de acordo com o processo pelo qual as espécies de iniciação são formadas: fotoiniciadores do Tipo I,

envolvendo reações unimoleculares e fotoiniciadores do Tipo II, envolvendo reações bimoleculares. A maioria dos fotoiniciadores do Tipo I são compostos carbonílicos aromáticos contendo substituintes que facilitam a fotofragmentação direta, gerando radicais. Dependendo da natureza do grupo funcional e de sua localização na molécula em função do grupo carbonila, a fragmentação pode ocorrer na ligação adjacente ao grupo carbonila (clivagem  $\alpha$ ) ou na ligação química na posição  $\beta$  (clivagem  $\beta$ ). O tipo mais importante de fragmentação nos processos de iniciação por radiação é a clivagem  $\alpha$  da ligação carbono-carbono entre o grupo carbonila e o radical alquíldico nas cetonas aquil-arila, que são conhecidas como reações de Norrish Tipo I. O principal objetivo do desenvolvimento de novos fotoiniciadores é encontrar estruturas que levem ao mecanismo de clivagem  $\alpha$ , pois este mecanismo é o mais eficiente no processo de iniciação das reações de fotopolimerização<sup>83</sup>.

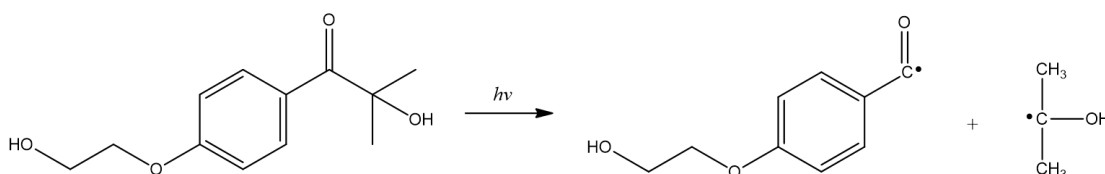
Grande parte dos fotoiniciadores comerciais são do Tipo I, apresentando o mecanismo de clivagem  $\alpha$ . As Figuras 15, 16 e 17 mostram exemplos da fotodegradação de alguns fotoiniciadores.



**Figura 15:** Geração de radicais reativos por fotodegradação do Irgacure<sup>®</sup> 184<sup>77</sup>.



**Figura 16:** Geração de radicais reativos por fotodegradação do Irgacure<sup>®</sup> 651<sup>77</sup>.



**Figura 17:** Geração de radicais reativos por fotodegradação do Irgacure<sup>®</sup> 2959<sup>77</sup>.

As duas reações principais para os fotoiniciadores do Tipo II são: abstração de hidrogênio pelo iniciador no estado excitado e transferência de elétrons fotoinduzida seguida de fragmentação. A abstração de hidrogênio é uma reação típica de diaril cetonas. A transferência de elétrons fotoinduzida é um processo mais geral, não se limitando a classes específicas de compostos.

Os estados excitados de algumas moléculas não levam à reação de fragmentação. A molécula pode, entretanto, reagir com outra molécula para produzir uma espécie iniciadora por meio de uma reação bimolecular. Estes sistemas de iniciação são denominados de fotoiniciadores bimoleculares ou do Tipo II<sup>83</sup>.

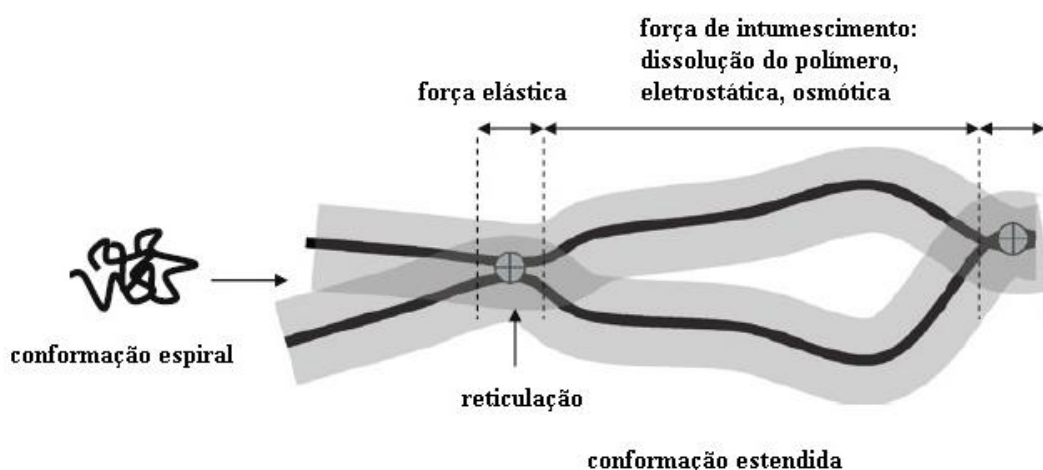
- **Reticulação utilizando enzimas:** o interesse em hidrogéis reticulados enzimaticamente é devido, principalmente, à suavidade desse tipo de reação. As reações enzimáticas são catalisadas pela maioria das enzimas em pH neutro, meio aquoso e em temperaturas moderadas. Adicionalmente, as reações secundárias indesejadas que podem ocorrer com fotoiniciadores ou reticulantes químicos são evitadas, devido a uma das melhores características do uso de enzimas: a especificidade<sup>42</sup>. Esta técnica tem mostrado grande potencial para aplicações biomédicas, tais como engenharia de tecidos e entrega de drogas ou proteínas<sup>60</sup>.

Os sistemas mediados por enzimas são relativamente recentes e apontam para direções promissoras em obtenção de hidrogel. Apesar dos grandes avanços e vantagens da utilização de biocatalisadores, ainda há desafios a serem superados. Estes dizem respeito, principalmente, à quantidade de estudos *in vivo*, a instabilidade de alguns tipos de enzimas, como transglutaminases e tirosinases e as limitadas propriedades mecânicas dos géis formados<sup>42, 84</sup>.

Predominantemente, transglutaminases e peroxidases podem ser destacadas como os sistemas enzimáticos mais bem estudados envolvidos na reticulação de hidrogéis para a engenharia de tecidos. Transglutaminases são altamente interessantes, pois elas oferecem grande integração entre o gel formado e tecido nativo. Adicionalmente, estas enzimas provaram catalisar a reação de reticulação em diferentes tipos de materiais, tais como poli(etileno glicol), elastina e gelatina. Peroxidases também são atrativas, devido à sua elevada estabilidade, disponibilidade e fácil purificação<sup>42, 60</sup>.

### 3.1.3 Água em Hidrogéis

O comportamento de intumescimento em hidrogéis é um importante parâmetro que rege suas aplicações na área biomédica. A presença de água na superfície dos hidrogéis reduz a energia livre interfacial em ambiente fisiológico e, portanto, melhora suas propriedades biológicas<sup>85</sup>. O conteúdo final de água nos hidrogéis depende de parâmetros cinéticos e termodinâmicos. Durante o processo de inchamento, as primeiras moléculas de água hidratam os grupos hidrofílicos. Assim que a hidratação dos grupos hidrofílicos é concluída a força osmótica das cadeias reticuladas permite que a rede absorva mais água. Este intumescimento é adicional e opõem-se pela presença de reticulações covalentes ou físicas por meio de força elástica de retração da rede. Por fim, o balanço das forças de retração e da diluição infinita estabelece um nível de equilíbrio de intumescimento, representado na Figura 18<sup>41</sup>.

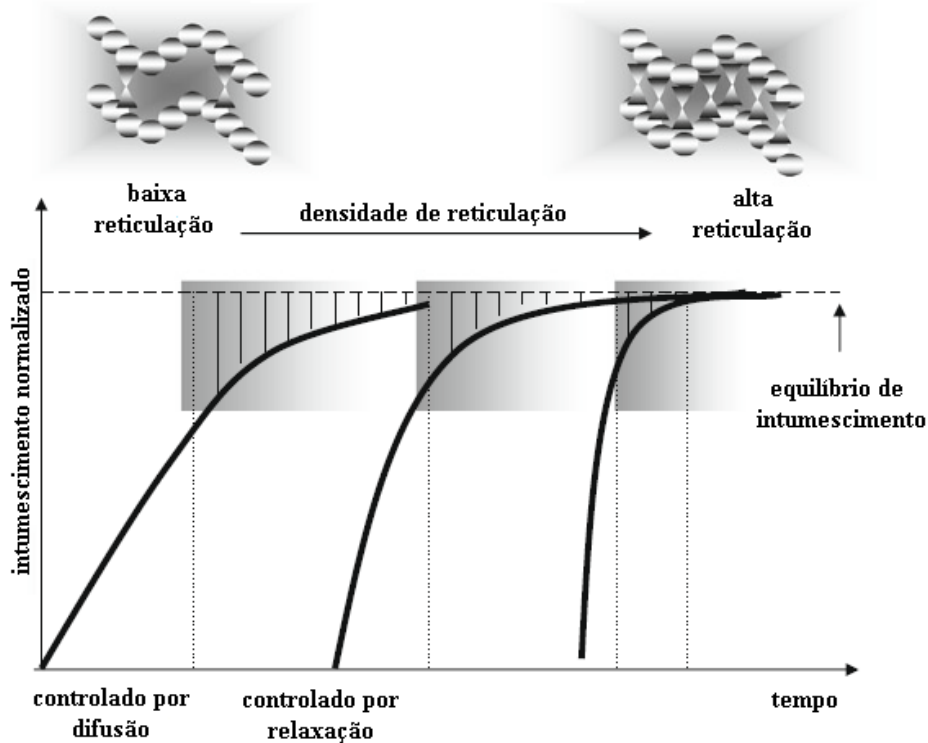


**Figura 18:** Forças presentes em hidrogéis intumescidos<sup>86</sup>.

A absorção de água em hidrogéis depende de muitos fatores, tais como: reticulação, a natureza da solução e estrutura do hidrogel (porosa ou sem poros). O fator mais importante é a densidade de reticulação, o qual é determinado pelo número de agentes químicos ou físicos de ligações cruzadas em um determinado volume. Este, por sua vez, determina a distância entre duas ligações cruzadas da mesma cadeia polimérica. Quanto menor a distância, maior a densidade de reticulação<sup>50</sup>.

O processo de intumescimento pode ser visto como um processo de difusão, seguido por um processo de relaxamento. Inicialmente o processo de intumescimento é determinado pela taxa à qual a água pode difundir na estrutura do hidrogel, o que depende principalmente do solvente, temperatura da solução e a extensão da porosidade.

A segunda etapa para é determinada pela maneira como cadeias poliméricas podem relaxar, o qual é um lento processo de absorção<sup>86</sup>. A Figura 19 ilustra a cinética de intumescimento de hidrogéis.

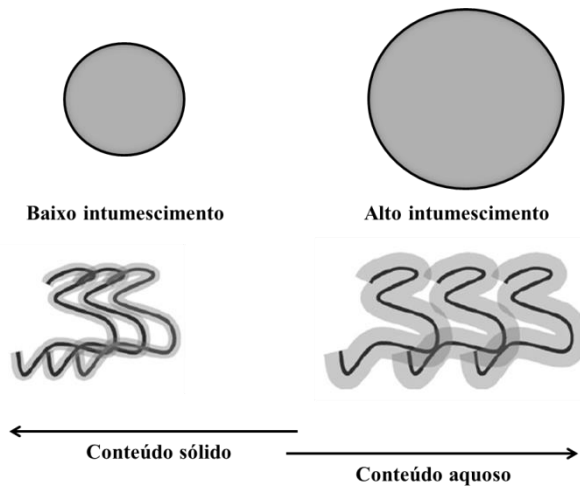


**Figura 19:** Cinética de intumescimento em hidrogéis<sup>86</sup>.

### 3.1.4 Propriedades dos Hidrogéis

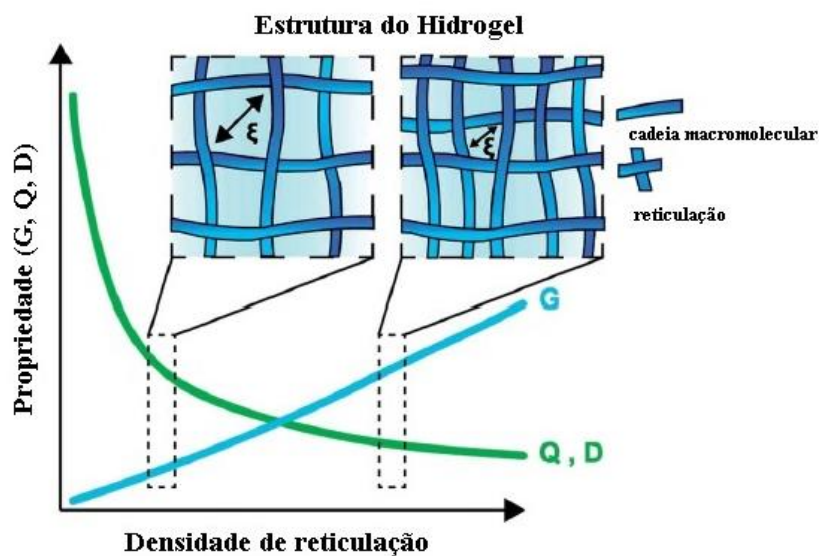
Um hidrogel é um compósito formado por um sólido (polímero) e um líquido (água). As propriedades finais de um hidrogel são determinadas pela composição do compósito (razão água-polímero). Como mostrado na Figura 20, um baixo ou um alto intumescimento é caracterizado por uma alta ou baixa proporção polímero/água, respectivamente. Hidrogéis, com estabilidade superior em seu estado intumescido, por exemplo, hidrogéis para lente de contato exigem um alto teor de sólidos e em hidrogéis com baixo teor de sólidos, por exemplo, géis superabsorventes para fraldas de bebê, é desejável que a capacidade de intumescimento seja elevada<sup>86, 87</sup>.





**Figura 20:** Propriedades de intumescimento e composição de hidrogéis<sup>86</sup>.

A densidade de reticulação é um importante parâmetro que governa muitas características estruturais dos hidrogéis<sup>50, 86</sup>. Existe uma relação entre a densidade de reticulação e as propriedades dos hidrogéis, como o módulo, o intumescimento e difusibilidade. A Figura 21 ilustra essa relação, onde à medida que a densidade de reticulação aumenta, razão volumétrica de intumescimento e a difusividade diminuem com a redução concomitante da dimensão na malha ( $\xi$ ). O tamanho da malha define o espaço entre as cadeias macromoleculares disponíveis para o transporte molecular e, portanto afeta o teor de água e a difusividade. Por outro lado, o módulo do gel aumenta mediante o aumento da densidade de reticulação<sup>3</sup>.



**Figura 21:** Relação entre densidade de reticulação e propriedades do hidrogel<sup>3</sup>.

Dependendo da natureza e composição do hidrogel a etapa posterior ao intumescimento é a desintegração e/ou dissolução se a cadeia polimérica ou ligações cruzadas são degradáveis. Hidrogéis biodegradáveis são vantajosos em aplicações tais como engenharia tecidual, cicatrização de feridas e liberação de fármacos. As ligações instáveis podem ser quebradas sob condições fisiológicas, via enzimática ou química, na maior parte dos casos, por hidrólise<sup>41,43</sup>.

Biocompatibilidade é a terceira propriedade mais importante exigida pelos hidrogéis. Biocompatibilidade é definida como a compatibilidade com o sistema imune do hidrogel e seus produtos de degradação formados, os que também não devem ser tóxicos. Idealmente, devem ser metabolizados em produtos inofensivos ou podem ser excretados pelo processo de filtração renal<sup>43</sup>. Geralmente, hidrogéis possuem uma boa biocompatibilidade devido a sua superfície hidrofílica apresentar uma baixa energia livre interfacial quando em contato com fluidos corporais, o que resulta em uma baixa adesão de proteínas e células nessas superfícies. Além disso, a natureza viscoelástica dos hidrogéis minimiza a irritação com o tecido envolvente<sup>50,88</sup>.

### 3.1.5 Caracterização de Hidrogéis

- **Caracterização Estrutural:** a estrutura química dos hidrogéis pode ser elucidada através de técnicas analíticas, tais como Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-<sup>1</sup>H)<sup>43</sup>. Geralmente FTIR é utilizada para investigar o arranjo estrutural no hidrogel em comparação com os materiais de partida<sup>89</sup>. A técnica de RMN é utilizada para controlar e/ou identificar o grau dos processos de polimerização/copolimerização<sup>90,91</sup> ou enxerto<sup>80,92</sup>.

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) pode ser utilizada para fornecer informações sobre a topografia da superfície da amostra, sua composição e outras propriedades, tais como a condutividade elétrica e presença ou não de poros. MEV é uma técnica amplamente usada para capturar a característica de estrutura em rede presente nos hidrogéis<sup>43,93,94</sup>.

- **Intumescimento:** uma vez que os valores de massa, volume e dimensão dos hidrogéis mudam durante o processo de intumescimento, qualquer um destes fatores pode ser utilizado para caracterizar o comportamento de intumescimento de hidrogéis. O método mais utilizado é a proporção de massa-intumescimento, que pode ser expressa em unidade de massa ou em porcentagem, como mostrado abaixo<sup>86</sup>.

$$Q_t = \frac{(m_{st} - m_d)}{m_d} \quad (\text{g/g}) \quad \text{Equação 2}$$

$$Q_t = \frac{(m_{st} - m_d)}{m_d} \times 100 \quad (\%) \quad \text{Equação 3}$$

Onde,  $Q_t$  é o intumescimento no tempo “t”,  $m_{st}$  é a massa do hidrogel intumescido no tempo “t” e  $m_d$  é a massa do hidrogel seco.

Quando  $m_{st} \gg m_d$  a razão massa-intumescimento é simplificada e expressa pela Equação 4.

$$Q_t = \frac{m_{st}}{m_d} \quad \text{Equação 4}$$

- **Massa molecular entre reticulações ( $M_c$ ):** a teoria de Flory-Rehner leva a uma expressão para a massa molecular entre ligações cruzadas se o hidrogel é preparado na ausência de um solvente. Peppas e Merrill modificaram esta teoria para hidrogéis preparados na presença de um solvente (Equação 5)<sup>13, 95</sup>.

$$\frac{1}{M_c} = \frac{2}{M_n} - \frac{\bar{v}}{V_1} \frac{[\ln(1-v_{2,s}) + v_{2,s} + \chi_1 v_{2,s}^2]}{v_{2,r} \left[ \left( \frac{v_{2,s}}{v_{2,r}} \right)^{\frac{1}{3}} - \frac{v_{2,s}}{2v_{2,r}} \right]} \quad \text{Equação 5}$$

Onde,  $M_n$  é a massa molecular média do polímero de origem,  $V_1$  é o volume molar da água,  $\bar{v}$  é o volume específico da água e  $\chi$  é o parâmetro de interação polímero-solvente. Os termos  $v_{2,r}$  e  $v_{2,s}$  denotam a fração de volume do polímero “relaxada” e totalmente intumescido, respectivamente<sup>13</sup>.

O estado de relaxamento se refere ao estado do polímero, imediatamente após a reticulação, mas antes de qualquer intumescimento adicional ocorrer. Se o gel é preparado na ausência de um solvente, a fração em volume do polímero no estado relaxado se torna um ( $v_{2,r} = 1$ ) o que provoca a mudança da equação 5 para a equação da teoria de Flory-Rehner (Equação 6)<sup>13</sup>.

$$\frac{1}{M_c} = \frac{2}{M_n} - \frac{\bar{v} [\ln(1-v_{2,s}) + v_{2,s} + \chi_1 v_{2,s}^2]}{v_{2,s}^{1/3} - \frac{v_{2,s}}{2}} \quad \text{Equação 6}$$

A fração no estado intumescido,  $v_{2,s}$ , em ambas as equações refere-se à fração em volume do polímero quando o hidrogel é totalmente intumescido na presença de água pura<sup>13</sup>.

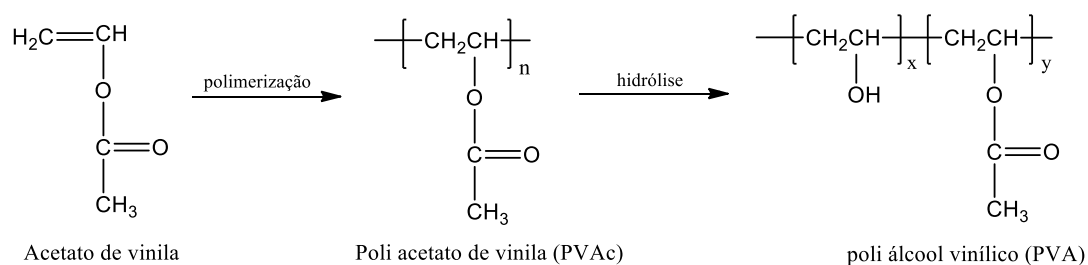
- **Caracterização Mecânica e Reológica:** para a maioria das aplicações o requisito mais importante dos hidrogéis é o quão bem um hidrogel pode manter a sua forma no estado intumescido, o que é chamado de estabilidade em estado molhado. A reticulação das cadeias do polímero é geralmente necessária para melhorar as propriedades mecânicas dos hidrogéis. Com o aumento na densidade de ligações cruzadas, as propriedades mecânicas são aumentadas<sup>96</sup>.

Hidrogéis tais como os polímeros são materiais viscoelásticos. Portanto, eles apresentam componentes elástico e viscoso. Estes dois são caracterizados pelos módulos de armazenamento e de perda, respectivamente. As propriedades viscoelásticas dos hidrogéis intumescidos podem ser medidas por um reômetro<sup>86</sup>. Assim como as propriedades mecânicas as propriedades reológicas são muito dependentes dos tipos de estrutura (associação, entrelaçamentos, ligações cruzadas) presentes no sistema e análise dos módulos permite distinguir entre soluções poliméricas concentradas e géis.

No caso de uma solução concentrada em baixas frequências, a solução apresenta comportamento viscoso ( $G'' > G'$ ), enquanto que em altas frequências um comportamento elástico ( $G' > G''$ ) é observado. A transição entre o comportamento viscoso e elástico é indicado pelo ponto de cruzamento entre as curvas de  $G'$  e  $G''$  em função da frequência. Em baixas frequências as cadeias poliméricas são capazes de recuperar a configuração de equilíbrio através do movimento browniano dentro da escala temporal do experimento e a solução se comporta como um líquido viscoso. Por outro lado, em altas frequências, acima do ponto de cruzamento das curvas de  $G'$  e  $G''$  as cadeias não conseguem se separar durante o curto período de oscilação e, portanto, se comportam como uma rede de ligações cruzadas em que a principal forma de acomodar o estresse é por deformação de rede e então o comportamento elástico ( $G' > G''$ ) é observado<sup>43, 85</sup>.

### 3.2 POLI (ÁLCOOL VINÍLICO)

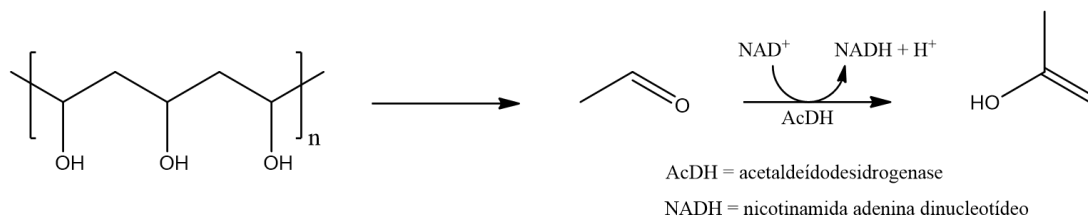
O poli (álcool vinílico) também conhecido por álcool polivinílico possui uma estrutura química relativamente simples com grupos hidroxila pendentes. A polimerização direta do álcool vinílico não é possível devido à instabilidade do monômero, o qual se tautomeriza para a forma de acetaldeído. Portanto, o PVA é um polímero sintético obtido por meio da polimerização radicalar do monômero de acetato de vinila para poli acetato de vinila (PVAc), seguida pela hidrólise dos grupos acetato para produzir a cadeia polimérica hidroxilada (Figura 22). A reação de hidrólise não é completa resultando em polímeros com certos graus de hidrólise dependendo da extensão da reação. Na essência, PVA é sempre um copolímero de PVA e PVAc<sup>97, 98</sup>.



**Figura 22:** Reações de obtenção do poli (álcool) vinílico.

O PVA é comercializado com altos graus de hidrólise (acima de 98,5%). O grau de hidrólise, ou o conteúdo de grupos acetato no polímero, tem um efeito global sobre as propriedades químicas, solubilidade e cristalinidade do PVA. A polimerização para obter o PVA resulta em uma distribuição de massa molecular bastante ampla. O índice de polidispersão de 2 a 2,5 é bastante comum em muitas classes comerciais. A distribuição de massa molecular é uma importante característica do PVA, pois afeta muitas propriedades, incluindo cristalização, adesão, força mecânica e difusibilidade<sup>98</sup>.

A solubilidade em água, biodegradabilidade e biocompatibilidade fazem do PVA um dos polímeros sintéticos mais interessantes<sup>99</sup>. A biodegradabilidade é um pré-requisito chave de precursores de hidrogéis para aplicações biomédicas. A Figura 23 mostra os produtos resultantes da degradação por hidrólise do PVA. Outro fator interessante é a sua reatividade uma vez que os grupos hidroxilas permitem a modificação estrutural do polímero<sup>100</sup>.



**Figura 23:** Reação de degradação do PVA<sup>78</sup>.

### 3.2.1 Hidrogéis de Poli (álcool vinílico)

Devido à capacidade de formar hidrogéis através de reticulação física ou química aliada às características de não toxicidade, mínima adesão celular e absorção de proteínas o PVA se tornou um polímero apropriado para fins biomédicos e farmacológicos<sup>101</sup>. O primeiro hidrogel a ser amplamente utilizado como um implante biomédico foi o hidrogel de PVA reticulado com formaldeído<sup>102</sup>. Este material foi inventado em 1949 e comercializado com o nome comercial Ivalon<sup>®</sup>. Começando na década de 1950, esse material foi estudado por quase todas as imagináveis aplicações biomédicas, incluindo: substituição de pele, substituição de cartilagem articular, *scaffolds* para regeneração óssea, próteses vasculares, tratamento para a tuberculose e como material embólico<sup>3</sup>.

PVA tem sido utilizado em hidrogéis<sup>53, 55, 100, 103</sup> e redes semi-interpenetradas (semi-IPN)<sup>104</sup> como sistema de liberação diferenciada em fármacos. Murphy *et al.*<sup>105</sup> sintetizaram hidrogéis de PVA/tetrahidroxiborato com finalidade de liberação de boratos em úlceras superficiais induzidas em ratos, com resultados positivos. Em adição, o PVA mostra potenciais aplicações em substituição de tecidos macios, cartilagem articular, cateteres, pele artificial, pâncreas artificial e membranas de hemodiálise. Algumas aplicações específicas serão discutidas<sup>98, 106</sup>.

Um dos primeiros trabalhos considerando o PVA como biomaterial foi realizado por Peppas e Merrill<sup>102, 107</sup>. Géis de PVA foram examinados para a sua utilização em aplicações onde a compatibilidade com o sangue era uma questão importante. Baseado nas informações destes trabalhos, hidrogéis de PVA foram investigados para a possível reconstrução de cordas vocais<sup>108</sup>. Hidrogéis de PVA também foram considerados como candidatos para aplicações como biomembranas em rins artificiais<sup>109</sup> e em válvulas cardíacas<sup>110</sup>.

Muitas pesquisas foram centradas em questões de biocompatibilidade para determinar com mais precisão a utilização de hidrogéis de PVA para aplicações biomédicas ou farmacêuticas. A compatibilidade celular de hidrogéis de PVA

funcionalizados com fibronectina para aplicação em enxerto vascular foi estudada por Millon e co-autores<sup>48</sup> e os resultados mostram a aderência e disseminação das células radiais arteriais e células endoteliais vasculares nas superfícies dos hidrogéis de PVA com fibronectina, enquanto que as células não aderiram no hidrogel de PVA não funcionalizado (controle). Gupta<sup>49</sup> preparou hidrogéis de PVA com ciclos de congelamento/descongelamento a fim de tornar o PVA susceptível à adesão celular e mostraram que alterações nas propriedades mecânicas e de energia de superfície influenciam na adesão de células (fibroblasto dérmico humano e células epiteliais oculares).

Hidrogéis de PVA com nanopartículas de carbono aplicados em reparo de defeito osteocondral foram estudados por Rodrigues<sup>111</sup> e apresentaram crescimento ósseo na interface implante/tecido. Song e co-autores<sup>112</sup> também estudaram hidrogéis contendo PVA em tecido ósseo. Eles prepararam hidrogéis compostos de poli (álcool vinílico), hidroxiapatita e colágeno tipo I. Os resultados mostraram que ocorreu a adesão, proliferação e diferenciação celular *in vitro*, assim os hidrogéis representam uma matriz de revestimento de superfície de implante promissora para a melhoria da osseointegração de implantes.

O PVA possui propriedades elásticas que podem ser benéficas para células cultivadas, por exemplo, melhorar a transmissão de estímulos mecânicos para induzir a orientação celular<sup>113</sup>. Assim como hidrogéis de poli (etileno glicol) (PEG), o PVA é não-adesivo às células e proteínas, mas pode ser covalentemente modificado com peptídeos de adesão celular. Esse assunto tem sido o foco de alguns estudos. Matsuda *et al.*<sup>114</sup> incorporaram peptídeos GRGDSP em filmes de PVA e obtiveram uma melhor aderência de células endoteliais bovinas sobre as superfícies de PVA modificadas do que em filmes de PVA.

Em outro exemplo, desta vez utilizando a sequência de peptídeos de aderência RGD, Schmedlen *et al.*<sup>113</sup> alteraram hidrogéis de PVA com RGDS para suporte em adesão e propagação de fibroblastos dérmicos humanos. A viabilidade celular foi mantida homogênea por todo o gel durante 2 semanas em cultura. O grau de proliferação e adesão foi dependente da dose e aumentou com concentrações superiores de RGDS. Kawase *et al.*<sup>115</sup> imobilizaram glicil-L-histidil-L-lisina (GHK) em superfícies derivadas de PVA para utilização como substratos para a cultura de hepatócitos. A agregação das células iniciou-se após 24 horas e esferóides multicelulares se desenvolveram durante o período de incubação de 5 dias.

### 3.3 INTERAÇÃO BIOMATERIAL E MEIO BIOLÓGICO

#### 3.3.1 Matriz Extracelular (MEC)

Nos últimos anos o conceito de biomateriais foi ampliado. Defende-se a ideia de que substratos implantados não devem apenas fornecer suporte estrutural para os tecidos danificados, mas também interagir com esses e idealmente promover a sua regeneração. O que se pensava anteriormente é que os materiais deveriam apresentar uma superfície relativamente inerte a fim de minimizar respostas imunes e fibróticas. No entanto, uma série de evidências sugere que materiais biomiméticos muitas vezes apresentam melhor desempenho mesmo que os mecanismos que regulam as respostas de tecido para estes materiais não sejam bem compreendidos. Esta evolução no pensamento tem solicitado um esforço crescente para modificar superfícies sintéticas com elementos biológicos para promover a integração com os tecidos circundantes, ou, alternativamente, para projetar substratos diretamente de moléculas biológicas<sup>116, 117</sup>.

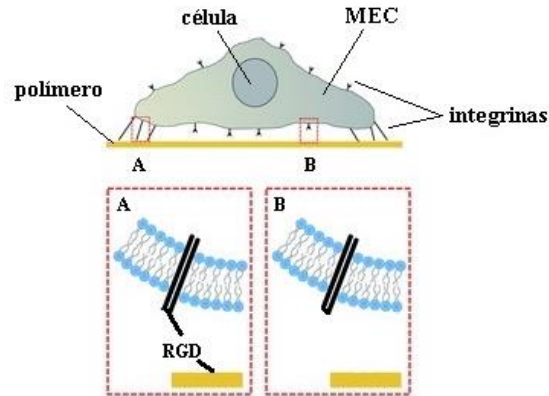
A interface entre o contato da célula e o biomaterial é a matriz extracelular. A MEC não é um meio inerte, ela é o meio natural em que as células proliferam, diferenciam e migram e, portanto, é de grande importância para a regeneração de tecidos<sup>118</sup>. Em condições fisiológicas a composição da MEC deriva da homeostase, um balanço dinâmico de regeneração, diferenciação e morte celular programada (apoptose), que remodela continuamente a MEC através de síntese e degradação de proteínas<sup>119</sup>. Dentre os constituintes da MEC podem ser citados diferentes tipos de macromoléculas (proteoglicanas e glicosaminoglicanas), proteínas fibrosas como colágeno e elastina, ambas com funções estruturais, além de glicoproteínas adesivas como laminina, tenacina e fibronectina<sup>120</sup>.

A aderência das células às proteínas da MEC se dá através da ação de proteínas de ligação transmembranar chamada de moléculas de adesão. As moléculas de adesão celular constituem um grupo heterogêneo de receptores de superfície celular importantes no desenvolvimento de diversos processos fisiológicos e patológicos, tais como: divisão, migração e diferenciação das células. As moléculas de adesão celular são classificadas em vários grupos, entre os quais estão as caderinas, as imunoglobulinas, as selectinas e as integrinas, entre outras<sup>121</sup>.

Existem várias interações moleculares que podem mediar a ligação de células, no entanto, grande parte das pesquisas nesta área tem-se centrado na utilização de peptídeos adesivos que se dedicam e ativam as integrinas na superfície das células,



dentre os quais a sequência peptídica Arg-Gly-Asp (RGD)<sup>122</sup>. Um esquema para representar a adesão entre a célula e o polímero funcionalizado com RGD está ilustrado na Figura 24.



**Figura 24:** Representação esquemática da adesão entre o polímero funcionalizado com RGD e a MEC, mediada pelas integrinas. Em B não ocorre adesão.

### 3.3.2 Sequência Peptídica RGD

Nas últimas décadas, os cientistas das áreas de ciência dos materiais, engenharia de superfícies, química, física, biologia, bioquímica e medicina funcionalizaram polímeros a fim de obter interações de superfície celular específicas. No início estes materiais foram revestidos com proteínas de adesão celular como fibronectina, colágeno ou laminina. O uso de proteínas, no entanto, tem algumas desvantagens na visão de aplicações médicas. A maior parte das desvantagens das proteínas pode ser superada por pequenos peptídeos imobilizados que apresentam função de reconhecimento celular<sup>123</sup>.

Os peptídeos exibem maior estabilidade para condições de esterilização, tratamento térmico e variação de pH (por exemplo, comparado com a fibronectina), de armazenamento e mudança conformacional, além de melhor custo-benefício<sup>124, 125</sup>. Devido aos peptídeos serem moléculas menores, a superfície é funcionalizada com maior densidade e, além disso, as proteínas da MEC normalmente contêm muitas funções de reconhecimento de células diferentes, enquanto que peptídeos representam apenas um único motivo. Por isso, eles podem tratar seletivamente um tipo particular de receptores de adesão celular<sup>126</sup>.

A sequência RGD foi identificada por Pierschbacher e Ruoslahti<sup>11</sup> como a sequência peptídica mínima necessária para a adesão nas integrinas da MEC. Pierschbacher citou a sequência RDGS como sendo um fator de reconhecimento celular

determinante comum a várias proteínas. Desde então inúmeros polímeros, em especial hidrogéis<sup>7</sup> foram funcionalizados com RGD para aplicações biomédicas. Segundo Hersel<sup>123</sup> não há regras e nunca houve um desenvolvimento a respeito de quais peptídeos RGD são usados para promover a adesão celular. Um grande número de diferentes peptídeos RGD são combinados com diferentes polímeros e linhas de células. Existem apenas alguns exemplos na literatura que realizam uma comparação quantitativa sistemática de diferentes peptídeos RGD.

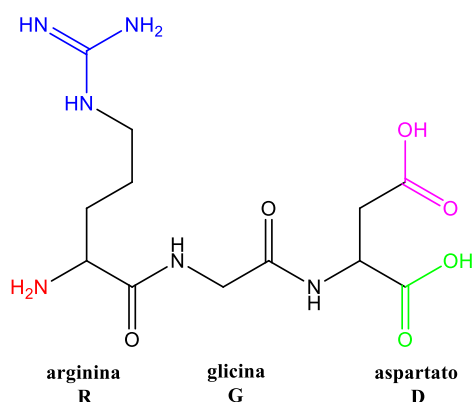
Hirano *et al.*<sup>127</sup> testaram as atividades de ligação de células de RGD, RGDS (a partir de fibronectina), RGDV (a partir de vitronectina) e RGDT (a partir de colágeno) para diferentes linhas de células. Os tetrapeptídeos mostraram um aumento distinto na fixação de células em comparação com a sequência tripeptídica. Curiosamente não houve diferença significativa na atividade de ligação celular dos diferentes tetrapeptídeos em relação às diferentes linhas de células.

A ligação estável de peptídeos RGD em uma superfície é essencial para promover uma forte adesão celular. Existem duas formas de ligação, via métodos físicos ou métodos químicos. Os métodos físicos de incorporação de RGD envolvem a deposição, adsorção ou precipitação sobre ou dentro de um material sólido. O peptídeo não está covalentemente ligado ao material, o que proporciona as propriedades de massa do sistema<sup>128</sup>. Os métodos químicos envolvem a formação de ligações covalentes entre o peptídeo e o substrato.

Todos os métodos químicos de modificação exigem a presença de grupos funcionais no material ao qual o peptídeo pode se ligar, através de um reagente de acoplamento ou um agente de reticulação. Os grupos funcionais que podem ser utilizados incluem ácidos carboxílicos, aminas, aldeídos, álcoois e tióis<sup>123</sup>. Os reagentes de acoplamento são utilizados para ativar os grupos funcionais ou do material ou do peptídeo e mediar a formação da ligação. A formação da ligação pode ser conseguida em síntese de uma única etapa, onde o reagente de acoplamento e o peptídeo são adicionados simultaneamente ou em síntese de duas etapas em que um grupo ativado semi-estável é formado na primeira etapa, e o peptídeo ou o polímero é adicionado na segunda etapa.

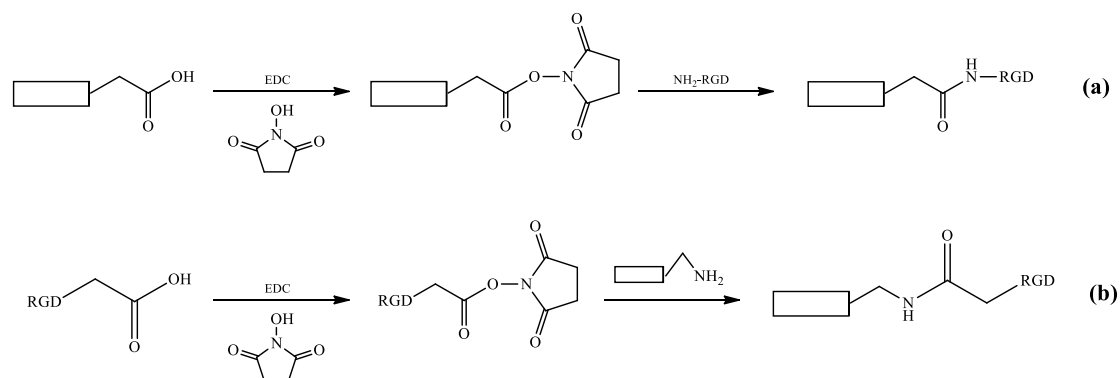
Na maioria dos casos os peptídeos RGD são ligados a polímeros através de uma ligação amida covalente estável e a reação ocorre entre um grupo ácido carboxílico ativado com um nitrogênio nucleofílico terminal através de uma reação de substituição nucleofílica. Grupos carboxílicos podem ser ativados através dos seguintes reagentes de

acoplamento: hidrocloreto de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*'-etilcarbodiimida (EDC), dicitclo-hexilcarbodiimida (DCC) ou carbonil diimidazola (CDI)<sup>123</sup>. Dois desafios podem surgir por este método de ativação: primeiramente, há mais grupos funcionais reativos no peptídeo RGD (grupos carboxilas no carbono terminal e na cadeia lateral do ácido aspártico e o grupo guanidino nucleofílico da cadeia lateral da arginina – Figura 25) e em segundo lugar o reagente de acoplamento e os grupos carboxila ativados podem ser desativados rapidamente, por hidrólise<sup>129</sup>.



**Figura 25:** Estrutura molecular do peptídeo RGD. Em vermelho o grupo amina terminal, em azul o grupo guanidino, em rosa o grupo carboxila lateral e em verde o grupo carboxila terminal.

Uma possibilidade para superar este problema é proteger as cadeias laterais dos peptídeos com grupos protetores e a utilização de outros solventes que não a água (por exemplo, dimetilformamida, diclorometano ou acetona)<sup>123</sup>. Por este método, peptídeos RGD protegidos foram ligados com sucesso em polímeros<sup>130, 131</sup>. Uma grande desvantagem dessa estratégia é a necessidade de condições severas para remover os grupos protetores. Alternativamente, o acoplamento de peptídeos RGD desprotegidos em meio aquoso é possível adicionando *N*-hidroxisuccinimida (NHS) ou sulfo *N*-hidroxisuccinimida (sulfo-NHS) à mistura reacional para aumentar a eficiência do acoplamento mediado pelo EDC proporcionando um intermediário que não é susceptível a hidrólise<sup>123, 128</sup> (Figura 26).



**Figura 26:** Reação do peptídeo RGD com polímeros contendo: (a) grupos carboxila e (b) grupos amina. Em ambas as reações os grupos ácidos são pré-ativados com EDC e NHS para gerar um éster estável. Figura adaptada<sup>123</sup>.

O consumo de prótons nessa reação requer um tampão para manter a acidez da solução. Porém, o tampão não pode ter ácidos carboxílicos, pois estes reagiriam com o intermediário estável que não é susceptível à hidrólise (*O*-acilissouréia). O composto ácido 2-morfolinoetanosulfônico (tampão MES) é frequentemente usado como um tampão em reações que utilizam a química da carbodiimida porque não contém ácidos carboxílicos<sup>129</sup>.

## **4 PARTE EXPERIMENTAL**

A parte experimental está descrita de acordo com o método de reticulação utilizado para a obtenção dos hidrogéis.

### **4.1 MATERIAIS**

Para a realização deste trabalho foram utilizados os seguintes materiais: poli(álcool vinílico), metacrilato de 2-isocianato de etila, 2-6-di-tert-butil-4-metilfenol, 4,4-dietoxibutilamina, 2-hidroxi-4'-(2-hidroxiétoxi)-2-metilpropilfenona, ácido 2-morfolinoetanosulfônico, sulfo *N*-hidroxisuccinimida, hidrocloreto de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida, arg-gli-asp-ser, cloreto de sódio, fosfato de sódio e ácido butano 1,2,3,4,-tetracarboxílico que foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

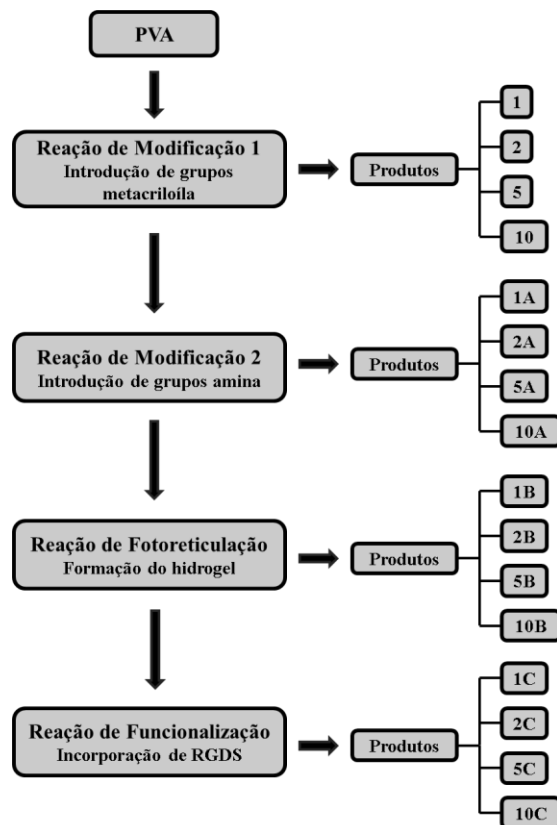
Acetona, ácido sulfúrico, hidróxido de amônio, dimetilsulfóxido e nitrato de prata foram adquiridos da empresa Synth e ácido cítrico foi adquirido da empresa Nuclear. Membranas de diálise com massa molecular de corte (MWCO) de 2000 Da foram adquiridas da empresa MilliPore.

### **4.2 MÉTODOS**

#### **4.2.1 Hidrogéis Fotoreticulados**

A reticulação fotoquímica foi o método escolhido devido à ausência de compostos reticulantes que pudessem causar toxicidade para o material (meio) biológico. Todos os reagentes utilizados foram escolhidos de forma a minimizar ao máximo a toxicidade do hidrogel final.

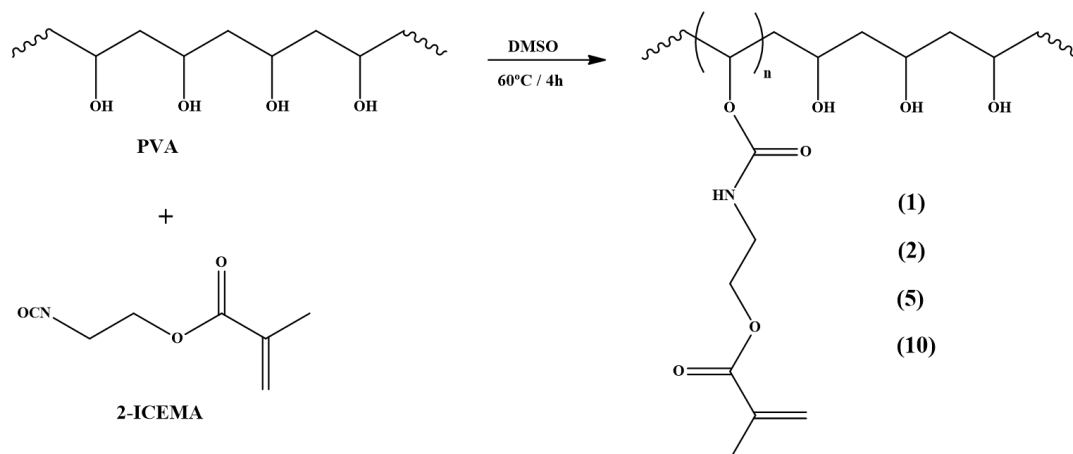
A fim de facilitar a compreensão das siglas utilizadas é apresentado um diagrama (Figura 27) das etapas da síntese dos hidrogéis fotoreticulados e a respectiva nomenclatura dos produtos obtidos em cada etapa.



**Figura 27:** Identificação dos produtos obtidos nas reações de modificação, fotoreticulação e funcionalização do PVA.

#### 4.2.1.1 Introdução de Grupos Metacriloila ao PVA (Reação de Modificação 1)

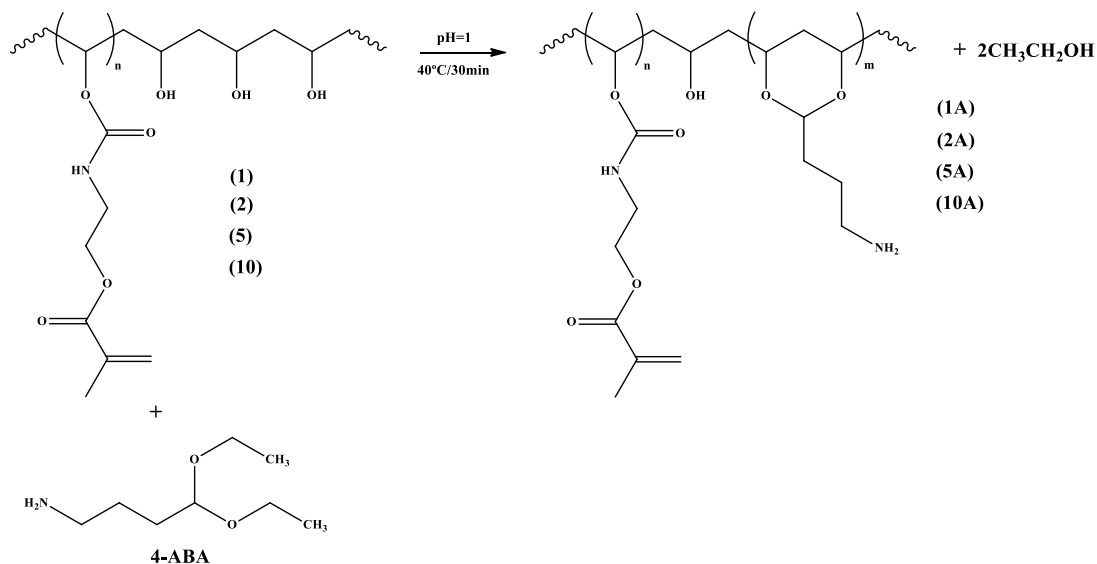
Para obtenção dos hidrogéis funcionalizados, o PVA foi modificado primeiramente pela reação com metacrilato de 2-isocianato de etila (2-ICEMA), utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente na proporção de 20% massa/volume (m/v) em relação ao PVA. Foi adicionado 1% m/m de 2-6-di-tert-butil-4-metilfenol (DTBMP) para inibir a polimerização de metacrilatos e a solução foi purgada com argônio durante 30 min. Após, percentagens molares (1, 2, 5 e 10%) de 2-ICEMA em relação aos grupos hidroxilas do PVA foram adicionados gota a gota e a reação foi mantida a 60°C durante 4h com agitação magnética constante<sup>132</sup> (Figura 28). O gel formado foi precipitado em acetona e seco em estufa a vácuo.



**Figura 28:** Reação de obtenção do PVA modificado com grupo metacrilóila.

#### 4.2.1.2 Introdução de Grupos Amina ao PVA (Reação de Modificação 2)

A segunda modificação na cadeia polimérica do PVA foi obtida através da reação em solução aquosa (12% m/v) dos PVAs modificados com grupo metacrilóila (PVA/A1-A10) com 4,4-dietoxibutilamina (4-ABA), sob agitação magnética na temperatura de 40°C durante 30min. Utilizou-se 10% em mol de 4-ABA em relação aos grupos hidroxilas do PVA e o pH do meio reacional foi ajustado para 1 com solução de HCl 6 mol·L<sup>-1</sup>. Transcorrido o tempo de 30min, elevou-se o pH até 8 com solução de NH<sub>4</sub>OH 20% e a mistura reacional foi transferida para membranas de diálise (MWCO 2000). O controle da diálise foi realizado através de teste de detecção de íons cloreto com solução de nitrato de prata 0,2 mol·L<sup>-1</sup>. Após a água utilizada na diálise apresentar resultado negativo no teste de íon cloreto, a solução foi liofilizada<sup>113, 133</sup> (Figura 29). Ao final desta reação, tem-se o PVA modificado com grupos metacrilóila e amina conforme a Figura 29.

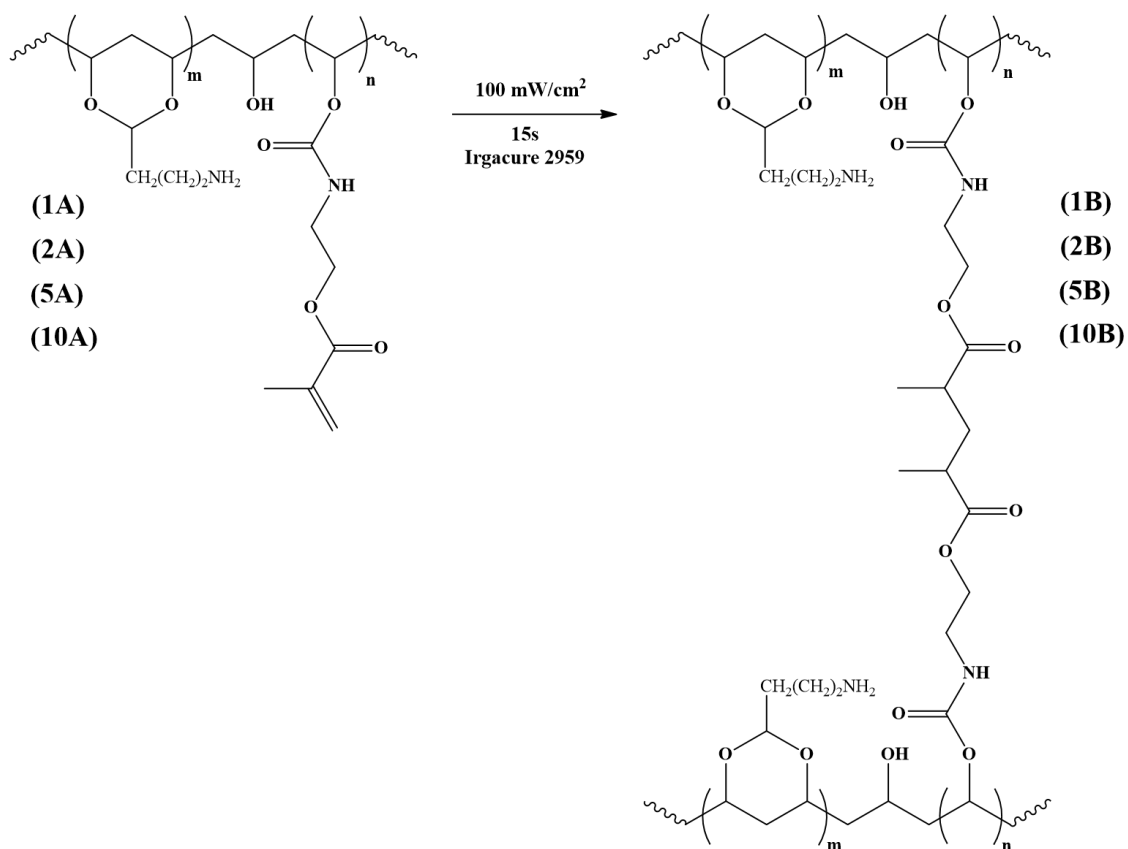


**Figura 29:** Reação de obtenção do PVA modificado com grupos amina.

#### 4.2.1.3 Síntese dos Hidrogéis Fotoreticulados

Hidrogéis foram obtidos a partir de solução aquosa a 1%, 2% e 3% m/v dos PVAs modificados com grupo amina (1A, 2A, 5A e 10A) na forma cilíndrica com diâmetros de aproximadamente 3 cm. Após diversos testes preliminares, foi escolhida a melhor condição para a reação de fotoreticulação. Foi adicionado 1% m/v de fotoiniciador (Irgacure 2959) e a solução foi exposta durante 15 s em lâmpada de Xenônio com potência de 300W e intensidade de 100mW/cm<sup>2</sup> (Figura 30).



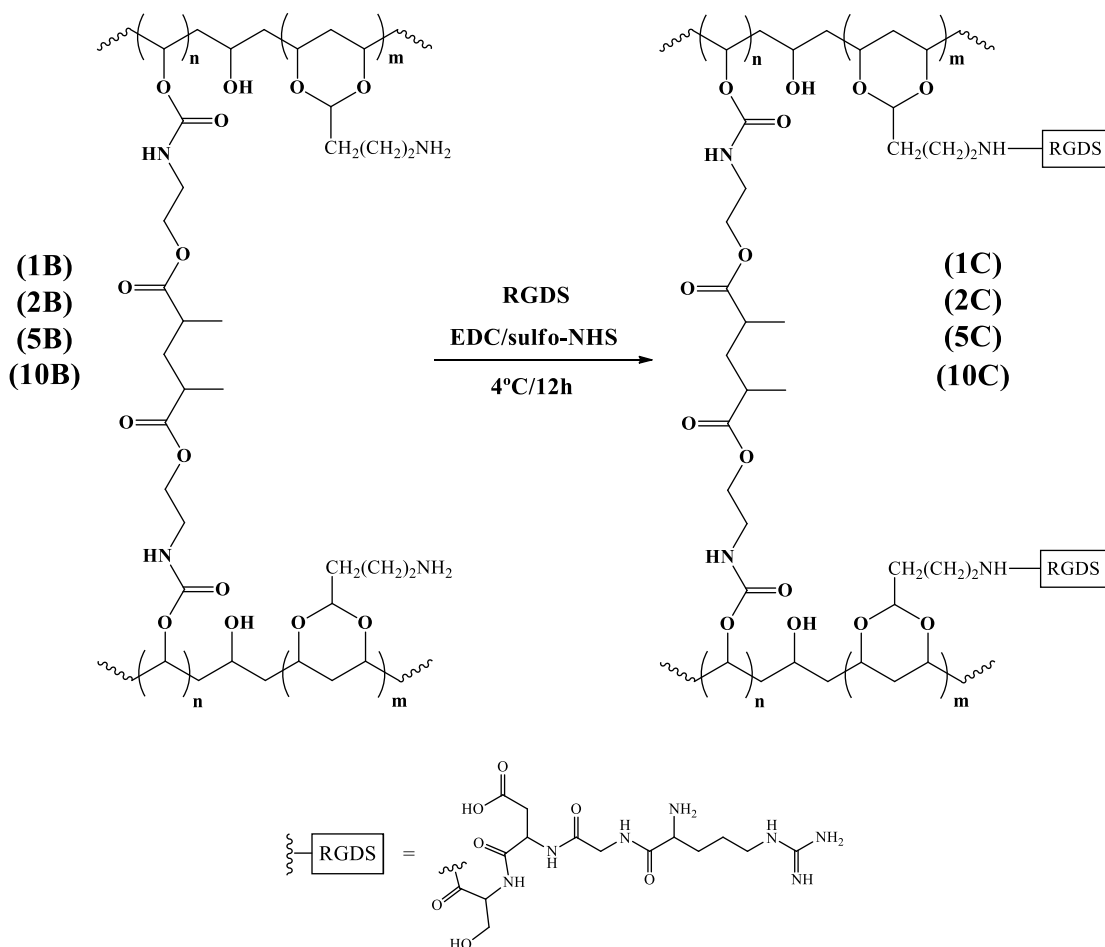


**Figura 30:** Reação de obtenção dos hidrogéis fotoreticulados.

#### 4.2.1.4 Funcionalização dos Hidrogéis Fotoreticulados

Os hidrogéis fotoreticulados foram então funcionalizados com a sequência peptídica arginina-glicina-ácido aspártico-serina (RGDS) via reação com carbodiimida. A primeira etapa é a ativação dos grupos ácidos do RGDS, que ocorre através da reação entre o hidrocloreto de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) e o sulfato *N*-hidroxisuccinimida (sulfo-NHS) utilizando o ácido 2-morfolinoetanosulfônico (MES) como tampão. Foi utilizado 2mM de sulfo-NHS e 5mM de EDC em 50mM de MES (pH 6, 0,5M NaCl), o período de ativação foi de 1h em temperatura ambiente.

A segunda etapa é a incorporação da sequência RGDS ao hidrogel. No meio reacional contendo EDC e sulfo-NHS foi adicionado 2,6 $\mu$ M de RGDS e logo após o hidrogel. O sistema foi mantido na temperatura de 4°C durante 12h com agitação magnética constante<sup>134, 135</sup> (Figura 31).

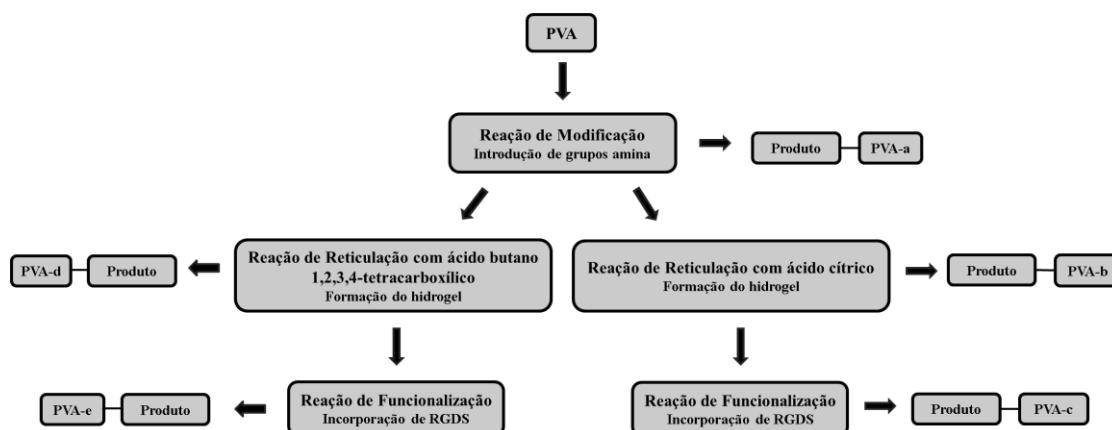


**Figura 31:** Reação de obtenção dos hidrogéis fotoreticulados funcionalizados com RGDS.

#### 4.3.1 Hidrogéis Quimicamente Reticulados

A fim de obter hidrogéis reticulados por método diferente do fotoquímico optou-se pela reticulação através de agentes químicos não citotóxicos, neste caso escolheu-se os poliácidos ácido cítrico e o ácido butano 1,2,3,4,-tetracarboxílico.

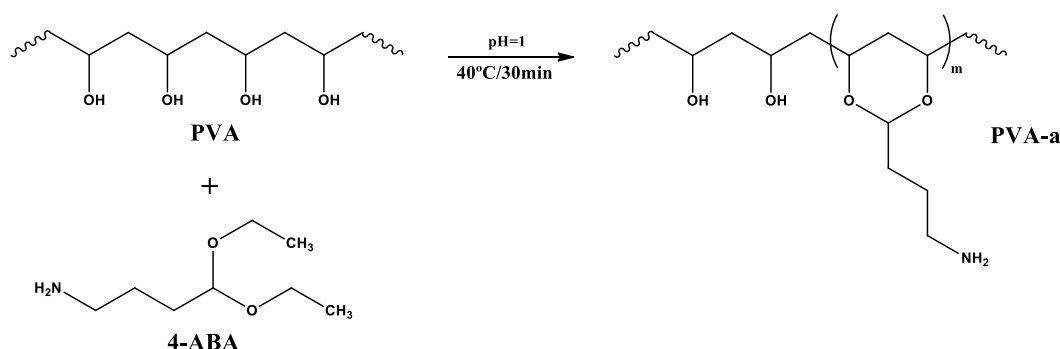
A fim de facilitar a compreensão das siglas utilizadas é apresentado um diagrama (Figura 32) das etapas da síntese dos hidrogéis quimicamente reticulados e a respectiva nomenclatura dos produtos obtidos em cada etapa.



**Figura 32:** Identificação dos produtos obtidos na reação de modificação, reticulação química e funcionalização do PVA.

#### 4.3.1.1 Reação de Modificação do PVA

Os polímeros reticulados por métodos químicos foram primeiramente modificados com grupos amina para permitir a posterior incorporação com o tetrapeptídeo RGDS. Assim, utilizou-se nessa etapa do trabalho a mesma metodologia empregada no item 4.2.1.2. A Figura 33 ilustra a reação envolvida.



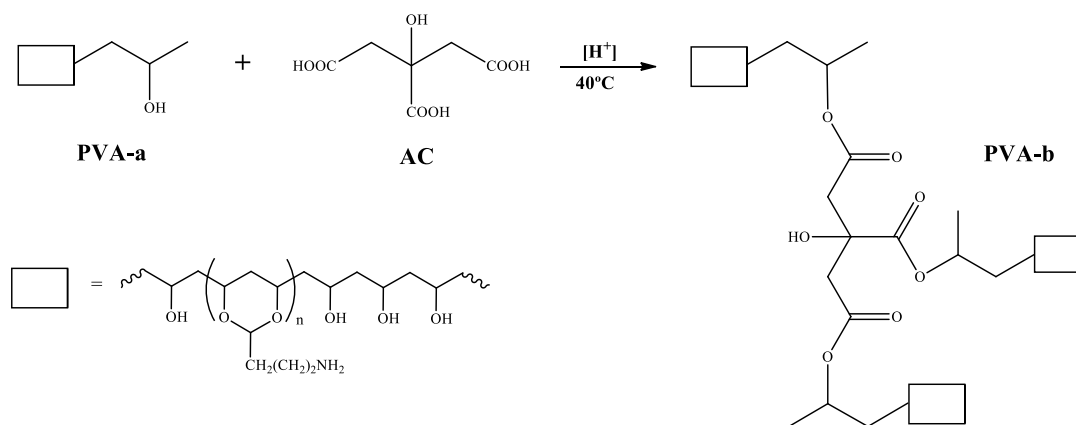
**Figura 33:** Reação de obtenção do PVA modificado com grupos amina.

#### 4.3.1.2 Síntese dos hidrogéis: reticulação com ácido cítrico

As proporções dos reagentes, concentração do catalisador, tempo e temperatura da reação foram escolhidas após repetições e adaptações da síntese de PVA reticulado com ácido adípico e ácido cítrico de Pereira (1995)<sup>64</sup>.

Para promover a reticulação do PVA-, foi empregada a solução aquosa a 5% m/v contendo 2% de ácido cítrico e 2% de solução de HCl 0,1mol·L<sup>-1</sup> como catalisador. O tempo de reação foi de 10 min na temperatura de 40°C com agitação magnética constante. Em seguida, a solução foi vertida em placa de petri e colocada na capela para

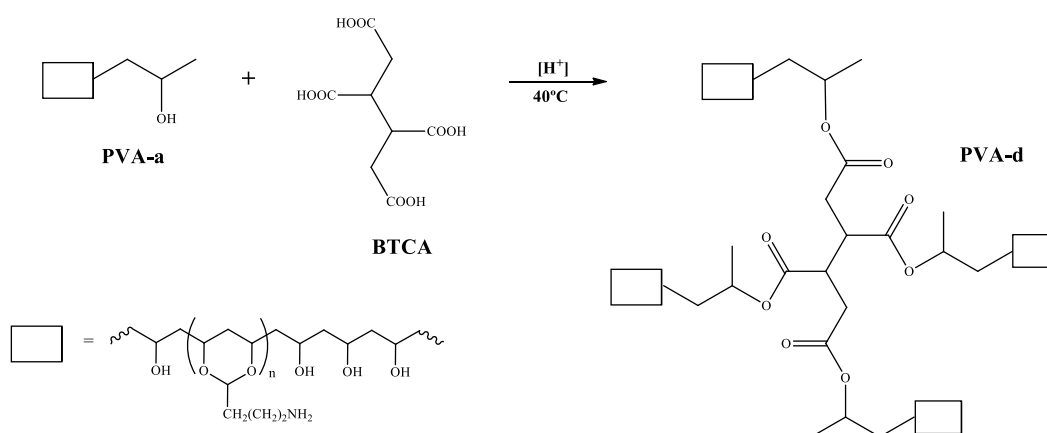
evaporação do solvente, nesta etapa a reação de esterificação do PVA com o agente reticulante foi completada (Figura 34).



**Figura 34:** Reação de obtenção dos hidrogéis reticulados com ácido cítrico.

#### 4.3.1.3 Síntese dos hidrogéis: reticulação com ácido butano 1,2,3,4,-tetracarboxílico

A reticulação do PVA-AM com ácido butano 1,2,3,4,-tetracarboxílico (BTCA) foi realizada utilizando a mesma metodologia empregada no item 4.3.1.2 (Figura 35).

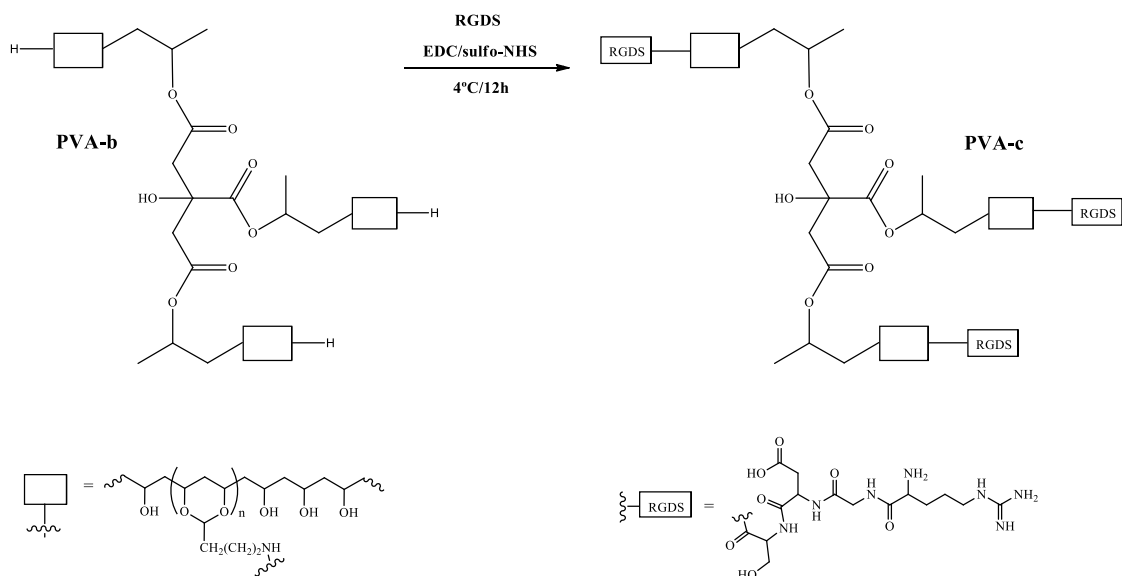


**Figura 35:** Reação de obtenção dos hidrogéis reticulados com BTCA.

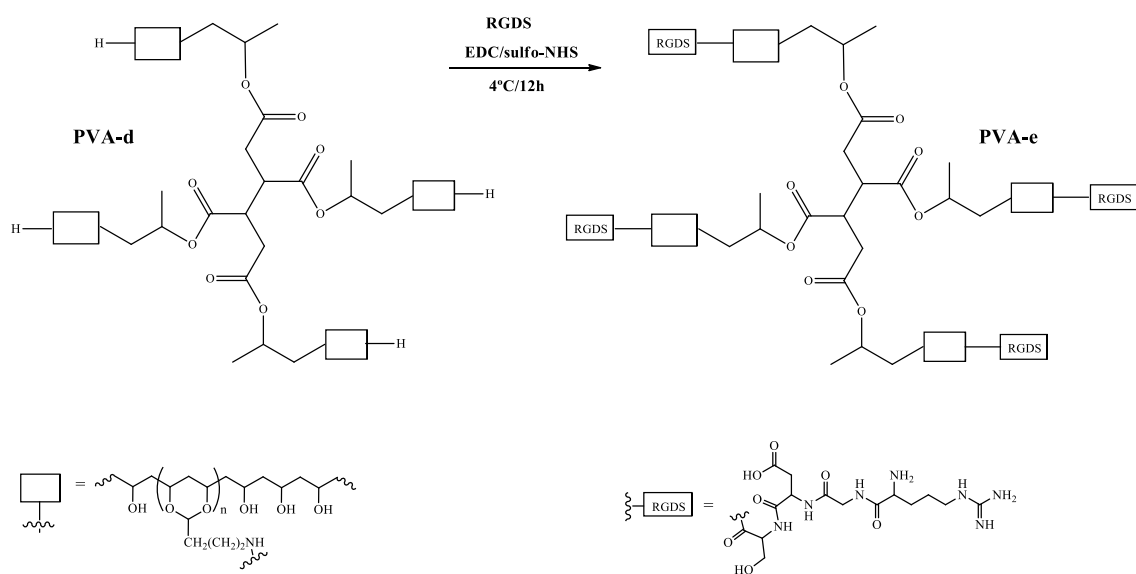
#### 4.3.1.4 Funcionalização com RGDS dos hidrogéis reticulados quimicamente

Os hidrogéis reticulados quimicamente com ácido cítrico e BTCA foram funcionalizados com RGDS via reação com carbodiimida utilizando a mesma metodologia empregada no item 4.2.1.4.

A reação encontra-se ilustrada nas Figuras 36 e 37 tanto para o hidrogel reticulado com ácido cítrico, quanto para o hidrogel reticulado com BTCA, respectivamente.



**Figura 36:** Reação de obtenção dos hidrogéis reticulados com ácido cítrico funcionalizados com RGDS.

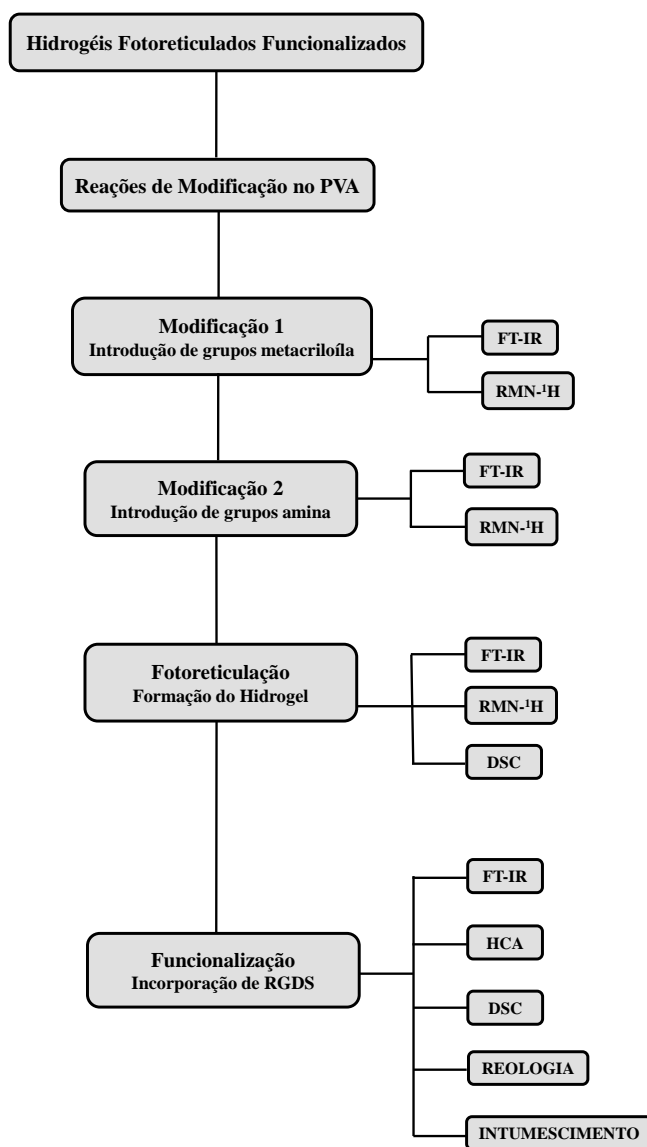


**Figura 37:** Reação de obtenção dos hidrogéis reticulados com BTCA funcionalizados com RGDS.

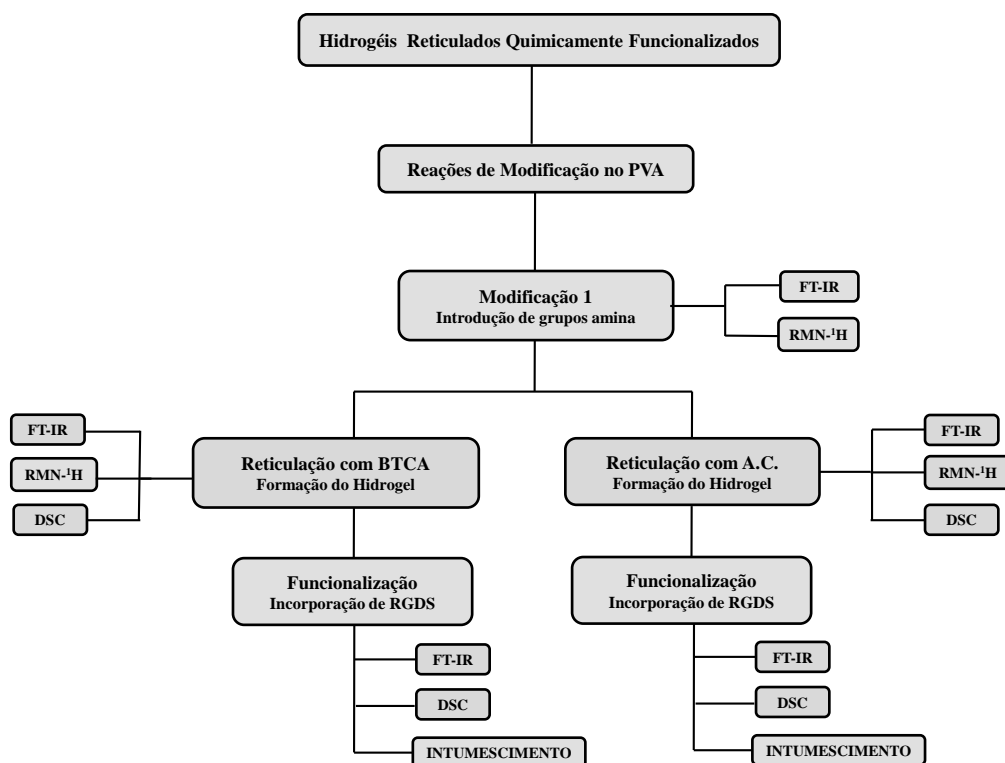
#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS DE PVA MODIFICADOS E FUNCIONALIZADOS

Todas as técnicas de caracterização e foram realizadas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com exceção dos experimentos de reologia, que foram realizadas no Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, na Universidade Federal do Paraná.

Abaixo, fluxogramas são apresentados para ilustrar a sequência das análises utilizadas para caracterização dos hidrogéis modificados e funcionalizados. As caracterizações dos hidrogéis obtidos pelo método fotoquímico estão esquematizadas na Figura 38 e as caracterizações dos hidrogéis obtidos por reticulantes químicos estão esquematizadas na Figura 39.



**Figura 38:** Análises utilizadas para caracterizar os hidrogéis fotoreticulados.



**Figura 39:** Análises utilizadas para caracterizar os hidrogéis reticulados quimicamente.

#### 4.4.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR)

Para a realização destas análises foi utilizado o equipamento marca Varian. As medidas foram realizadas na faixa de  $4.000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  e 40 varreduras no modo de reflectância Total Atenuada (ATR).

#### 4.4.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-<sup>1</sup>H)

As análises de RMN-<sup>1</sup>H foram realizadas utilizando o equipamento marca Varian. Os espectros foram obtidos a 400MHz e o solvente utilizado foi água deuterada.

#### 4.4.3 Análise Hierárquica por Agrupamentos (HCA)

Os dados de FT-IR das amostras 1B, 2B, 10B, 1C, 2C e 10C foram analisados através da técnica quimiométrica Análise Hierárquica por Agrupamentos (do inglês *hierarchical cluster analysis*). O software utilizado foi o Matlab 7.11 (MathWorks Inc., Natick, MA), rotina do PLS Toolbox 6.2.1 (Eigenvector Research Inc.).

#### 4.4.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As medidas de Calorimetria Exploratória Diferencial foram realizadas em um equipamento DSC Q2000 TA Instruments, utilizando atmosfera de nitrogênio. Para a realização das análises foram utilizadas em torno de  $7,0 \pm 0,3$  mg. As amostras foram aquecidas da temperatura ambiente até  $150^{\circ}\text{C}$ , com isoterma de cinco minutos. As amostras foram então resfriadas até  $0^{\circ}\text{C}$  e aquecidas novamente até  $250^{\circ}\text{C}$ . As análises foram conduzidas a uma taxa de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ .

#### 4.4.5 Estudo Reológico

As medidas reológicas sob cisalhamento oscilatório foram obtidas utilizando o equipamento Themo Scientific - Reoterm, modelo Haake Mars - Modular Advanced Rheometer System. A geometria utilizada foi de placas paralelas com espaçamento entre as placas (GAP) de 0,8 mm. Todas as medidas foram realizadas na temperatura de  $36,5^{\circ}\text{C}$  no modo tensão controlada. Primeiramente, foi realizada uma varredura de tensão a fim de escolher a região de viscoelasticidade linear, nessa região ambos os módulos ( $G'$  e  $G''$ ) são independentes da tensão aplicada.

#### 4.4.6 Teste de Intumescimento

Os testes de intumescimento foram realizados a  $36^{\circ}\text{C}$  e o solvente utilizado foi água deionizada (pH 6). As amostras secas e previamente pesadas (10 mg) foram imersas em água e em intervalos pré-definidos (0,25; 0,75; 1,25; 1,75; 18; 24 e 48 horas) as amostras foram removidas e secas com auxílio de papel filtro para remover o excesso de água superficial e pesadas em balança analítica.

O grau de intumescimento, expresso em porcentagem, foi calculado conforme a equação 7<sup>86</sup>.

$$\frac{M_t - M_0}{M_0} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

Onde  $M_t$  representa a massa da amostra intumescida no tempo  $t$  e  $M_0$  à massa inicial da amostra seca.

#### 4.4.7 Citotoxicidade e Adesão Celular

Para realização de ensaio visual de citotoxicidade foi utilizado células frescas *cumulus oophorus* extraídos de complexos de cumulus oophorus (CCOs) de ovários bovinos captados em matadouros comerciais.



Os hidrogéis foram colocados em placa de quatro poços (Nunc™) e cobertas com o meio TCM199. Células *cumulus oophorus* foram mecanicamente isoladas de COCs e colocadas sobre a superfície dos hidrogéis. Cultivou-se a 38,5°C durante 48 h, em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. Após a cultura, as células de *cumulus* e os hidrogéis foram fixados com 4% paraformaldeído durante 5 min à temperatura ambiente.

Os hidrogéis foram corados com soluções de hematoxilina e eosina durante 5 minutos em cada solução. A análise visual da viabilidade celular foi realizada em um microscópio óptico Olympus BX41.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor visualização e entendimento, as seções a seguir foram divididas conforme o método de reticulação empregado para a obtenção dos hidrogéis.

### 5.1 HIDROGÉIS FOTORETICULADOS

#### 5.1.1 Síntese e Caracterização Espectroscópica

##### 5.1.1.1 PVA modificado com grupos metacrilóila

A espectroscopia na região do infravermelho foi utilizada para caracterizar o polímero puro (PVA), o reagente responsável pela modificação (2-ICEMA) e os materiais obtidos (1, 2, 5, 10). Em particular, FTIR foi utilizado para identificar se ocorreram mudanças nos grupos funcionais característicos dos materiais obtidos, em comparação aos grupos funcionais característicos dos compostos de partida, avaliando assim a eficiência da reação utilizada para a modificação do PVA.

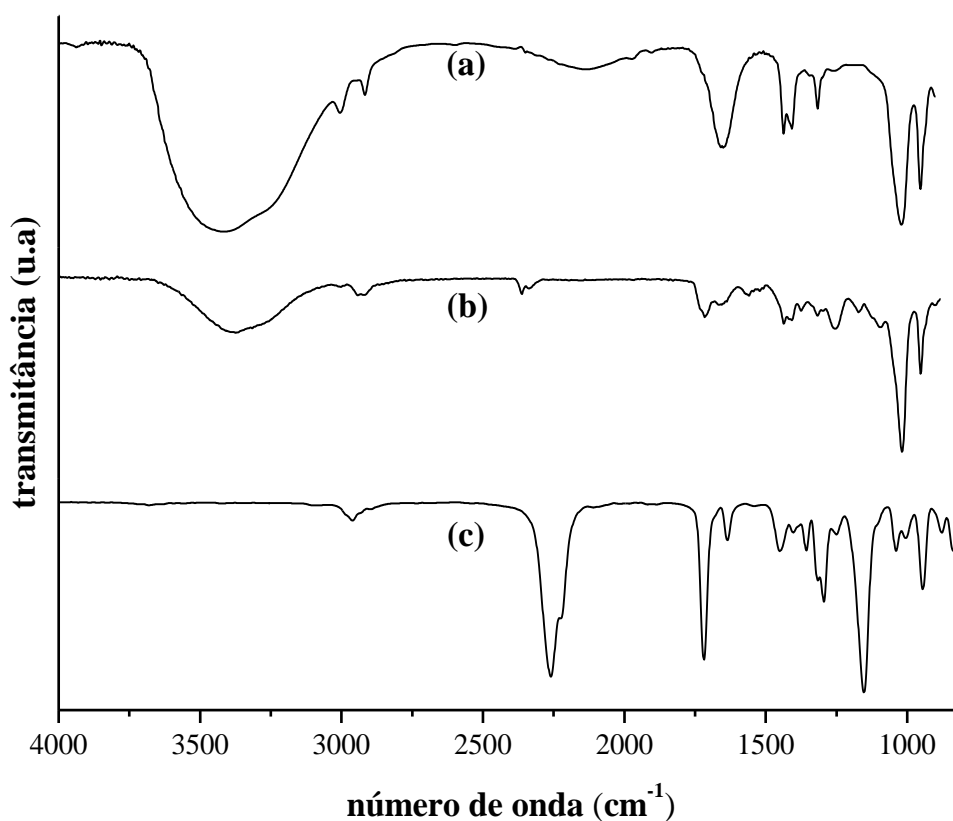
Na Tabela 1 estão listadas as principais bandas presentes no espectro de FTIR do poli (álcool vinílico).

**Tabela 1:** Relação das bandas do PVA obtidas por espectrofotometria no infravermelho.

Grupo característico	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Referência
v O-H da ligação de hidrogênio intra/intermolecular	3500 - 3200	136
v C-H de alcanos	3000 - 2900	136
δ C=O de éster	1650	48, 137
v C-O de éster	1320	48, 137
δ C-H de CH <sub>3</sub>	1440	136
v C-O de álcool	1020	136

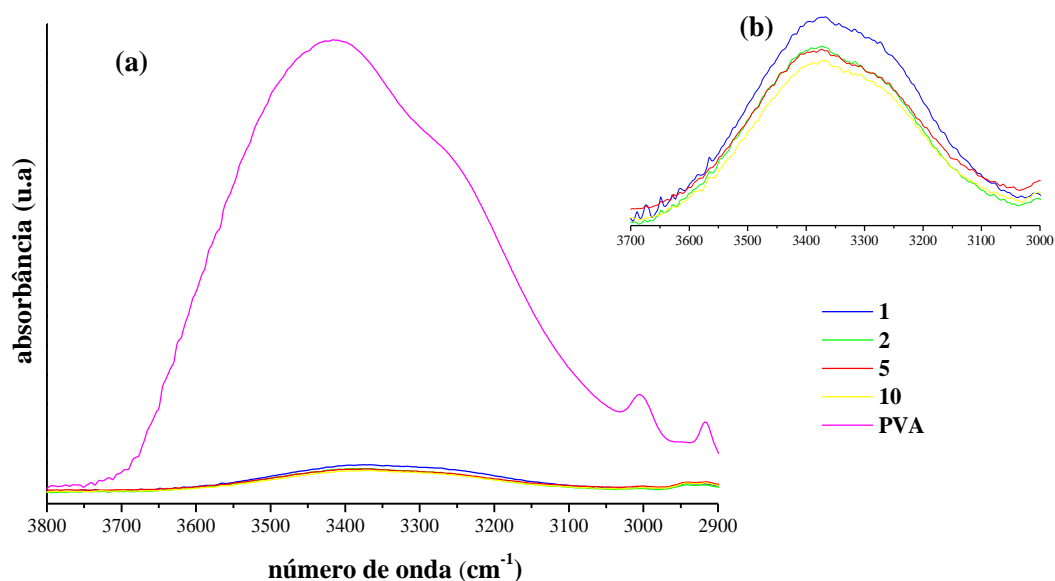
Um espectro típico do PVA é observado na Figura 40, mostrando a banda larga entre 3500-3200 cm<sup>-1</sup> que está relacionada com o estiramento O-H das ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares, e as bandas em 1650 cm<sup>-1</sup> e 1320 cm<sup>-1</sup>, atribuídas aos estiramentos C=O e C-O dos grupos acetatos remanescentes do PVA, respectivamente. Ainda na Figura 40 os espectros do PVA, 2-ICEMA e um dos produtos obtidos (10) são apresentados. Os espectros das amostras 1, 2, 5 e 10 são

sobreponíveis, então será apresentado somente o espectro da amostra 10, a título representativo. Os outros espectros se encontram no Anexo. A banda existente no 2-ICEMA em  $2250\text{ cm}^{-1}$  referente ao grupo isocianato<sup>138</sup> tem a sua intensidade bastante reduzida, quase inexistente, nos polímeros modificados obtidos, confirmando assim a introdução de grupamentos metacrilóila na cadeia polimérica do PVA.



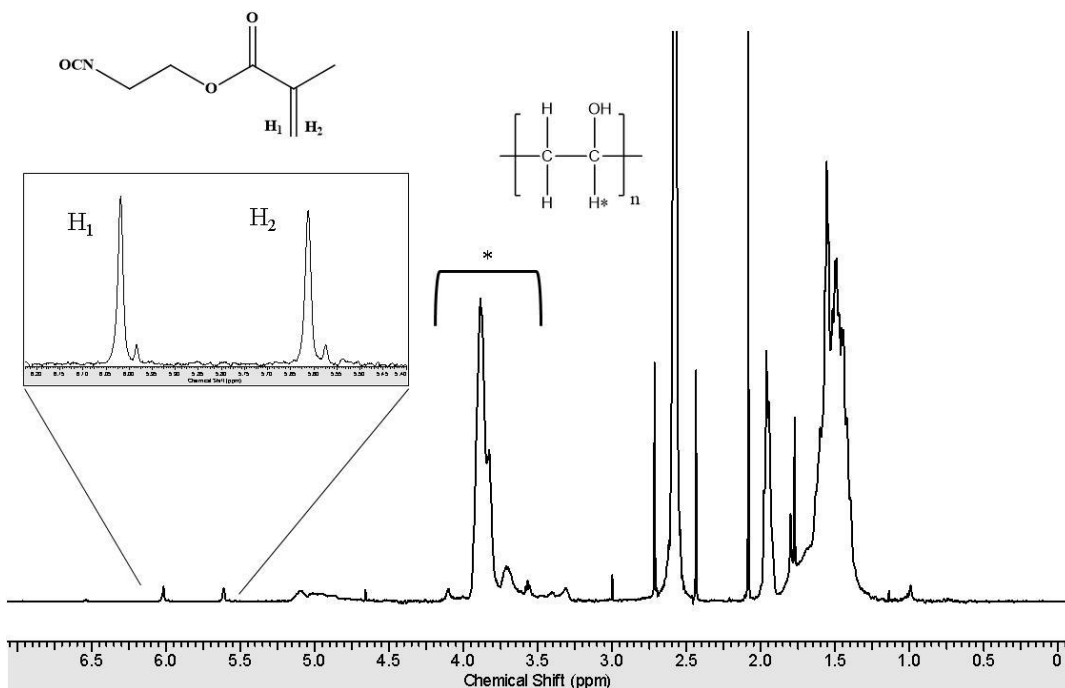
**Figura 40:** Espectros na região do infravermelho para: (a) PVA, (b) polímero modificado obtido (10) e (c) reagente de modificação (2-ICEMA).

A extensão da reação pode ser vista pela diminuição da intensidade da banda referente ao OH do PVA, em comparação aos polímeros modificados obtidos, conforme mostra os espectros de FTIR em absorbância da Figura 41. Pela análise da Figura 41 observa-se que conforme aumenta o teor do reagente 2-ICEMA (1, 2, 5 e 10%) utilizado nas reações de modificação 1, a banda referente ao grupo hidroxila nos materiais obtidos (1, 2, 5 e 10) apresenta menor intensidade de absorbância.



**Figura 41:** (a) Espectros na região entre 3800-2900  $\text{cm}^{-1}$  no infravermelho, em absorbância, para o polímero puro (PVA) e os polímeros modificados obtidos (1, 2, 5 e 10) e em (b) ampliação da região entre 3700-3000  $\text{cm}^{-1}$  para os polímeros modificados obtidos (1, 2, 5 e 10).

A confirmação da introdução dos grupos metacrilóila na cadeia do PVA é dada pelo espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Figura 42) da amostra 10. Os espectros das outras amostras estão dispostos em Anexo. Há dois picos distintos na região de ligação dupla (5,6 e 6 ppm), os quais estão correlacionados com os hidrogênios  $\text{H}_1$  e  $\text{H}_2$  do reagente 2-ICEMA<sup>92, 132, 139</sup> e que confirmam a modificação realizada na reação 1. O sinal entre 3,5-4 ppm é referente ao H do PVA assinalado ( $\text{H}^*$ ). Os demais sinais são referentes aos hidrogênios que não estão assinalados<sup>92, 139</sup>.



**Figura 42:** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do polímero modificado 10 em D<sub>2</sub>O.

O grau de substituição da reação 1 ( $GS_1$ ) foi calculado a partir dos espectros de RMN-<sup>1</sup>H. Onde a razão entre a média aritmética das áreas dos hidrogênios vinílicos ( $H_1$  e  $H_2$ ) dos grupos metacrilóila e a área total, dada pela soma da média das áreas dos hidrogênios  $H_1$  e  $H_2$  e dos hidrogênios hidroxílicos ( $H^*$ ) (Equação 8)<sup>139</sup>.

$$GS_1 = \left[ \frac{(A(H_1) + A(H_2))/2}{(A(H_1) + A(H_2))/2 + A(H^*)} \times 100 \right] \quad \text{Equação 8}$$

O número de reticulações por cadeia do polímero foi calculado através da Equação 9<sup>92</sup>. Onde MM é a massa molecular e UR representa a unidade repetitiva do polímero.

$$\text{Reticulação por cadeia} = GS_1 \left( \frac{MM_{polimero}}{MM_{UR}} \right) \quad \text{Equação 9}$$

O grau de substituição ( $GS_1$ ) para cada polímero modificado obtido está listado na Tabela 2, juntamente com o número de reticulações por cadeia.

**Tabela 2:** Grau de substituição para a reação de modificação 1 do PVA e número de reticulações por cadeia para os polímeros modificados 1, 2, 5 e 10.

<b>Polímero Modificado</b>	<b>GS teórico (%)</b>	<b>GS<sub>1</sub> (%)</b>	<b>Reticulações por cadeia</b>
1	1	1,9	4,5
2	2	3,5	8,3
5	5	4,3	10,2
10	10	9,1	21,6

Verifica-se que, nas proporções de reagentes em que a reação 1 foi realizada, a modificação ocorreu com alto grau de substituição, sendo assim satisfatória. Stephanie J. Bryant e colaboradores<sup>140</sup> utilizaram o 2-ICEMA para introduzir grupos fotopolimerizáveis no hidrogel de poli (álcool vinílico)/sulfato de condroitina e obtiveram eficiência de 80-100%.

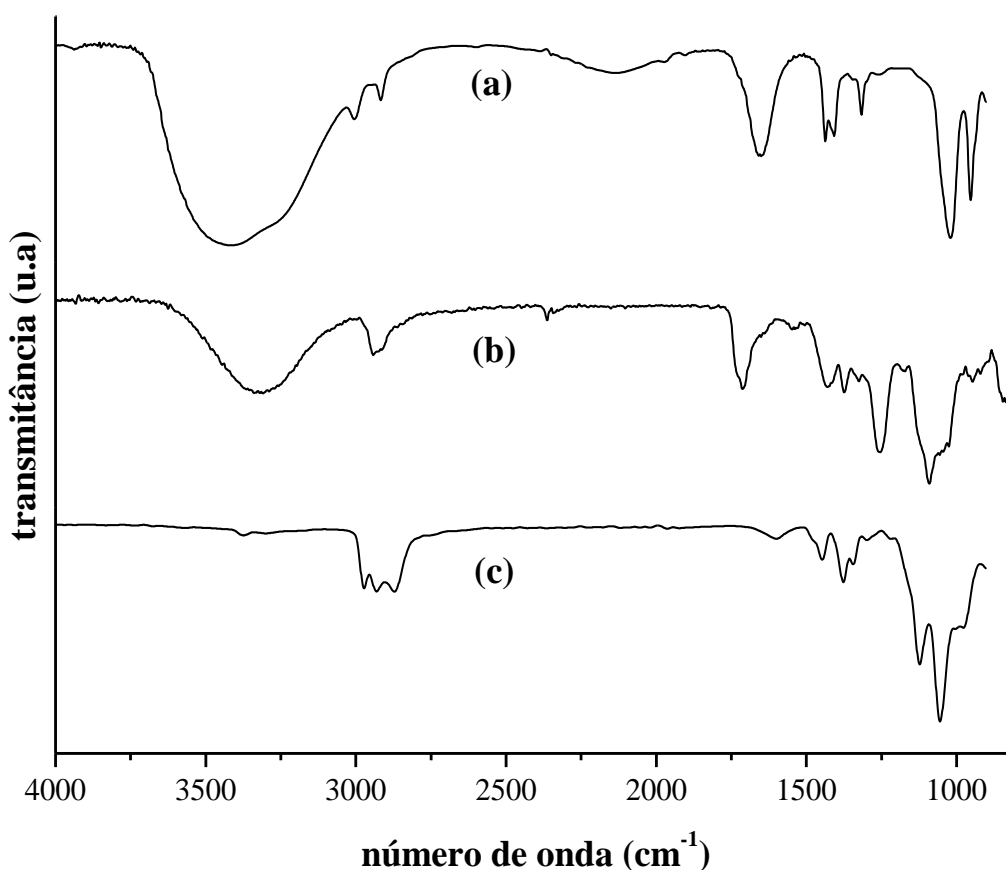
Joydip Kundu e colaboradores<sup>92</sup> modificaram o hidrogel de poli (álcool vinílico)/fibroína de seda e também obtiveram um rendimento alto na reação utilizando o 2-ICEMA. Além do alto rendimento a reação se processa em meio homogêneo, condições suaves e tempo relativamente curto, algo que outras rotas de modificação<sup>80, 93, 141</sup> não oferecem.

O número de reticulações por cadeia obedeceu ao esperado, ou seja, aumentou conforme aumentou o grau de substituição (GS<sub>1</sub>). Além disso, observa-se que quanto maior a quantidade de grupos metacrilóila adicionada ao PVA, mais reticulada será a estrutura do hidrogel resultante. Igualmente, o valor encontrado para o número de reticulações por cadeia do polímero modificado 1 corrobora com o valor encontrado no trabalho de Kundu<sup>92</sup>, onde foram obtidas 4 reticulações por cadeia para o teor de 1% de funcionalização do PVA.

#### **5.1.1.2 PVA modificado com grupos amina**

Após a liofilização, os polímeros modificados com grupos amina foram caracterizados por espectroscopias de FTIR e de RMN-<sup>1</sup>H. O espectro no infravermelho para a amostra 10A é apresentado na Figura 43, os espectros das outras amostras estão dispostos em anexo. É possível observar alteração na banda presente em 1250 cm<sup>-1</sup> quando comparado com o polímero modificado obtido na primeira reação de

modificação do PVA (Figura 40). Essa alteração (banda mais intensa) pode ser atribuída à formação de ligação acetal (éter cíclico)<sup>136, 142</sup>. Outra alteração associada à formação da ligação acetal é observada na banda de estiramento C-O<sup>143</sup>, presente em 1020 cm<sup>-1</sup>, que passa a apresentar menor intensidade e tem sua posição alargada devido à presença da ligação C-N que aparece em região próxima (1090 cm<sup>-1</sup>).

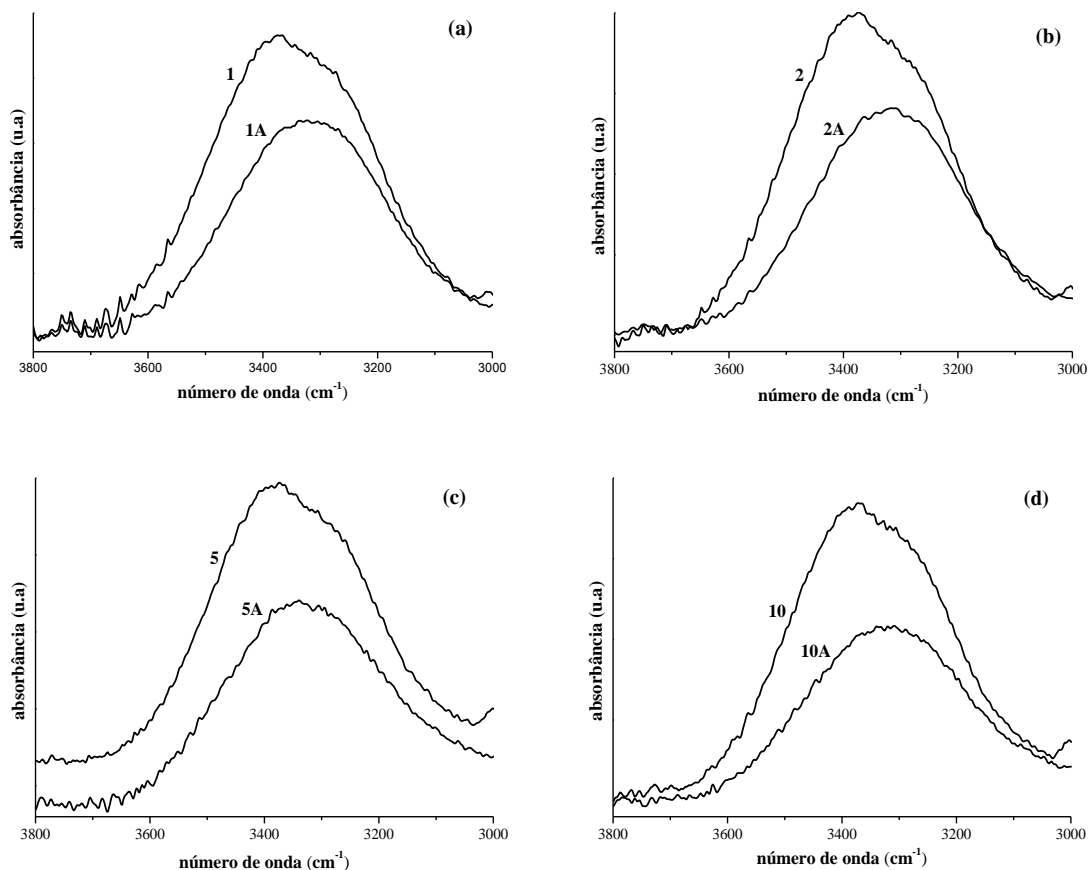


**Figura 43:** Espectros na região do infravermelho para: (a) PVA, (b) polímero modificado obtido (10A) e (c) reagente de modificação (4-ABA).

A extensão da reação pode ser observada quando os espectros no infravermelho dos polímeros modificados com grupos amina (1A, 2A, 5A e 10A) são comparados com os polímeros modificados com grupos metacrilóila (1, 2, 5 e 10) (Figura 44). A banda de OH apresenta diminuição de sua intensidade nos materiais onde foi incorporado grupos amina, esse comportamento é observado em todos os polímeros modificados.

Embora os dados obtidos por FT-IR não sejam conclusivos, eles indicam possíveis mudanças estruturais no polímero, após a reação de modificação. A confirmação da introdução dos grupos amina na cadeia do polímero é dada por RMN-

$^1\text{H}$ , cujo espectro da amostra 10A é apresentado na Figura 45. Os espectros das outras amostras estão dispostos em Anexo.



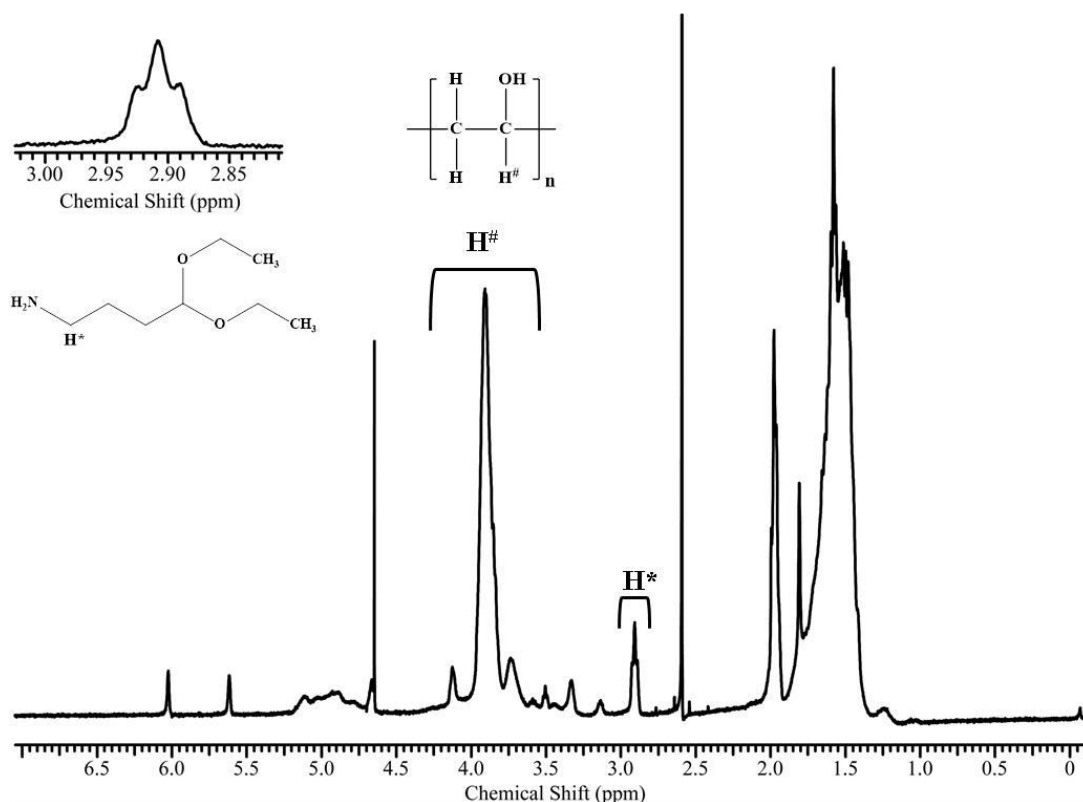
**Figura 44:** Espectros na região entre 3800-3000  $\text{cm}^{-1}$  do infravermelho, em absorbância, (a) 1 e 1A; (b) 2 e 2A; (c) 5 e 5A; (d) 10 e 10A.

A Figura 45 mostra a presença de um pico em 2,9 ppm referente aos hidrogênios assinalados ( $\text{H}^*$ ), esse sinal confirma a introdução dos grupos amina à cadeia polimérica do PVA. O sinal entre 3,5-4 ppm é referente ao hidrogênio do PVA assinalado ( $\text{H}^\#$ ).

Com os espectros de  $\text{RMN-}^1\text{H}$  foi calculado o grau de substituição ( $\text{GS}_2$ ) de cada polímero obtido através da razão entre as áreas dos hidrogênios do carbono ligado ao grupo amina e a área total, dada pela soma da área dos hidrogênios  $\text{H}^*$  (referentes aos grupos amina) e dos hidrogênios  $\text{H}^\#$  (referentes aos hidrogênios hidroxílicos do PVA) do grupo amina e dos hidrogênios hidroxílicos, multiplicando o resultado por 100, como mostrado na Equação 10<sup>132, 139</sup>.



$$GS_2 = \left[ \frac{A(H^*)}{A(H^*) + A(H^\#)} \times 100 \right] \quad \text{Equação 10}$$



**Figura 45:** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do polímero modificado 10A em D<sub>2</sub>O. A esquerda a ampliação na região entre 2,8 e 3,2 ppm.

A tabela 3 mostra o grau de substituição  $GS_2$  para os polímeros obtidos a partir da reação de modificação 2 do PVA. Verifica-se que, nas proporções de reagentes em que a reação 2 foi realizada, a modificação ocorreu com alto grau de substituição, indo de encontro aos dados encontrados na literatura<sup>132</sup>.

A inserção de grupos amina é realizada para a posterior funcionalização com RGDS ser possível. A inserção do tetrapeptídeo RGDS à cadeia do PVA ocorre por meio de ligação amida, resultante entre o grupo amina inserido no PVA com a reação de modificação 2 e o grupo ácido carboxílico presente na unidade serina (S) do tetrapeptídeo RGDS. As propriedades mecânicas e de biocompatibilidade juntamente com o baixo custo e facilidade de produção do PVA<sup>144</sup> justificam o uso das três reações utilizadas (modificação 1 e 2 e a reação de fotoreticulação) para obter hidrogéis capazes de se ligar ao peptídeo.

**Tabela 3: Grau de substituição para a reação de modificação 2 do PVA.**

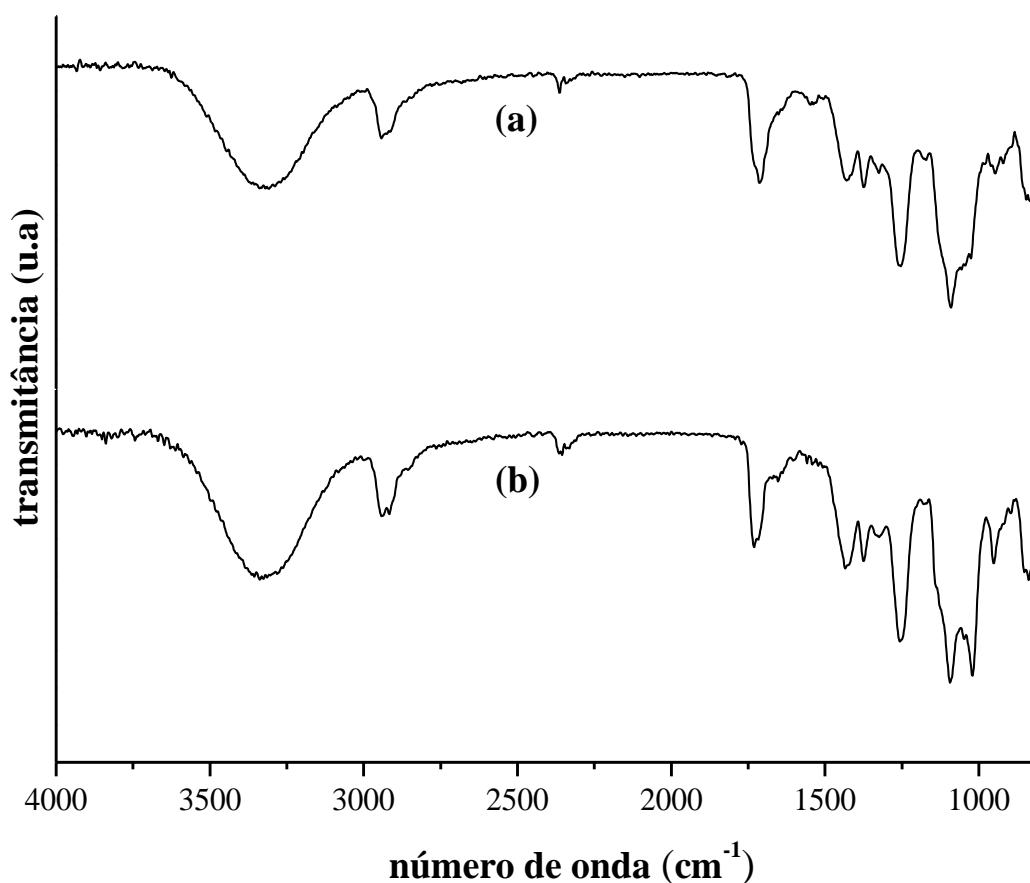
<b>Polímero Modificado</b>	<b>GS teórico (%)</b>	<b>GS<sub>2</sub> (%)</b>
1A	10	9,7
2A	10	8,8
5A	10	7,2
10A	10	13,2

### **5.1.1.3 Hidrogéis fotoreticulados**

Hidrogéis foram obtidos após a reticulação utilizando a lâmpada policromática (item 4.2.1.3), a partir de solução aquosa dos polímeros contendo grupos amina (1A, 2A, 5A e 10A) nas concentrações de 1, 2 e 3% m/v. Os hidrogéis foram caracterizados por espectroscopias de FTIR e de RMN-<sup>1</sup>H. Os espectros no infravermelho para os hidrogéis obtidos (1B, 2B, 5B e 10B) são praticamente sobreponíveis, então será apresentado somente um espectro (Figura 46) a título representativo (amostra 10C na concentração de 3%), os demais espectros encontram-se em anexo.

Observando o espectro constata-se que é bastante similar ao espectro apresentado do PVA modificado com grupos amina (10A). Assim pode-se afirmar que a adição do fotoiniciador não induz modificações nos grupos químicos do polímero, apenas reticulou sua estrutura.

A. Gupta<sup>54</sup> e colaboradores investigaram a eficácia do hidrogel de PVA reticulado com persulfato de potássio como material para curativo. A espectroscopia de FTIR foi utilizada para analisar as mudanças no PVA após a reticulação e mostrou que a estrutura não foi modificada, a não ser pela conversão do OH em C=O, a qual faz parte das reações radiculares envolvidas no processo de reticulação. Já Qiaozhi An, Catherine Beh e Huining Xiao<sup>100</sup> modificaram o PVA pela introdução de grupos acetaldeído e após utilizaram glutaraldeído como agente reticulante. Os espectros de FTIR e de RMN-<sup>1</sup>H também mostraram que o reticulante não alterou a estrutura química do hidrogel, criando somente uma rede reticulada.

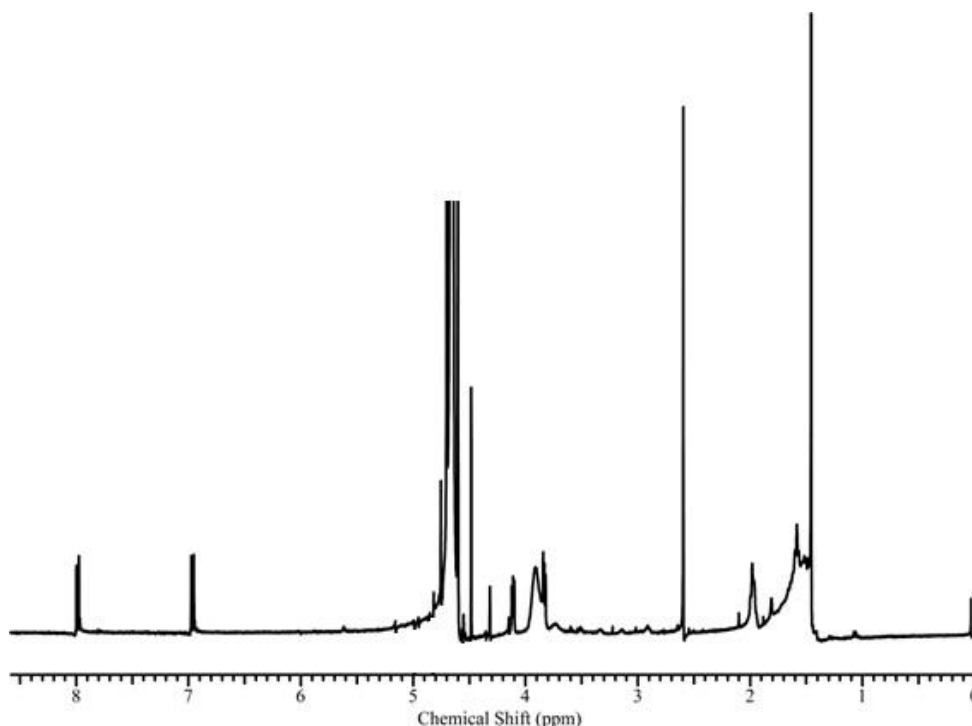


**Figura 46:** Espectro na região do infravermelho para: (a) o polímero modificado 10A, (b) o polímero reticulado 10B.

Os espectros de RMN-<sup>1</sup>H dos hidrogéis também mostram que a reticulação não afetou a estrutura química do polímero, ocorreu apenas o desaparecimento dos sinais em 5,6 e 6 ppm referentes aos grupos metacrilóila. A Figura 47 representa o espectro para a amostra 10B. Os sinais referentes à cadeia do PVA estão presentes, e os sinais em 5,6 e 6 ppm dos grupos metacrilóilas desapareceram, o que era esperado uma vez que é a partir destes grupos que a reticulação ocorre. Jeon e co-autores<sup>145</sup> também observaram o desaparecimento dos sinais referentes aos grupos metacrilóila do metacrilato de 2-amino etila no espectro de RMN-<sup>1</sup>H do hidrogel de alginato sintetizado. Outra alteração presente são os sinais em 7 e 8 ppm, os quais são atribuídos ao resíduo do fotoiniciador empregado (I-2959), Jeon<sup>145</sup> também identificou resíduos de fotoiniciador (D-2959) no hidrogel.

Os sinais do fotoiniciador em 7 e 8 ppm são confirmados ao comparar os espectros de RMN-<sup>1</sup>H do hidrogel e do fotoiniciador. Como a quantidade de fotoiniciador utilizada é pouca e a quantidade que não reagiu é menor ainda, a técnica

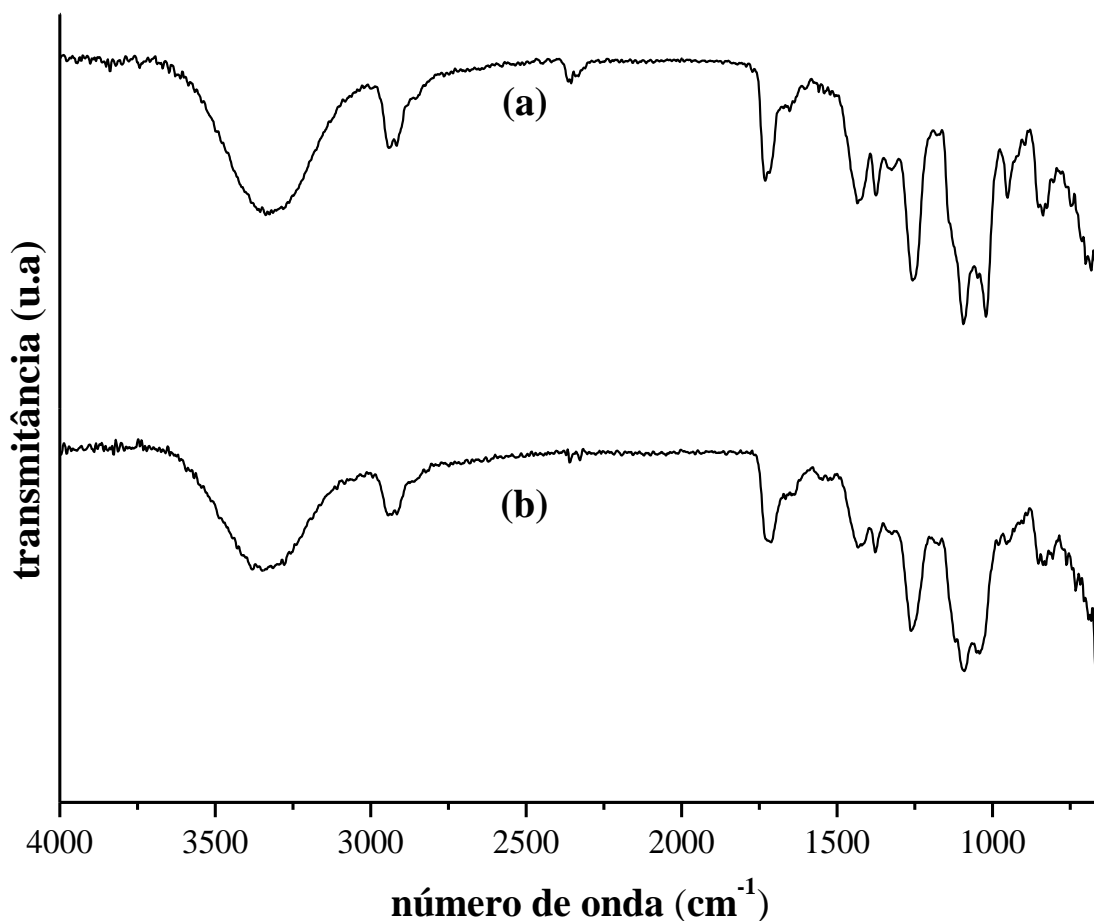
de infravermelho não possui sensibilidade o suficiente para identificação do fotoiniciador, o que é possível através da técnica de ressonância magnética de próton. A única alteração presente no FT-IR da Figura 46 ocorre em aproximadamente  $1000\text{ cm}^{-1}$  (ligeiro desdobramento). Essa banda pode ser atribuída à ligação C-O, pois após a reticulação os grupamentos metacrilóílas não se enquadram como ramificações da cadeia polimérica, mas sim agentes de ligação entre as cadeias do PVA.



**Figura 47:** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  do polímero reticulado 10B em  $\text{D}_2\text{O}$ .

#### 5.1.1.4 Hidrogéis funcionalizados com RGDS

Após a funcionalização dos hidrogéis com RGDS estes foram caracterizados por espectroscopias de FT-IR e Análise Hierárquica por Agrupamentos (HCA). Os espectros de infravermelho para os hidrogéis (1C, 2C, 5C e 10C) em todas as três concentrações empregadas são sobreponíveis, então novamente será apresentado somente um espectro (Figura 48) a título representativo (10C na concentração de 3% m/v).



**Figura 48:** Espectro na região do infravermelho para: (a) o polímero reticulado 10B, (b) o polímero reticulado e funcionalizado 10C.

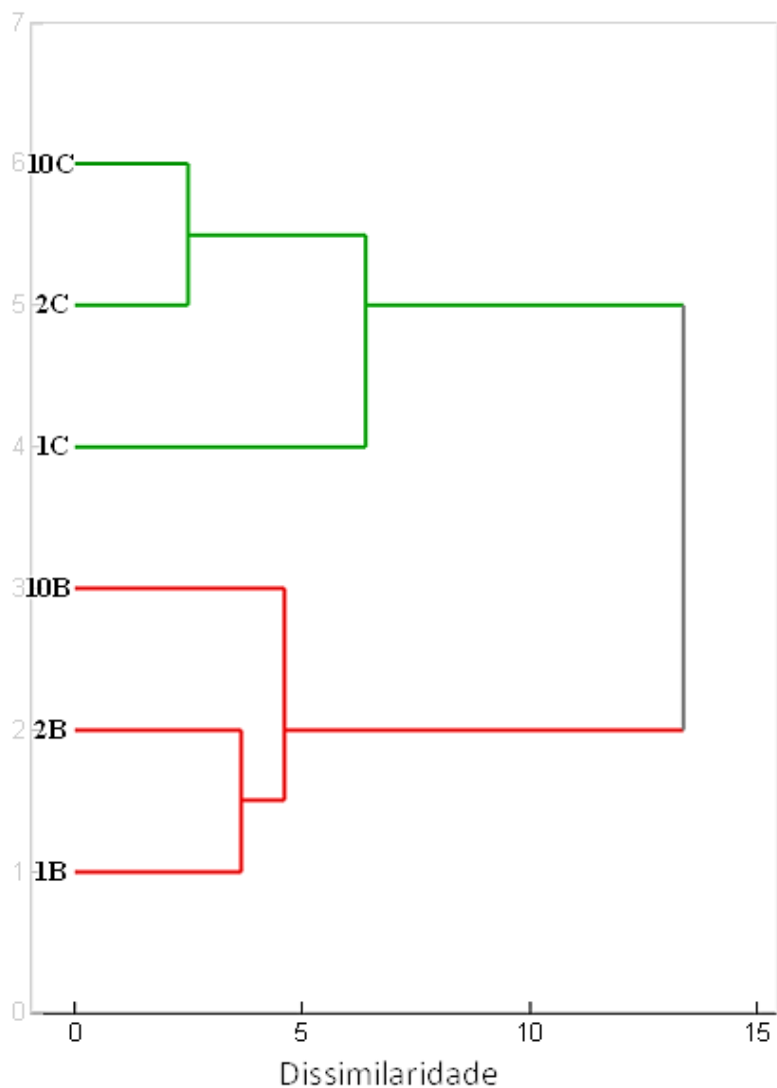
A Figura 48 não apresenta nenhuma alteração nas bandas referentes aos grupos funcionais, quando comparado com o espectro do hidrogel 4B. A alteração esperada seria a presença da banda característica de amida, uma vez que a reação de funcionalização do hidrogel ocorre entre a amina terminal e o grupo ácido da serina presente na sequência tetrapeptídica RGDS. Porém, a banda da amida aparece acima de  $3000\text{ cm}^{-1}$ , mesma região onde se encontra a banda de OH do álcool e devido à banda de OH ser bastante larga e intensa, a banda da amida fica mascarada e sua identificação não é possível. Outra banda característica da amida aparece entre  $650\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ , porém essa região se localiza dentro da zona de “impressão digital” fazendo com que a identificação de grupos funcionais não seja confiável para a técnica de infravermelho que se utilizou. A dificuldade de observar as diferenças antes e após a funcionalização com RGDS é clara e, por esse motivo, optou-se por empregar uma ferramenta estatística de separação por similaridade chamada Análise Hierárquica por Agrupamentos (HCA).

O uso da HCA tem como objetivo principal agrupar as amostras em classes, baseando-se na similaridade dos participantes de uma mesma classe e nas diferenças entre os membros de classes diferentes. A representação gráfica obtida é chamada de dendrograma, um gráfico bidimensional independentemente do número de variáveis do conjunto de dados<sup>146, 147</sup>.

Diversos trabalhos utilizam a espectroscopia de infravermelho aliada a ferramentas quimiométricas para extrair informações quantitativas e qualitativas. O trabalho de M. Prieto<sup>148</sup> mostra que vários estudos já foram realizados utilizando FTIR e análises quimiométricas, como HCA e PCA como ferramentas para caracterizar a composição molecular em bactérias patogênicas transmitidas por alimentos. Em outro trabalho M. Pietro<sup>149</sup> aplica a espectroscopia de FTIR juntamente com HCA e *stepwise discriminant analysis* (SDA) na identificação e caracterização de bactérias lácticas. Outro exemplo onde a quimiometria e a espectroscopia de infravermelho são amplamente utilizadas é na identificação de óleos vegetais utilizados na produção de biodiesel<sup>150</sup>.

A faixa do infravermelho utilizada para realizar a HCA foi de 700 a 1400  $\text{cm}^{-1}$ . Foi escolhida esta região, pois é a região que se encontra a ligação N-H de amidas. A Figura 47 apresenta a HCA dos hidrogéis antes da funcionalização (1B, 2B e 10B) e após a funcionalização (1C, 2C e 10C). O hidrogel 5B foi retirado da análise, em virtude de um erro na aquisição do espectro. Analisando o dendrograma da Figura 49 observa-se a divisão em dois grupos, os hidrogéis sem RGDS (1A, 2A e 10A) correspondem ao grupo vermelho e os hidrogéis com RGDS (1C, 2C e 10C) que correspondem ao grupo verde.

A partir dessa divisão e sabendo que a HCA relaciona a identidade das amostras com suas características químicas, pode-se afirmar que o grupo dos hidrogéis não funcionalizados é diferente do grupo dos hidrogéis funcionalizados. Como a reação que foi utilizada na funcionalização visa a transformação de uma amina em amida, espera-se que essa divisão dos grupos seja decorrente da formação da ligação amida, uma vez que para obter a HCA foi utilizado a faixa de número de onda em que a ligação N-H de amidas aparece.



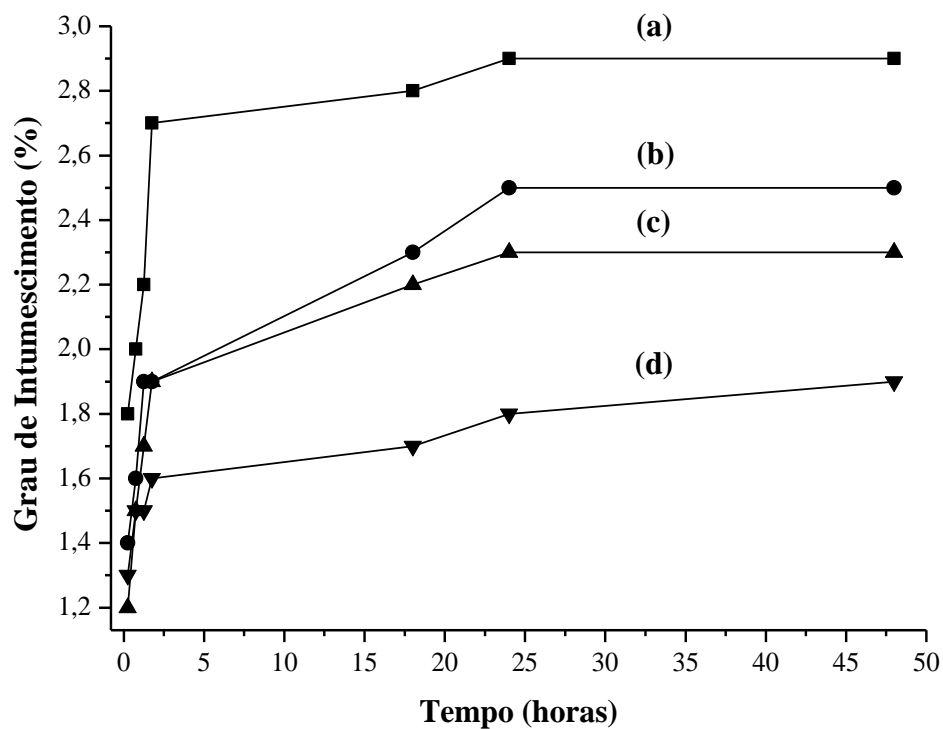
**Figura 49:** Dendrograma dos hidrogéis sem RGDS (1B, 2B e 10B) e dos hidrogéis com RGDS (1C, 2C e 10C).

### 5.1.2 Perfil de Intumescimento

A absorção de água em hidrogéis depende de muitos fatores, tais como: reticulação, a natureza da solução e estrutura do hidrogel (porosa ou sem poros)<sup>86</sup>. O fator mais importante é a densidade de reticulação, por este motivo optou-se em avaliar o comportamento de inchamento em função do teor de agente reticulante utilizado nas reações.

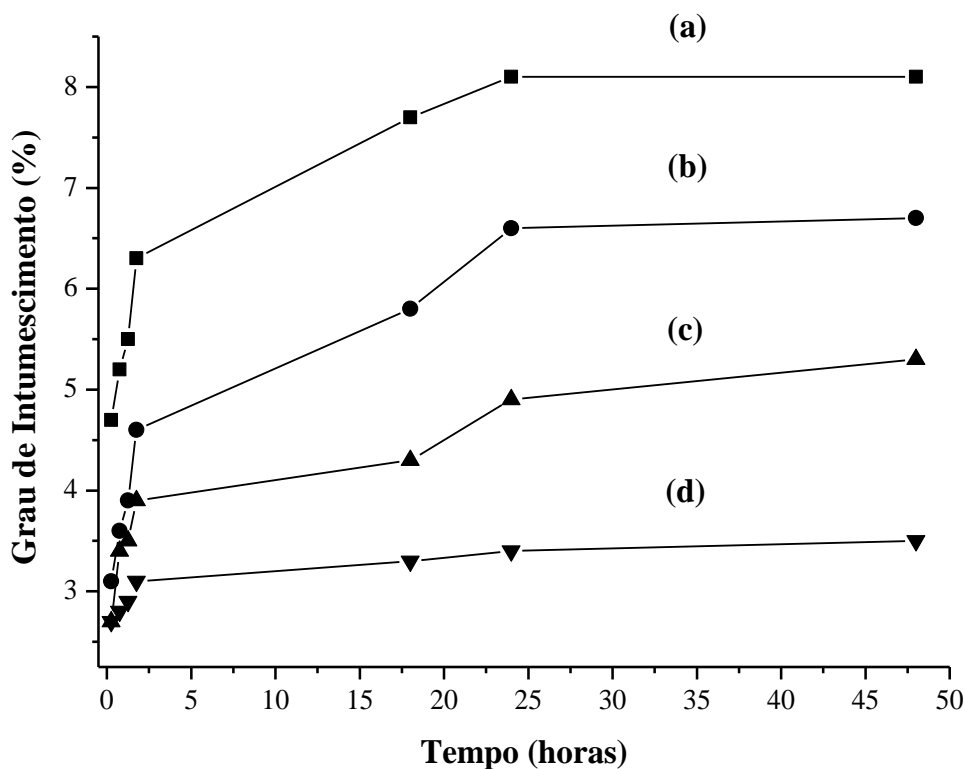
As Figuras 50 e 51 mostram os perfis de intumescimento na temperatura de 37°C dos hidrogéis funcionalizados obtidos (1C, 2C, 5C e 10C). Para ambas as concentrações (2 e 3%) o perfil de intumescimento é similar aumentando rapidamente até o tempo de 105 minutos (1,75h) e após aumentando gradativamente até 24h, em maior ou menor

proporção dependendo do teor de grupos metacrilóila presentes na estrutura do hidrogel. Após 24h, não ocorreram mudanças significativas no conteúdo de água, podendo-se afirmar que os hidrogéis atingiram o equilíbrio.



**Figura 50:** Perfil de intumescimento para: (a) 1C, (b) 2C, (c) 5C e (d) 10C na concentração de 3% m/v.





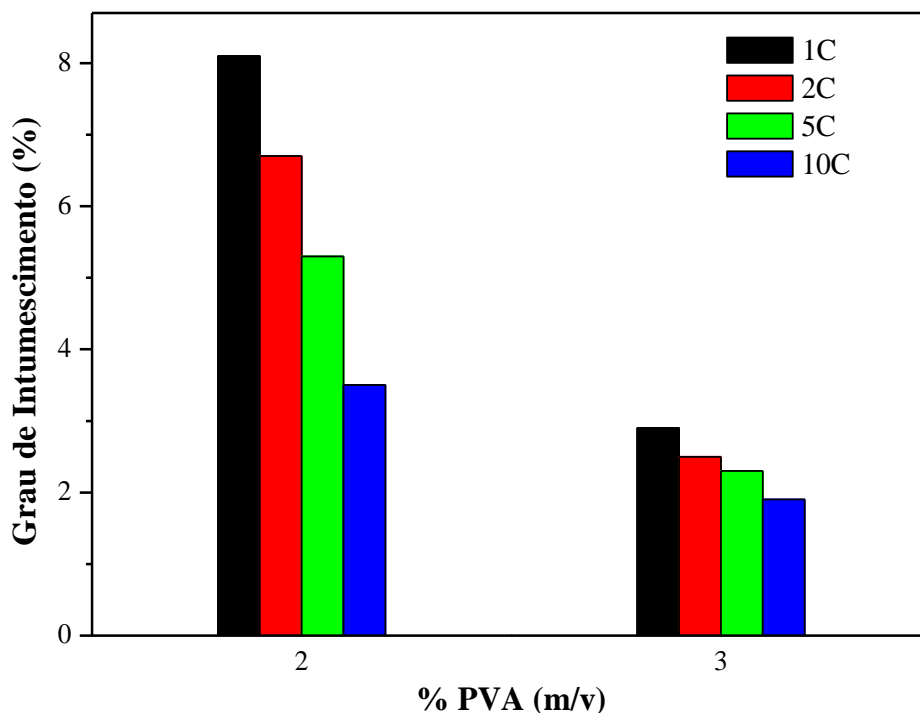
**Figura 51:** Perfil de intumescimento para: os hidrogéis (a) 1C, (b) 2C, (c) 5C e (d) 10C na concentração de 2% m/v.

O processo de intumescimento de um hidrogel é governado por forças físicas e químicas que induzem a entrada de líquido na matriz polimérica. O início do intumescimento começa com um processo de difusão, onde a água é absorvida por grupos hidrofílicos através da formação de ligações de hidrogênio. A capacidade de absorção vai depender principalmente do volume livre existente entre as cadeias do polímero, o qual é maior em estruturas reticuladas, pois assim as cadeias poliméricas estão mais afastadas umas das outras<sup>151, 152</sup>. Provavelmente nos tempos iniciais o intumescimento de todas as amostras aumentou rapidamente por causa do elevado volume livre existente em sua estrutura. Após determinado tempo (18 horas), a água que está se difundindo na estrutura do hidrogel encontra os pontos de reticulação, os quais funcionam como obstáculos, assim a absorção de mais água é regulada pela força osmótica das cadeias reticuladas. A última etapa é o equilíbrio, alcançado para todas as amostras após 24 horas. Nessa etapa a rede polimérica está expandida e a força de intumescimento é contrabalanceada pela força de retração imposta pela estrutura reticulada (resposta elástica)<sup>12, 86</sup>.

O tempo que o hidrogel demora em alcançar o equilíbrio vai depender da densidade de reticulação presente na estrutura. Um aumento na densidade de reticulação tem o efeito de aumentar a força resistiva e assim hidrogéis altamente reticulados vão alcançar o equilíbrio em tempo menor e conseqüentemente vão apresentar baixos graus de intumescimento<sup>3</sup>. Esse comportamento foi observado nas Figuras 50 e 51, onde o intumescimento foi menor para hidrogéis que apresentam maior teor de agente reticulante (maior densidade de reticulação).

O gráfico apresentado na Figura 52 está de acordo com o esperado, uma vez que ao aumentar o teor de agente reticulante reduz-se o grau de intumescimento no equilíbrio. Resultados semelhantes foram encontrados por Martens *et al.*<sup>153</sup> em trabalho que avaliava as propriedades mecânicas em hidrogéis de PVA. Aumentando o número de grupos funcionais por cadeia do PVA o resultado é um decréscimo significativo no intumescimento, seguido pelo aumento no módulo de tensão. Já Gupta e colaboradores<sup>49</sup> em trabalho sobre géis de PVA preparados pelo método *freeze-thaw* observaram que um maior grau de reticulação resulta em menor absorção de água.

A figura 52 indica uma variação no grau de intumescimento em função da concentração do PVA. A proporção de intumescimento diminui à medida que a concentração do polímero aumenta. Esse resultado é decorrente da organização da estrutura macromolecular do polímero quando em solução. Em uma concentração maior, a disponibilidade de locais (sítios) onde a reticulação pode ocorrer é mais elevada do que em uma solução com concentração menor. Assim, soluções concentradas terão maior densidade de reticulação e, conseqüentemente, menores graus de intumescimento<sup>154</sup>. No entanto, à medida que a concentração aumenta, a viscosidade do meio também aumenta, fazendo com que a movimentação das cadeias poliméricas diminuam e, por conseqüência menor o grau de reticulação e a capacidade de absorção do hidrogel<sup>155, 156</sup>.



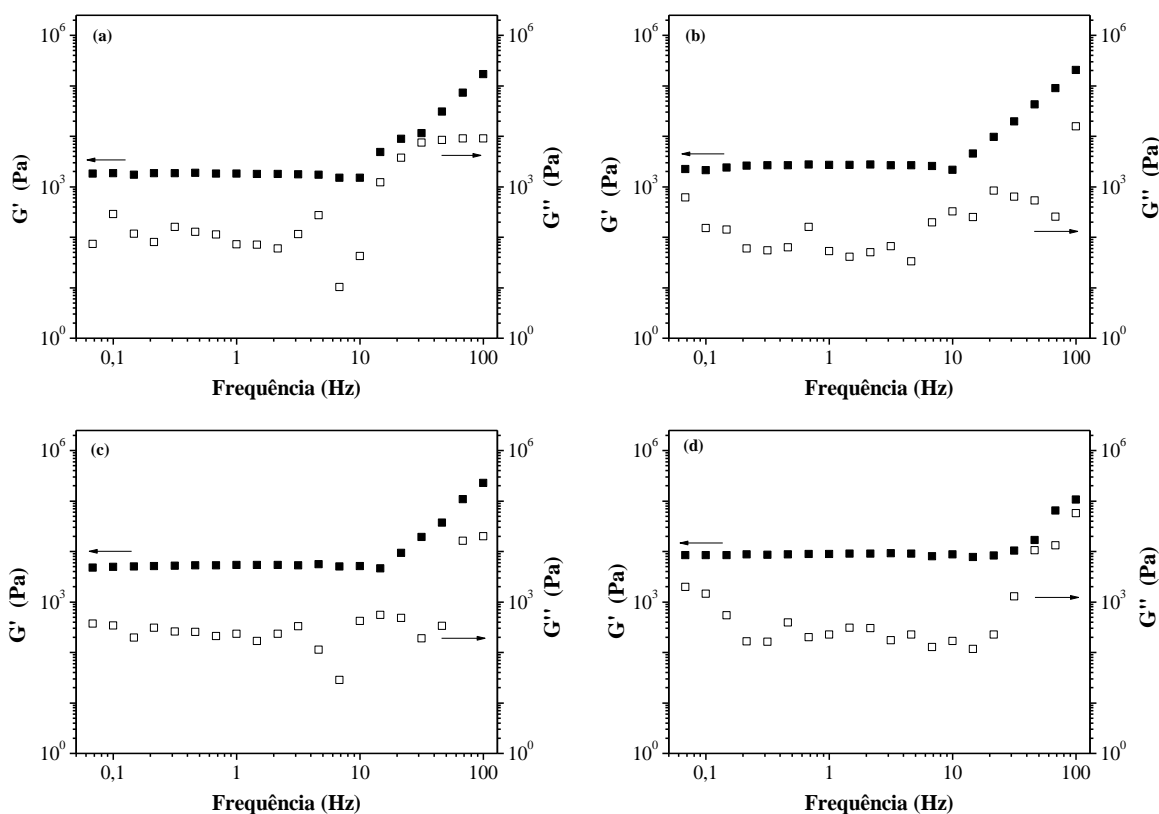
**Figura 52:** Grau de intumescimento após 48 horas para os hidrogéis 1C, 2C, 5C e 10C nas concentrações de 2 e 3% m/v.

### 5.1.3 Propriedades Reológicas

#### 5.1.3.1 Efeito do teor de agente reticulante

A concentração de grupos metacrilóila alterou as propriedades de intumescimento, como foi discutido no tópico anterior (5.1.2), e também alterou as propriedades viscoelásticas dos hidrogéis. O módulo elástico ( $G'$ ) variou entre a ordem de grandeza  $10^2$  até  $10^4$  para os hidrogéis sintetizados. Os valores de  $G'$  e  $G''$ , bem como os valores de frequência, para todos os gráficos apresentados estão em escala logarítmica.

Durante toda a região de varredura, que compreende o intervalo entre 0,03 a 100 Hz (Figura 53) os hidrogéis na concentração de 3% apresentaram pouca dependência com a frequência. Além disso, o módulo de armazenamento ( $G'$ ) foi maior do que o módulo de perda ( $G''$ ), com valores de  $G'$  em torno de 1-2 ordens de grandeza maiores do que  $G''$  em baixas frequências (Figura 54). Esses dois fatores fazem com que os hidrogéis sintetizados sejam caracterizados como géis fortes<sup>85</sup> apresentando um comportamento altamente elástico.



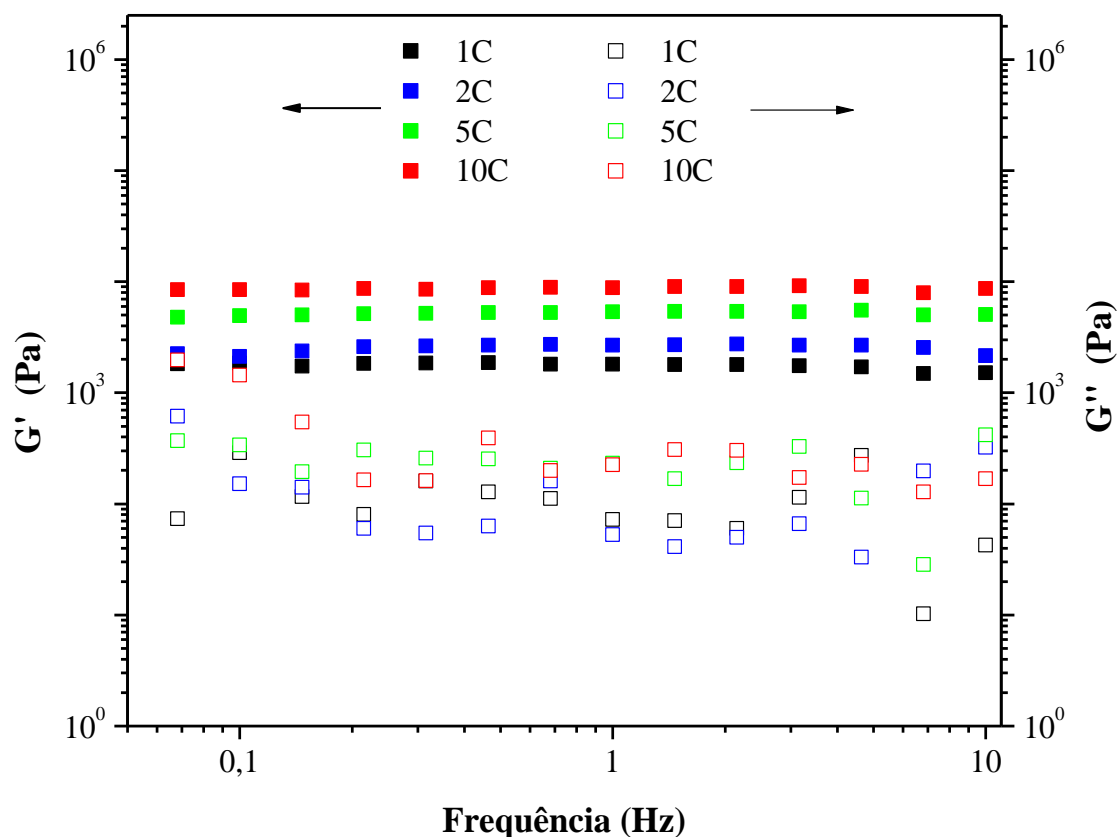
**Figura 53:** Símbolos fechados ( $G'$ ) e símbolos abertos ( $G''$ ) para os hidrogéis : (a) 1C (b) 2C (c) 5C e (d) 10C na concentração de 3% m/v.

A Figura 54 mostra o módulo de armazenamento em função da concentração do agente reticulante empregado. De maneira geral, observa-se o aumento do módulo de armazenamento em função do aumento da quantidade de agente reticulante. Este comportamento era previsto, uma vez que o incremento da quantidade de grupos fotopolimerizáveis inseridos na cadeia do polímero leva a uma estrutura mais reticulada, que por sua vez apresenta um módulo de armazenamento maior ( $G'$ ).

Outra observação que pode ser feita a partir da Figura 54 é sobre a proximidade dos valores de  $G'$  conforme o teor de agente reticulante (% de grupos metacrilóila inseridos na cadeia do PVA). Para os hidrogéis 1C e 2C as curvas de  $G'$  possuem valores próximos, bem como para os hidrogéis 5C e 10C. Esse resultado mostra que para pequenas variações no teor de agente reticulante (de 1 para 2%) o aumento de  $G'$  é mais pronunciado que para grandes variações do teor de agente reticulante (de 5 para 10%).

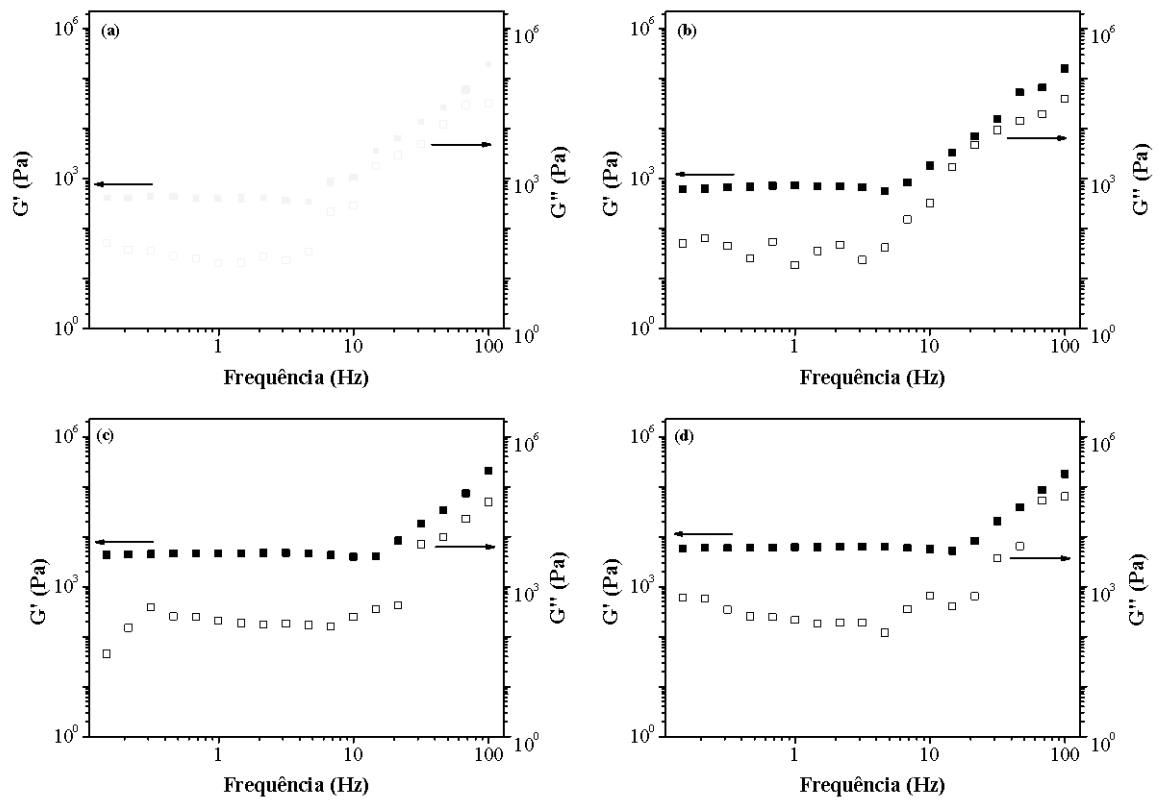
O comportamento observado pode ser atribuído à formação de rede associativa cuja força está diretamente relacionada ao número efetivo de reticulações. Esse

comportamento será explicado mais detalhadamente no item 5.1.3.2 (abaixo da Figura 58).

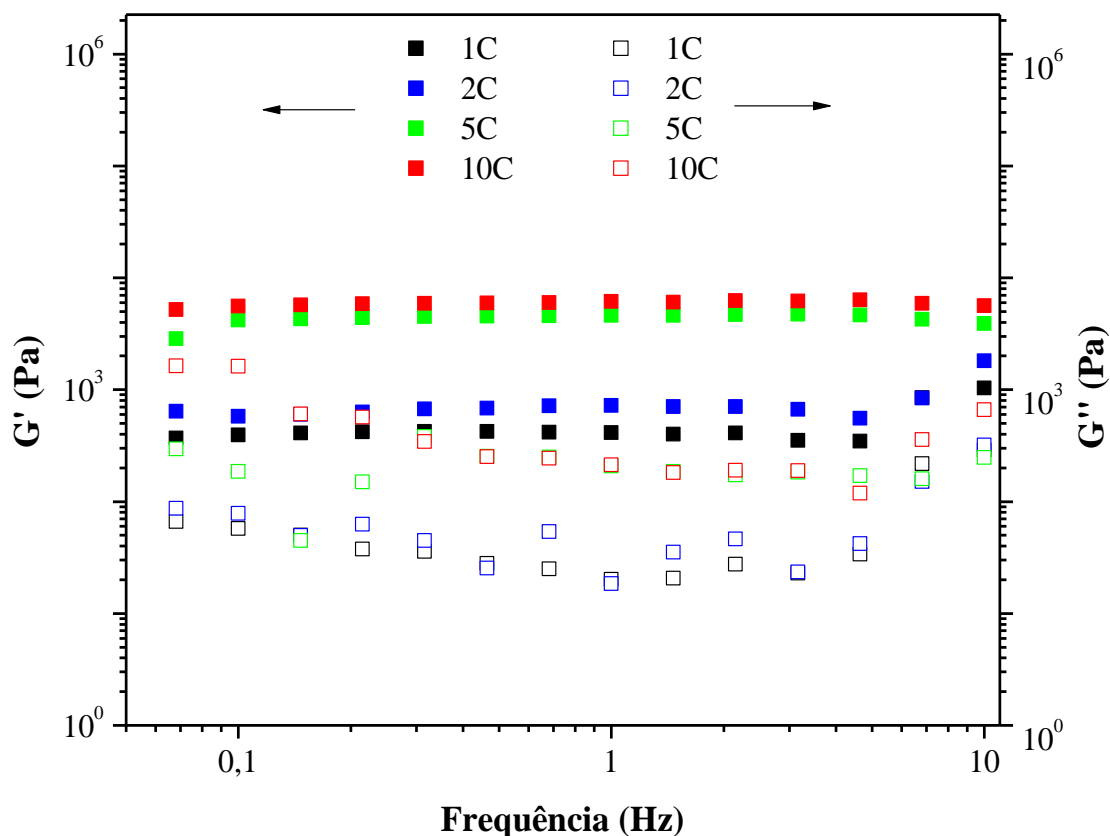


**Figura 54:** Módulo de Armazenamento e Perda no intervalo de baixas frequências para os hidrogéis na concentração de 3% m/v com diferentes teores de agente reticulante.

O efeito do aumento da quantidade de agente reticulante para os hidrogéis na concentração de 2% sobre os valores de  $G'$  e  $G''$  apresentou o mesmo comportamento descrito para os hidrogéis na concentração de 3%. Ou seja, um aumento no teor de grupos metacrilóila introduzidos no PVA induziu um aumento no módulo de armazenamento dos hidrogéis (Figura 55). Novamente os valores de  $G'$  em baixas frequências para os hidrogéis 1C e 2C são próximos, assim como para os hidrogéis 5C e 10C (Figura 56).



**Figura 55:** Símbolos fechados ( $G'$ ) e símbolos abertos ( $G''$ ) para os hidrogéis : (a) 1C (b) 2C (c) 5C e (d) 10C na concentração de 2% m/v.

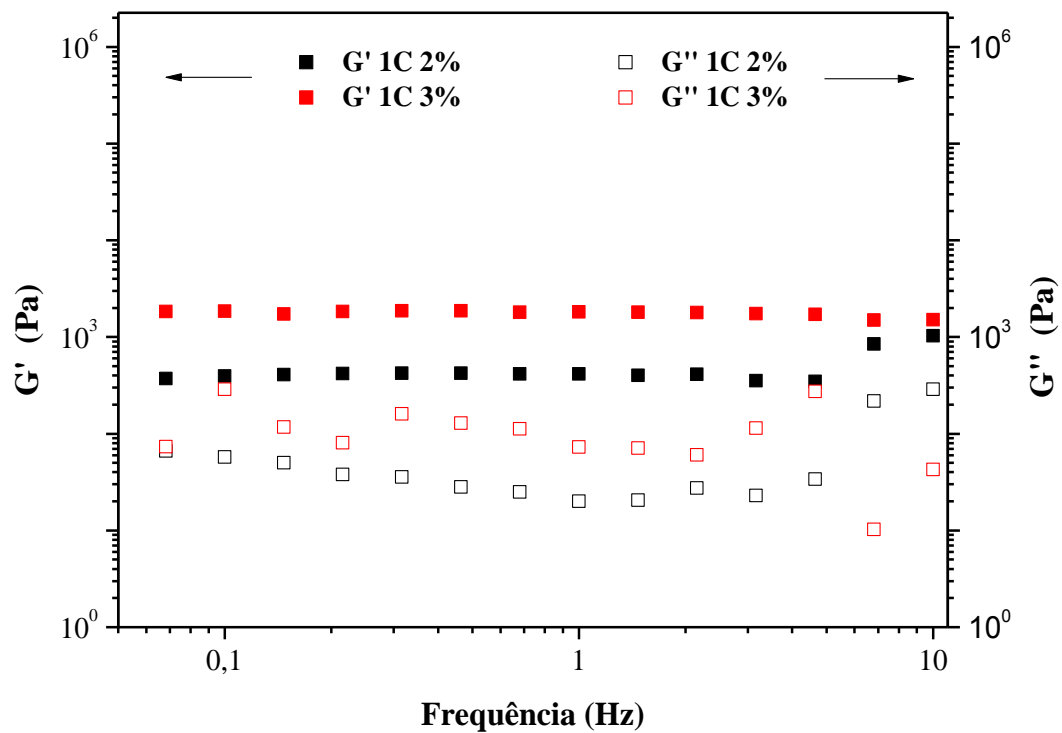


**Figura 56:** Módulo de Armazenamento e Perda no intervalo de baixas frequências para os hidrogéis na concentração de 2% m/v com diferentes teores de agente reticulante.

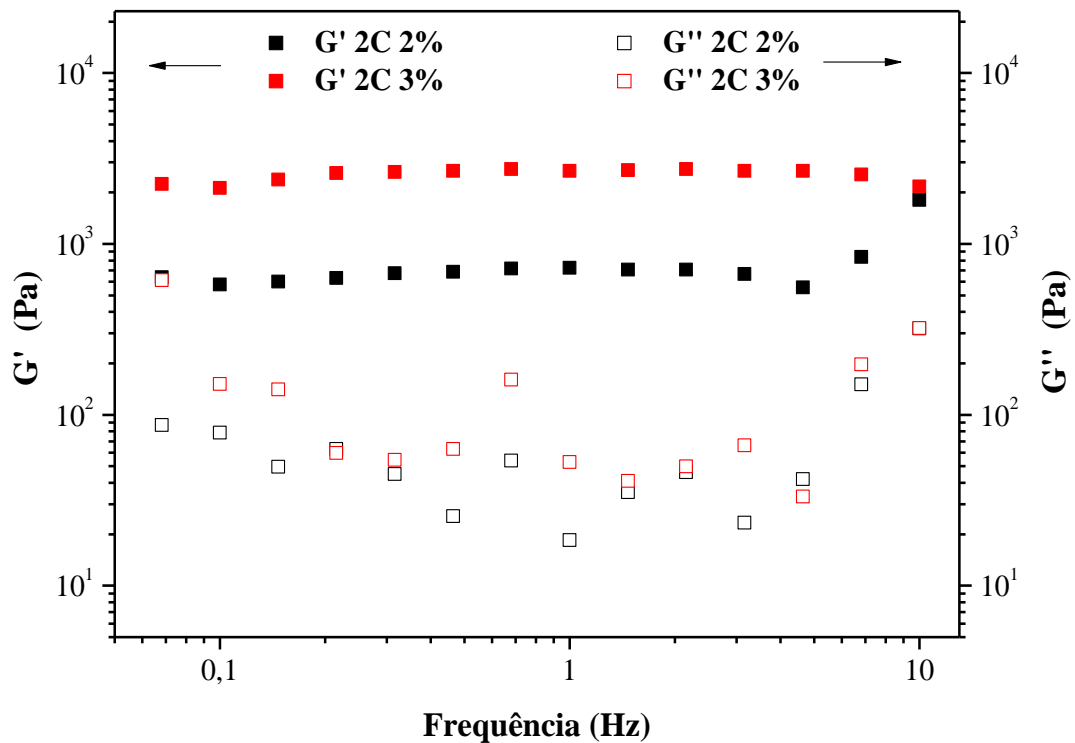
As pesquisas na área de hidrogéis abordam o efeito da quantidade de agente reticulante sobre as propriedades de intumescimento, porém, poucos estudos sobre as propriedades reológicas em função da variação do teor de agente reticulante são encontrados na literatura. Entretanto, a maioria dos artigos aborda as diferenças reológicas em função da incorporação de outro polímero<sup>157, 158</sup> ou de compósitos<sup>159</sup>.

### 5.1.3.2 Efeito da concentração do PVA

A concentração do polímero na solução a ser reticulada influenciou nas propriedades reológicas dos hidrogéis obtidos. Nesse trabalho utilizaram-se duas concentrações para os hidrogéis 1C, 2C e 5C e três concentrações para o hidrogel 10C. A Figura 57 mostra os módulos de armazenamento e perda para o hidrogel 1C nas duas concentrações trabalhadas, 2% e 3%. Observa-se que ambos os módulos,  $G'$  e  $G''$  são maiores para a concentração de 3%. Esse comportamento é visto também para o hidrogel 2C (Figura 58).



**Figura 57:** Módulo de Armazenamento e Perda no intervalo de baixas frequências para os hidrogéis 1C nas concentrações de 2 e 3% m/v.



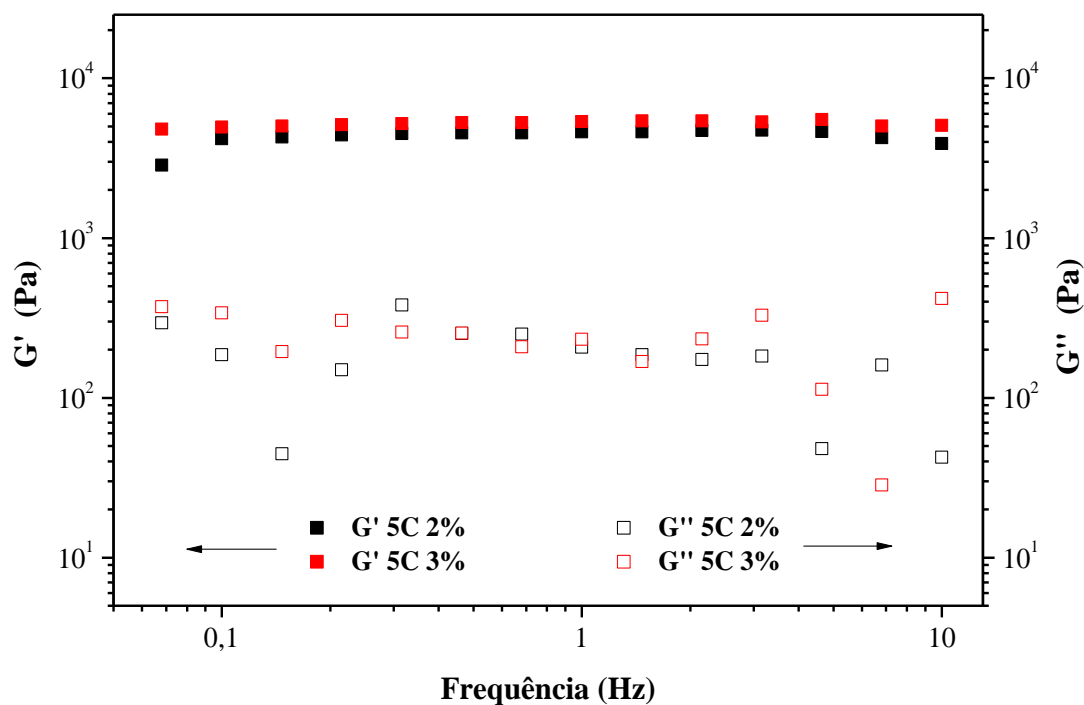
**Figura 58:** Módulo de Armazenamento e Perda no intervalo de baixas frequências para os hidrogéis 2C nas concentrações de 2 e 3% m/v.



Para os hidrogéis 5C e 10C novamente  $G'$  e  $G''$  são maiores na concentração de 3% (Figura 59 e 60) do que na concentração de 2%. Porém essa diferença é pequena. Pode-se explicar esse resultado com base nos gráficos anteriores, onde a diferença entre  $G'$  de hidrogel 5C e o hidrogel 10C é pequena, assim a partir de certa densidade de reticulação o módulo não é afetado pelo cisalhamento imposto.

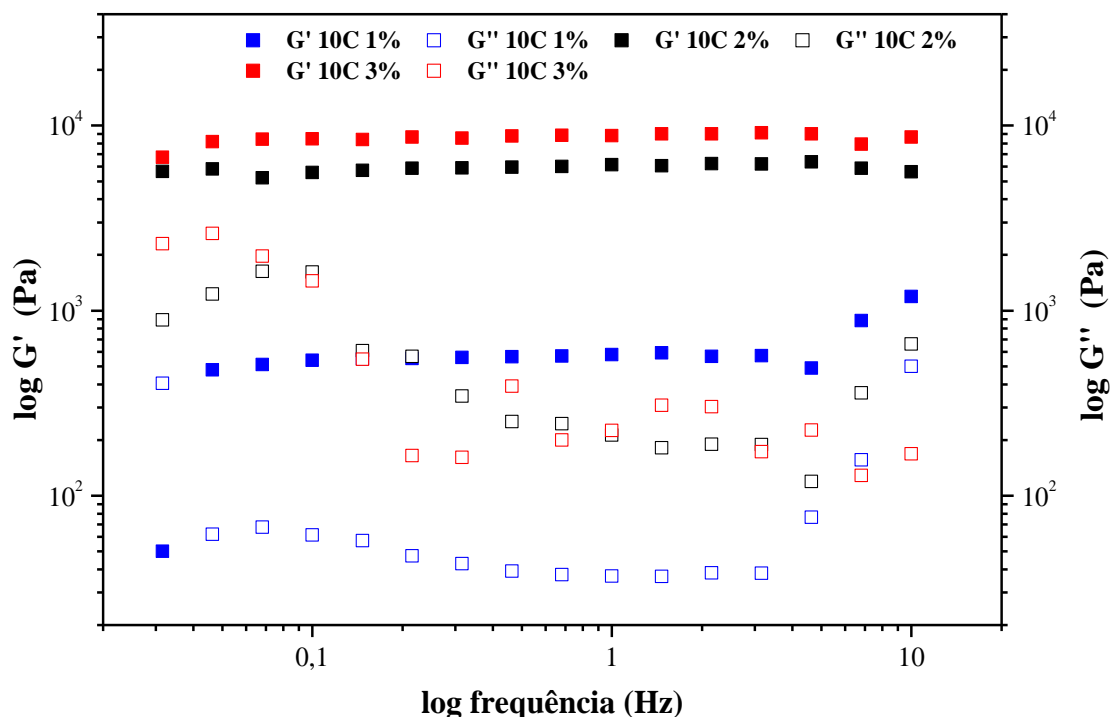
De acordo com a teoria da rede transiente desenvolvida por Green e Tobolsky<sup>160</sup> o módulo de equilíbrio é proporcional ao número de cadeias elasticamente efetivas por unidade de volume. Os resultados expostos nas Figuras 54, 57-60 mostram claramente que conforme a densidade de reticulação aumenta, seja por aumento da quantidade de grupos metacrilóila inseridos na cadeia do PVA ( $GS_1$ ) ou pelo aumento da concentração do polímero o módulo ( $G'$ ) tem um acréscimo. O perfil pouco dependente da frequência para todos os hidrogéis fornece informações sobre a estrutura desses hidrogéis. Os sistemas possuem uma elevada densidade de ligações cruzadas, fato que foi confirmado pelos valores de  $GS_1$  obtidos e também pelos baixos valores nos graus de intumescimento.

Resultados similares foram encontrados por Choudhary e Bhatia<sup>161</sup> em trabalho sobre a reologia e nanoestrutura de géis e soluções de alginato modificados com grupos hidrofóbicos. O módulo dos géis aumentou com o aumento dos grupos hidrofóbicos e também com o aumento do teor de alginato.



**Figura 59:** Módulo de Armazenamento e Perda no intervalo de baixas frequências para os hidrogéis 5C nas concentrações de 2 e 3% m/v.

O módulo de armazenamento para o hidrogel 10C na concentração de 1% é uma ordem de grandeza menor que para os hidrogéis nas outras concentrações (2 e 3%) (Figura 60). Em uma menor concentração, a densidade de reticulação será mais baixa, pois há menor proporção de cadeias poliméricas e, desta forma, uma quantidade inferior de reticulações, quando comparado com uma concentração mais elevada de polímero.



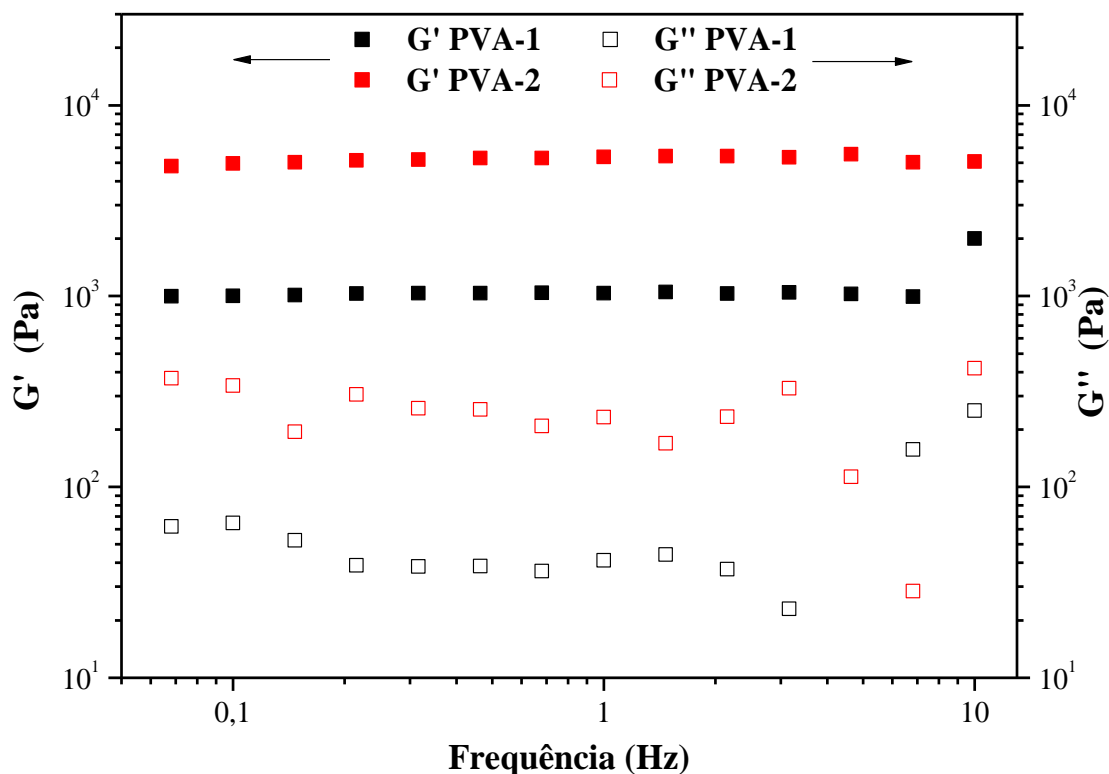
**Figura 60:** Módulo de Armazenamento e Perda no intervalo de baixas frequências para os hidrogéis 10C nas concentrações de 1, 2 e 3% m/v.

### 5.1.3.3 Efeito da massa molecular do PVA

Em reologia de polímeros um assunto bastante abordado é a influência da massa molecular do polímero sobre as propriedades viscoelásticas. Um aumento na massa molecular implica em cadeias poliméricas maiores, e assim com maior número de possibilidades no grau de emaranhamento. Desta forma, é necessário uma maior temperatura, maior taxa de cisalhamento ou tempos maiores para causar mudanças em sua estrutura.

Em hidrogéis espera-se que um aumento na massa molecular do polímero cause o mesmo efeito que é observado em polímeros lineares, ou seja, um aumento em ambos os módulos (elástico e viscoso). Esse resultado pode ser verificado na Figura 61. Resultados semelhantes foram encontrados por Uchida<sup>162</sup>, onde ao aumentar a massa molecular do polímero (polietilenoimina) o módulo de armazenamento também aumentou. O comportamento do hidrogel com massa molecular menor (31.000-50.000 Da) não é alterado. Isso demonstra que mesmo utilizando PVA com massa molecular menor o hidrogel resultante se comporta como um hidrogel forte, assim pode-se

concluir que a estrutura da rede reticulada depende fortemente do agente reticulante e de sua concentração, dependendo muito fracamente da massa molecular do polímero.



**Figura 61:** Módulo de Armazenamento e Perda no intervalo de baixas frequências para os hidrogéis 5C na concentração de 3% m/v. PVA-1: 31.000-50.000 Da e PVA-2: 85.000-124.000 Da.

## 5.1.4 Propriedades Térmicas

### 5.1.4.1 Efeito da funcionalização com RGDS

O poli (álcool vinílico) é um polímero semicristalino que apresenta temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) em aproximadamente 88°C e temperatura de fusão em torno de 212°C<sup>158</sup>, estes valores podem variar em função da massa molecular do PVA e seu grau de hidrólise. A Figura 62 representa os termogramas de calorimetria diferencial exploratória (DSC) dos hidrogéis antes e após a funcionalização.

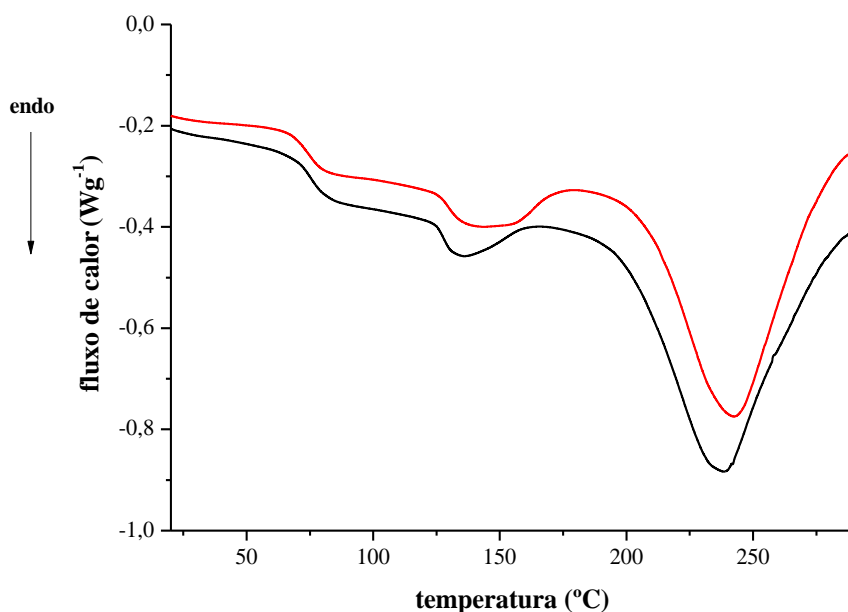
A funcionalização com a sequência tetrapeptídica RGDS do hidrogel causou um leve deslocamento para maiores temperaturas nos eventos térmicos de fusão ( $T_m$ ), e um leve deslocamento para menores temperaturas na transição vítrea ( $T_g$ ) quando a sequência peptídica está presente na estrutura do hidrogel. As temperaturas de

transições vítreas se mantêm entre a região de 70 a 85°C. Já os picos endotérmicos de fusão se encontram entre 135 e 143°C e são referentes aos segmentos cristalinos do PVA, uma vez que esse polímero é classificado como semi-cristalino<sup>98</sup> e também pelo ordenamento da estrutura causado pela reticulação. O pico entre 237 e 242°C é referente a fusão do poli (álcool vinílico).

As maiores temperaturas de fusão ( $T_m$ ) encontradas para o hidrogel 10C podem ser explicadas analisando a estrutura do hidrogel funcionalizado. O hidrogel 10C possui a molécula de RGDS em sua estrutura, assim sua cadeia lateral é maior do que a cadeia do hidrogel 10B, o qual não possui RGDS. Para fundir uma substância é necessário romper suas ligações e como o hidrogel funcionalizado apresenta na sua cadeia lateral a molécula de RGDS mais energia (nesse caso, na forma de calor) deve ser fornecida para fundir o hidrogel em toda a sua extensão.

O menor valor de transição vítrea para o hidrogel 10C pode ser atribuído à presença da sequência tetrapeptídica na cadeia lateral do polímero. A molécula de RGDS pode ter ocasionado um afastamento entre as cadeias de PVA (maior volume livre), aumentando o grau de mobilidade da cadeia principal e diminuindo os valores de  $T_g$ .

Comparando os valores de  $T_g$  encontrados para os hidrogéis 10B (não funcionalizado) e 10C (funcionalizado) com os valores de  $T_g$  para o PVA puro<sup>64, 163, 164</sup> observa-se que o polímero puro possui uma maior  $T_g$ , o que pode ser atribuído ao maior número de grupos hidroxilas em sua cadeia polimérica. Os grupos hidroxila formam ligações de hidrogênio que reduzem a mobilidade da cadeia polimérica e aumentam a densidade de empacotamento e, conseqüentemente, a  $T_g$  do polímero<sup>165</sup>.

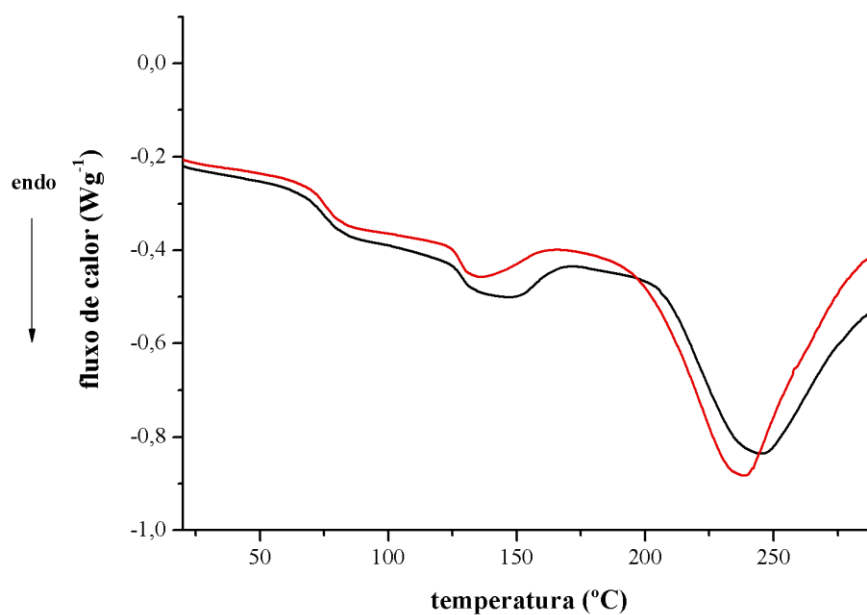


**Figura 62:** Termograma de DSC para o hidrogel não funcionalizado (10B) em preto e para o hidrogel funcionalizado (10C) em vermelho.

#### 5.1.4.2 Efeito do teor de agente reticulante

A Figura 63 mostra as curvas de DSC para os hidrogéis 5B e 10B, correspondentes a incorporação de 5% e 10% (em mol) de grupos metacrilóila à cadeia do PVA, respectivamente. Os valores de  $T_g$  e  $T_m$  sofrem um leve acréscimo para o hidrogel 5B. Novamente o resultado encontrado pode ser explicado pela natureza da estrutura química dos hidrogéis.

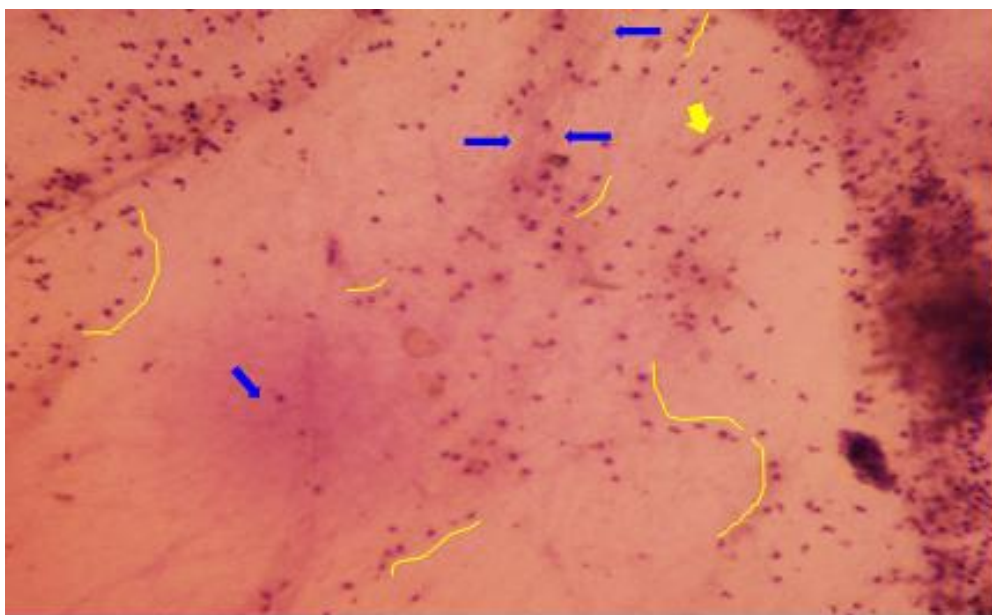
O hidrogel 5B contém menos grupos metacrilóila, os quais agem como reticulantes, assim o hidrogel possui mais grupos hidroxilas livres quando comparado com o hidrogel 10B. Esses grupos hidroxilas formam pontes de hidrogênio, as quais tem a capacidade de reduzir a mobilidade da cadeia polimérica e assim aumentando a  $T_g$  do polímero. Esse efeito é pouco pronunciado sendo de difícil visualização na Figura 63. Se esse efeito tivesse sido estudado entre os hidrogéis 1C e 10C poderia gerar termogramas com maiores diferenças entre as transições térmicas.



**Figura 63:** Termograma de DSC para os hidrogéis não funcionalizados 5B (em preto) e 10B (em vermelho).

### 5.1.5 Citotoxicidade e adesão celular

Para investigar os possíveis efeitos adversos dos hidrogéis em meio celular foi utilizado teste de citotoxicidade visual com células do complexo *cumulus oophorus*. A Figura 64 mostra a microscopia óptica do hidrogel 1B (não funcionalizado).



**Figura 64:** Microscopia óptica com aumento de 400 vezes do hidrogel 1B. As linhas amarelas indicam células em alinhamento, a seta amarela indica células em aparente migração e as setas azuis indicam feixes e agrupamentos de células.

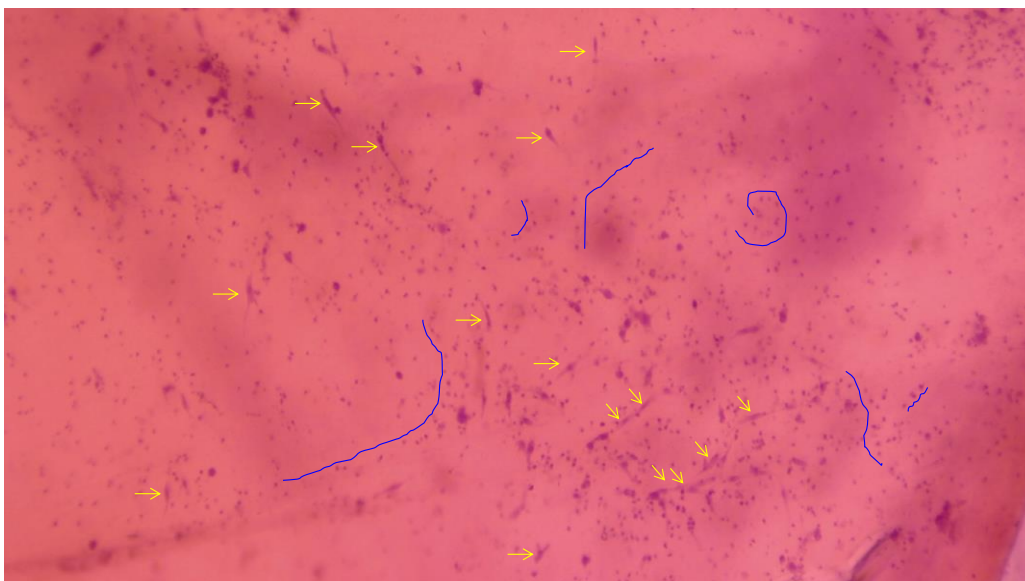
A sobrevivência das células após 48 horas em contato com o hidrogel indica que a composição química do hidrogel e os produtos químicos utilizados na sua síntese não foram prejudiciais para as células. As células não apresentaram comportamento de apoptose (morte celular programada), o que indica que o hidrogel apresenta características para ser um produto biocompatível<sup>166, 167</sup>. As células migraram a partir do agregado inicial (setas e linhas amarelas na Figura 64) em aparente alinhamento. O alinhamento pode seguir as reticulações presentes no hidrogel, porém se faz necessário a realização de microscopias eletrônicas para confirmar essa hipótese.

A Figura 65 mostra a microscopia óptica do hidrogel 1C (funcionalizado com RGDS). Observam-se células em aparente migração (setas amarelas na Figura 65) e células seguindo um alinhamento (linhas azuis). A funcionalização com RGDS do hidrogel alterou a morfologia das células, as quais adquiriram morfologia fusiforme, a qual indica possível proliferação celular. Lei<sup>168</sup> e co-autores investigaram a influência das seguintes variáveis sobre a adesão, migração e proliferação celular de células-tronco mesenquimais de ratos em hidrogel de ácido hialurônico: natureza do reticulante, concentração de RGD, concentração do polímero e densidade de reticulação. Um dos resultados mostrou que a introdução de RGD alterou significativamente a morfologia celular, as células apresentavam morfologia esférica antes da adição de RGD e após a adição de RGD passaram a apresentar morfologia fusiforme.

Outro resultado interessante do trabalho de Lei<sup>168</sup> é referente a proliferação celular e a concentração de RGD. Geralmente, quanto mais elevada a concentração de RGD, mais rapidamente as células migram e proliferam, porém o resultado encontrado foi diferente. A migração e proliferação celular foi maior em hidrogéis que apresentam menor concentração de RGD, Lei<sup>168</sup> explica esse fato afirmando que a concentração de RGD é um fator importante para modular a migração de células em hidrogéis de ácido hialurônico.

Levando em consideração a morfologia fusiforme adquirida pelas células após a introdução de RGDS e também os resultados encontrados no trabalho de Lei<sup>168</sup> e também de outros trabalhos<sup>8, 169</sup> pode-se afirmar que o hidrogel de PVA sintetizado possui características potenciais para servir de matriz para o cultivo celular e ser aplicado como biomaterial para a medicina regenerativa (engenharia tecidual).





**Figura 65:** Microscopia óptica com aumento de 400 vezes do hidrogel 1C. As setas amarelas indicam células em aparente migração, as linhas azuis indicam feixes e agrupamentos de células.

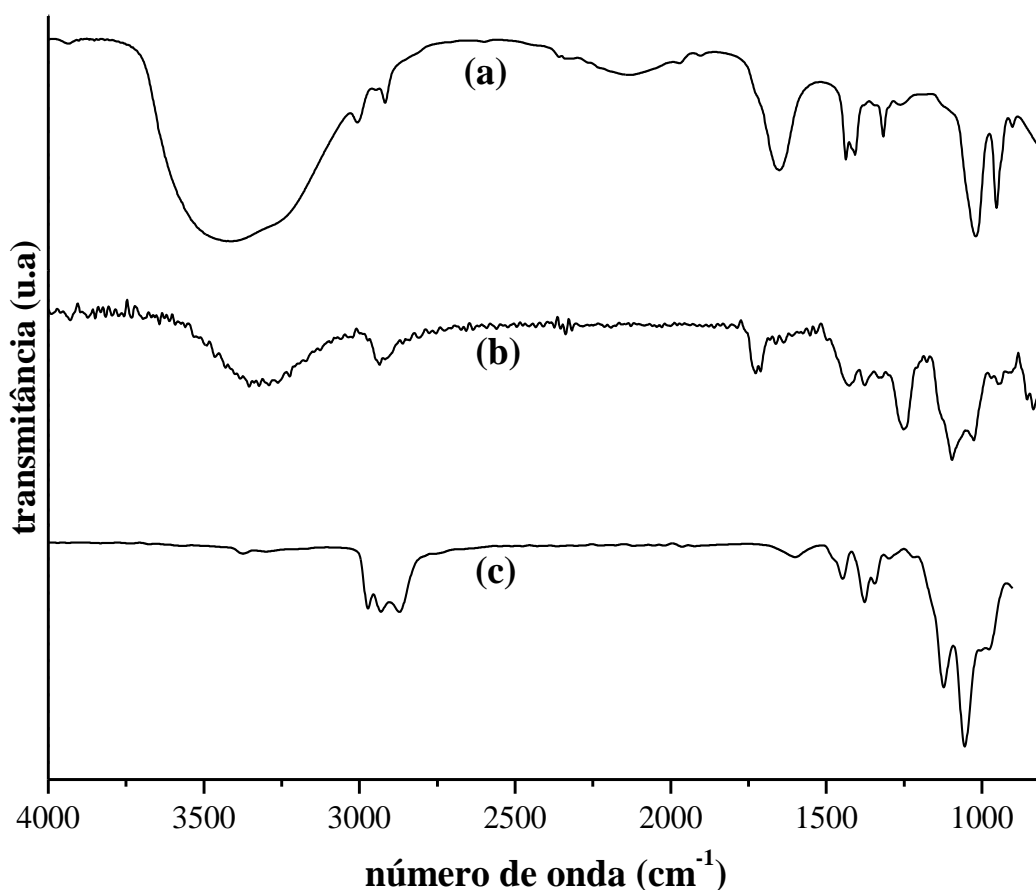
## 5.2 HIDROGÉIS RETICULADOS QUIMICAMENTE

### 5.2.1 Síntese e Caracterização Espectroscópica

#### 5.2.1.1 PVA modificado com grupos amina

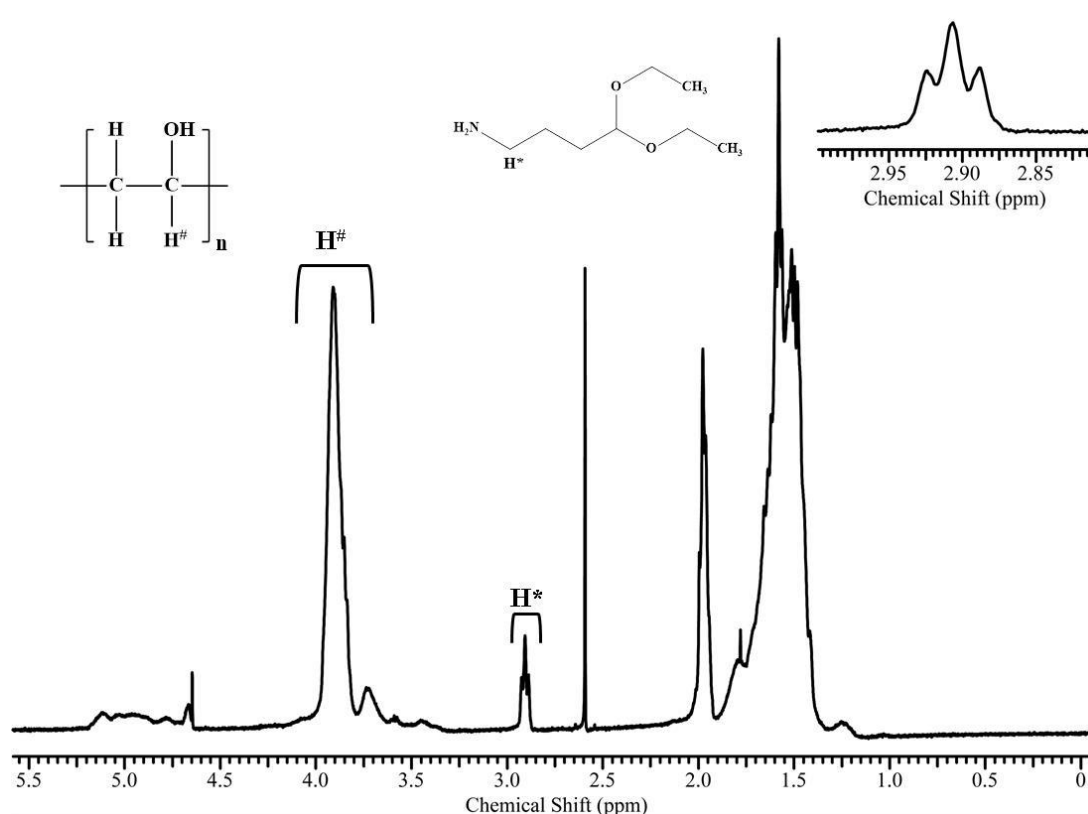
O poli (álcool vinílico) foi modificado pela introdução de grupos amina conforme reação mostrada no item 4.3.1.1. O produto desta reação, após liofilização, foi caracterizado por espectroscopias no infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

O espectro no infravermelho do produto obtido (Figura 66) mostra uma banda presente em  $1250\text{ cm}^{-1}$ , referente à formação da ligação acetal, outra banda relativa a essa ligação aparece em  $1020\text{ cm}^{-1}$  (banda de estiramento da ligação C-O), como já foi discutido no item 5.1.1.2. A confirmação da introdução dos grupos aminas na cadeia do polímero é dada por RMN- $^1\text{H}$ .



**Figura 66:** Espectro na região do infravermelho para: (a) PVA, (b) PVA-a e (c) 4-ABA.

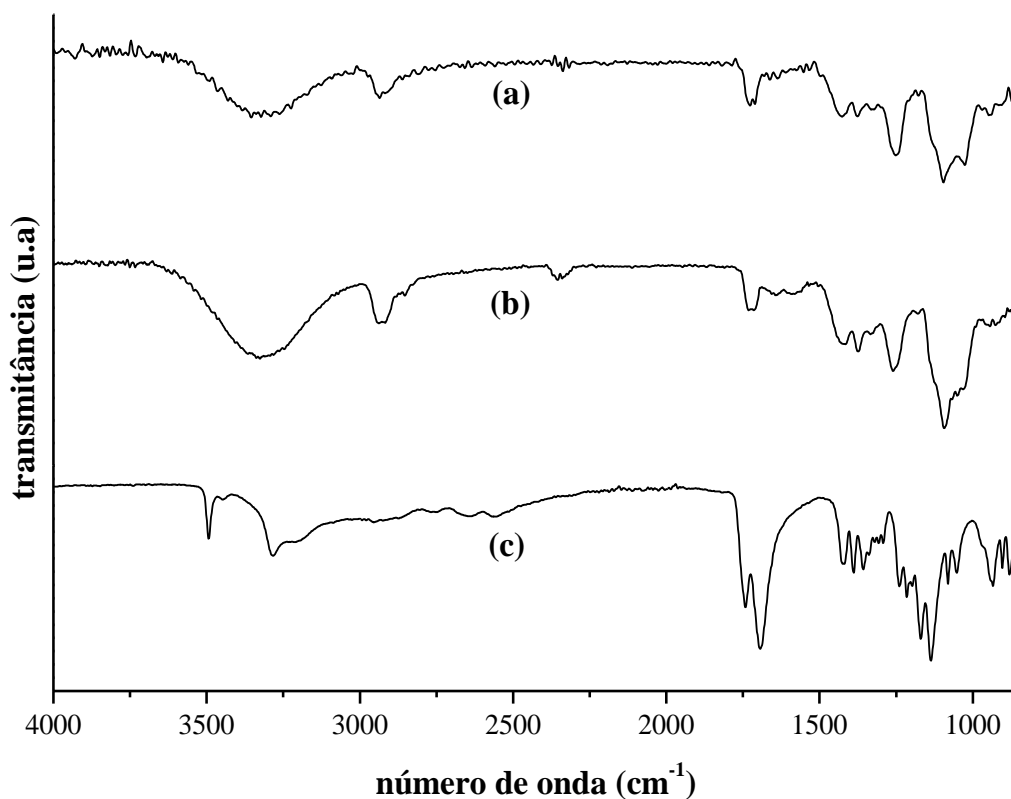
A partir das áreas dos picos de interesse presentes no espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 67), foi calculado o grau de substituição (GS) do polímero obtido através da Equação 10 (item 5.1.1.2). O valor obtido a partir da equação 10 foi de 8,5%. O que indica que a reação de incorporação de grupos amina ao PVA foi bem sucedida, uma vez que a quantidade teórica é de 10%.



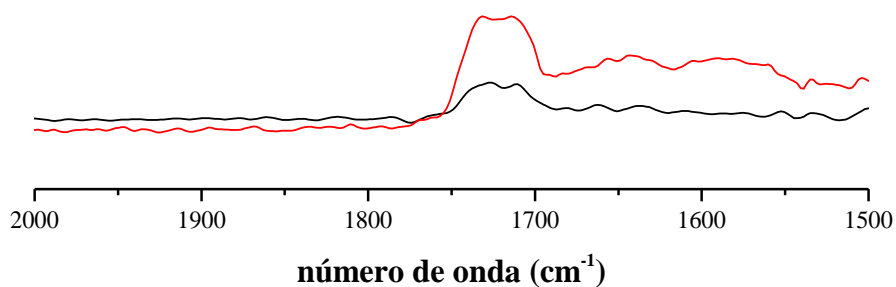
**Figura 67:** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  do PVA modificado com grupos amina (PVA-a) em  $\text{D}_2\text{O}$ . A direita a ampliação na região entre 2,8 e 3,2 ppm.

### 5.2.1.2 Hidrogéis reticulados com ácido cítrico

A Figura 68 apresenta o espectro de FTIR obtido para o PVA com grupos amina (PVA-a), o ácido cítrico utilizado como reticulante e o hidrogel obtido (PVA-b). Os espectros do PVA-a e PVA-b são praticamente coincidentes, porém ao ampliar a região entre  $1500$  a  $2000\text{ cm}^{-1}$  e analisar em absorvância (Figura 69) observa-se um aumento da intensidade das bandas correspondentes às ligações  $\text{C}=\text{O}$  ( $1750$  a  $1700\text{ cm}^{-1}$ ), indicando que os grupos carboxila do ácido cítrico foram incorporados à cadeia principal do polímero, conforme detalhada pela reação exposta no item 4.3.1.2. O excesso de ácido cítrico (que pode não ter participado da reação) nos hidrogéis foi eliminada através do enxague destes com solução de  $\text{NaOH}$   $0,01\text{ mol/L}$  e água deionizada até alcançar o pH entre 6-8.



**Figura 68:** Espectro na região do infravermelho para: (a) PVA-a, (b) PVA-b e (c) ácido cítrico.

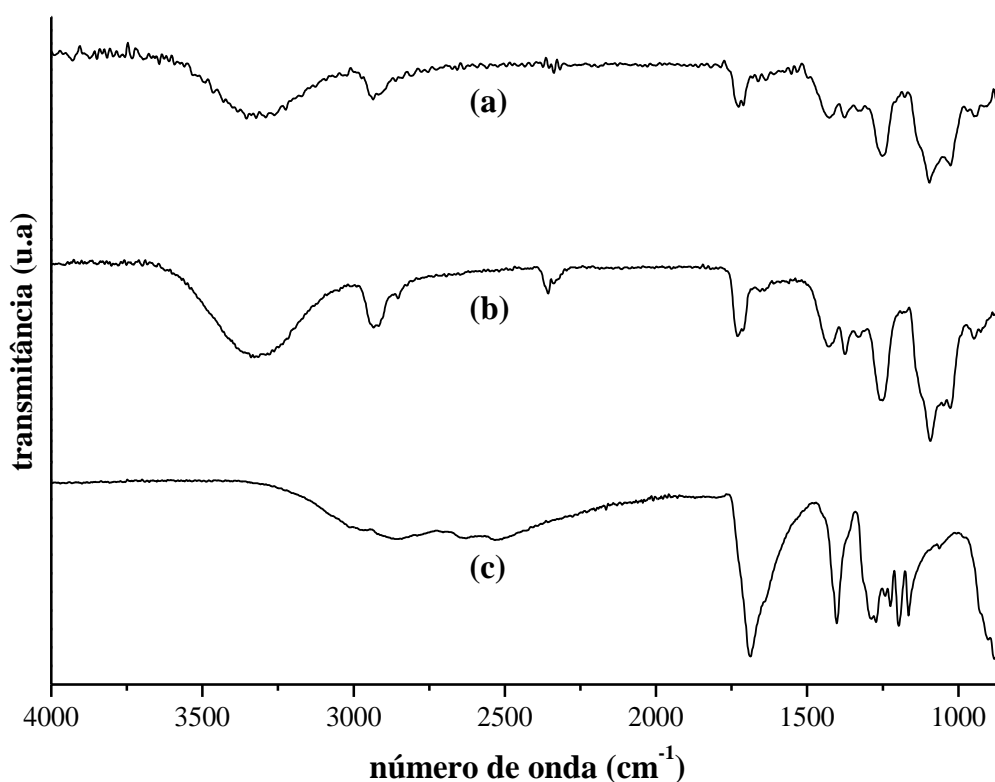


**Figura 69:** Espectro na região do infravermelho entre 1500-2000  $\text{cm}^{-1}$  para o PVA-a em preto e para o PVA-b (em vermelho).

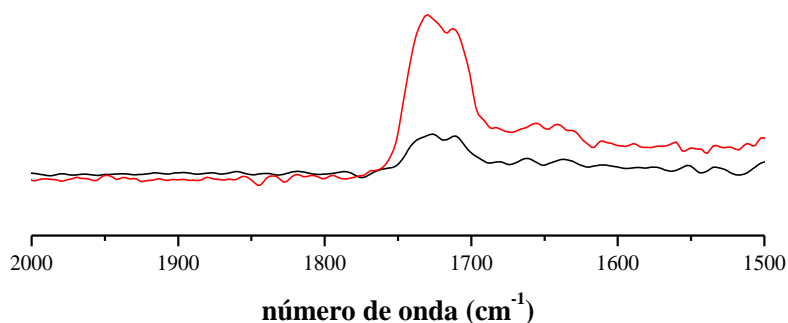
### 5.2.1.3 Hidrogéis reticulados com BTCA:

A Figura 70 apresenta o espectro de FTIR obtido para o PVA com grupos amina (PVA-a), o BTCA utilizado como reticulante e o hidrogel obtido (PVA-d). Novamente os espectros do PVA com grupos amina (PVA-a) e o hidrogel obtido (PVA-d) são praticamente coincidentes. Ao analisar a Figura 71 que nestes hidrogéis também ocorreu

um aumento da intensidade das bandas correspondentes às ligações C=O (1750 a 1700  $\text{cm}^{-1}$ ), o que indica a incorporação do BTCA à cadeia do PVA, conforme sugere a reação exposta no item 4.3.1.3. Os hidrogéis foram lavados com solução de NaOH 0,01 mol/L e água deionizada até alcançar o pH entre 6-8 para eliminar o excesso de BTCA (que pode não ter participado da reação).



**Figura 70:** Espectro na região do infravermelho para: (a) PVA-a, (b) PVA-d e (c) BTCA.



**Figura 71:** Espectro na região do infravermelho entre 1500-2000  $\text{cm}^{-1}$  para o PVA-a em preto e para o PVA-d (em vermelho).

#### **5.2.1.4 Hidrogéis reticulados quimicamente e funcionalizados**

Após a funcionalização dos hidrogéis com RGDS estes foram caracterizados por espectroscopias de FT-IR (espectros em Anexo). Novamente não se observa mudanças que indicam a formação de amida. Os motivos são os mesmos apresentados no item 5.1.1.4. Não foi possível realizar a Análise Hierárquica por Agrupamentos (HCA), pois precisa de grupos com maior quantidade de componentes em cada grupo para realizar essa análise. Aqui o grupo seria composto por somente duas amostras (amostra grupo 1: hidrogel sem RGDS e amostra grupo 2: hidrogel com RGDS), não podendo fazer uma comparação de similaridade entre os componentes de cada grupo, ocasionando assim um resultado não confiável.

#### **5.2.2 Perfil de Intumescimento**

O hidrogel reticulado com ácido cítrico e funcionalizado com RGDS se dissolveu na água utilizada para realizar os testes de intumescimento em menos de quinze minutos. O mesmo ocorreu para o hidrogel reticulado com BTCA e funcionalizado com RGDS. Analisando a reação de reticulação do PVA-a com ambos os ácidos, ácido cítrico e BTCA, percebe-se que ocorre uma competição de reações entre os grupos ácidos e os grupos hidroxila e amina presentes na cadeia do PVA.

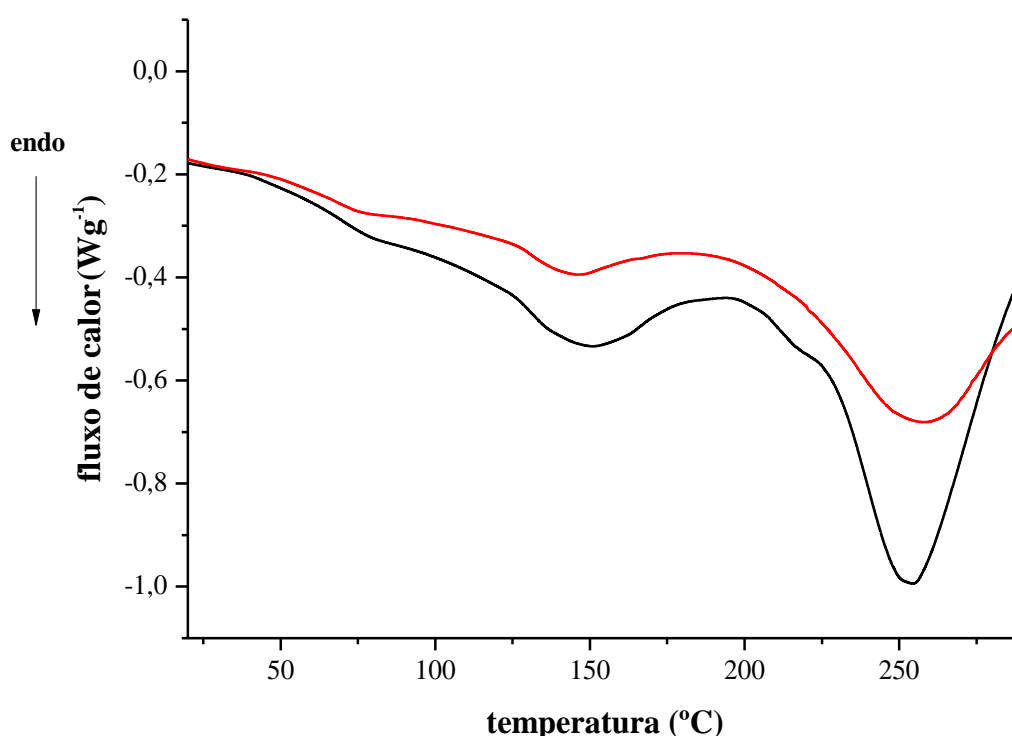
A reação que deve ocorrer para formar as reticulações é a esterificação. Segundo o aumento da banda de C=O visto nos espectros de FTIR a reação ocorre, porém os testes de intumescimento mostram que a reação ocorreu em baixa extensão. Os fatores que levaram a este resultado são os seguintes: solução ácida utilizada como catalisador não é eficiente ou os grupos amina presentes na estrutura do PVA reagem com os grupos ácidos carboxílicos do ácido cítrico e do BTCA. É pouco provável ter ocorrido a reação entre os grupos amina e o ácido, pois os grupos hidroxila estão presente em quantidade muito superior na estrutura do PVA, porém não se pode descartar essa hipótese.

#### **5.2.3 Propriedades Térmicas**

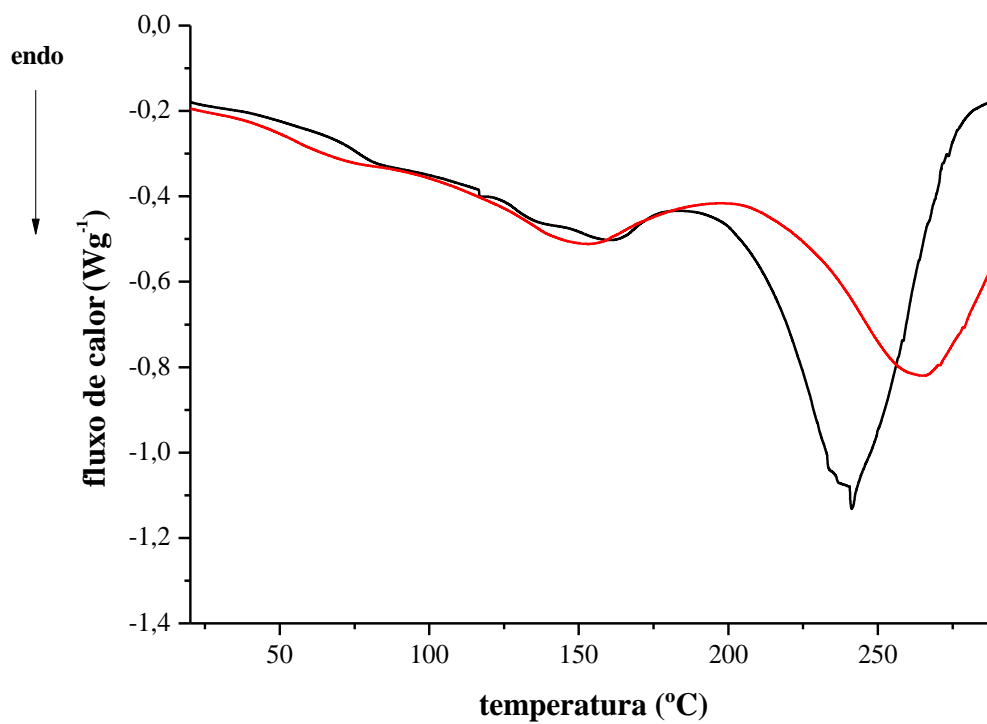
A Figura 72 mostra o termograma obtido para os hidrogéis reticulados com ácido cítrico. As transições térmicas não são afetadas pelos mesmos motivos expostos no item 5.1.4.

O termograma para os hidrogéis reticulados com BTCA (Figura 73) foi o termograma que apresentou a diferença mais significativa entre todos os hidrogéis

estudados neste trabalho. Essa diferença se encontra no pico exotérmico de fusão um pouco acima de 250°C para o PVA-e. Este comportamento pode ser explicado com base na estrutura química do hidrogel. O reticulante utilizado nessa reação possui quatro grupos ácidos que podem reagir com os grupos hidroxilas do PVA, porém devido a efeitos de impedimento estérico é bastante provável que nem todos os grupos sofram reação de esterificação formando a estrutura reticulada. Desta forma, os grupos que permanecem livres, podem reagir com grupamentos amina presentes no RGDS. Cabe lembrar que na reação entre os grupos ácidos do BTCA e os grupos amina do RGDS, também poderia ocorrer impedimento estérico, porém esta possibilidade poderia explicar o pico de fusão em maiores temperaturas.



**Figura 72:** Termograma de DSC para o PVA-b (em preto) e para o PVA-c (em vermelho).



**Figura 73:** Termograma de DSC para o PVA-d (em preto) e para o PVA-e (em vermelho).



## 6 CONCLUSÕES

- Os hidrogéis de poli (álcool vinílico) modificados com grupos metacrilóila e grupos amina e funcionalizados com RGDS foram sintetizados e caracterizados com sucesso. A introdução de grupos metacrilóila, gerou altos graus de substituição, bem como a inserção de grupos amina. A reação de fotoreticulação não alterou a estrutura química do hidrogel e a funcionalização com RGDS se mostrou eficiente, segundo resultados obtidos por ferramentas quimiométricas.

- O estudo de intumescimento dos hidrogéis fotoreticulados e funcionalizados mostrou que foi obtido géis altamente reticulados, confirmando os resultados do grau de substituição da reação de incorporação de grupos metacrilóila. As características reológicas desses hidrogéis também refletiram a influência do número de grupos metacrilóila inseridos na cadeia polimérica do PVA. Quanto as propriedades térmicas, não houve mudanças significativas nos hidrogéis fotopolimerizados após a funcionalização.

- Os resultados obtidos pelo teste de adesão e citotoxicidade mostrou que os hidrogéis reticulados fotoquimicamente não são letais para as células, uma vez que não ocorreu apoptose celular;

- Os hidrogéis obtidos por reticulação com agentes químicos, ácido cítrico e BTCA, foram sintetizados e caracterizados com sucesso. Porém, eles mostraram serem hidrogéis fracamente reticulados, Quanto as propriedades térmicas, não houve mudanças significativas após a funcionalização.

- Uma vez que os hidrogéis funcionalizados e reticulados fotoquimicamente apresentaram resultados promissores como biomaterial para a regeneração de tecidos a perspectiva é realizar outros testes de cito-toxicidade e também testes de biocompatibilidade e biodegradabilidade juntamente com testes *in vitro* e posteriormente *in vivo* para a certificação e eficiência de sua aplicação. Já os hidrogéis funcionalizados e reticulados com agentes químicos necessitam de maiores estudos, tanto em termos de síntese, como em avaliação de suas propriedades reológicas e de intumescimento.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bergmann, C. P.; Stumpf, A. In *Topics in Mining, Metallurgy and Materials Engineering*, Springer, (Edt); 2013; DOI: 10.1007/978-3-642-38224-6\_2.
2. Ratner, B. D.; Bryant, S. J.; *Annual Review Biomedical Engineering* **2004**, 6, 41.
3. Kirschner, C. M.; Anseth, K. S.; *Acta Materialia* **2013**, 61, 931.
4. Refojo, M. F.; *Journal of Biomedical Materials Research* **1971**, 5, 113.
5. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado. (Acesso em: 25 de fevereiro de 2014).
6. Wang, X.; Yan, C.; Ye, K.; He, Y.; Li, Z.; Ding, J.; *Biomaterials* **2013**, 34, 2865.
7. Lam, J.; Segura, T.; *Biomaterials* **2013**, 34, 3938.
8. Park, H.; Lee, K. Y.; *Carbohydrate Polymers* **2011**, 86, 1107.
9. Park, J. S.; N.Yang, H.; SuY.Jeon; Woo, D. G.; Na, K.; Keun-HongPark. *Biomaterials* **2010**, 31, 6239.
10. Cook, A. D.; Hrkach, J. S.; Gao, N. N.; Johnson, I. M.; Pajvani, U. B.; Cannizzaro, S. M.; Langer, R.; *Journal of Biomedical Materials Research* **1997**, 35, 513.
11. Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E.; *Nature* **1984**, 309, 30.
12. Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E.; *Biomaterial Science - An Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press: 1996.
13. Peppas, N. A.; Slaughter, B. V.; Khurshid, S. S.; Omar Z. Fisher; Khademhosseini, A.; *Adv. Mater.* **2009**, 21, 3307.
14. Peppas, N. A.; *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **1997**, 2, 531.
15. Watanabe, J.; Kiritoshi, Y.; Nam, K. W.; Ishihara, K., Hydrogels. In *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, 2ª edição ed.; 2008; p 3434.
16. Cassano, R.; Trombino, S.; Muzzalupo, R.; Tavano, L.; Picci, N.; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2009**, 72, 232.
17. Pounikar, Y.; Jain, P.; Khurana, N.; Omray, L. K.; Gajbhiye, A.; *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2012**, 4, 85.
18. Demitri, C.; Scalera, F.; Madaghiele, M.; Sannino, A.; Maffezzoli, A.; *International Journal of Polymer Science* **2013**, 2013.

19. Kim, S.; Iyer, G.; Nadarajah, A.; Frantz, J. M.; Spongberg, A. L.; *International Journal of Polymer Analysis and Characterization* **2010**, 15, 307.
20. Sannino, A.; Demitri, C.; Madaghiele, M.; *Materials* **2009**, 2, 353.
21. Hoare, T. R.; Kohane, D. S.; *Polymer* **2008**, 49, 1993.
22. Thiele, J.; Ma, Y.; Bruekers, S. M. C.; Ma, S.; Huck, W. T. S.; *Advanced Materials* **2014**, 26, 125.
23. Jejurikar, A.; Seow, X. T.; Lawrie, G.; Martin, D.; Jayakrishnan, A.; Grøndahl, L.; *Journal of Materials Chemistry* **2012**, 22, 9751.
24. Cui, L.; Jia, J.; Guo, Y.; Liu, Y.; Zhu, P.; *Carbohydrate Polymers* **2014**, 99, 31.
25. Fukae, R.; Yoshimura, M.; Yamamoto, T.; Nishinari, K.; *Journal of Applied Polymer Science* **2011**, 120, 573.
26. Ahmed, E. M.; *Journal of Advanced Research* **2013**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.00>.
27. Xiao, L.; Isner, A. B.; Hilt, J. Z.; Bhattacharyya, D.; *Journal of Applied Polymer Science*. **2013**, 128, 1804.
28. Yamaki, K.; Haradaa, I.; b, M. G.; Choc, C.-S.; Akaike, T.; *Biomaterials* **2009**, 30, 1421.
29. Zang, Z.; Chen, L.; Deng, M.; Bai, Y.; Chen, X.; Jing, X.; *J. Polym. Sci. Part A: Polymer Chemistry* **2011**, 49, 2941.
30. Ozay, O.; . *Journal of Applied Polymer Science* **2014**, 131, 39660.
31. Boruah, M.; Mili, M.; Sharma, S.; Gogoi, B.; Dolui, S. K.; *Polymer Composites* **2014**, DOI 10.1002/pc.22909.
32. Servant, A.; Bussy, C.; Al-Jamal, K.; Kostarelos, K.; *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, 1, 4593.
33. Zhao, Y.-L.; Stoddart, J. F.; *Langmuir* **2009**, 25, 8442.
34. Patel, A.; Mequanint, K. In *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges*, (Edt); 2011; 275-296.
35. Vermonden, T.; Censi, R.; Hennink, W. E.; *Chemical Reviews* **2012**, 112, 2853.
36. Kozlovskaya, V.; Chen, J.; Tedjo, C.; Liang, X.; Campos-Gomez, J.; Oh, J.; Saeed, M.; Lungu, C. T.; Kharlampieva, E.; *Journal of Materials Chemistry B* **2014**, DOI: 10.1039/c4tb00165f.

37. Silva, F. P. Síntese e caracterização de hidrogéis de Poli[(N-isopropilacrilamida)-co-(ácido metacrílico)] e sua aplicação como sistemas de liberação controlada de medicamentos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.
38. Prasannan, A.; Tsai, H.-C.; Chen, Y.-S.; Hsiue, G.-H.; *Journal of Materials Chemistry B* **2014**, DOI: 10.1039/c3tb21360a.
39. Lin, G.; Cosimbescu, L.; Karin, N. J.; Tarasevich, B. J.; *Biomedical Materials* **2012**, 7, 1.
40. Kharkar, P. M.; Kiick, K. L.; Kloxin, A. M.; *Chemical Society Reviews* **2013**, 42, 7335.
41. Hoffman, A. S.; *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, 64, 18.
42. Teixeira, L. S. M.; Feijen, J.; Blitterswijk, C. A. v.; Dake, S. A.; Karperien, M.; *Biomaterials* **2012**, 33, 1281.
43. Gulrez, S. K. H.; Al-Assaf, S.; Phillips, G. O. In *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications*, (Edt); 2011; 117-151.
44. Davidovich-Pinhas, M.; Bianco-Peled, H.; *Carbohydrate Polymers* **2010**, 79, 1020.
45. Bhosale, R. R.; Osmani, R. A.; Ghodake, P. P.; Shaikh, S. M.; Chavan, S. R.; *International Journal of Pharmaceutical Medical Research* **2013**, 1, 60.
46. Ashit Kumar Pramanick; Gupta, S.; Mishra, T.; Sinha, A.; *Materials Science and Engineering C* **2012**, 32, 222.
47. Zhang, H.; Xia, H.; Zhao, Y.; *ACS Macro Letters* **2012**, 1, 1233.
48. Millon, L. E.; Padavan, D. T.; Hamilton, A. M.; Boughner, D. R.; Wan, W.; *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials* **2012**, 100:B, 01.
49. Gupta, S.; Webster, T. J.; Sinha, A.; *Journal of Materials Science: Materials Medicine* **2011**, 22, 1763.
50. Bae, K. H.; Wang, L.-S.; Kurisawa, M.; *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, 1, 5371.
51. Berger, J.; Reista, M.; Mayera, J. M.; Felth, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R.; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, 57, 19.
52. Reinhart, C. T.; Peppas, N. A.; *Journal of Membrane Science* **1984**, 18, 227.
53. Varshosaz, J.; Kooaie, N.; *Iranian Polymer Journal* **2002**, 11, 123.

54. Gupta, A.; Kumar, R.; Upadhyay, N. K.; Surekha, P.; Roy, P. K.; *Journal of Applied Polymer Science* **2009**, 111, 1400.
55. More, S. M.; Kulkarni, R. V.; Sa, B.; Kayane, N. V.; *Journal of Applied Polymer Science* **2010**, 116, 1732.
56. Coelho, S. d. L. Desenvolvimento e caracterização de hidrogel para liberação de nitrofurazona. Dissertação de Mestrado, Universidade de Sorocaba, 2012.
57. Alupeii, I. C.; Popa, M.; Hamcerencu, M.; Abadie, M. J. M.; *European Polymer Journal* **2002**, 38, 2313.
58. Paradossi, G.; Finelli, I.; Cerroni, B.; Chiessi, E.; *Molecules* **2009**, 14, 3662.
59. Thinh, N. N.; Hanh, P. T. B.; Ha, L. T. T.; Anh, L. N.; Hoang, T. V.; Hoang, V. D.; Dang, L. H.; Khoi, N. V.; Lam, T. D.; *Materials Science and Engineering C* **2013**, 33, 1214.
60. Bhattarai, N.; Gunn, J.; Zhang, M.; *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, 62, 83.
61. Cui, L.; Jia, J.; Guo, Y.; Liu, Y.; Zhu, P.; *Carbohydrate Polymers* **2014**, 99, 31.
62. Thomas, L. V.; Arun, U.; Remya, S.; Nair, P. D.; *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2009**, 20, 259.
63. Sadahira, C. M. Síntese, caracterização e avaliação do perfil de liberação in vitro de hidrogéis de álcool polivinílico pH sensitivos processados por métodos físico-químicos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
64. Pereira, B. M. Hidrogéis de Poli(álcool vinílico): efeito da densidade de reticulação e da natureza química do reticulante sobre a liberação controlada de compostos iônicos. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, 1997.
65. Taguchi, T.; Saito, H.; Uchida, Y.; Sakane, M.; Kobayashi, H.; Kataoka, K.; Tanaka, J.; *Materials Science and Engineering C* **2004**, 24.
66. Aoki, H.; Taguchi, T.; Saito, H.; Kobayashi, H.; Kataoka, K.; Tanaka, J.; *Materials Science and Engineering C* **2004**, 24, 787.
67. Saito, H.; Taguchi, T.; Aoki, H.; Murabayashi, S.; Mitamura, Y.; Tanaka, J.; Tateishi, T.; *Acta Biomaterialia* **2007**, 3, 89.
68. Demitri, C.; Sole, R. D.; Scalera, F.; Sannino, A.; Vasapollo, G.; Maffezzoli, A.; Ambrosio, L.; Nicolais, L.; *Journal of Applied Polymer Science* **2008**, 110, 2453.
69. Gorgieva, S.; Kokol, V.; *Carbohydrate Polymers* **2011**, 85, 664.

70. Seidel, C.; Kulicke, W.-M.; Heß, C.; Hartmann, B.; Lechner, M. D.; Lazik, W.; *Starch/Stärke* **2001**, 53, 305.
71. Hsieh, S. H.; Lin, E. S.; Wei, H. C.; *Journal of Applied Polymer Science* **2006**, 101, 3264.
72. Orhan, M.; Kut, D.; Gunesoglu, C.; *Journal of Applied Polymer Science* **2009**, 111, 1344.
73. Zhou, W.; Yang, C. Q.; Lickfield, G. C.; *Journal of Applied Polymer Science* **2004**, 91, 3940.
74. Georgea, J. D.; Pricea, C. J.; Marra, M. C.; Myersa, C. B.; Jahnke, G. D.; *Reproductive Toxicology* **2001**, 15, 413.
75. Executive Summary of Safety and Toxicity Information - National Toxicology Program. (Acesso em 27/03/2014),
76. Çay, A.; Miraftab, M.; *Journal of Applied Polymer Science* **2013**, 129, 3140.
77. Wang, D.-a.; Elisseeff, J. H., Photopolymerization. In *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, Taylor & Francis: 2013; pp 2150-2161.
78. Torgersen, J.; Qin, X.-H.; Li, Z.; Ovsianikov, A.; Liska, R.; Stampfl, J.; *Advanced Functional Materials* **2013**, 23, 4542.
79. Nguyen, K. T.; West, J. L.; *Biomaterials* **2002**, 23, 4307.
80. Martens, P.; Anseth, K. S.; *Polymer* **2000**, 41, 7715.
81. Jing Sun; Wenqian Xiao; Yajun Tang; Li, K.; Fan, H.; *Soft Matter* **2012**, 8, 2398.
82. Williams, C. G.; Malika, A. N.; Kima, T. K.; Manson, P. N.; Elisseeff, J. H.; *Biomaterials* **2005**, 26, 1211.
83. Ruiz, C. S. B. Avaliação da formação e degradação de filmes de vernizes curados por radiação ultravioleta e feixe de elétrons e expostos ao envelhecimento acelerado. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
84. Hennink, W. E.; Nostrum, C. F. v.; *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, 64, 223.
85. Barbucci, R.; *Hydrogels - Biological Properties and Applications*. Springer: Milan, 2009; p 15-20.
86. Ottenbrite, R. M.; Park, K.; Okano, T.; *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*. Springer: 2010; p 06.
87. Gerlach, G.; Arndt, K.-F.; *Hydrogel Sensors and Actuators*. Springer: Berlin, 2009; p 77-104.

88. Liu, Y.; Wang, S.; Krouse, J.; Kotov, N. A.; Eghtedari, M.; Vargas, G.; Motamedi, M.; *Journal of Biomedical Materials Research* **2007**, 83A, 1.
89. Mansur, H. S.; Oréface, R. L.; Mansur, A. A. P.; *Polymer* **2004**, 45, 7193.
90. Xun, W.; Wu, D.-Q.; Li, Z.-Y.; Wang, H.-Y.; Fu-Wei Huang; Cheng, S.-X.; Zhang, X.-Z.; Zhuo, R.-X.; *Macromolecular Bioscience* **2009**, 9, 1219.
91. Zhao, C.; Zhuanga, X.; He, P.; Xiao, C.; He, C.; Sun, J.; Chen, X.; Jing, X.; *Polymer* **2009**, 50, 4308.
92. Kundu, J.; Poole-Warren, L. A.; Martens, P.; Kundu, S. C.; *Acta Biomaterialia* **2012**, 8, 1720.
93. Kim, S.-H.; Chu, C.-C.; *Journal of Biomedical Materials Research* **2000**, 49.
94. Ghasemzadeh, H.; Ghanaat, F.; *Journal of Polymer Research* **2014**, 21, 355.
95. Peppas, N. A.; J. Zach Hilt; Khademhosseini, A.; Langer, R.; *Advanced Materials* **2006**, 18, 1345.
96. Ahearne, M.; Yang, Y.; Liu, K.-K. In *Mechanical Characterisation of Hydrogels for Tissue Engineering Applications*, N Ashammakhi, R. R., & F Chiellini, (Edt); Expertissues: 2008;
97. Lewis, A.; ClareHeaysman In *Polymeric and Self Assembled Hydrogels: From Fundamental Understanding to Applications*, Loh, X. J.; Scherman, O. A., (Edt); Royal Society of Chemistry: 2013; 232-252.
98. Hassan, C. M.; Peppas, N. A. In *Advances in polymer science*, (Edt); Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 2000; 38-55.
99. Qiu, K.; Qiu, K.; *Polymer Composites* **2013**, 34, 799.
100. An, Q.; Beh, C.; Xiao, H.; *Journal of Applied Polymer Science* **2014**, 131, DOI: 10.1002/app.39720.
101. Jiang, S.; Liu, S.; Feng, W.; *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **2011**, 4, 1228.
102. Peppas, N. A.; Merrill, E. W.; *Journal of Applied Polymer Science* **1977**, 21.
103. Fejerskov, B.; Smith, A. A. A.; Jensen, B. E. B.; Hussmann, T.; Zelikin, A. N.; *Langmuir* **2013**, 29, 344.
104. Bajpai, A. K.; Bhanu, S.; *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2004**, 15, 43.
105. Murphy, D. J.; Sankalia, M. G.; Loughlin, R. G.; Donnelly, R. F.; Jenkins, M. G.; McCarron, P. A.; *International Journal of Pharmaceutics* **2012**, 423, 326.

106. Hassan, C. M.; Peppas, N. A. In Science, A. i. P., (Edt); Springer: 2000; 37-65.
107. Peppas, N. A.; Merrill, E. W.; *Journal of Biomedical Materials Research* **1977**, 11, 423.
108. Peppas, N. A.; Robert E. Benner, J.; *Biomaterials* **1980**, 1, 158.
109. Peppas, N. A.; *Polymer Preprints* **1977**, 18, 794.
110. Nuttelman, C. R.; Henry, S. M.; Anseth, K. S.; *Biomaterials* **2002**, 23, 3617.
111. Rodrigues, A. A.; Batista, N. A.; Bavaresco, V. P.; Baranauskas, V.; Ceragioli, H. J.; Peterlevitz, A. C.; Mariolani, J. R. L.; Santana, M. H. A.; Belangero, W. D.; *Carbon* **2012**, 50, 2091.
112. Song, W.; Markel, D. C.; Jin, X.; Shi, T.; Ren, W.; *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2012**, 100A, 3071.
113. Schmedlen, R. H.; Masters, K. S.; West, J. L.; *Biomaterials* **2002**, 23, 4325.
114. Matsuda, T.; Kondo, A.; Makino, K.; Akutsu, T.; *ASAIO Trans* **1989**, 35.
115. Kawase, M.; Miura, N.; Kurikawa, N.; Masuda, K.; Higashiyama, S.; Yagi, K.; Mizoguchi, T.; *Biological Pharmaceutical Bulletin*. **1999**, 22, 999.
116. Bellis, S. L.; *Biomaterials* **2011**, 32, 4205.
117. Ramakrishna, S.; Sundarrajan, S.; Ravichandran, R.; Venugopal, J. R.; Mukherjee, S.; *Macromolecular Bioscience* **2012**, 12, 286.
118. Meredith, J. E.; Fateli, B.; Schwartz, M. A.; *Molecular Cellular Biology* **1993**, 9, 953.
119. Bosman, F. T.; Stamenkovic, I.; *The Journal of Pathology* **2003**, 200, 423.
120. Ungaro, F.; Biondi, M.; Indolfi, L.; Rosa, G. D.; Rotonda, M. I. L.; Quaglia, F.; Netti, P., Bioactivated Polymer Scaffolds for Tissue Engineering. In *Topics in Tissue Engineering*, Ashammakhi, N.; Reis, R. L., Eds. 2005; Vol. 2.
121. Pereira, A. L. A. Expressão imuno-histoquímica das integrinas  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$  e  $\alpha 5\beta 1$  em carcinoma epidermóide de lábio inferior e língua. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.
122. Munarin, F.; Guerreiro, S. G.; Grellier, M. A.; Tanzi, M. C.; Barbosa, M. A.; Petrini, P.; Granja, P. L.; *Biomacromolecules* **2011**, 12, 568.
123. Hersel, U.; Dahmen, C.; Kessler, H.; *Biomaterials* **2003**, 24, 4385.
124. Fields, G. B.; Lauer, J. L.; Dori, Y.; Forns, P.; Yu, Y.-C.; Tirrell, M.; *Biopolymers* **1998**, 47, 143.



125. Ito, Y.; Kajihara, M.; Imanishi, Y.; *Journal of Biomedical Materials Research* **1991**, 25, 1325.
126. Neff, J. A.; Caldwell, K. D.; Tresco, P. A.; *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, 40, 511.
127. Hirano, Y.; Okuno, M.; Hayashi, T.; Goto, K.; Nakajima, A.; *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **1993**, 4, 235.
128. Perlin, L.; MacNeil, S.; Rimmer, S.; *Soft Matter* **2008**, 4, 2331.
129. McDonagh, B. H. Optimised Carbodiimide Chemistry for RGD-coupled Alginate. Tese de Doutorado, Norwegian University of Science and Technology, 2012.
130. Quirk, R. A.; Chan, W. C.; Davies, M. C.; Tendler, S. J. B.; Shakesheff, K. M.; *Biomaterials* **2001**, 22, 865.
131. Lin, H. B.; Sun, W.; Mosher, D. F.; Garciaecheverria, C.; Schaufelberger, K.; Lelkes, P. I.; Cooper, S. L.; *Journal of Biomedical Materials Research* **1994**, 28, 329.
132. Rafat, M.; Rotenstein, L. S.; You, J.-O.; Auguste, D. T.; *Biomaterials* **2012**, 33, 3380.
133. Sanjust, E.; Cocco, D.; Curreli, N.; Rescigno, A.; Sollai, F.; Bannister, J. V.; *Journal of Applied Polymer Science* **2002**, 85, 2471.
134. Dhoot, N. O.; Tobias, C. A.; Fischer, I.; Wheatley, M. A.; *Journal of Biomedical Materials Research A*. **2004**, 71, 191.
135. Maraldo, D.; Mutharasan, R.; *Sensors and Actuators B* **2007**, 123, 474.
136. Stuart, B.; *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Wiley: 2004.
137. Singh, B.; Vikrant Sharma; Pal, L.; *Carbohydrate Polymers* **2011**, 86, 1371.
138. Barruet, J.; Gaillet, C.; Penelle, J.; *Macromolecular Rapid Communications* **2007**, 28, 2007.
139. Crispim, E. G. Síntese e caracterização de hidrogéis de poli(álcool vinílico) modificado com metacrilato de glicidila (PVA-Ma) e de PVA-Ma associado com sulfato de condroitina. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá, 2006.
140. Bryant, S. J.; Davis-Arehart, K. A.; Luo, N.; Shoemaker, R. K.; Arthur, J. A.; Anseth, K. S.; *Macromolecules* **2004**, 37, 6726.
141. Martens, P.; Holland, T.; Anseth, K. S.; *Polymer* **2002**, 43, 6093.
142. Yeom, C. K.; Lee, K.-H.; *Journal of Applied Polymer Science* **1998**, 67, 209.
143. Lima, A. M. F.; Andreani, L.; Soldi, V.; Borsali, R.; *Quimica Nova* **2007**, 30, 832.
144. Kanaya, T.; Takahashi, N.; Takeshita, H.; Ohkura, M.; Nishida, K.; Kaji, K.; *Polymer Journal* **2012**, 44, 83.

145. Jeon, O.; Bouhadir, K. H.; Mansour, J. M.; Alsberg, E.; *Biomaterials* **2009**, 30, 2724.
146. Adamson, G. W.; Bawden, D.; *Journal of Chemical Information and Computer Science* **1981**, 21, 204.
147. Brereton, R. G.; *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. John Wiley & Sons, Ltd.: 2003; p 42-49.
148. Alvarez-Ordóñez, A.; Mouwen, D. J. M.; López, M.; Prieto, M.; *Journal of Microbiological Methods* **2011**, 84, 369.
149. Prieto, M.; Mouwen, D. J. M.; Hörman, A.; Korkeala, H.; Alvarez-Ordóñez, A.; *Vibrational Spectroscopy* **2011**, 56, 193.
150. Ferrão, M. F.; Mueller, D.; Marder, L.; Costa, A. B. d.; Schneider, R. d. C. d. S.; *Sensors* **2013**, 13, 4258.
151. Flory, P. J.; *Principles of Polymer Chemistry*. Cornell University Press: New York, 1953.
152. Zheng, Y.; Li, P.; Zhang, J.; Wang, A.; *European Polymer Journal* **2007**, 43, 1691.
153. Martens, P.; Blundo, J.; Nilasaroya, A.; Odell, R. A.; Cooper-White, J.; Poole-Warren, L. A.; *Chemistry of Materials* **2007**, 19, 2641.
154. Peng, Z.; Li, Z.; Zhang, F.; Peng, X.; *Journal of Macromolecular Science Part B: Physics* **2012**, 51, 1934.
155. Hosseinzadeh, H.; *Current Chemistry Letters* **2013**, 2, 153.
156. Saunders, J. R.; Moussa, W.; *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **2012**, 50, 1198.
157. Tang, Y.-F.; Du, Y.-M.; Hu, X.-W.; Shi, X.-W.; Kennedy, J. F.; *Carbohydrate Polymers* **2007**, 67, 491.
158. Smith, T. J.; Kennedy, J. E.; Higginbotham, C. L.; *Journal of Materials Science* **2010**, 45, 2884.
159. Shimojo, A. A. M.; Pires, A. M. B.; Torre, L. G. d. l.; Santana, M. H. A.; *Journal of Applied Polymer Science* **2013**, 128, 2180.
160. Green, M. S.; Tobolsky, A. V.; *The Journal of Chemical Physics* **1946**, 14, 80.
161. Choudhary, S.; Bhatia, S. R.; *Carbohydrate Polymers* **2012**, 87 524.
162. Uchida, Y.; Fukuda, K.; Murakami, Y.; *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **2013**, 51, 124.

163. Rodrigues, I. R. Síntese e Caracterização de Redes Poliméricas a base de Quitosana e PVP e PVA para aplicação na liberação controlada de fármacos Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.
164. El-Sayed, S.; K.H.Mahmoud; A.A.Fatah; A.Hassen. *Physica B* **2011**, 406, 4068.
165. Ramos, G. M. d. Fibras ocoas compostas para osmose inversa e nanofiltração baseadas em poli(álcool vinílico) com resistência a agentes oxidantes e incrustações orgânicas. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.
166. Werner, C.; Prewitz, M.; Seib, F. P.; Pompe, T.; *Macromolecular Rapid Communications* **2012**, 33, 1420.
167. Elisseff, J.; Ferran, A.; Varghese, H., S.; Zhang, Z.; *Stem Cells and Development* **2006**, 15, 295.
168. Lei, Y.; Gojgini, S.; Lam, J.; Segura, T.; *Biomaterials* **2011**, 32, 39.
169. Jeon, O.; Powell, C.; Ahmed, S. M.; Alsberg, E.; *Tissue Engineering: Part A* **2010**, 16, 2915.

## **8 ANEXOS**

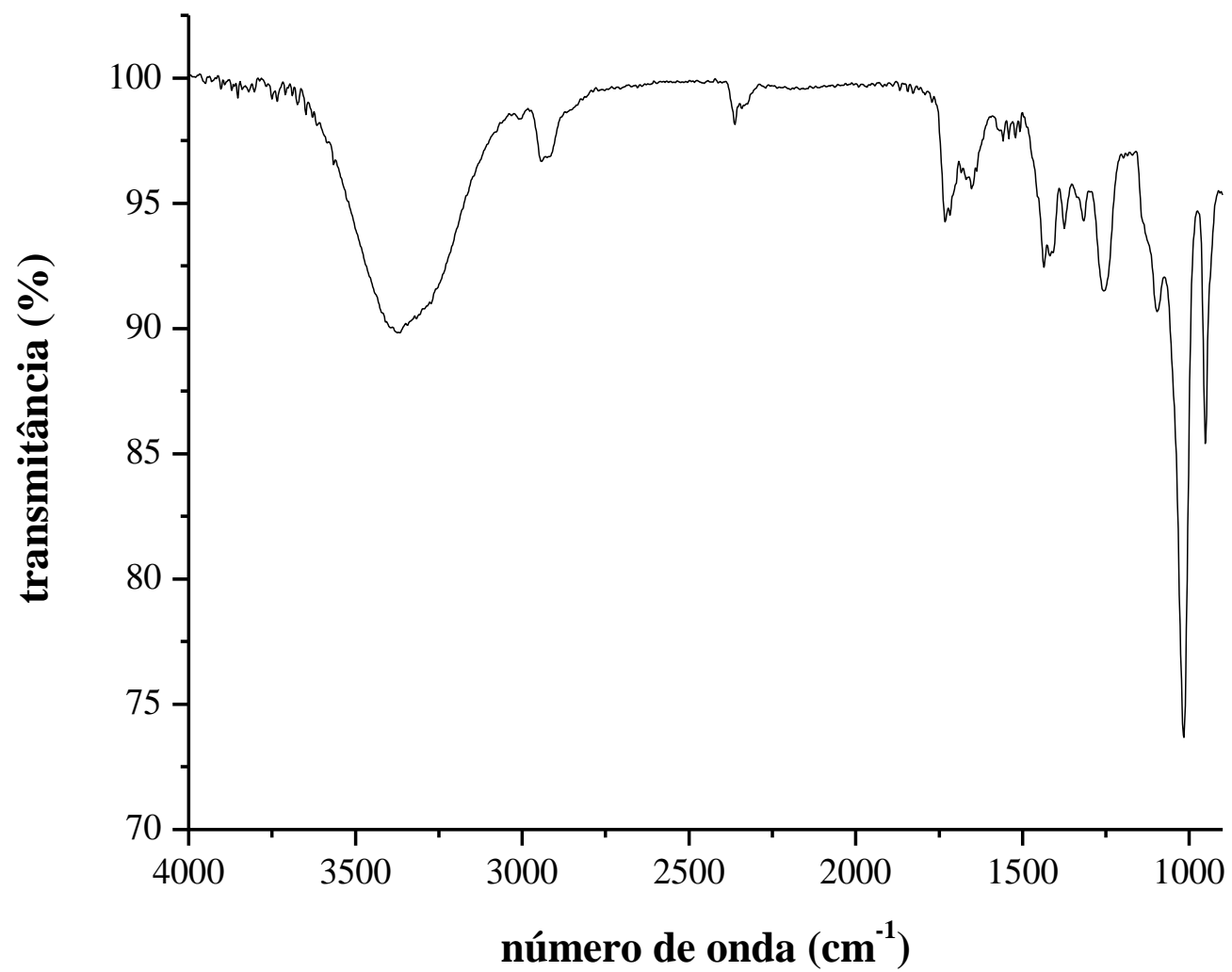


Figura A1: Espectro de absorção na região do infravermelho (ATR) do polímero modificado 1.

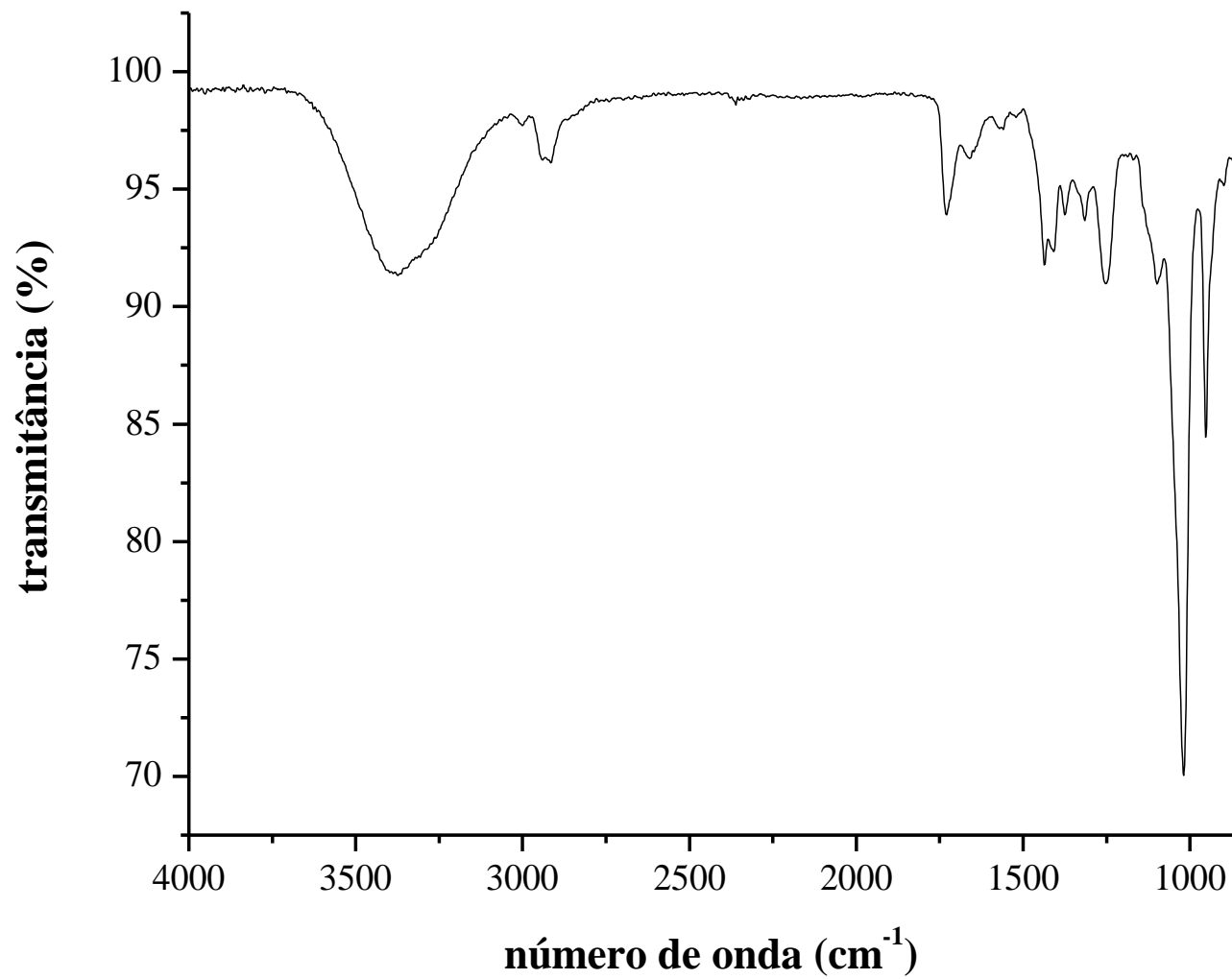


Figura A2: Espectro de absorção na região do infravermelho (ATR) do polímero modificado 2.

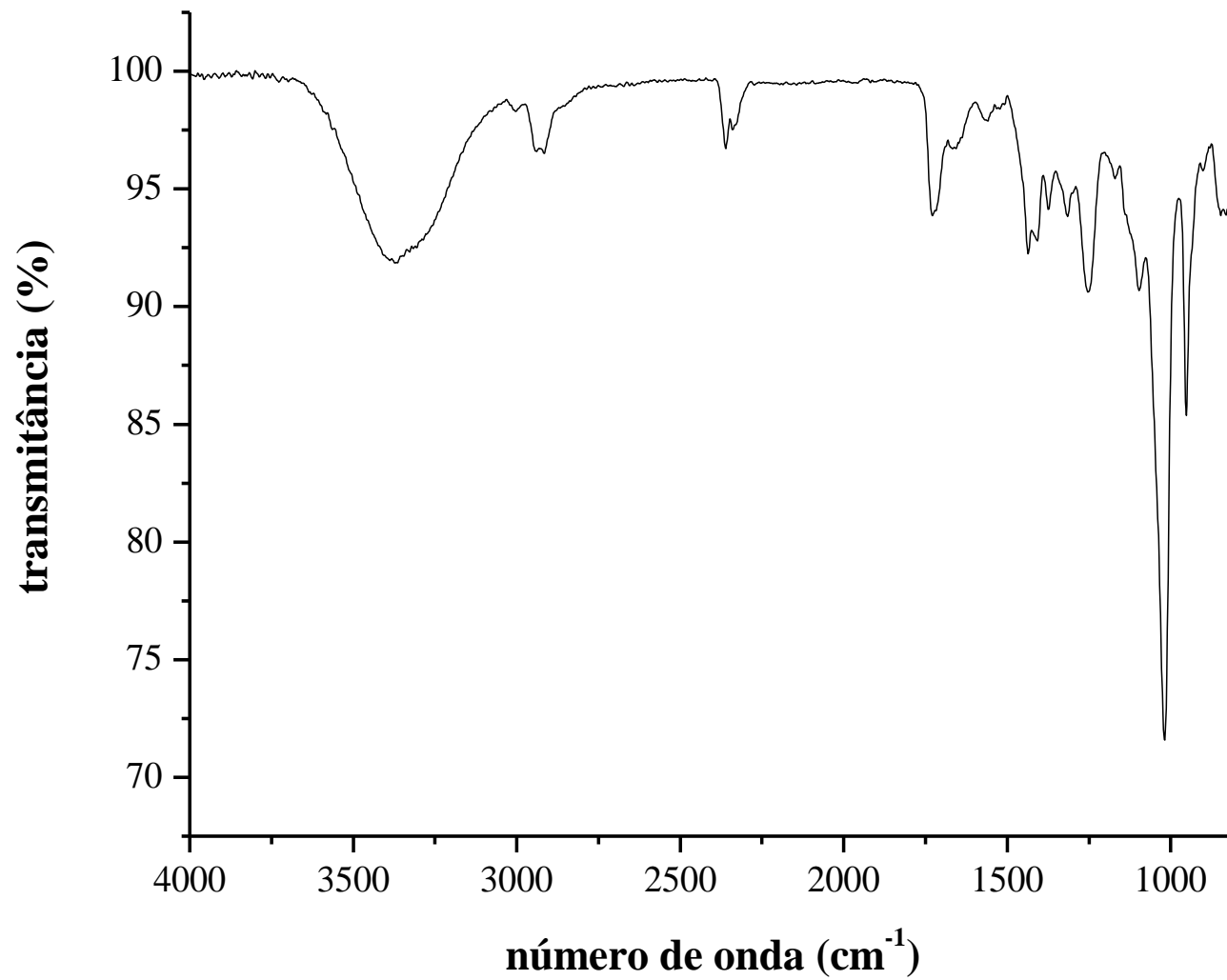


Figura A3: Espectro de absorção na região do infravermelho (ATR) do polímero modificado 5.

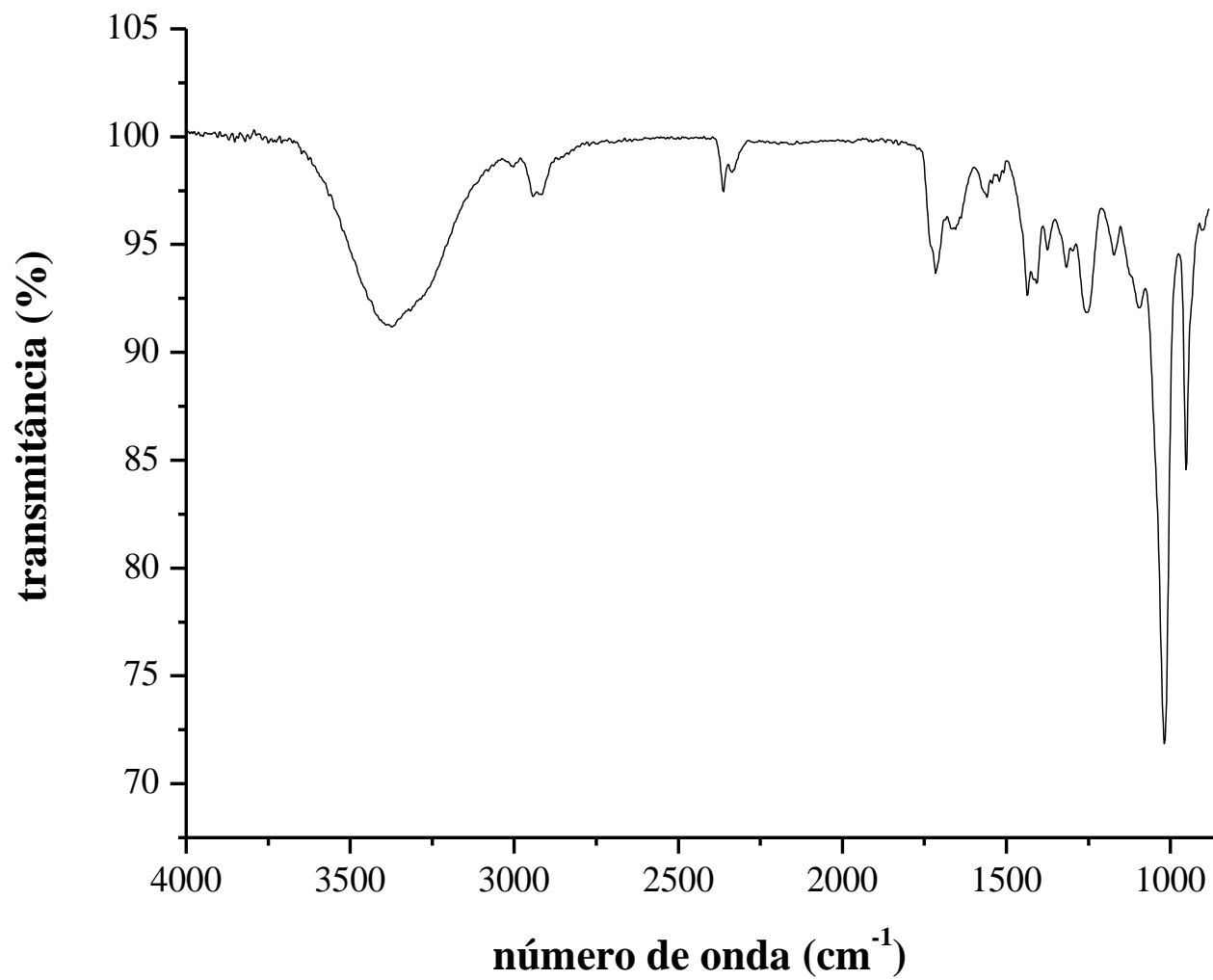


Figura A4: Espectro de absorção na região do infravermelho (ATR) do polímero modificado 10.



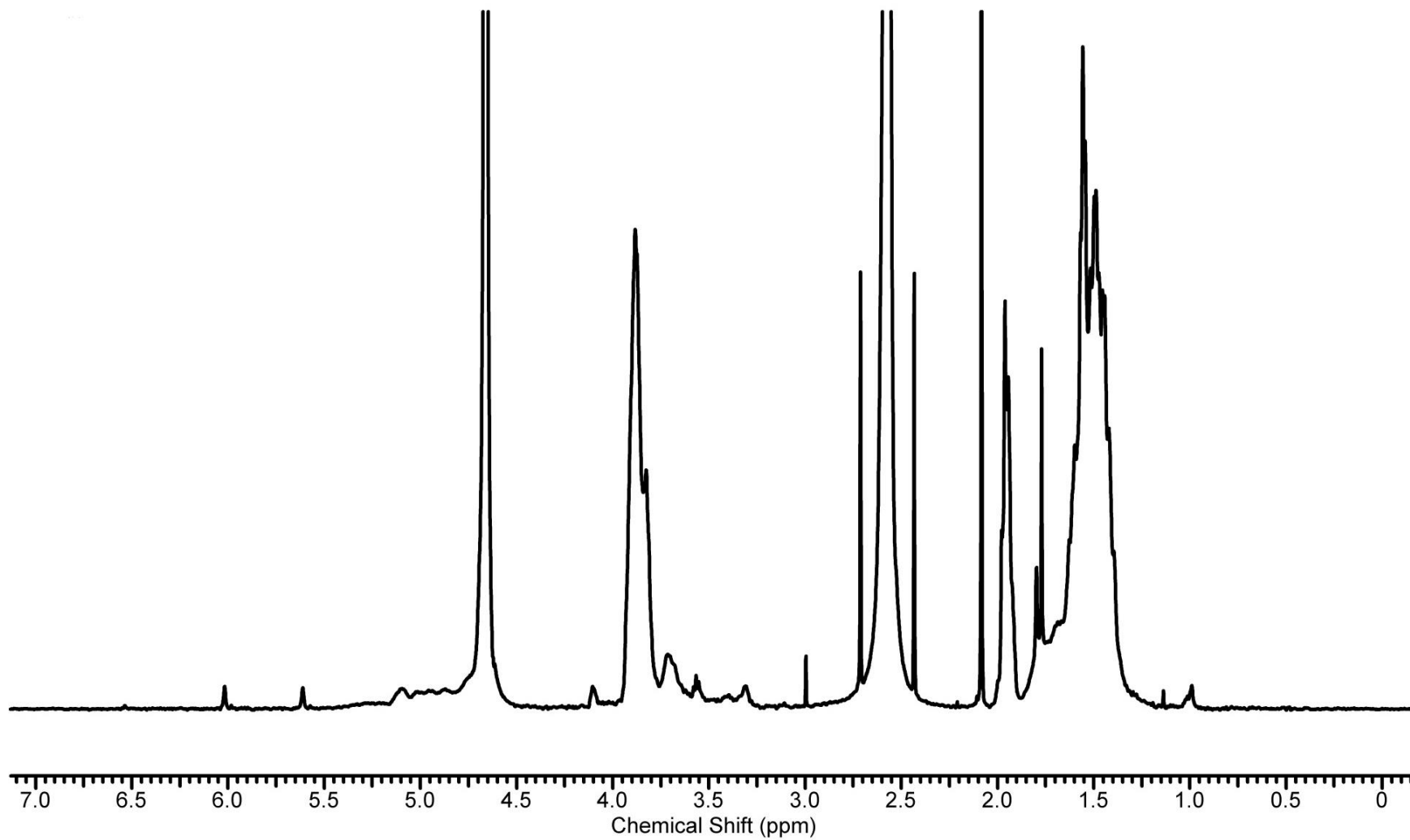


Figura A5: Espectro de RMN- $^1\text{H}$  do polímero modificado 1 em  $\text{D}_2\text{O}$ .

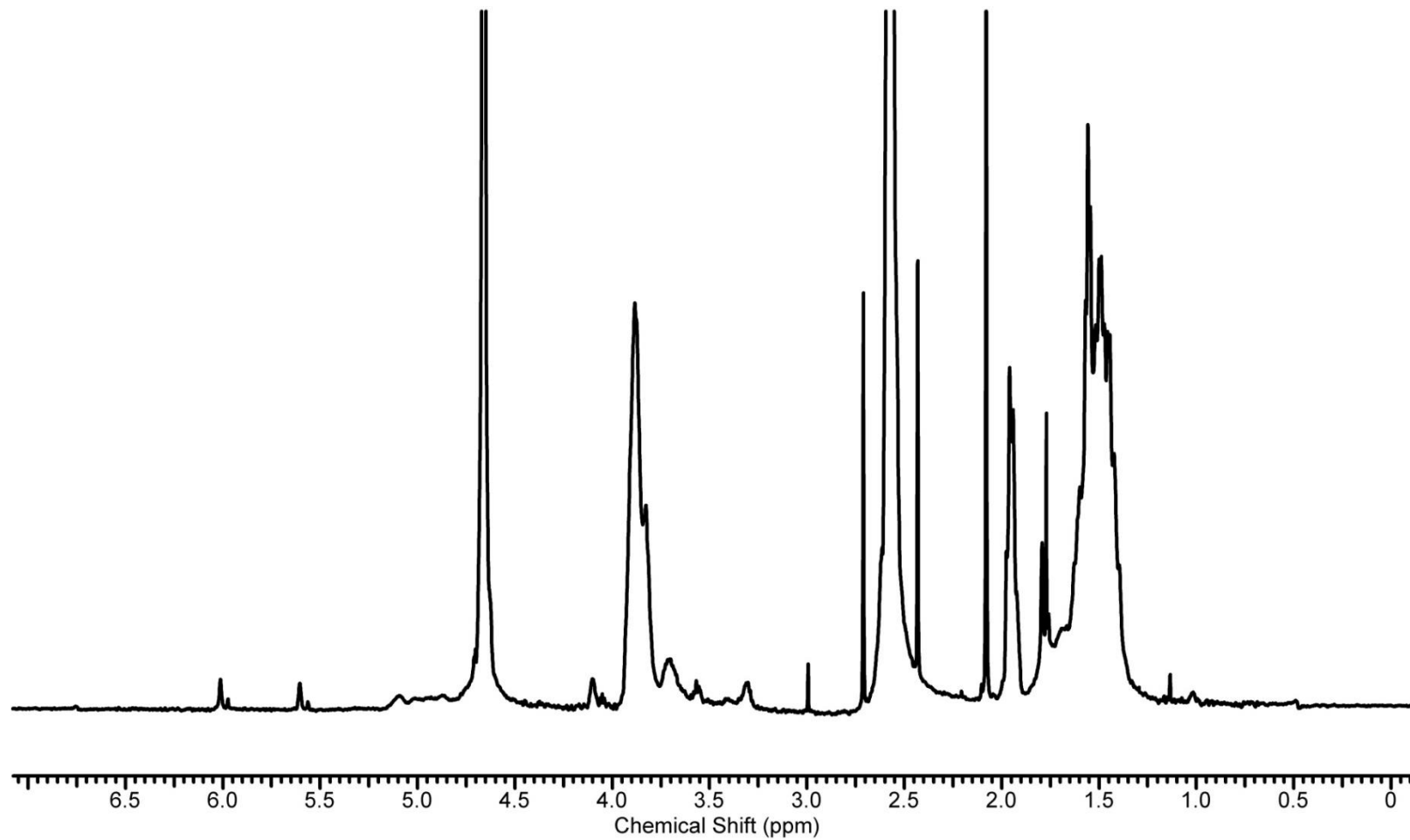


Figura A6: Espectro de RMN- $^1\text{H}$  do polímero modificado 2 em  $\text{D}_2\text{O}$ .

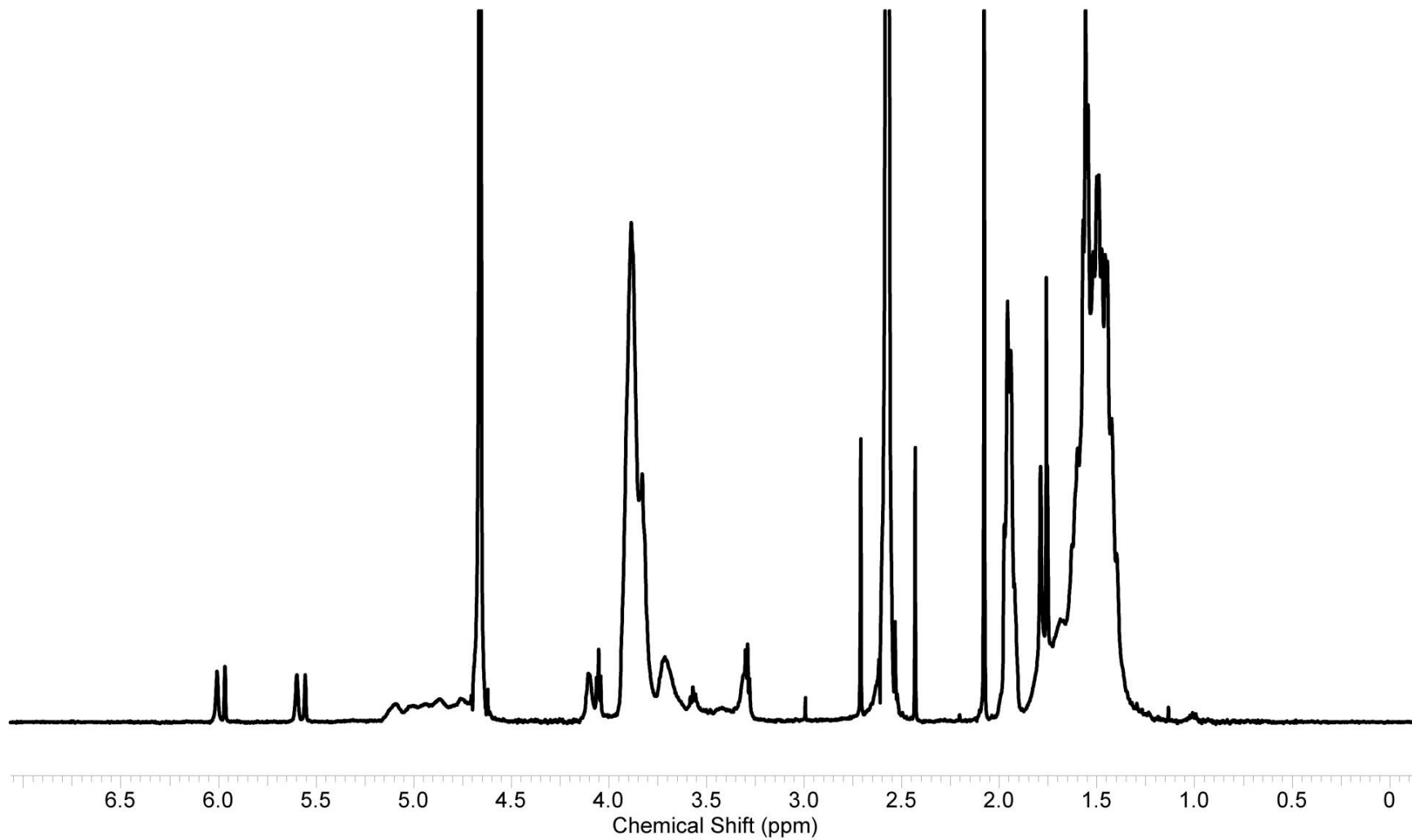


Figura A7: Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do polímero modificado 5 em D<sub>2</sub>O.

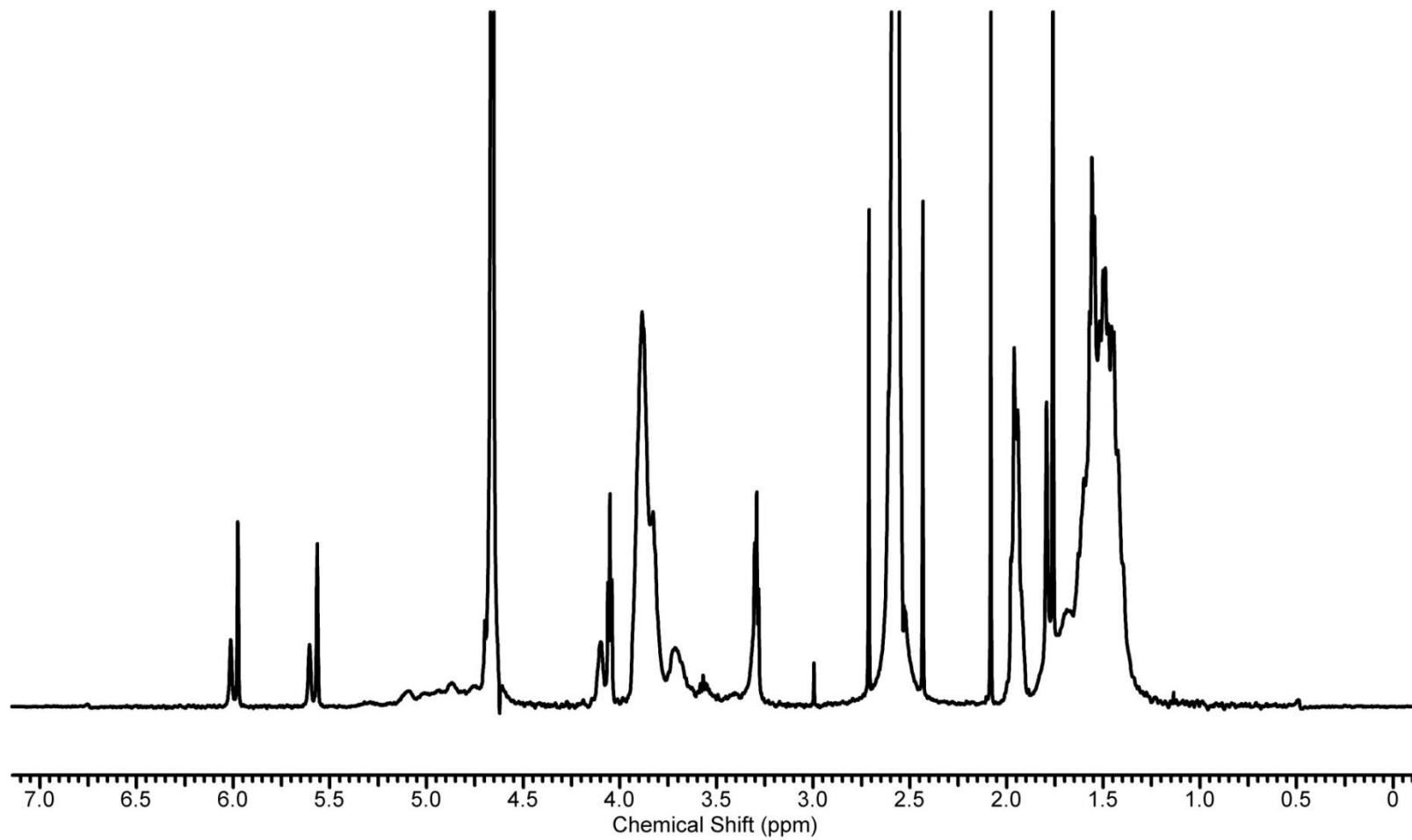


Figura A8: Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do polímero modificado 10 em D<sub>2</sub>O.

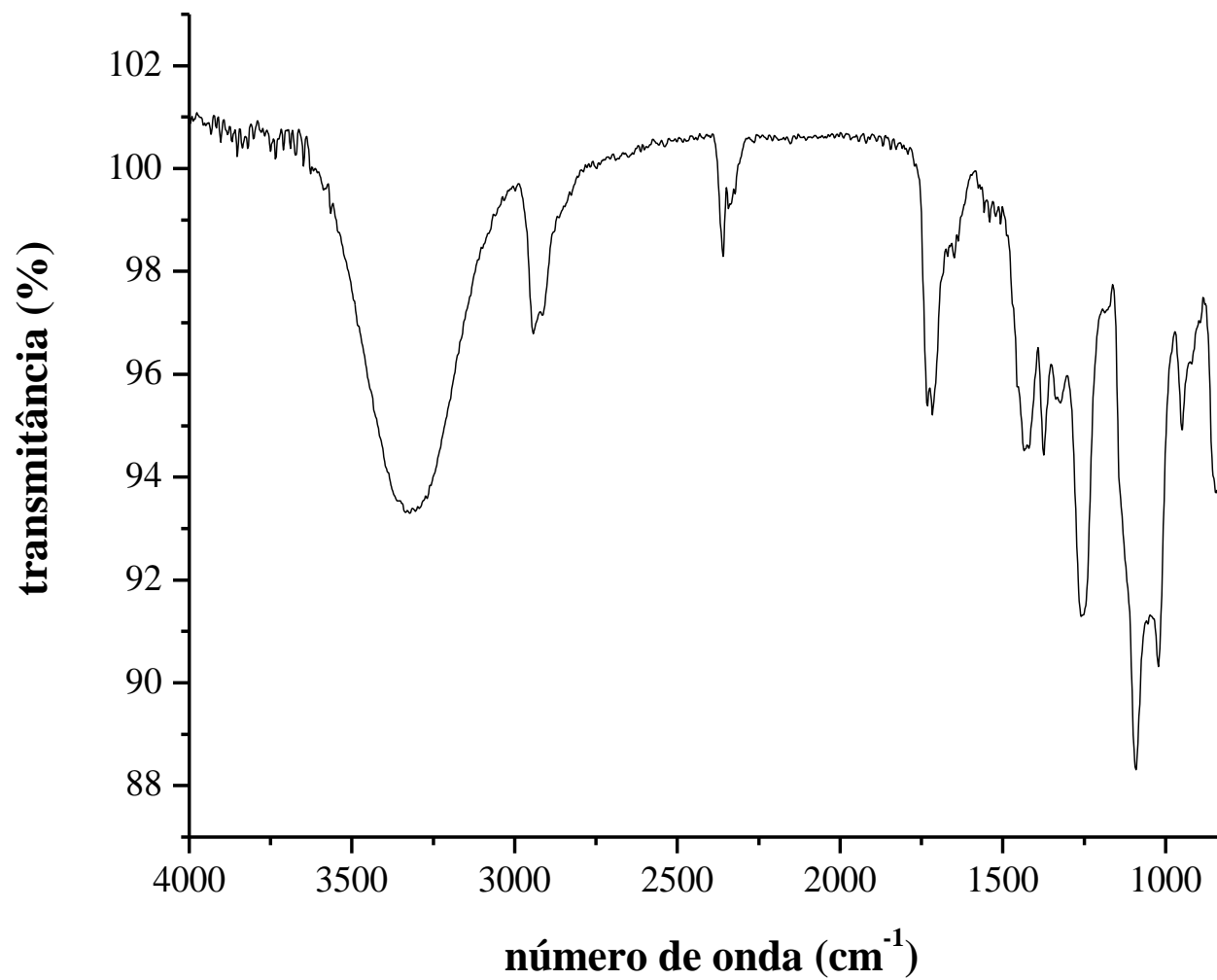


Figura A9: Espectro de absorção na região do infravermelho (ATR) do polímero modificado 1A.

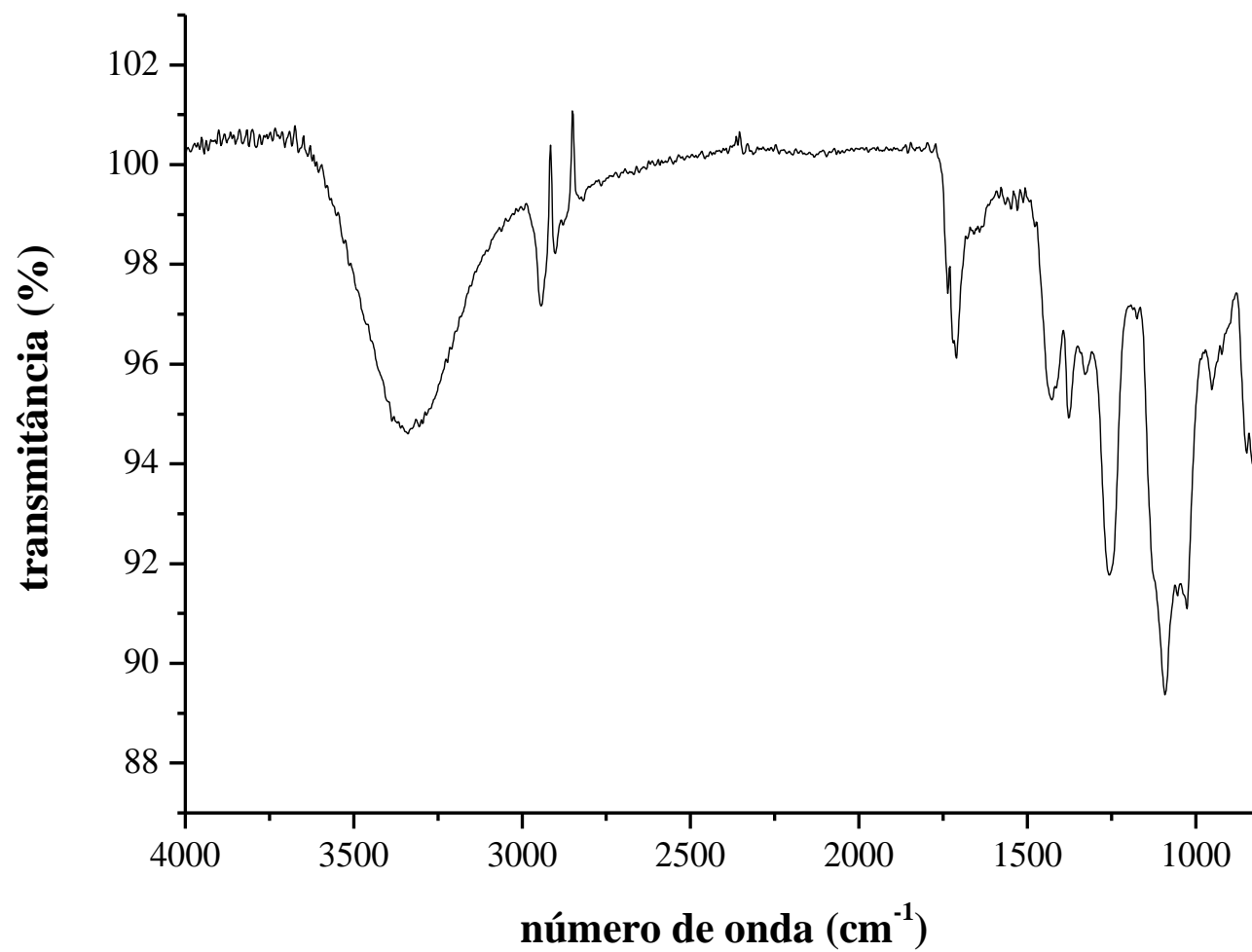


Figura A10: Espectro de absorção na região do infravermelho (ATR) do polímero modificado 2A.

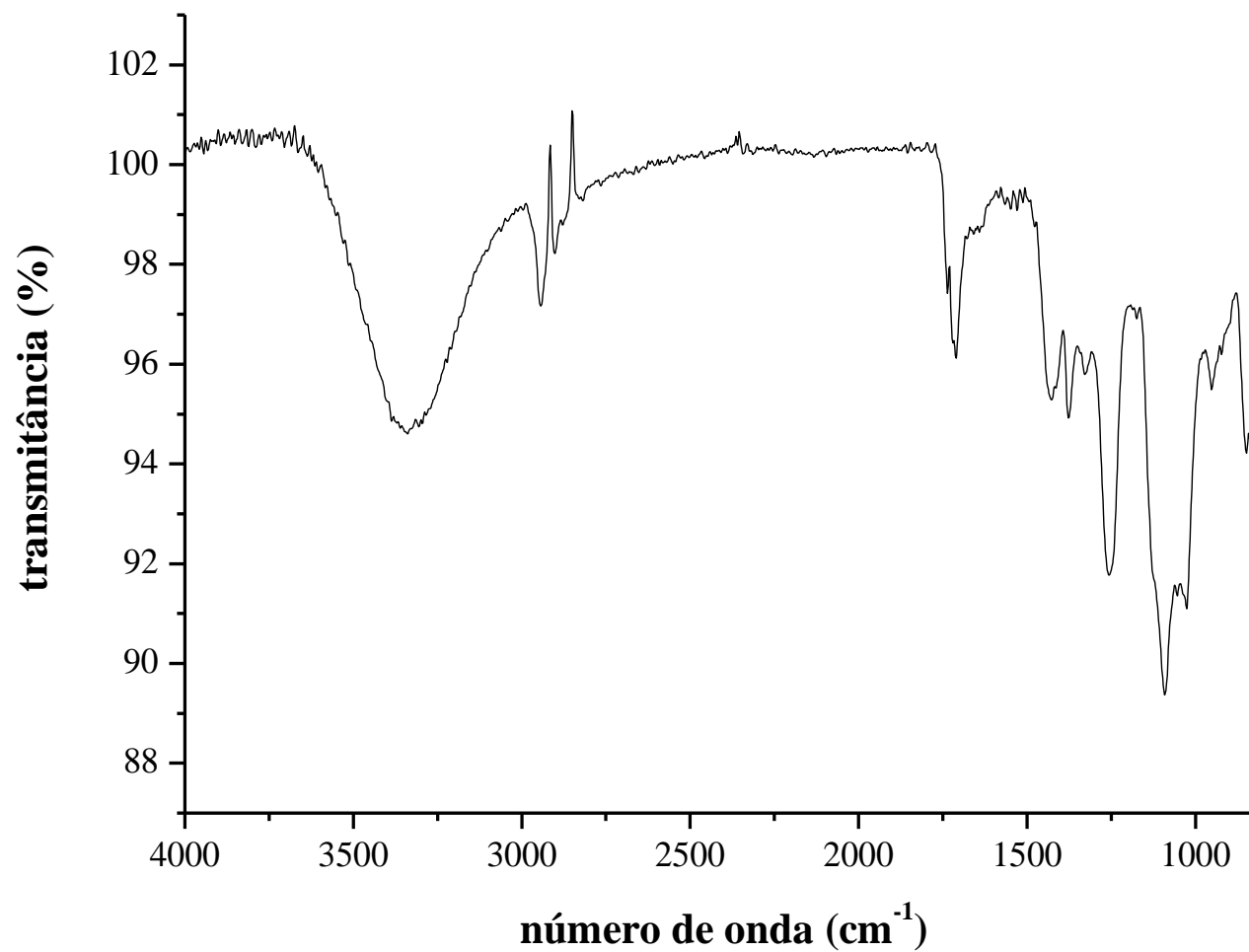


Figura A11: Espectro de absorção na região do infravermelho (ATR) do polímero modificado 5A.

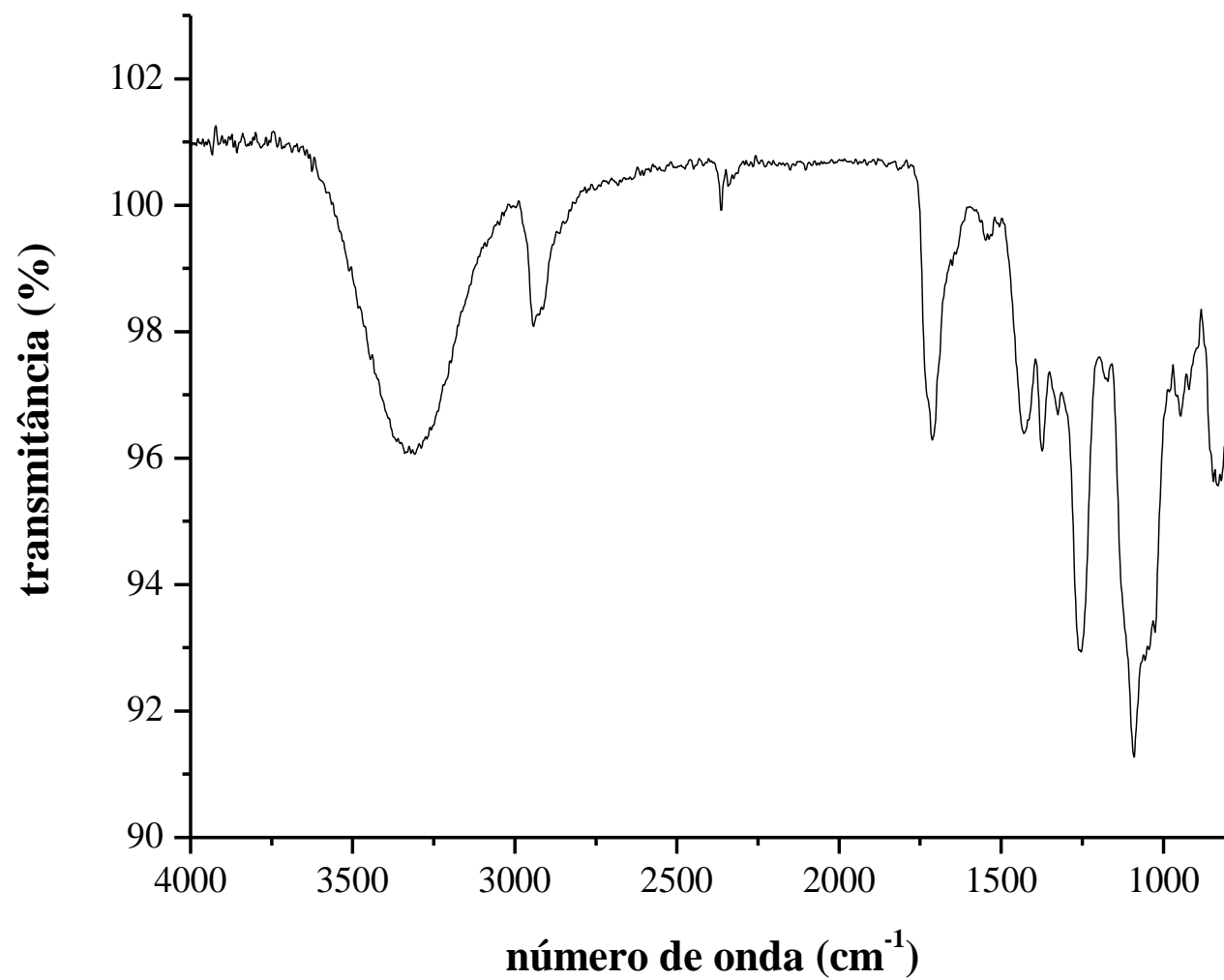


Figura A12: Espectro de absorção na região do infravermelho (ATR) do polímero modificado 10A.



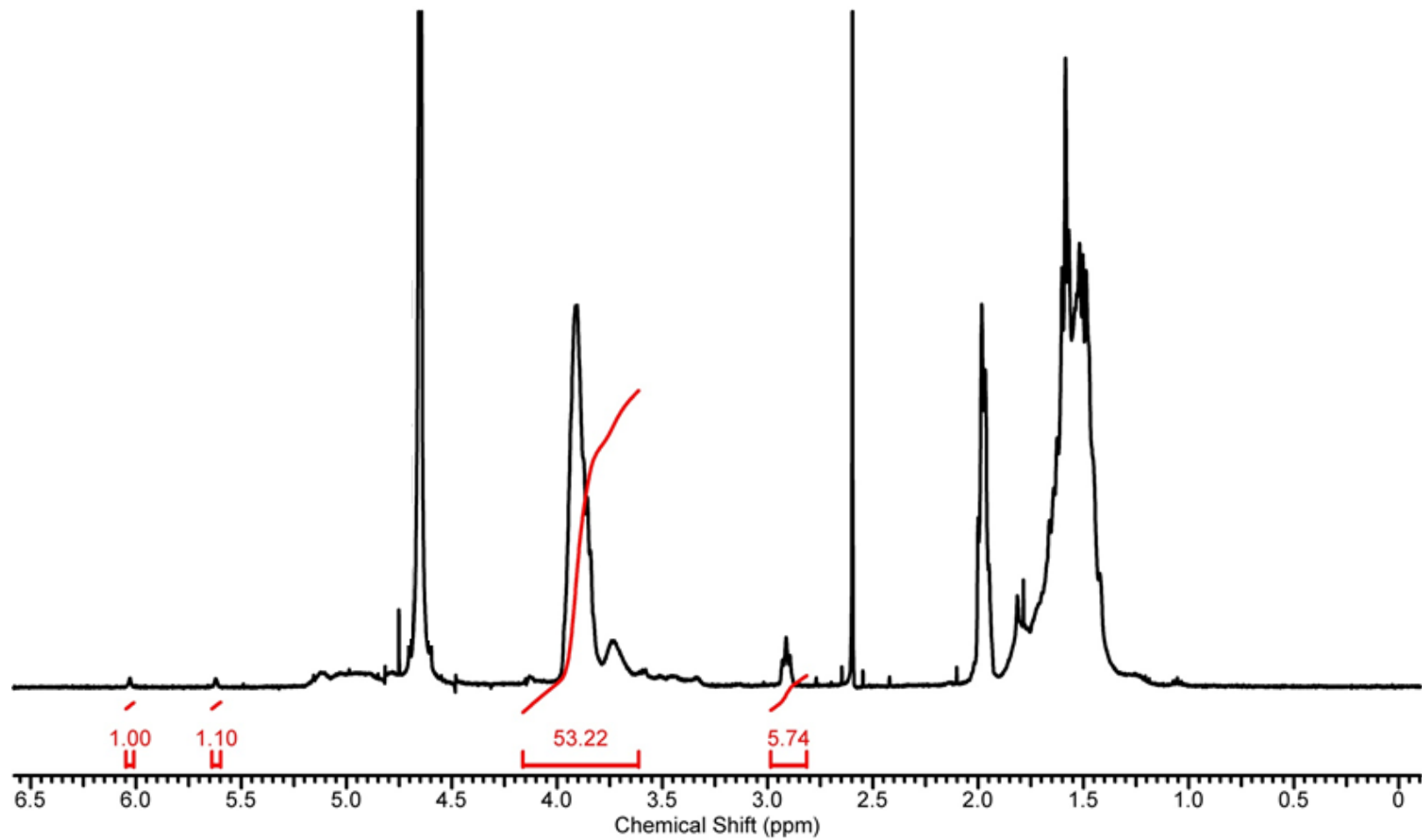


Figura A13: Espectro de RMN- $^1\text{H}$  do polímero modificado 1A em  $\text{D}_2\text{O}$ .

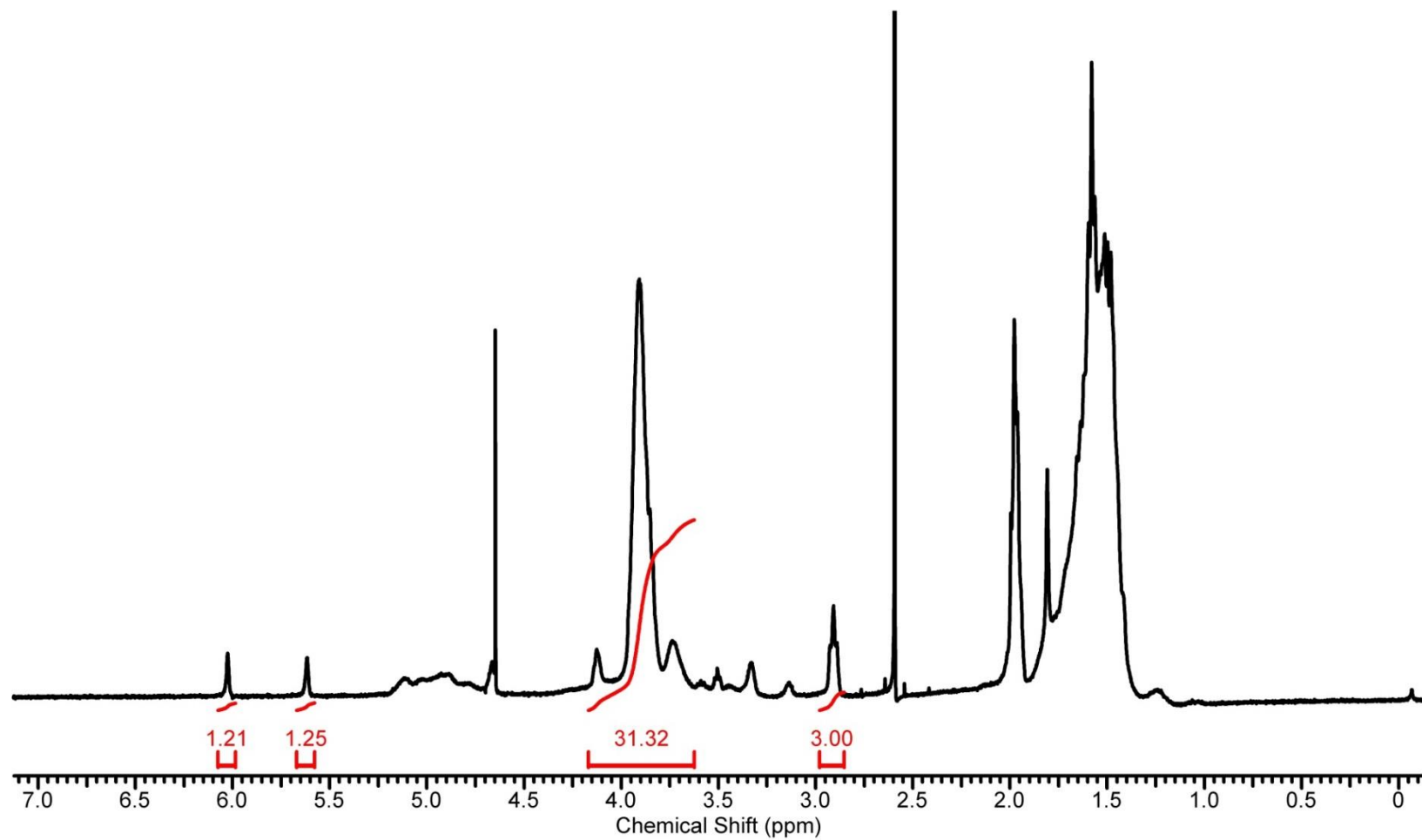


Figura A14: Espectro de RMN- $^1\text{H}$  do polímero modificado 2A em  $\text{D}_2\text{O}$ .

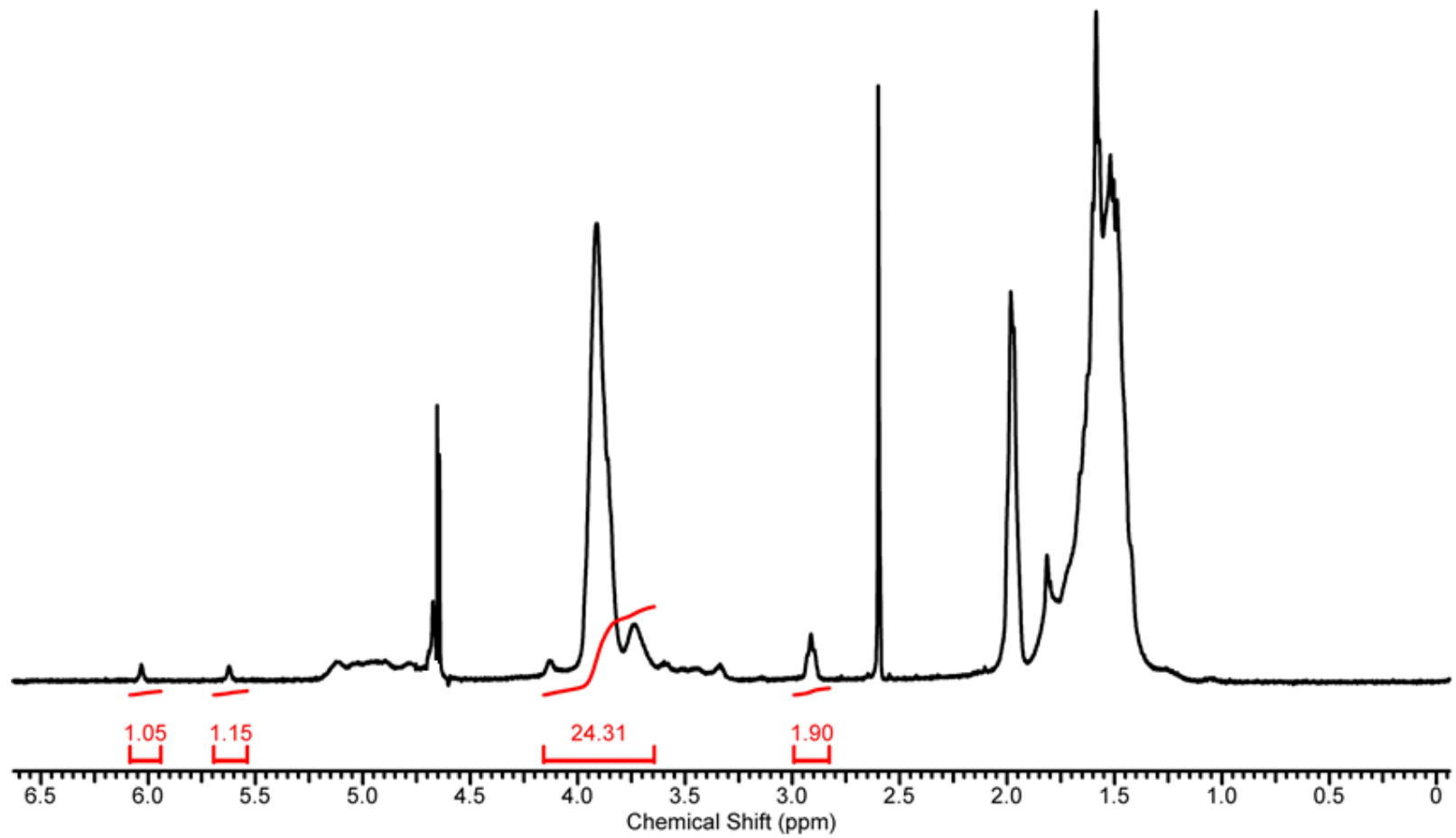


Figura A15: Espectro de RMN- $^1\text{H}$  do polímero modificado 5A em  $\text{D}_2\text{O}$ .

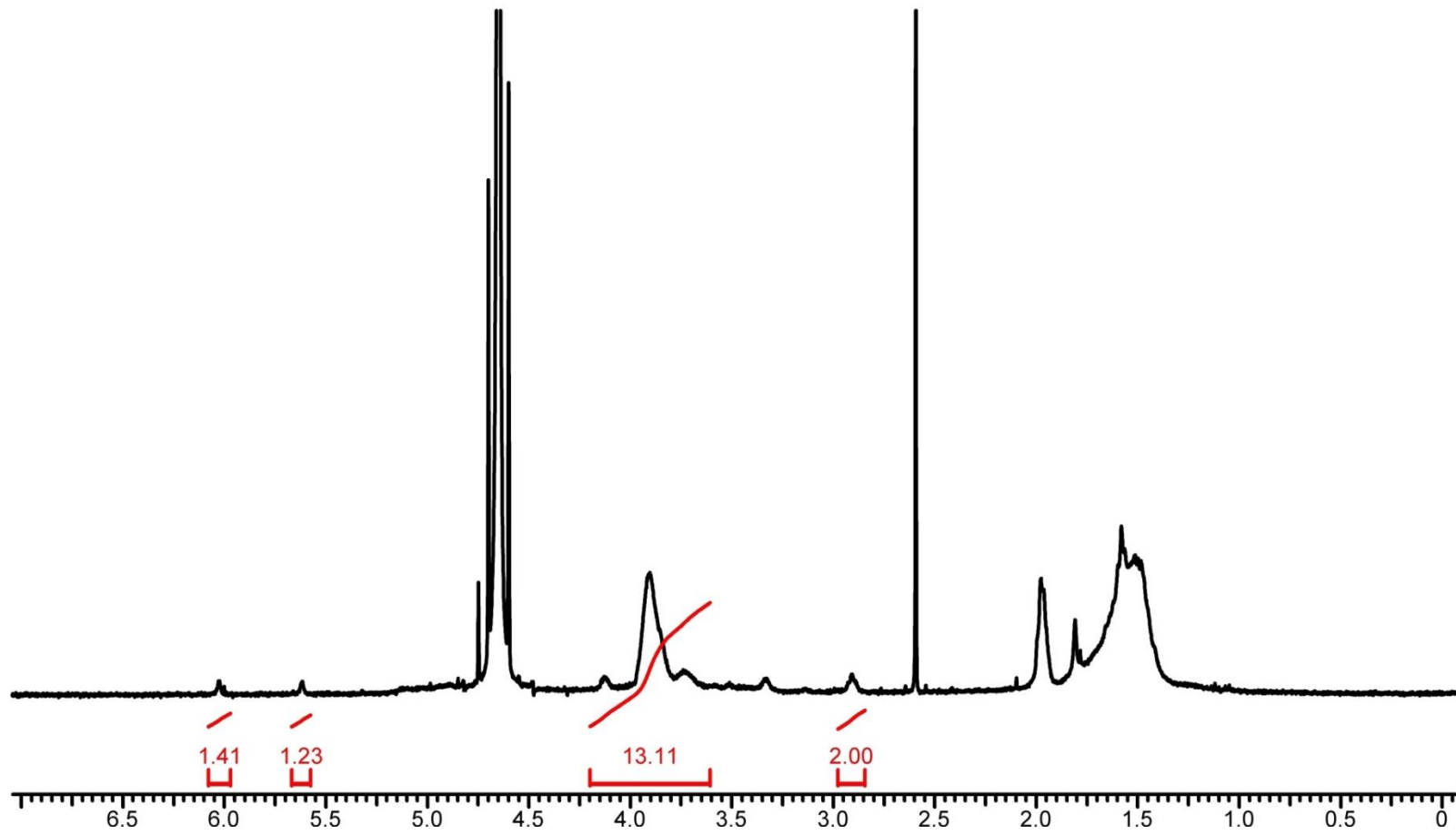


Figura A16: Espectro de RMN- $^1\text{H}$  do polímero modificado 10A em  $\text{D}_2\text{O}$ .

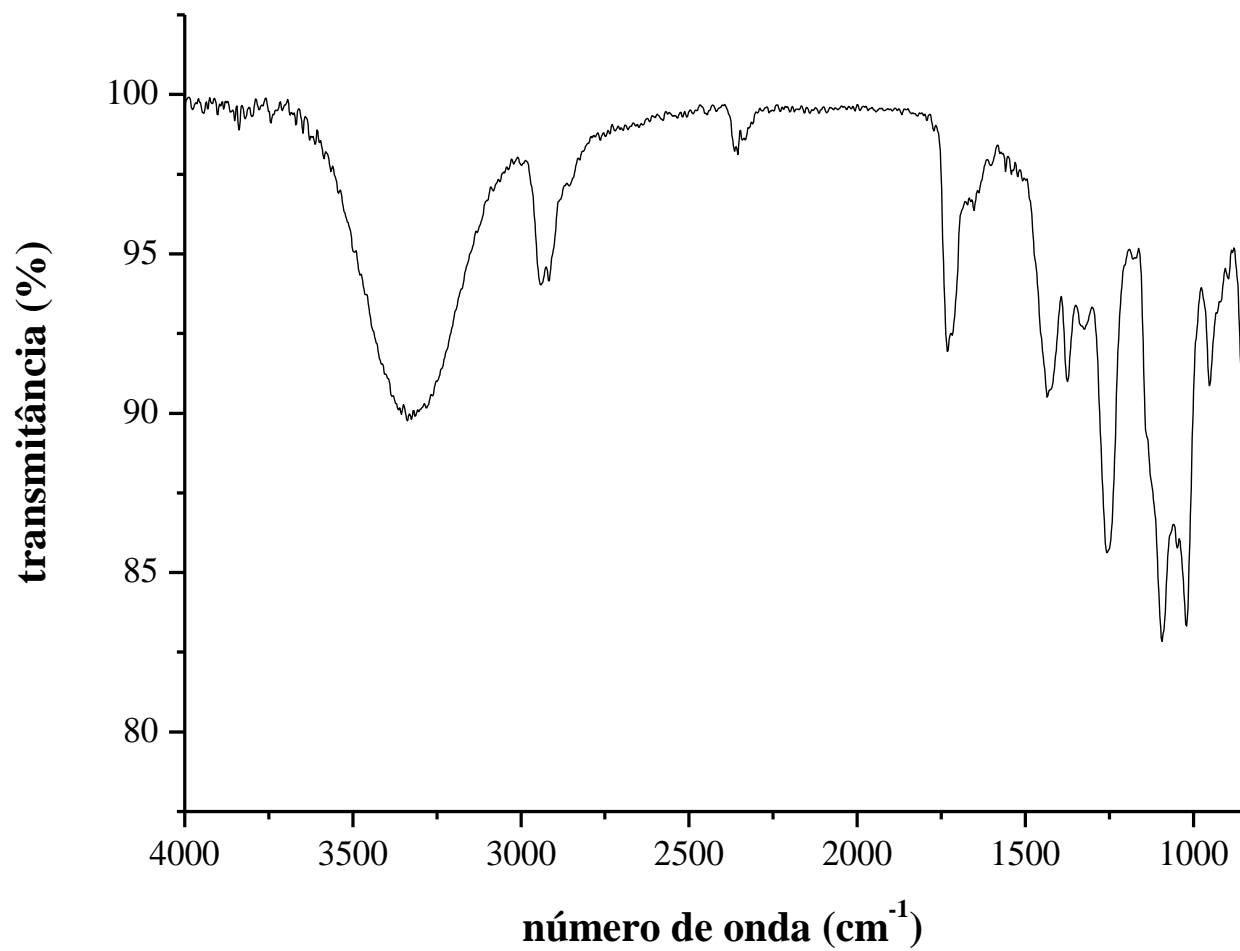


Figura A17: Espectro de absorção na região do infravermelho (ATR) do polímero modificado 1B na concentração de 3%.

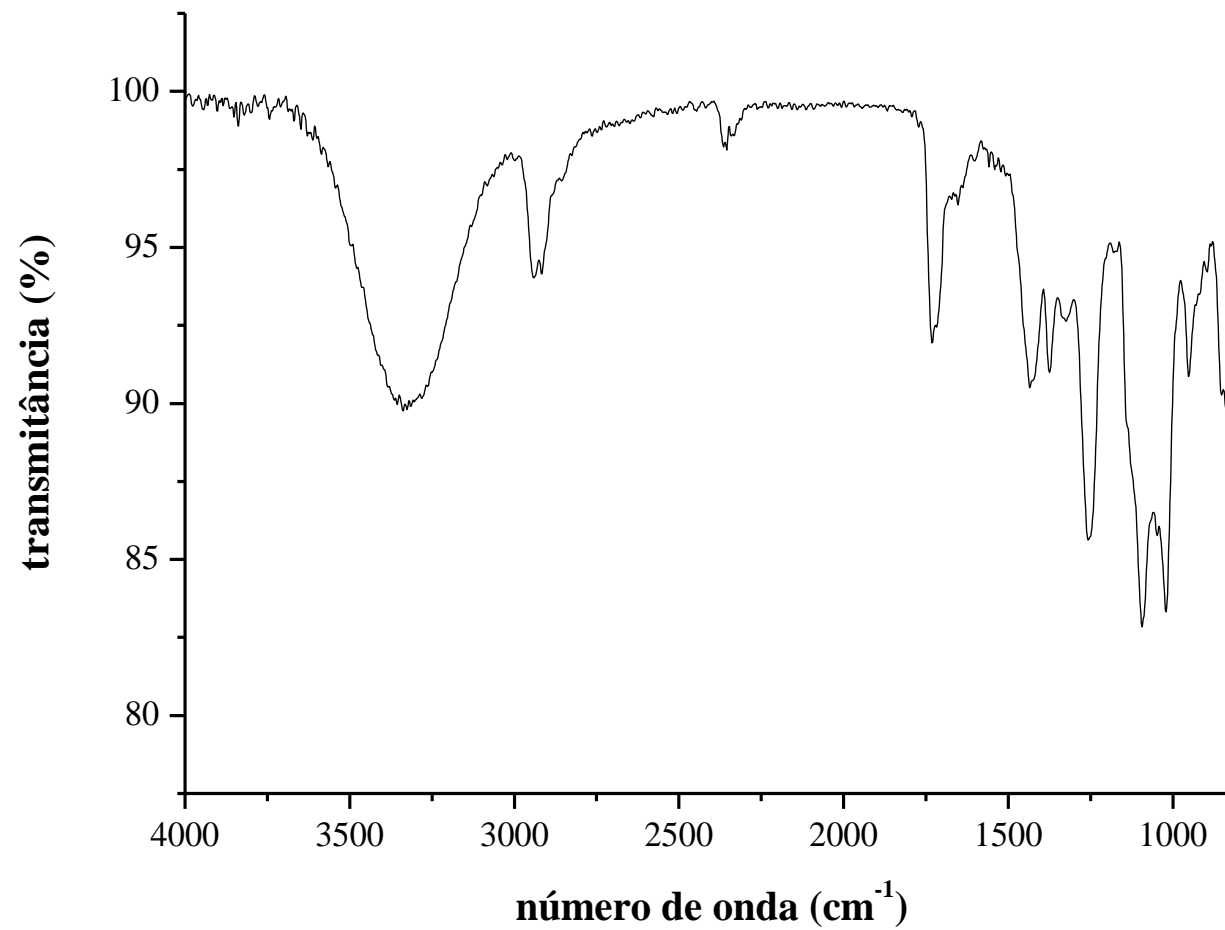


Figura A18: Espectro de absorção na região do infravermelho (ATR) do polímero modificado 2B na concentração de 3%.

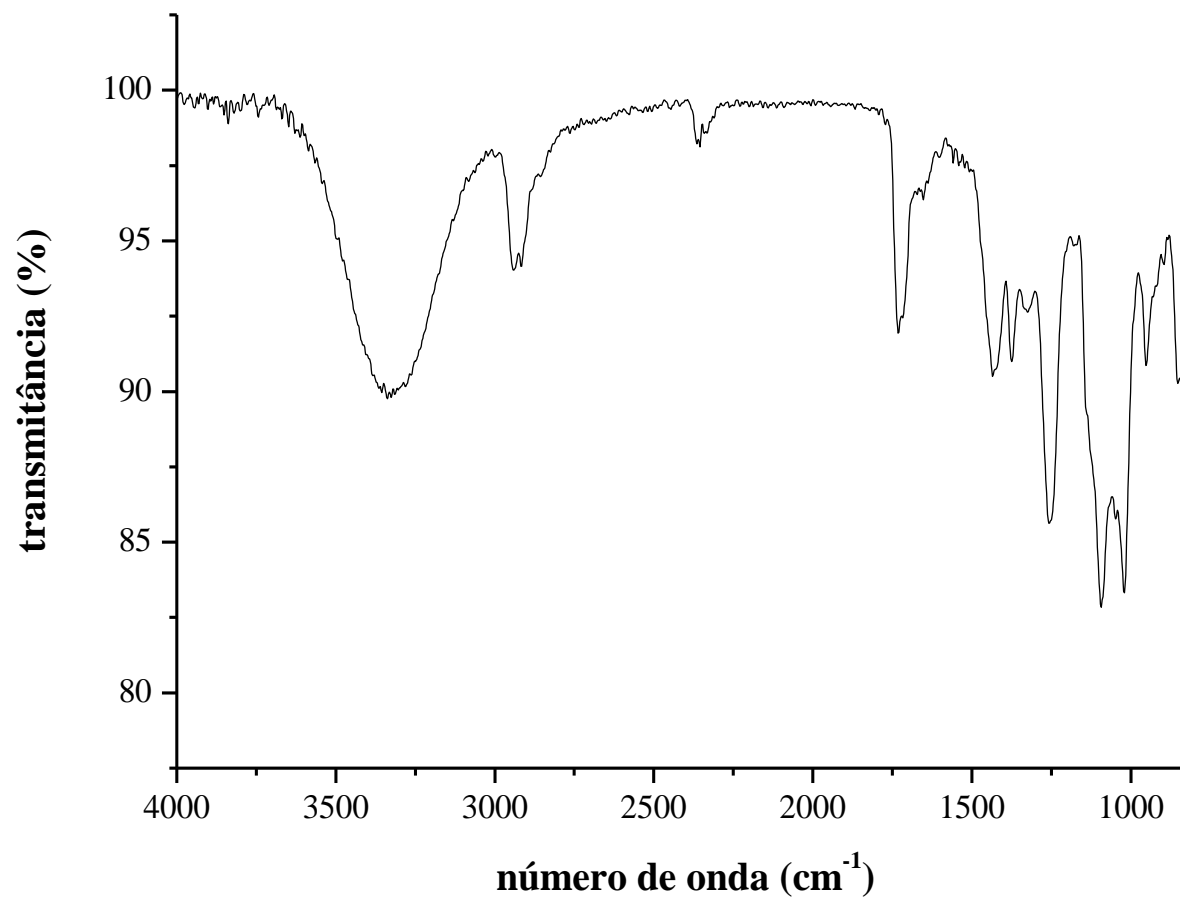


Figura A19: Espectro de absorção na região do infravermelho (ATR) do polímero modificado 5B na concentração de 3%.

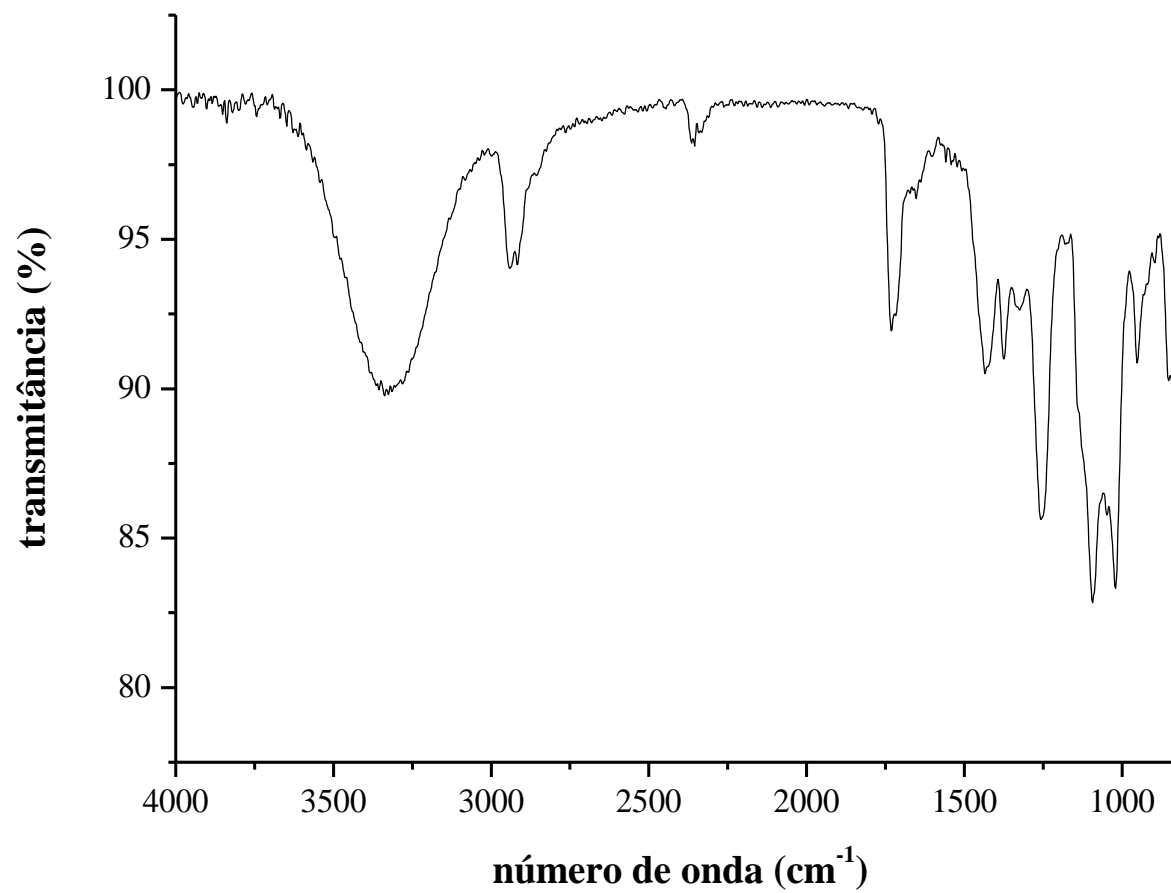


Figura A20: Espectro de absorção na região do infravermelho (ATR) do polímero modificado 10B na concentração de 3%.



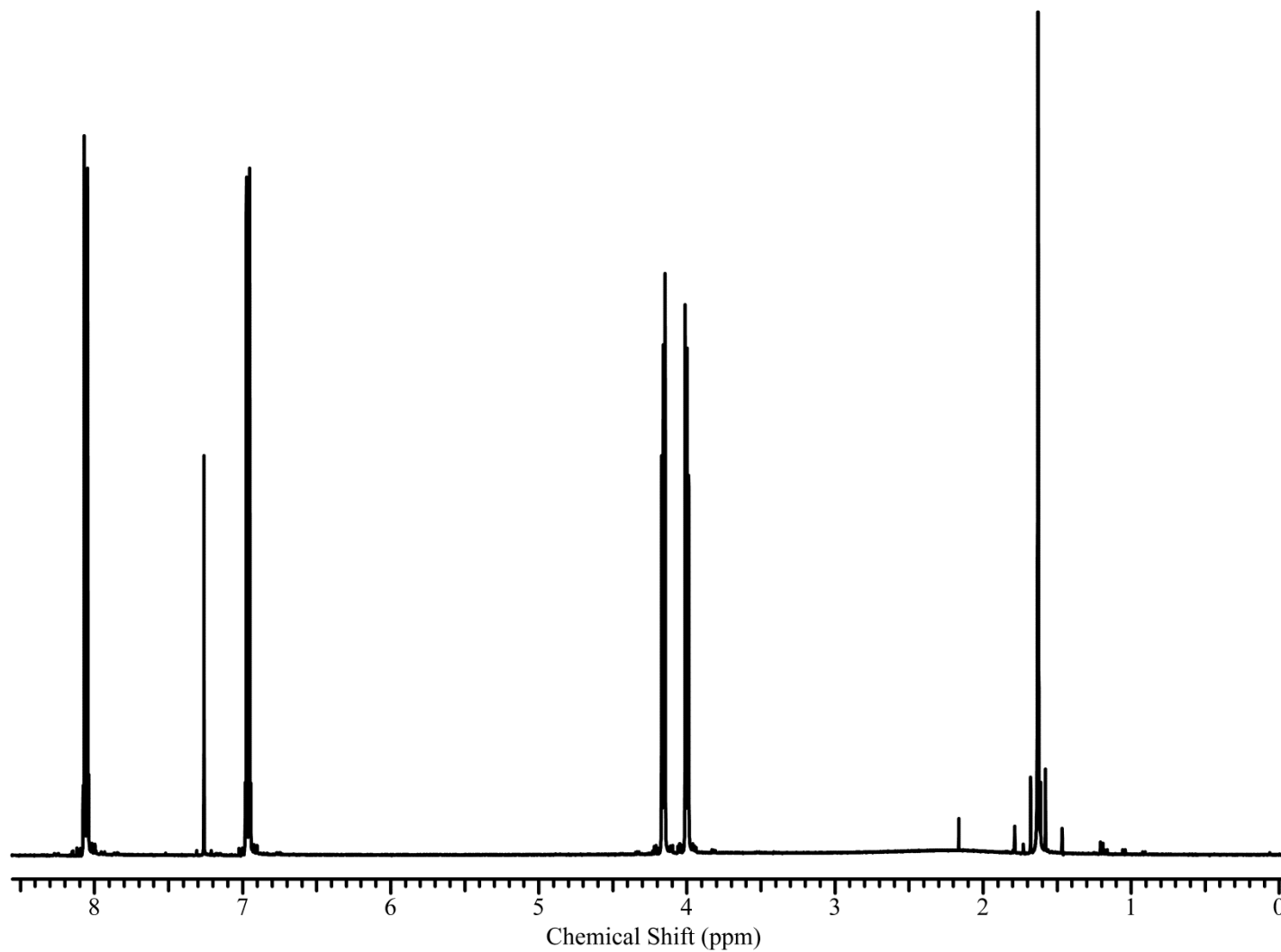


Figura A21: Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do fotoiniciador Irgacure<sup>®</sup> 2959 em D<sub>2</sub>O.

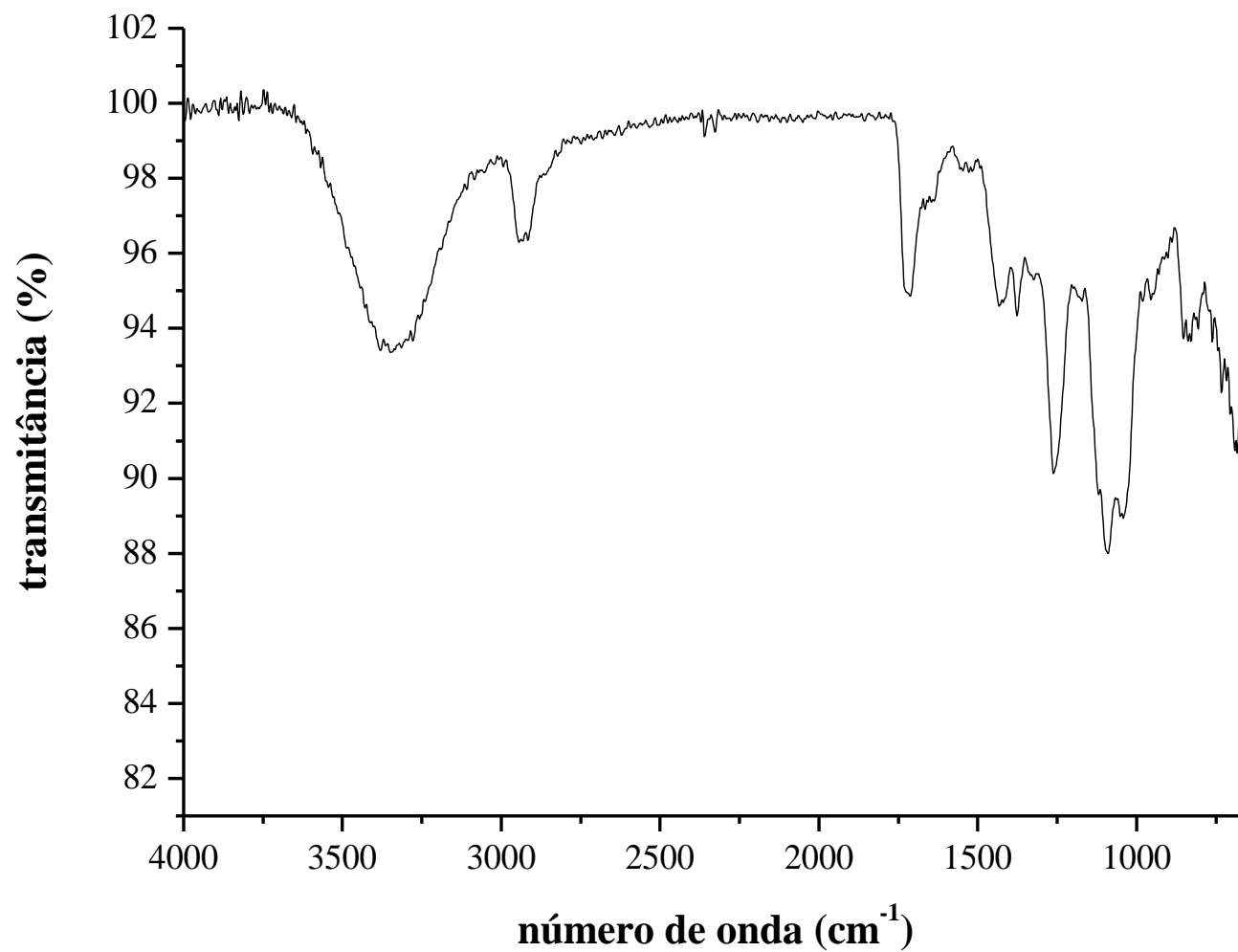


Figura A22: Espectro de absorção na região do infravermelho (ATR) do polímero modificado 1C na concentração de 3%.

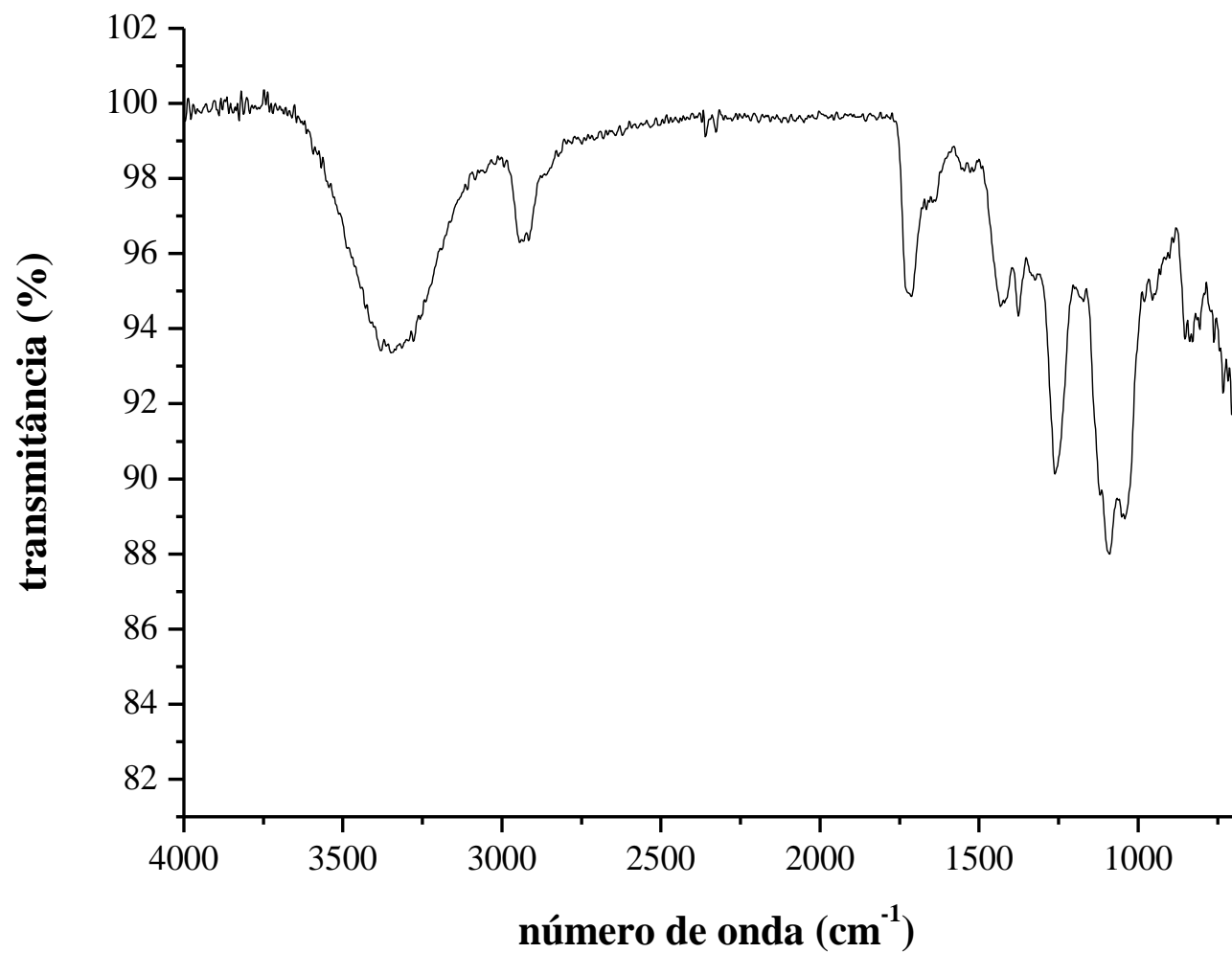


Figura A23: Espectro de absorção na região do infravermelho (ATR) do polímero modificado 2C na concentração de 3%.

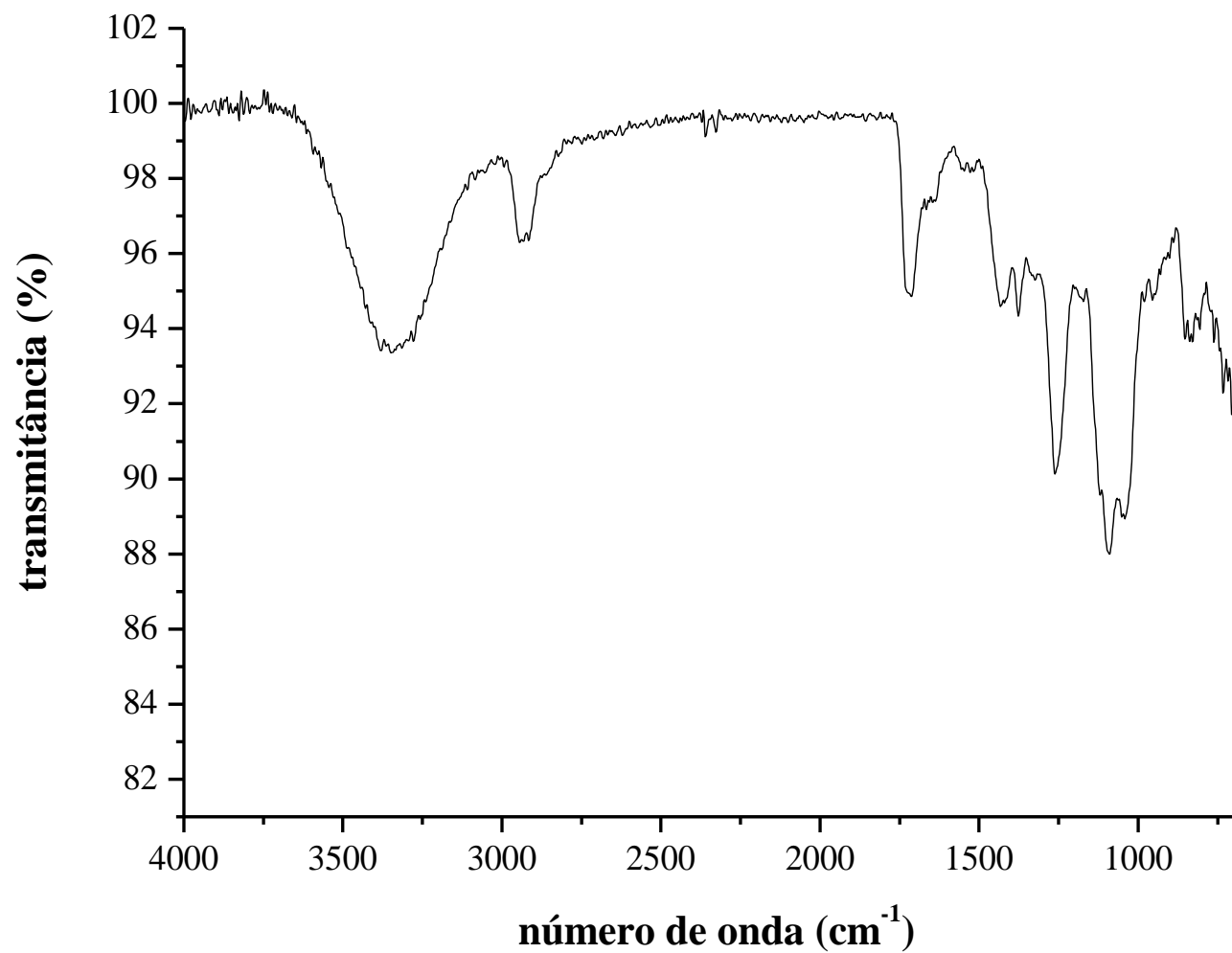


Figura A24: Espectro de absorção na região do infravermelho (ATR) do polímero modificado 5C na concentração de 3%.

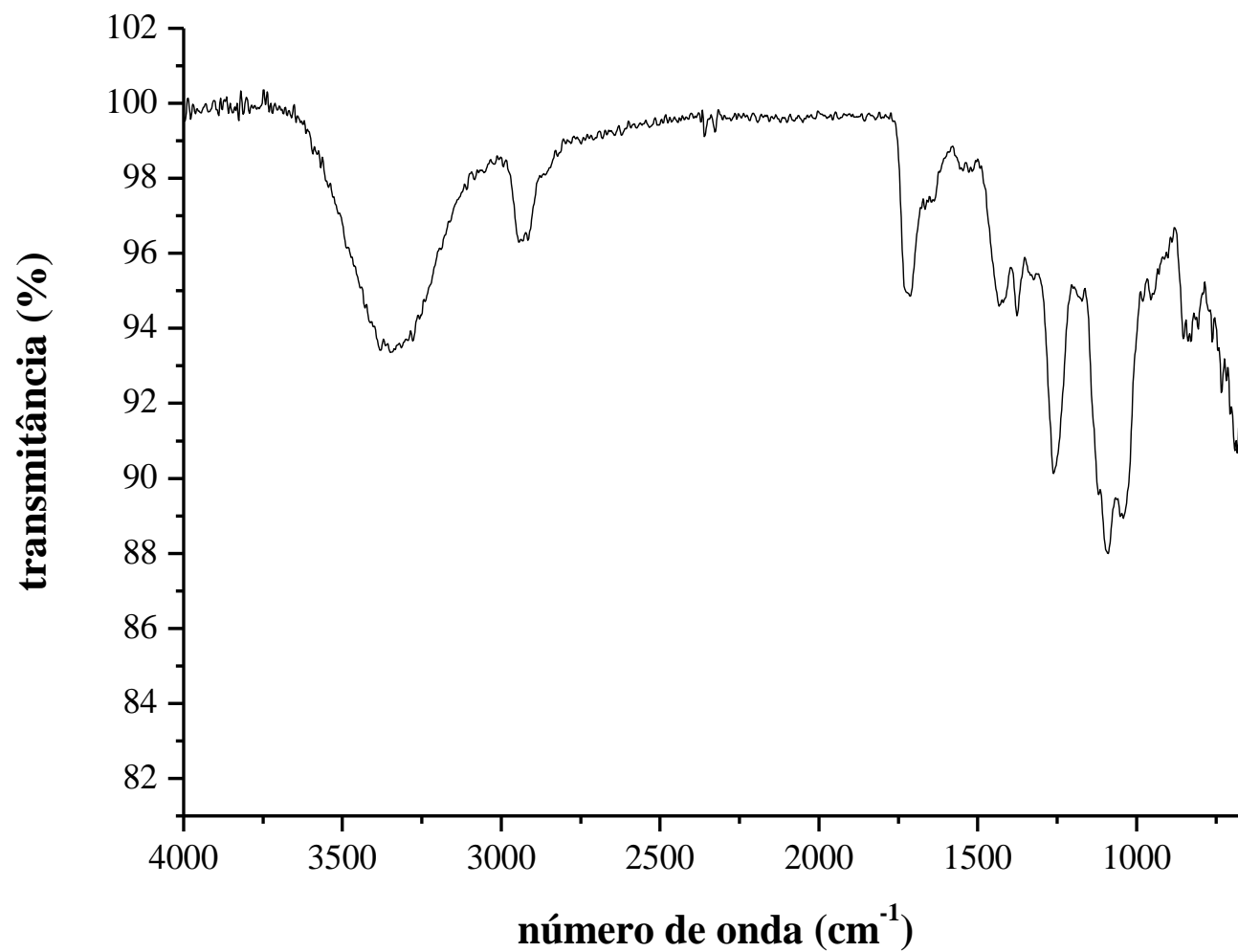


Figura A25: Espectro de absorção na região do infravermelho (ATR) do polímero modificado 10C na concentração de 3%.