



Universidade Federal do Rio de Janeiro

Programa de Pós-Graduação em Engenharia de
Processos Químicos e Bioquímicos



Louise de Aguiar Sobral

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS PARA PRODUÇÃO
DE BIOMATERIAIS**

Rio de Janeiro

2019

LOUISE DE AGUIAR SOBRAL

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS PARA PRODUÇÃO DE BIOMATERIAIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientação: Prof^a Verônica Maria de Araújo Calado

EQ/UFRJ

Rio de Janeiro

2019

CIP – Catalogação na Publicação

Sobral, Louise de Aguiar

Síntese e caracterização de hidrogéis para produção de biomateriais/
Louise de Aguiar Sobral. – Rio de Janeiro, 2019. 64

f.: xiv.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2019.

Orientadora: Veronica Maria de Araújo Calado

1. Biomateriais. 2. Hidrogel. 3. Cartilagem Articular. 4. Poli Álcool Vinílico. 5. Módulo de Young. 6. Planejamento de Misturas – Teses. I. Calado, Veronica M.A. (Orient.). II. Síntese e caracterização de hidrogéis para produção de biomateriais.

LOUISE DE AGUIAR SOBRAL

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS PARA PRODUÇÃO DE BIOMATERIAIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada por:

Verônica Maria de Araújo Calado, D.Sc.
(Orientadora e presidente da banca – Universidade Federal do Rio de Janeiro, EQ/UFRJ)

R, D.Sc. (Universidade Federal do Rio de Janeiro, EQ/UFRJ)

Ricardo Cunha Michel, D.Sc.
(Universidade Federal do Rio de Janeiro, IQ/UFRJ)

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

Marie Curie

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por todas as coisas que aconteceram em minha vida, fossem boas ou ruins, e por ter me dado a oportunidade de conhecer pessoas muito especiais.

Agradeço aos meus pais, Andreia e Luis, por terem me motivado a estudar e por sempre serem o meu exemplo de dedicação e determinação. Gostaria de agradecer também às minhas irmãs, Dominique e Pamela, pelos momentos divertidos e pelo companheirismo de sempre, e ao resto da minha família que sempre torce pelas minhas realizações.

Agradeço ao meu amado amigo, Mateus Rieger, por todo apoio, atenção e paciência durante esse período frenético que se configurou o realizar dos experimentos desse projeto e, pelo amor, carinho e companheirismo de sempre.

Agradeço à minha amiga, Tatiane Franco, pela torcida, pelos conselhos e por me acalmar nos momentos de total descontrole meu.

Agradeço muito à professora Aïda Espinola pelo incentivo e pelo empurrãozinho na escolha da minha carreira. Aos 16 anos, eu estava muito confusa a respeito do meu futuro e ela, como ninguém, clareou o meu caminho.

Agradeço à minha orientadora, Verônica Calado, por terem me acolhido como orientada, por terem me ensinado muitas coisas e pela atenção e paciência que tiveram durante todo o projeto.

Agradeço aos amigos dos laboratórios Labter: Rosana, Amanda, Pamela, Felipe, Juliana, entre outros, pela ajuda nas análises, pelas dicas e pelo carinho.

Agradeço aos amigos do laboratório COAM, do Centro de Tecnologia Mineral (CETEM), pelas análises de microscopia eletrônica de varredura, em especial ao Otávio pela paciência.

Agradeço também aos amigos do IMA, pela análise de TGA e DSC e pela torcida para que eu conseguisse escrever tudo a tempo.

Agradeço aos amigos de faculdade, que provavelmente estarão sempre presentes em minha agora e sempre, pelos bons momentos e por serem tão especiais.

Resumo da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos.

LOUISE DE AGUIAR SOBRAL

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS PARA PRODUÇÃO DE BIOMATERIAIS

Fevereiro, 2019

Orientação: Prof^a Verônica Maria de Araújo Calado

A utilização de biomateriais para a realização de implantes de órgãos e tecidos tem se tornado uma alternativa eficaz na substituição do processo de transplantes convencionais. Os biomateriais podem ser de origem sintética ou natural; contudo, precisam ser biofuncionais e biocompatíveis para poderem ser implantados no corpo humano. Dentre a grande variedade de materiais possíveis para se utilizar como biomateriais, os hidrogéis têm grande importância por serem bem aceitos pelo corpo humano devido à sua semelhança estrutural em relação à superfície das células humanas. Uma das possíveis aplicações de biomateriais à base de hidrogéis que pode ser realizada é a confecção de implantes para recuperação de tecido cartilaginoso articular. O tecido cartilaginoso articular, geralmente, não se regenera com facilidade sendo considerado um tecido de difícil tratamento pós lesão. Sendo assim, o objetivo do seguinte trabalho é sintetizar e caracterizar hidrogéis compostos de Poli Álcool vinílico (PVA), Poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) e Poli óxido de etileno (PEO) para serem utilizados na confecção de biomateriais para reposição de tecidos cartilagosos. Os hidrogéis foram sintetizados utilizando-se a técnica de solubilização polimérica em água, seguida de ciclos de congelamento. O planejamento experimental de misturas do tipo simplex-centroide com pontos axiais foi utilizado para se determinar a proporção ideal entre os três polímeros estudados, com o intuito de se obter um hidrogel com propriedades mecânicas adequadas. A proporção dos polímeros, porém, foi restrita a no mínimo 70% de PVA, baseando-se em estudos anteriores. Nesse planejamento, também foram considerados três graus de hidratação distintos (90, 85 e 80%). A variável resposta utilizada nesse planejamento foi o módulo de Young, determinado por análise dinâmico-mecânica (DMA). O planejamento experimental teve como resultado a proporção de 98%, 0,5% e 1,5% para os polímeros PVA, PVP e PEO, respectivamente, e grau de hidratação do hidrogel de 80%. Após a síntese do hidrogel com essas especificações, foi realizada sua caracterização por meio das seguintes análises: TGA/DTG, DSC, DMA, determinação do grau de intumescimento e microscopia eletrônica de varredura.

Palavras chave: Biomateriais, Hidrogel, Cartilagem Articular, Poli Álcool Vinílico, Módulo de Young, Planejamento de Misturas.

Abstract of the Dissertation presented to the Postgraduate Course in Chemical and Biochemical Processes Engineering Technology of the Chemistry School/Federal University of Rio de Janeiro as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Chemical and Biochemical Processes Engineering Technology.

LOUISE DE AGUIAR SOBRAL

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF HYDROGELS FOR BIOMATERIALS APPLICATION

February, 2019

Supervisor: Professor Verônica Maria de Araújo Calado

The use of biomaterials in the performance of organ and tissue implants has become an effective alternative for replacing the conventional transplant process. The biomaterials may be of synthetic or natural origin; however, need to be bio-functional and biocompatible to be implanted in the human body. Among the great variety of materials to be used as biomaterials, hydrogels are of paramount importance because they are well accepted by the human body due their structural similarity to the surface of human cells. One of the possible applications of biomaterials, based on hydrogels, which can be performed, is the preparation of implants for the recovery of articular cartilaginous tissue. The articular cartilaginous tissue usually does not regenerate, easily, being considered a difficult to treat post-injury tissue. Therefore, the following work aimed at synthesizing and characterizing hydrogels composed of Polyvinyl Alcohol (PVA), Polyvinyl-2-pyrrolidone (PVP) and Polyethylene Oxide (PEO) to be used for manufacturing biomaterials in the replacement of cartilaginous tissues. The hydrogels were synthesized using the technique of polymeric solubilisation in water followed by freezing cycles. The experimental design of simplex-centroid blends with axial points was used to determine the ideal proportion between the three polymers studied, in order to obtain a hydrogel with adequate mechanical properties. The proportion of the polymers, however, was restricted to at least 70% PVA, based on previous studies. In this planning, three different degrees of hydration were also considered (90, 85 and 80%). The response variable used in this planning was the Young's modulus, determined by dynamic-mechanical analysis (DMA). The experimental design resulted in the proportion of 98%, 0.5% and 1.5% for the polymers PVA, PVP and PEO, respectively, and hydration degree of the hydrogel of 80%. After the synthesis of the hydrogel with these specifications, it was carried out its characterization by means of the following analyses: TGA / DTG, DSC, DMA, determination of swelling degree and scanning electron microscopy.

Keywords: Biomaterials, Hydrogel, Articular Cartilage, Poly(vinyl alcohol), Young's Modulus, Mixture Design of Experiments.

Sumário

1 Introdução.....	1
2 Objetivos.....	6
2.1 Objetivo Geral.....	6
2.2 Objetivos Específicos	6
3 Revisão Bibliográfica	7
3.1 Biomecânica da Cartilagem Articular.....	7
3.2 Características dos Biomateriais.....	11
3.3 Módulo de Young ou Elasticidade.....	14
3.4 Características dos Hidrogéis	18
3.5 Hidrogéis de PVA, PVP e PEO	26
4 Materiais e Métodos	31
4.1 Síntese dos Hidrogéis	31
4.2 Planejamento Experimental.....	33
4.3 Análise Dinâmico-Mecânica (DMA)	34
4.4 Análise Termogravimétrica (TGA/DTG).....	35
4.5 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC).....	36
4.6 Determinação do Grau de Intumescimento (GI).....	37
4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	38
5 Resultados e Discussão.....	39
5.1 Planejamento Experimental	39
5.2 Análise Dinâmico-Mecânica (DMA).....	45
5.3 Análise Termogravimétrica (TGA/DTG).....	46
5.4 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)	47

5.5 Grau de Intumescimento (GI).....	49
5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	49
6 Conclusões.....	51
7 Sugestões Futuras.....	52
Referências Bibliográficas.....	52
ANEXO 1.....	63

Lista de Figuras

Figura I.1 – Tecidos e órgãos do corpo humano que são substituídos, total ou parcialmente, por biomateriais	2
Figura I.2 – Foto de um hidrogel (A) e a representação de sua rede polimérica (B)	2
Figura III.1 – Cartilagem articular do joelho: radiografia lateral (A); representação frontal (B); e representação transversal (C)	7
Figura III.2 – Zonas existentes na cartilagem articular	9
Figura III.3 – Gráfico de tensão versus deformação para cálculo do módulo de elasticidade de um material	15
Figura III.4 – Tensões que podem ser exercidas em um corpo de prova	17
Figura III.5 – Formas de preparo da rede polimérica dos hidrogéis	19
Figura III.6 – Estrutura microscópica dos hidrogéis	19
Figura III.7 – Tipos de água existentes nos hidrogéis	20
Figura III.8 – Classificações dos hidrogéis	23
Figura III.9 – Representação da interação de biomateriais feitos de hidrogel no organismo	25
Figura III.10 – Estrutura química do poli álcool vinílico (PVA)	26
Figura III.11 – Estrutura química do poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP)	27
Figura III.12 – Estrutura química do polióxido de etileno (PEO)	27
Figura III.13 – Efeito dos ciclos de congelamento na estrutura do hidrogel de PVA	29
Figura IV.1 – Aspecto macroscópico observado após 5 ciclos de congelamento (A) e após 15 ciclos de congelamento (B)	32
Figura IV.2 – Planejamento experimental de mistura realizado	34
Figura V.1 – Gráfico de Pareto antes da retirada de termos do modelo	42
Figura V.2 – Gráfico de Pareto após a retirada de termos do modelo	43
Figura V.3 – Superfície de resposta do planejamento experimental para as amostras com grau de hidratação igual a 80%	44
Figura V.4 – Resultado da análise de DMA para amostra de hidrogel otimizado (98% de PVA, 0,5% de PVP e 1,5% de PEO)	45

Figura V.5 – Termograma da amostra de hidrogel otimizado	46
Figura V.6 – Gráfico de DSC para o hidrogel otimizado	48
Figura V.7 – Micrografia do hidrogel de PVA puro (A) e do hidrogel otimizado (B)	50

Lista de Tabelas

Tabela III.1 – Alguns Biomateriais e suas Aplicações	13
Tabela V.1 - Resultados dos Valores do Módulo de Young para as Amostras com 90% de Hidratação	39
Tabela V.2 - Resultados dos Valores do Módulo de Young para as Amostras com 85% de Hidratação	40
Tabela V.2 - Resultados dos Valores do Módulo de Young para as Amostras com 80% de Hidratação	41

Lista de Siglas

- ANOVA – Análise de variância
- DMA – Análise Dinâmico-Mecânica
- DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial
- GI – Grau de Intumescimento
- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
- PBS – Tampão Fosfato Alcalino
- PEG – Polietileno Glicol
- PEO – Poli Óxido de Etileno
- PHEMA – Polihidroxietilmetacrilato
- PVA – Poli Álcool Vinílico
- PVP – Poli(N-vinil-2-pirrolidona)
- TGA – Análise Termogravimétrica

Capítulo 1 – Introdução

Os órgãos e tecidos do corpo humano, com o decorrer do tempo, sofrem desgastes naturais e/ou podem sofrer lesões devido a injúrias ou doenças (EBARA, 2016; RUYS, 2013). Sendo assim, desde o início da medicina moderna, diversos tipos de materiais são utilizados para substituir o tecido ou órgão lesionado ou doente de forma a mimetizar suas características e funções biológicas no corpo humano (RODRIGUES; MOTA, 2017; RUYS, 2013). Os materiais com essa finalidade são denominados biomateriais e a sua utilização na realização de implantes tem se tornado uma alternativa eficaz na substituição do processo de transplantes convencionais (EBARA, 2016).

Os biomateriais são materiais sintéticos ou naturais que precisam ser biofuncionais e biocompatíveis para poderem ser implantados no corpo humano e restaurar ou substituir, total ou parcialmente, tecidos danificados. Esses materiais podem ser de origem metálica, cerâmica, polimérica ou uma combinação entre eles (compósitos) (BLACK, 2006; LI; WEISEL, 2014; RUYS, 2013).

Atualmente, existem biomateriais capazes de mimetizar diversos órgãos ou tecidos, conforme mostra a Figura I.1. Entretanto, casos de rejeição ou perda de função biológica do material implantado ainda são muito recorrentes (LI; WEISEL, 2014; RODRIGUES; MOTA, 2017). Sendo assim, pesquisadores buscam produzir biomateriais com características cada vez mais semelhantes aos componentes do corpo humano (EBARA, 2016). Dentre a grande variedade de materiais possíveis para se utilizar como biomateriais, os hidrogéis têm grande importância por serem bem aceitos pelo corpo humano, por conseguirem mimetizar a estrutura natural da superfície das células animais (HENCH; JONES, 2005; MARK, 2004; RUYS, 2013).

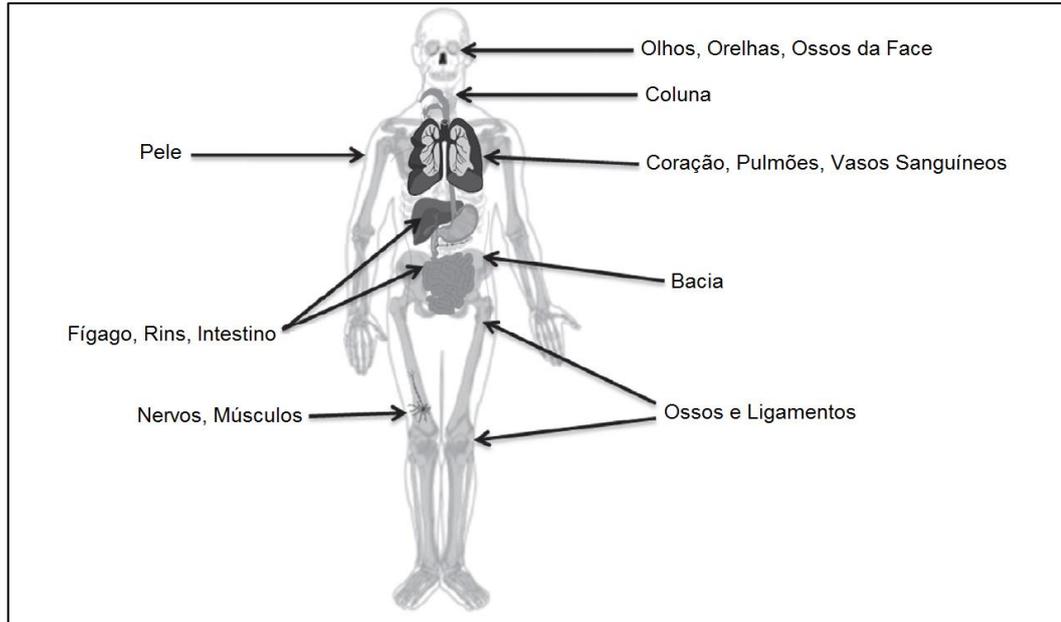


Figura I.1 – Tecidos e órgãos do corpo humano que são substituídos, total ou parcialmente, por biomateriais. Fonte: Adaptado de GRUMEZESCU, 2016.

Os hidrogéis consistem em uma rede tridimensional polimérica hidrofílica que retém água, podendo ser feitos de polímeros de origem natural ou sintética, conforme ilustrado na Figura I.2 (MARK, 2004; PERALE; HILBORN, 2017).

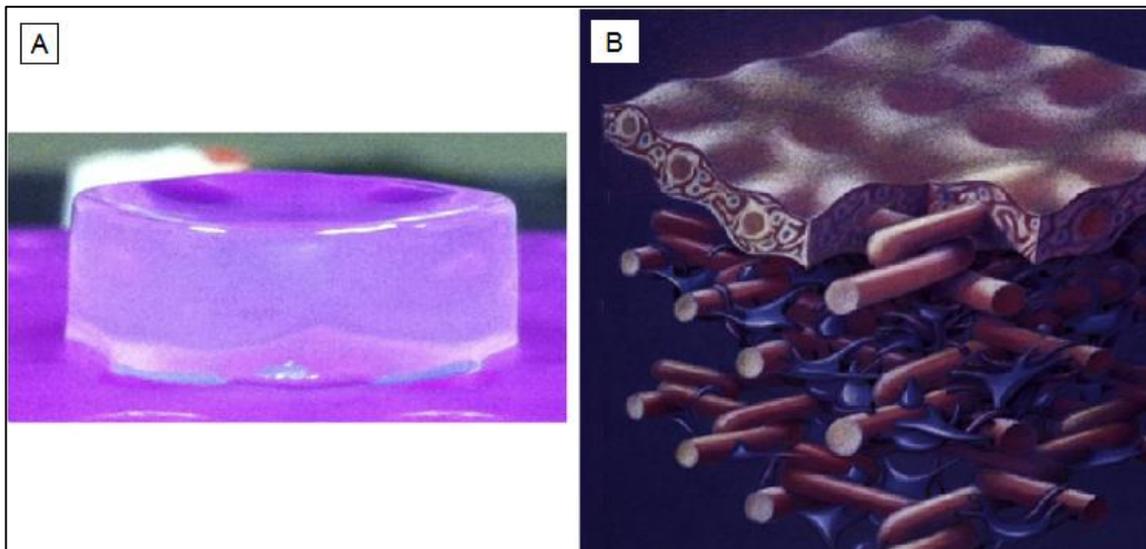


Figura I.2 – Foto de um hidrogel (A) e a representação de sua rede polimérica (B). Fonte: PERALE; HILBORN, 2017.

A utilização dos hidrogéis com fins biomédicos começou com a produção e comercialização de lentes de contato flexíveis (feitas de hidrogéis à base de

Polimetilmetacrilato) e cápsulas gelatinosas para liberação controlada de fármacos (HENCH; JONES, 2005; MARK, 2004). Atualmente, esse tipo de material vem sendo estudado para aplicação na produção de “scaffolds” (estrutura base para crescimento de células animais de forma organizada) na área de engenharia de tecidos (JENNINGS; BUMGARDNER, 2017; RODRIGUES; MOTA, 2017; WANG, 2017). Isso se deve ao fato dos hidrogéis possuírem, geralmente, em sua composição mais de 70% de água, facilitando a difusão de nutrientes e metabólitos quando inseridos em qualquer parte do corpo humano. Isso favorece o crescimento das células cultivadas em sua matriz (JENNINGS; BUMGARDNER, 2017). Além disso, os hidrogéis podem ser confeccionados de maneira a terem propriedades mecânicas desejadas e diversas outras características, a depender do objetivo do implante a curto e longo prazos (RUYS, 2013; WANG, 2017).

As aplicações mais recentes para “scaffolds” compostos de hidrogéis relatadas na literatura são para implantes de tecido ósseo e tecido cartilaginoso, principalmente para diminuir o tempo de recuperação dos pacientes com doenças ou lesões nesses tecidos (APARICIO; GINEBRA, 2016; RODRIGUES; MOTA, 2017). O tecido cartilaginoso, geralmente, é pouco irrigado pelos vasos sanguíneos e possui baixa capacidade de regeneração, sendo considerado um tecido de difícil tratamento pós lesão (HENCH; JONES, 2005; PARK et al., 2013; WANG, 2012).

Nesse contexto, a utilização de hidrogéis para reparar ou substituir (total ou parcialmente) cartilagens articulares vem sendo amplamente estudada devido as seguintes vantagens: fácil moldagem do material a ser implantado; propriedades mecânicas semelhantes ao tecido a ser substituído; habilidade de encapsular células; bioatividade, entre outros (APARICIO; GINEBRA, 2016; RUYS, 2013; BECK et al., 2016). No entanto, até o presente momento, as técnicas de engenharia de tecido empregadas com o intuito de se regenerar o tecido

cartilagenoso articular não conseguiram obter o resultado esperado (HENCH; JONES, 2005; WANG, 2017).

A maior dificuldade em se obter hidrogéis adequados para a substituição de cartilagem articular é conseguir mimetizar as propriedades mecânicas mantendo ao mesmo tempo o grau de hidratação necessário para o crescimento e manutenção vital das células cartilagenosas (condrócitos) (APARICIO; GINEBRA, 2016). Geralmente, a utilização de monômeros sintéticos na síntese do hidrogel resulta em um material com propriedades mecânicas desejadas, mas com baixa concentração de água (MARK, 2004; POOLE; MARTENS; GREEN, 2016). Em contrapartida, os hidrogéis produzidos com polímeros de origem natural possuem ótimas condições para o cultivo de condrócitos, entretanto suas propriedades mecânicas são inadequadas à produção de cartilagens, apresentando baixa resistência a tensões e a fricção (JENNINGS; BUMGARDNER, 2017; POOLE; MARTENS; GREEN, 2016). Sendo assim, a utilização de hidrogéis feitos a partir de copolímeros e/ou misturas poliméricas pode ser uma forma para se obter o biomaterial ideal neste caso (AMBROSIO, 2017; JENNINGS; BUMGARDNER, 2017).

Os hidrogéis a base de PVA (Poli Álcool Vinílico) são muito utilizados na produção de biomateriais para substituição de tecido epitelial devido às suas propriedades mecânicas (LIU, 2010). Sendo assim, esse tipo de material vem sendo empregado como uma das possíveis soluções para se produzir implantes cartilagenosos (LIU et al., 2010; MAIOLO et al., 2012). Uma das técnicas mais aplicadas para a produção de hidrogéis de PVA é a síntese utilizando-se ciclos de congelamento, com o intuito de promover interações físicas entre as cadeias poliméricas, formando-se, assim, a rede polimérica tridimensional do hidrogel (MAIOLO et al., 2012; URUSHIZAKI et al., 1990).

O poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) é um polímero amplamente utilizado para aplicações biomédicas, principalmente para confecção de lentes de contato (BONACIN, 2011; MARK, 2004). Atualmente, o PVP vem sendo adicionado à composição de hidrogéis na produção de biomateriais, por auxiliar na formação da rede polimérica (nas ligações entre cadeias poliméricas) e por conferir características bioativas à superfície do hidrogel (ALCÂNTARA, 2013).

Outro material amplamente utilizado com aplicações biomédicas é o PEO (poli óxido de etileno), polímero com mesma composição que o PEG (polietileno glicol), mas possuindo massa molecular maior (acima de 20.000 g/mol) (JENKINS, 2007; YANG et al., 2017). Além das diversas aplicações do PEG/PEO na confecção de implantes de tecido epitelial e ósseo, estudos recentes mostraram que esse material copolimerizado ou misturado a outros polímeros pode auxiliar na fabricação de cartilagens artificiais (WANG et al., 2017).

Capítulo 2 – Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar hidrogéis compostos de Poli Álcool Vinílico (PVA), Poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) e Poli óxido de etileno (PEO) para serem utilizados na confecção de biomateriais na reposição de tecidos cartilagosos.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar o planejamento experimental do tipo misturas para determinar o grau de hidratação e composição ótimos para se obter o hidrogel com as propriedades mecânicas mais semelhantes à cartilagem articular humana;
- Sintetizar o hidrogel com composição e grau de hidratação de acordo com o resultado obtido no planejamento experimental;
- Caracterizar o hidrogel produzido: análise dinâmico-mecânica, análise termogravimétrica, determinação do grau de intumescimento, entre outros;
- Comparar o valor do módulo de Young ou módulo de Elasticidade do hidrogel produzido, obtido na análise dinâmico-mecânica, com o de uma cartilagem articular humana.

Capítulo 3 – Revisão Bibliográfica

3.1 Biomecânica da Cartilagem Articular

O tecido cartilaginoso humano é encontrado em diversas partes do corpo (a exemplo das articulações, nariz, orelhas e discos vertebrais) e possui características distintas a depender do local e função que exerce no organismo (BECK, 2008; GRUMEZESCU, 2016; HENCH; JONES, 2005).

As cartilagens podem ser de três tipos: fibrocartilagem, cartilagem elástica, e cartilagem articular. As fibrocartilagens estão presentes na região do menisco do joelho, nos discos vertebrais, nos ligamentos e tendões por todo o corpo. As cartilagens elásticas são encontradas dando forma ao nariz e às orelhas (GRUMEZESCU, 2016; HENCH; JONES, 2005). Por fim, as cartilagens articulares são encontradas nas articulações e são responsáveis por transmitir, de forma uniforme, as tensões de um osso ao outro e, ao mesmo tempo, reduzir o atrito entre esses ossos para evitar o seu desgaste severo (AMBROSIO, 2017). A Figura III.1 mostra três representações da articulação do joelho humano, mostrando como a cartilagem articular envolve as extremidades dos ossos fêmur, tíbia e rótula.

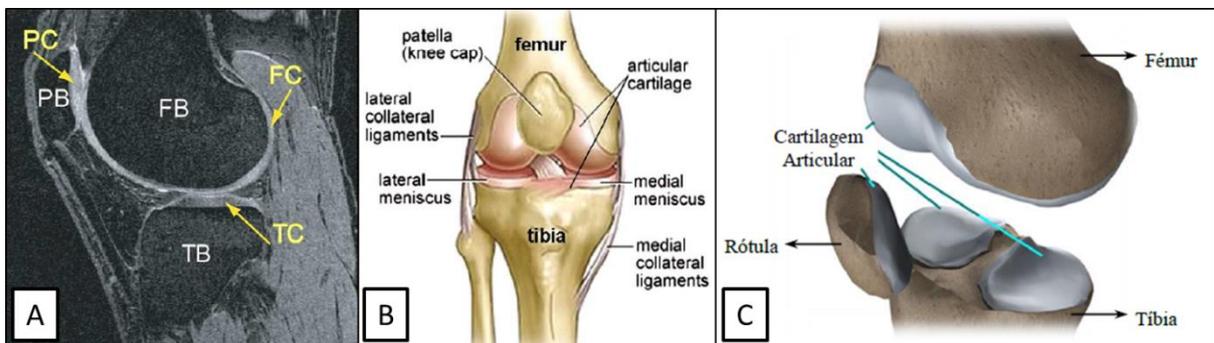


Figura III.1 – Cartilagem articular do joelho: radiografia lateral (A); representação frontal (B); e representação transversal (C). Fontes: WANG, 2012 (A e B) e MACHADO, 2015 (C).

As cartilagens articulares são compostas basicamente de células do tecido cartilaginoso, condrócitos, imersas em material extracelular. O material extracelular desse tecido consiste em uma mistura de macromoléculas, a exemplo de colágeno (vários tipos), elastina, glicoproteínas e proteoglicanos, cuja concentração e dispersão dependem do tipo e de função da cartilagem no organismo (GRUMEZESCU, 2016). A proporção de colágeno e de proteoglicanos nesse tecido é de 75% (aproximadamente) e de 20-30%, respectivamente, em base seca (AMBROSIO, 2017). Os proteoglicanos mais abundantes em cartilagens articulares são os glicosaminoglicanos (GAGs) e, em conjunto com as moléculas de colágeno, são responsáveis pelas características estruturais presentes no tecido cartilaginoso (YANG et al., 2017).

O componente mais abundante na cartilagem articular é a água, que está em maior concentração na superfície da cartilagem (aproximadamente 80% m/m). Sua concentração diminui linearmente em relação ao aumento da profundidade do tecido cartilaginoso, chegando a valores de aproximadamente 65% na zona profunda (AMBROSIO, 2017; NORDIN; FRANKEL, 2003).

As cartilagens articulares possuem regiões em que se observam diferentes concentrações de colágeno, GAGs e água, além de interações moleculares distintas. Conforme ilustra a Figura III.2, ao todo, a cartilagem pode ser dividida em quatro regiões: zona tangencial superficial, zona intermediária, zona profunda e zona calcificada (AMBROSIO, 2017; NGUYEN et al., 2011).

A zona superficial é localizada na superfície da cartilagem e possui pequenas quantidades de GAGs e de colágeno do tipo X, que tem maior capacidade estrutural em comparação com outros tipos de colágeno presentes. No entanto, é a região que apresenta maior grau de hidratação (80% m/m de água, aproximadamente) e maior concentração de colágeno do tipo II. A zona intermediária, como o próprio nome sugere, possui características

intermediárias em comparação com a zona superficial e a zona profunda. A zona profunda é a região que compõe a maior parte da cartilagem articular e possui maior concentração de GAGs e de colágeno tipo X. Essas moléculas se encontram organizadas, funcionando como molas de amortecedores, aliviando o impacto de tensões exercidas sobre os condrócitos (evitando o rompimento dessas células). Por fim, a zona calcificada é uma região de transição para o tecido ósseo que possui baixo grau de hidratação, maior concentração de proteínas estruturais orientadas e compactadas, e a presença de hidroxiapatita de cálcio (substância presente na composição do tecido ósseo) (AMBROSIO, 2017; LEES; PARTINGTON, 2016).

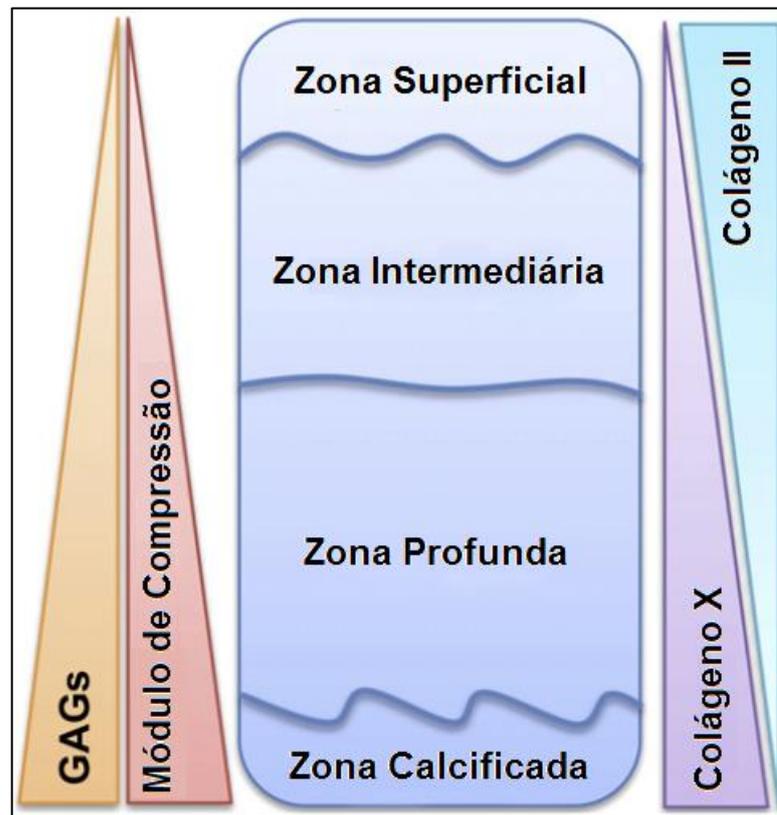


Figura III.2 – Zonas existentes na cartilagem articular. Fonte: Adaptado de NGUYEN et al., 2011.

As causas de degradação de cartilagens articulares são diversas e podem estar relacionadas a hábitos específicos do paciente, doenças relacionadas à idade, pré-disposição genética e/ou problemas articulares e musculares. As principais causas relatadas são:

- Lesão por trauma (acidentes e injúrias repentinas);

- Atividades físicas de alto impacto em alta frequência;
- Câncer: de cartilagem (raro), ósseo, muscular;
- Doenças congênitas: Síndrome de Treacher Collins e Síndrome de Apert;
- Artrites reumatóides;
- Doenças autoimunes: miastenia gravis, poliartrite reumatóide, lúpus sistêmico eritematoso;
- Doenças genéticas: Fibrodissplasia Ossificante Progressiva (FOP), neurofibromatose tipo I, Síndrome de DiGeorge e Distrofia Muscular.

Essas doenças causam dor e inatividade física para qualquer tipo de exercício ou movimento articular, piorando muito a qualidade de vida das pessoas e resultando em grandes prejuízos aos governos devido aos gastos com os tratamentos médico-cirúrgicos (GRUMEZESCU, 2016). A articulação do joelho é a que mais apresenta relatos de lesões e, sendo assim, diversos métodos para reparação dos tecidos existentes nessa parte do corpo foram desenvolvidos (WANG, 2012).

Dentre os métodos existentes para reparação de cartilagem articular, os mais recentes e inovadores são baseados na implantação de material no tecido lesionado, com o intuito de estimular a regeneração do tecido local. O material a ser implantado pode conter somente hidrogéis, para servir de matriz estrutural para o crescimento e recuperação de células existentes no próprio tecido ou conter a mistura de hidrogéis e células, nos casos em que as células do tecido lesionado estão em pouca quantidade ou com problemas de crescimento e realização de funções metabólicas (AMBROSIO, 2017).

Sendo assim, é requerido que os hidrogéis utilizados nos implantes em tecidos cartilagosos possuam propriedades mecânicas (principalmente), químicas e físicas adequadas

para permitir o crescimento apropriado dos condrócitos e para suportar o estresse mecânico sofrido por esse tecido (NGUYEN et al., 2011).

3.2 Características dos Biomateriais

Biomaterial é qualquer material, de origem sintética ou natural, que usado em sistemas biológicos (em contato com tecidos vivos) tem como objetivo restaurar ou substituir, total ou parcialmente, tecidos danificados no corpo humano (BLACK, 2006; GRUMEZESCU, 2016). Sendo assim, com o aumento da longevidade da população mundial, os biomateriais se tornaram extremamente importantes na manutenção da qualidade de vida das pessoas (EBARA, 2016). No entanto, a necessidade de implantes ou tratamentos específicos pode-se iniciar na juventude do paciente, devido a doenças ou traumas. Nesse contexto, o biomaterial se torna uma alternativa mais acessível e barata que os transplantes de tecidos ou órgãos (RODRIGUES; MOTA, 2017).

O primeiro biomaterial conhecido foi o aço inoxidável, desenvolvido em 1929, que somente em 1938 foi utilizado em cirurgias de implantes em tecido ósseo. A partir desse momento, outros materiais conhecidos à época e que apresentavam potencial uso como biomaterial foram testados e utilizados em implantes (PLUNKETT, 2005).

Os biomateriais podem ser de tamanhos variados e são aplicados a diversas áreas biomédicas: ortopedia, cardiologia, cirurgias plásticas e/ou de reconstrução facial, oftalmologia, neurologia, engenharia de tecidos entre outros. O objetivo do uso de biomateriais é melhorar ou restaurar funções vitais de um órgão ou tecido, para permitir que o paciente consiga viver de forma autônoma, sem afetar negativamente outras partes do corpo (GRUMEZESCU, 2016).

A escolha do biomaterial adequado depende de uma série de fatores relacionados com a parte do corpo humano a ser mimetizada. Esse material precisa atender às necessidades anatômicas do local onde ele será implantado e precisa desempenhar a função biológica do tecido ou órgão a ser substituído, além de possuir as propriedades mecânicas adequadas. Além disso, a interação química e física do biomaterial com o corpo humano não pode liberar substâncias tóxicas nem desencadear reações imunológicas; ou seja, esse material deve ser biocompatível (BRANT, 2008; GRUMEZESCU, 2016).

Um material é classificado como biocompatível quando provoca resposta biológica mínima ao ser implantado; ou seja, o material em contato com o organismo não induz reações químicas que causam inflamações, alergias e processo de rejeição do implante (PERALE; HILBORN, 2017).

O conjunto de propriedades químicas, físicas e biológicas exigidas para um biomaterial desempenhar adequadamente determinada função é denominado biofuncionalidade. Esse conceito descreve o comportamento do material implantado no organismo e ainda compreende a capacidade do dispositivo desempenhar uma função desejada durante o período esperado (BLACK, 2006).

Outro aspecto importante é a capacidade de esterilização prévia do material a ser implantado. Os biomateriais precisam suportar os tratamentos químicos ou físicos que promovam a completa destruição de micro-organismos, para que possam ser implantados sem o risco de ocorrer uma infecção microbiológica (PERALE; HILBORN, 2017).

A composição do biomaterial pode ser de origem natural (colágeno, quitosana, carbonato de cálcio proveniente de corais e ossos, entre outros) ou de origem sintética (metais, polímeros, cerâmicos, compósitos) (RODRIGUES; MOTA, 2017). A Tabela III.1, a seguir

mostra alguns dos biomateriais mais aplicados na medicina, sua aplicação e sua composição química.

Tabela III.1 – Alguns Biomateriais e suas Aplicações. Fonte: BRANT, 2008.

Dispositivo	Função no Organismo	Composição
Prótese da córnea	Prover um caminho ótico para a retina	Hidrogel de PMMA
Válvulas cardíacas	Substituição de válvulas danificadas	Ligas Co-Cr; carbono histórico de baixa temperatura; liga de Ti com Silastic
Próteses artificiais do quadril, joelho, ombro, cotovelo e pulso	Reconstrução de articulações artríticas ou fraturadas	Aço inox 316L; liga Co-Cr; Ti e liga Ti-Al-V; cimento de PMMA; polímero poliacetil; alumina de alta densidade
Pinos intramedulares	Alinhamento de fraturas	Compósito polissulfona-fibra de carbono; compósito de ácido polilático-ácido poliglicólico
Prótese mamária	Substituição ou aumento de seios	Gel e borracha de silicone, Dacron; esponja de Hydron
Pele artificial	Tratar queimaduras severas	Colágeno tratado; compósito de espuma de policaprolactona (PCL) – filme de PCL
Suturas	Manutenção de contato entre tecidos para auxiliar na cicatrização	PLA, PGA, P(LA-co-GA); Aço inox; seda; náilon; polipropileno

A produção de dispositivos e implantes é regulamentada e fiscalizada por diversos órgãos competentes. Órgãos, a exemplo da ASTM (American Society for Testing and Materials) e da ISO (International Standards Organization), desenvolvem protocolos para verificação das especificações exigidas para biomateriais licenciados, para auxiliar na manutenção da qualidade e padronização dos materiais produzidos. Outros órgãos, a exemplo da FDA (Food and Drugs Administration), auxiliam na fiscalização das empresas produtoras e comercializadoras desses produtos. Essas organizações procuram garantir que os biomateriais

utilizados apresentem biocompatibilidade, biofuncionalidade e estejam aptos ao uso médico (BLACK, 2006).

As pesquisas mais recentes procuram obter biomateriais que possam ser aplicados no desenvolvimento da área da engenharia de tecido (PERALE; HILBORN, 2017). A engenharia de tecido consiste em uma área da ciência biomédica que busca produzir ou regenerar tecidos ou órgãos por meio da implantação ou cultivo controlado de células específicas da parte do corpo a ser mimetizada. No entanto, para que isso possa ser realizado, três componentes básicos são necessários: células específicas, fatores de sinalização e “scaffolds” (material estrutural para o crescimento ordenado das células) (HENCH; JONES, 2005). Os “scaffolds” utilizados no desenvolvimento da engenharia de tecido são biomateriais que precisam ser bioativos e, geralmente, biodegradáveis ou reabsorvíveis. Nesse caso, os biomateriais de origem polimérica possuem vantagens em relação a outros tipos de materiais devido à capacidade de permitir o crescimento e manutenção celular, ser absorvido pelo organismo a longo prazo e apresentar propriedades mecânicas adequadas (ALMEIDA, 2010).

3.3 Módulo de Young ou Elasticidade

As propriedades mecânicas de um material são o conjunto de informações que especificam como ele irá se comportar quando sofrer a ação de uma carga ou de uma força. As propriedades mecânicas são especificadas por meio da determinação dos parâmetros: módulo de elasticidade, limite de resistência à tração, resistência ao impacto e resistência à fadiga (CALLISTER, 2002).

A quantificação dos parâmetros que envolvem o comportamento mecânico de um material é realizada ao se relacionar tensão exercida (σ) com a deformação resultante (ϵ). As

equações que descrevem essas variáveis, nos casos de tensões unidirecionadas, são (RODRIGUES; MOTA, 2017):

$$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0} = \frac{L - L_0}{L_0} \quad \text{e} \quad \sigma = \frac{F}{A} \quad (1)$$

sendo ΔL igual à diferença entre o comprimento inicial e final da amostra após sofrer a tensão σ ; L_0 igual ao comprimento inicial da amostra; F igual à força aplicada sobre o material; e A igual à área transversal ao movimento. Nesse caso, a força é aplicada no sentido em que se observa a deformação ε . Se considerarmos a lei de Hooke para um material sólido com elasticidade ideal, temos:

$$\sigma = E\varepsilon \quad (2)$$

sendo E igual ao módulo de Young ou módulo de Elasticidade (RODRIGUES; MOTA, 2017).

A Figura III.3 mostra a relação entre tensão, deformação e o módulo de Young.

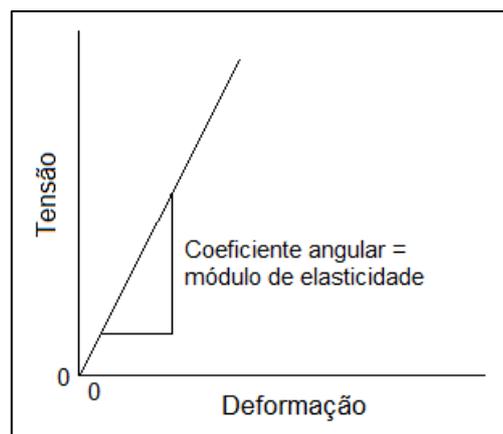


Figura III.3 – Gráfico de tensão versus deformação para cálculo do módulo de elasticidade de um material. Fonte: Adaptado de CALLISTER, 2002.

O valor do módulo de elasticidade é calculado em unidades de pressão, geralmente, sendo expresso em GPa, MPa ou psi. Sabendo-se o valor dessa variável, é possível prever o quanto um material irá se deformar quando sofrer uma determinada tensão. Mesmo não sendo uma informação suficiente para descrever o comportamento mecânico de um material, o módulo de Young auxilia na comparação e na escolha dos materiais de acordo com a finalidade para a qual será aplicado (TANZI; FARE, 2017).

O valor do módulo de elasticidade é um dos fatores mais utilizados para se descrever o comportamento mecânico de biomateriais, principalmente, quando a peça ou dispositivo a ser confeccionado tem função estrutural (BLACK, 2006). Sendo assim, durante a etapa de caracterização de novos biomateriais a serem aplicados com o intuito de substituir cartilagens articulares, ensaios mecânicos são realizados para obter o valor do módulo de elasticidade (E) do material. O valor do módulo de elasticidade do biomaterial precisa ser o mais próximo possível do valor do material biológico a ser mimetizado, para ser considerado biofuncional (WU et al., 2008).

Os valores das propriedades mecânicas dos materiais são obtidos por meio da realização de experimentos em laboratório, que devem reproduzir, o mais fielmente possível, as condições de estresse que o material irá sofrer na realidade. Dentre os fatores a serem considerados nesse tipo de análise, incluem-se a natureza da carga aplicada e a duração da sua aplicação bem como as condições ambientais (a exemplo da temperatura e umidade do ambiente). A carga/força aplicada pode ser do tipo tração, compressiva, flexiva ou de cisalhamento, conforme ilustra a Figura III.4 (CALLISTER, 2002; MENARD, 2008).

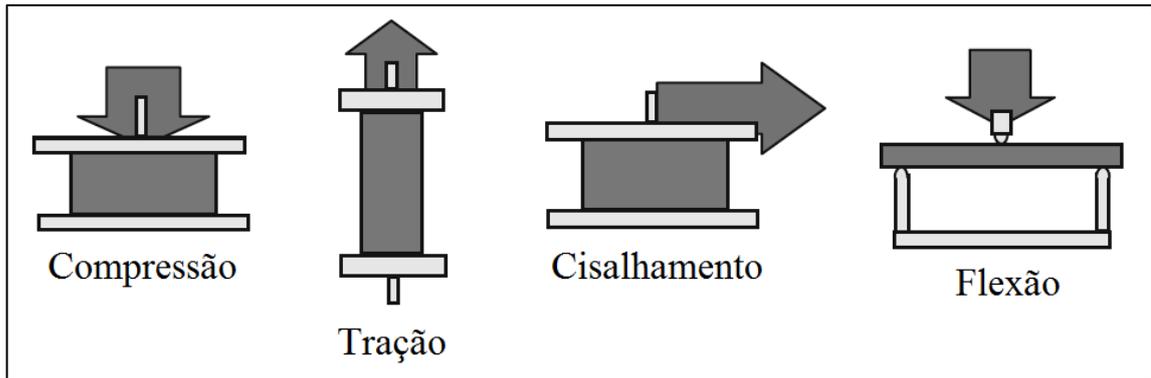


Figura III.4 – Tensões que podem ser exercidas em um corpo de prova. Fonte: Adaptado de MENARD, 2008.

A magnitude da força aplicada pode ser constante ao longo do tempo ou então variar constantemente. Outro parâmetro a ser observado é o tempo de aplicação da força, pois o ensaio deve ser realizado dentro de um período adequado para se observar o comportamento do material de forma adequada (CALLISTER, 2002).

Atualmente, para o cálculo do módulo de elasticidade de um determinado biomaterial, os ensaios mais utilizados são os de tração ou compressão da amostra. Os equipamentos utilizados para realizar análise, na maioria das pesquisas científicas realizadas, são os UMT (*Universal Mechanical Tester*) (MAIOLO et al., 2012; MASRI; CHAGNON; FAVIER, 2017). Porém, é possível observar que, na maioria dos trabalhos publicados, a temperatura da amostra não foi controlada; ou seja, as análises foram realizadas sob condições ambientais locais (GUPTA; SINHA; SINHA, 2010; MAIOLO et al., 2012; WU et al., 2008). No entanto, a temperatura da amostra, durante os ensaios de compressão ou tração, pode influenciar no valor do módulo de elasticidade observado, principalmente se o material for de origem polimérica, a exemplo dos hidrogéis (BLACK, 2006).

A temperatura ideal para a realização dos ensaios de compressão ou tração de biomateriais é 37 °C, aproximadamente, valor de temperatura corpórea observado na maioria dos seres humanos saudáveis (TANZI; FARÈ, 2017). Contudo, o módulo de elasticidade

também pode ser calculado por meio dos resultados da análise dinâmico-mecânica (DMA), em que a condição de temperatura utilizada no teste pode ser controlada (CHEN et al., 2014).

A confecção de um biomaterial deve estar de acordo com os valores das propriedades mecânicas do tecido a ser mimetizado. No caso de tecido cartilaginoso articular, o módulo de elasticidade é um dos primeiros fatores físicos a ser avaliado (MASRI; CHAGNON; FAVIER, 2017; WANG et al., 2017). No caso do tecido cartilaginoso articular, por exemplo, o módulo de elasticidade varia entre 0,5 e 1,5 MPa no corpo humano de acordo com Nordin e Frankel (2003) e entre 0,20 e 5,41 MPa de acordo com Maiolo et al. (2012). O trabalho publicado por Machado (2015) relata que o valor encontrado para o módulo de elasticidade da cartilagem articular de joelho é de 0,3886 MPa.

3.4 Características dos Hidrogéis

Os hidrogéis consistem em uma rede polimérica tridimensional que absorve água e que, ao mesmo tempo, é insolúvel em meios aquosos sob determinada faixa de temperatura, pH e força iônica (DARWIS et al., 2002; DULONG et al., 2006). A rede polimérica dos hidrogéis é formada por meio de interações entre as cadeias dos polímeros ou oligômeros, utilizados na síntese do material. Esses polímeros se mantêm conectados em pontos chamados “cross-linkers”, que podem ser formados por ligações covalentes, eletrostáticas (ou hidrofóbicas) ou por interações dipolo-dipolo, conforme mostra a Figura III.5, a seguir (MARK, 2004).

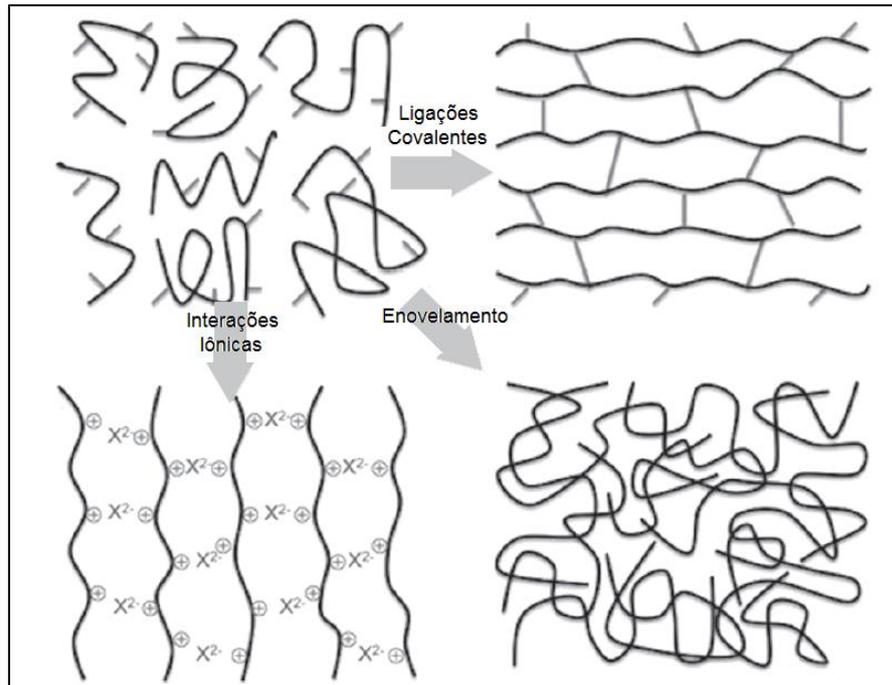


Figura III.5 – Formas de preparo da rede polimérica dos hidrogéis. Fonte: Adaptado de LI; WEISEL, 2014.

A Figura III.6 representa microscopicamente como a rede polimérica do hidrogel é organizada. Os espaços entre os interstícios formados não são padronizados devido à complexidade que envolve a formação do hidrogel (KIM, 1999; PERALE; HILBORN, 2017).

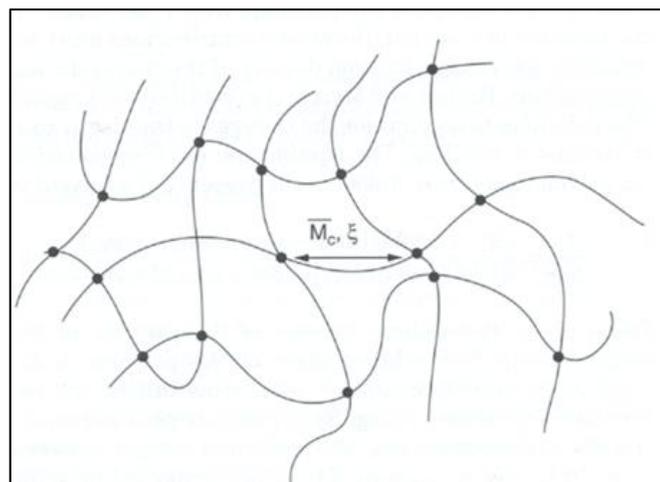


Figura III.6 – Estrutura microscópica dos hidrogéis. Fonte: Fonte: Adaptado de PERALE; HILBORN, 2017.

A hidrofiliçidade do hidrogel ocorre devido à presença de grupos hidrofílicos, tais como: hidroxila, carboxila, amida e sulfônicos ao longo da cadeia polimérica (ALCÂNTARA, 2013;

KIM, 1999). Entretanto, os hidrogéis retêm água até um valor de equilíbrio (ALMEIDA, 2010). O equilíbrio no estado de hidratação de um hidrogel resulta de um balanço entre as forças motrizes osmóticas, que causam o intumescimento do hidrogel, com as forças coesivas exercidas pelas cadeias poliméricas, que resistem à expansão e expõem a água do hidrogel. As forças coesivas dependem da densidade de “cross-linkers” existentes no hidrogel e as forças osmóticas dependem do ambiente em que o hidrogel está inserido (BRANT, 2008). Após o intumescimento, ao tentar-se retirar a água, muitas vezes a estrutura do hidrogel pode colapsar (BRANT, 2008; MARK, 2004).

Em relação à forma com que a água está interagindo com a rede polimérica, existem quatro tipos água observados no hidrogel, conforme ilustra a Figura III.7. A água pode ser classificada como: água livre, água adsorvida, água intersticial ou água ligada (PERALE; HILBORN, 2017).

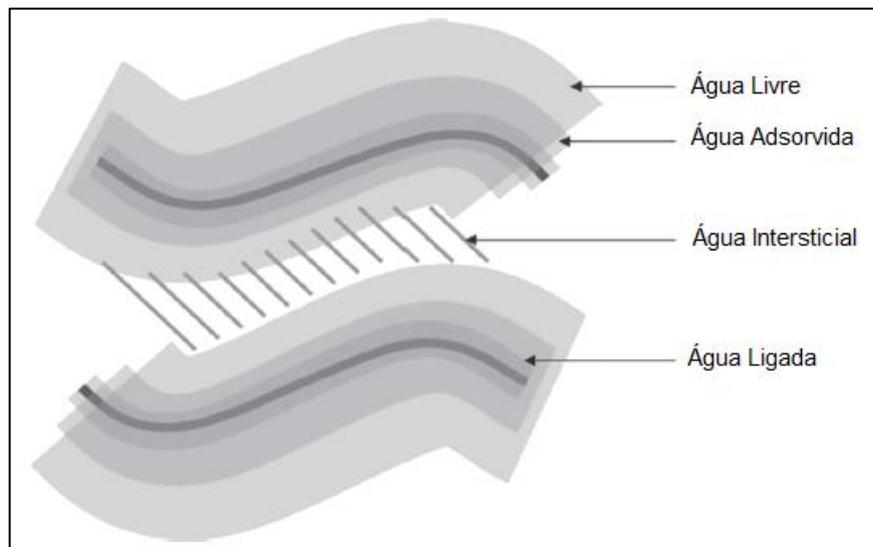


Figura III.7 – Tipos de água existentes nos hidrogéis. Fonte: Adaptado de PERALE; HILBORN, 2017.

A água ligada está mais fortemente ligada à cadeia polimérica, principalmente por ligações de hidrogênio. A água adsorvida interage diretamente com a água ligada e também é considerada fortemente ancorada ao hidrogel. A água intersticial preenche os poros do hidrogel.

Por fim, a água livre é a que preenche a superfície e os grandes vazios existentes no hidrogel. A água do tipo livre ou intersticial possui maior mobilidade que a água ligada ou adsorvida, por interagir de forma mais fraca com os outros componentes do hidrogel, e, sendo assim, é a água que migra nos processos de intumescimento e desidratação do hidrogel (ALMEIDA, 2010). Esses tipos de água são determinados por DSC (*differential scanning calorimetry*) e RMN (ressonância magnética nuclear) (MARK, 2004; TANZI; FARE, 2017).

Um aspecto importante a ser levado em consideração é que quase todos os hidrogéis que contêm grandes quantidades de água (acima de 85%) possuem propriedades mecânicas ruins (DATTA, 2007). No entanto, a quantidade de água existente no hidrogel determina as características de difusão e de transporte. Na maioria dos casos, é observado que quanto mais água melhor a difusão de moléculas no hidrogel (KIM, 1999).

Outra característica a ser observada nos hidrogéis se refere à cristalinidade das redes poliméricas formadas, ou seja, o grau de organização molecular observado. Os hidrogéis amorfos apresentam cadeias poliméricas dispostas de forma aleatória e enoveladas, o que resulta em um material, geralmente, transparente e macio. Enquanto isso, os hidrogéis semicristalinos possuem cadeias com um empacotamento ordenado em determinadas regiões e são mais rígidos e opacos (ALCÂNTARA, 2013).

Devido às inúmeras formas de síntese, de composição e características, os hidrogéis possuem diversas classificações, conforme mostra a Figura III.8. De acordo com Alcântara (2013) e Brant (2008), os hidrogéis podem ser classificados das seguintes formas:

- Quanto à origem do polímero: o polímero pode ser de origem natural (colágeno, alginato, quitosana, celulose, entre outros), de origem sintética (PEG/PEO, PVA, PLA, PMMA, entre outros) ou uma mistura entre polímeros naturais e sintéticos.

- Quanto à carga iônica: o polímero que compõe o hidrogel pode ter carga negativa, positiva, ser neutro, ou adquirir cargas distintas a depender do pH e/ou força iônica do meio;
- Quanto às propriedades de interação com o meio em que estão inseridos: os hidrogéis podem apresentar modificações na sua estrutura quando estimulados (chamados de hidrogéis inteligentes) ou podem ser inertes, ou seja, não interagir (hidrogéis convencionais);
- Quanto aos métodos de síntese do hidrogel: realizando reações com polímeros ou a partir de monômeros, na presença ou não de agentes reticulantes;
- Quanto à biodegradabilidade: os hidrogéis podem ser estáveis (não biodegradáveis) ou sofrer reações químicas de oxidação ou hidrólise com o decorrer do tempo (biodegradáveis);
- Quanto ao tipo de reticulação realizada: a síntese do hidrogel pode ser realizada por reações químicas entre as cadeias poliméricas (hidrogéis químicos) ou por interações físicas entre grupamentos químicos existentes nas moléculas dos polímeros (hidrogéis físicos).

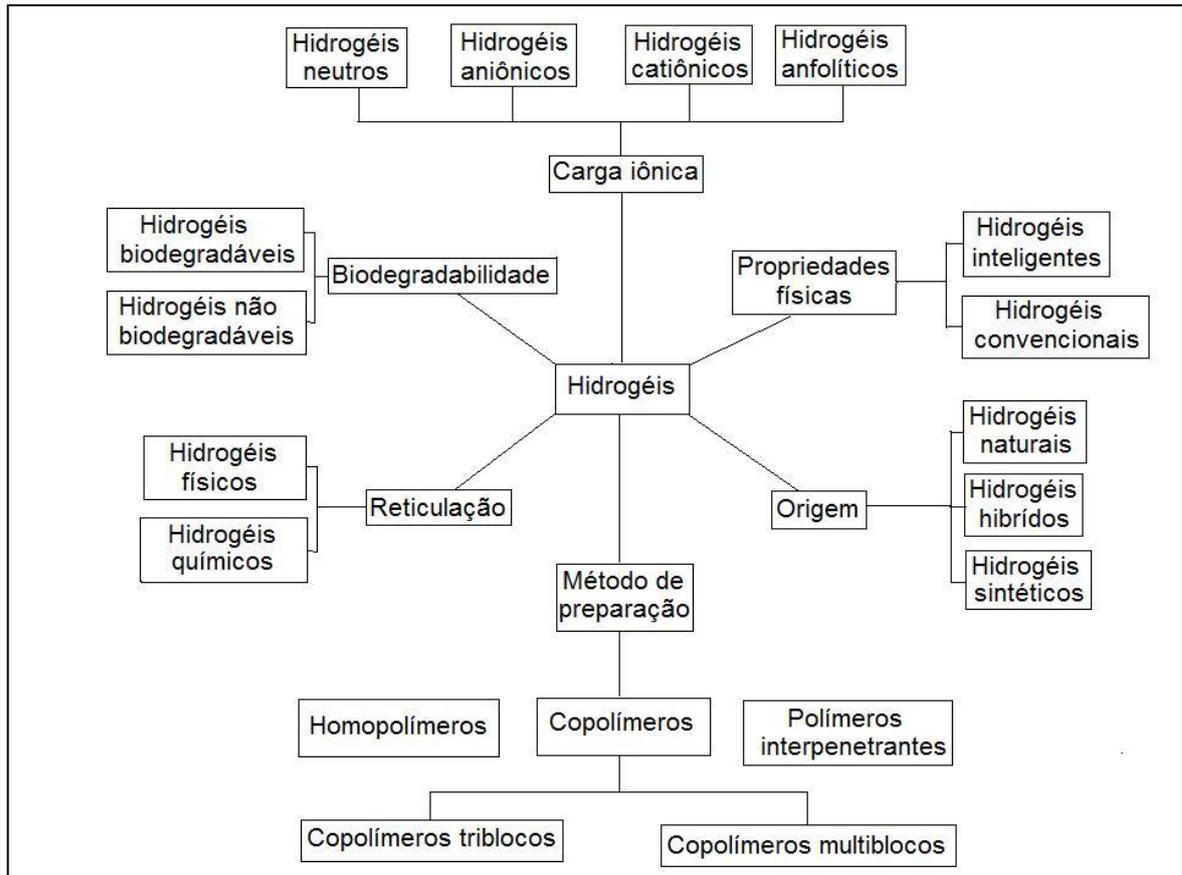


Figura III.8 – Classificações dos hidrogéis. Fonte: ALCÂNTARA, 2013.

Uma das classificações mais relevantes ao se estudar um hidrogel é a que define por qual método de reticulação a rede polimérica foi formada. Nesse contexto, os hidrogéis podem ser classificados como físicos ou químicos (BRANT, 2008; SANNA, 2013).

Os hidrogéis químicos são formados por meio de reações químicas entre grupamentos existentes nos polímeros utilizados na síntese. Sendo assim, a estrutura tridimensional do hidrogel é mantida coesa devido a ligações covalentes entre as cadeias poliméricas. Esse tipo de hidrogel é considerado estável em ambientes biológicos (ABDELHALIM, 2006; BRANT, 2008). No caso dos hidrogéis físicos, as cadeias poliméricas estão coesas por interações mais fracas (não-covalentes) e, por isso, se tornam mais susceptíveis às mudanças no meio (pH, temperatura, pressão osmótica). A síntese do hidrogel físico ocorre, principalmente, por ação

de forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e enovelamento das cadeias poliméricas (BRANT, 2008; SANNA, 2013).

Os hidrogéis físicos possuem vantagens em relação aos hidrogéis químicos quanto à utilização para fins biomédicos, pois conseguem apresentar propriedades mecânicas similares aos órgãos e tecidos a serem mimetizados e não apresentam problemas quanto à toxicidade do biomaterial produzido, por não utilizarem agentes reticulantes durante sua síntese (como ocorre na produção de hidrogéis químicos) (GANN et al., 2009; GUPTA et al., 2009).

Uma das formas de se sintetizar hidrogéis físicos é utilizar o processo de solubilização de polímeros hidrofílicos em água e realizar ciclos de congelamento para induzir a formação do hidrogel. Esse tipo de hidrogel tem aplicação na produção de pele sintética e tem sido testado para aplicação como cartilagens artificiais (HOLLOWAY et al., 2011).

A utilização de hidrogéis ocorre em diversas indústrias, a exemplo da farmacêutica, cosmética e de alimentos (NORTON; HANCOCKS; GROVER, 2014). Na indústria farmacêutica, os hidrogéis são muito utilizados na liberação de fármacos de forma controlada no organismo (DULONG et al., 2006). Outros materiais de uso biomédico, como lentes de contato ocular e pele sintética, também utilizam hidrogéis na sua formulação (DARWIS et al., 2002). Recentemente, biomateriais à base de hidrogéis e hidroxiapatita têm sido aplicados na produção de implantes ósseos (HAYAMI et al., 2007).

Os hidrogéis são bem aceitos pelo corpo humano (aplicações biomédicas) porque conseguem mimetizar a estrutura natural da superfície ou material que envolve as células do corpo humano (YIN, 2012). Com isso, os hidrogéis têm sido amplamente estudados com o propósito de utilizá-los na produção de “scaffolds” na área da engenharia de tecido (REN et al., 2015; SARKER, 2015). A Figura III.9 mostra a interação do biomaterial implantado no corpo humano, servindo de estrutura para o crescimento de células e regeneração do tecido tratado.

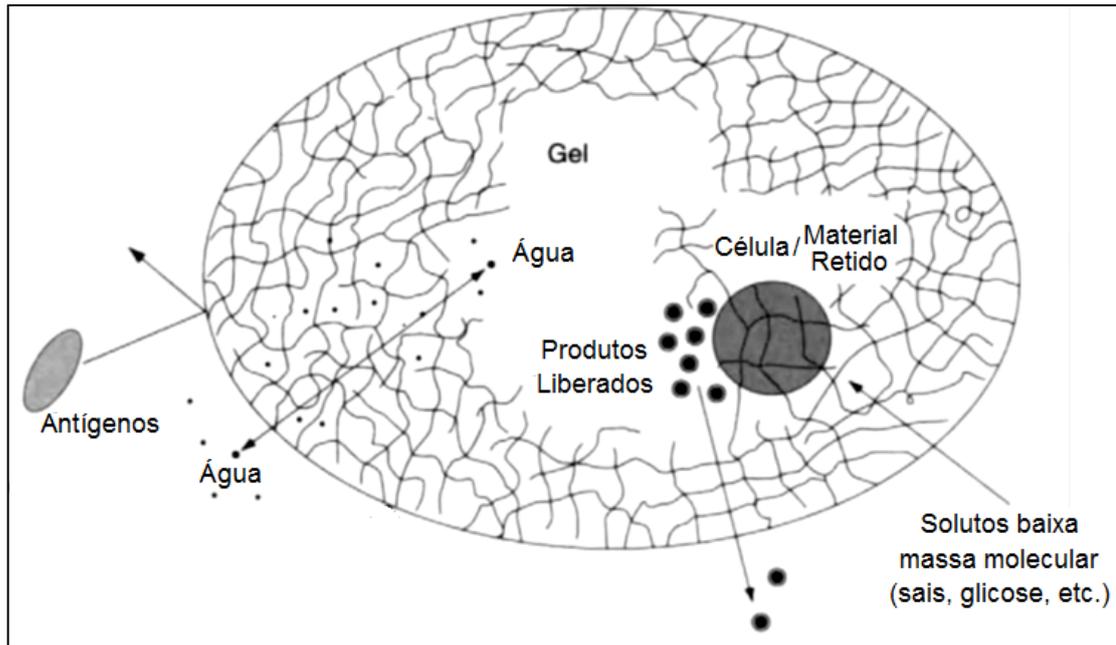


Figura III.9 – Representação da interação de biomateriais feitos de hidrogel no organismo. Fonte: Adaptado de OSADA e KAJIWARA, 2001.

Devido ao seu comportamento mecânico frente a esforços do tipo fricção, pesquisas utilizando hidrogéis na substituição de cartilagens articulares estão sendo realizadas. Além de bom desempenho mecânico, os hidrogéis apresentam boa lubrificação superficial, o que se assemelha às cartilagens naturais, auxiliando na sua proteção contra desgastes (BAYKAL et al., 2013; BLUM; OVAERT, 2013; SPILLER et al., 2008; THOMAS et al., 2009). Além disso, os hidrogéis podem ser citocompatíveis e permitem a difusão de água, nutrientes e metabólitos que ajudam na manutenção e crescimento celular (BAYKAL et al., 2012; REMYA; NAIR, 2013; SARKER, 2015). Nesse contexto, os hidrogéis de PVA estão sendo estudados por apresentarem características desejáveis à utilização na confecção de biomateriais para reposição de cartilagens articulares (NGUYEN et al., 2012; RODRIGUES et al., 2012).

3.5 Hidrogéis de PVA, PVP e PEO

O Poli Álcool Vinílico (PVA) é um polímero sintético, solúvel em água, que possui grupamentos hidroxila ao longo da sua cadeia polimérica (LIU, 2010). Esse polímero,

geralmente, é produzido por meio da alcoólise do poliacetato de vinila (PVAc) e pode ser comercializado com massa molar e graus de hidrólise variados (EBEWELE, 2000). A Figura III.10, a seguir, mostra a estrutura química do PVA.

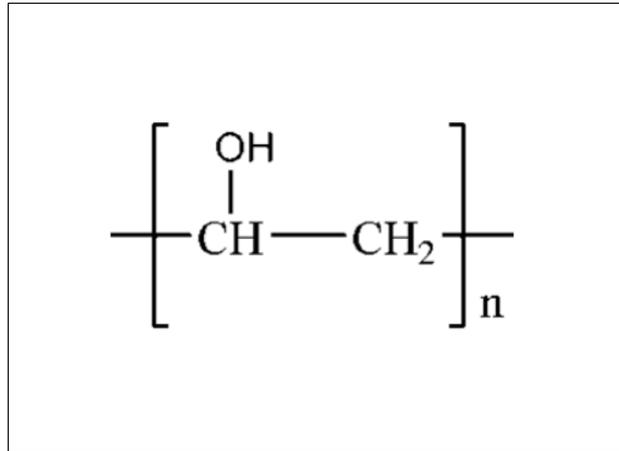


Figura III.10 – Estrutura química do poli álcool vinílico (PVA). Fonte: LIU, 2010.

O polímero de PVA é utilizado na síntese de hidrogéis com excelentes propriedades mecânicas para aplicação na indústria de engenharia de tecidos, mais especificamente, na produção de pele e cartilagens artificiais (JENKINS, 2007). Os hidrogéis de PVA e os biomateriais feitos a partir deles são regulamentados e aprovados pela FDA (*Food and Drugs Administration*) e outros órgãos reguladores. No entanto, as células animais não aderem com facilidade sob sua superfície, limitando a sua aplicação como “scaffolds” (POOLE; MARTENS; GREEN, 2016). Uma das alternativas para melhorar a aderência dos hidrogéis de PVA é utilizar o poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) na mistura polimérica (ZHENG et al., 2008).

O poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) é um polímero solúvel em água que possui baixa toxicidade, biocompatibilidade e alta resistência química (MA et al., 2009). Esse polímero é utilizado em diversas aplicações em quase todas as áreas da indústria, principalmente nas indústrias farmacêutica, cosmética e de alimentos (BRANT, 2008). A Figura III.11, a seguir, mostra a estrutura química do PVP.

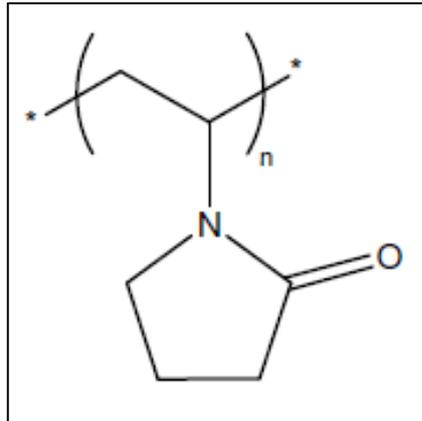


Figura III.11 – Estrutura química do poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP). Fonte: BRANT, 2008.

Os hidrogéis de PVP são utilizados pela indústria biomédica na produção de biomateriais, principalmente pelos artificiais (BONACIN, 2011; MUTA et al., 2002).

O polióxido de etileno (PEO) é um polímero biodegradável que quando apresenta massa molecular abaixo de 20.000 g/gmol é chamado de polietileno glicol (PEG). Esse polímero sintético é o mais utilizado em aplicações biomédicas por ser considerado não tóxico, não alergênico e apresentar baixa aderência para proteínas em sua superfície e, por isso, seu uso é aprovado pela FDA (*Food and Drugs Administration*) e outros órgãos reguladores (POOLE; MARTENS; GREEN, 2016). A Figura III.12 representa a estrutura química do PEO.

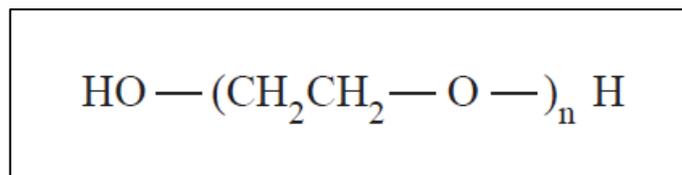


Figura III.12 – Estrutura química do polióxido de etileno (PEO). Fonte: EBEWELE, 2000.

Os hidrogéis de PVA podem ser sintetizados por reações químicas ou por interações físicas (STAUFFER; PEPPAS, 1992). As reações para produção de hidrogéis químicos à base de PVA ocorrem por meio da adição de agentes reticulantes ou pela ação de radiação e consistem em reagir os grupamentos hidroxila de uma cadeia polimérica de PVA com outras cadeias adjacentes formando a rede polimérica do hidrogel (LIU, 2010).

As interações responsáveis por formar hidrogéis físicos de PVA consistem em formar a rede polimérica por meio da técnica de cristalização por ciclos de congelamento. Os hidrogéis físicos de PVA são viscoelásticos e possuem resistência à tração. Além disso, a rota física de síntese de hidrogéis evita a geração de biomateriais com resíduos químicos (agentes reticulantes usados em reações químicas) ou com radicais livres (devido à reação por radiação). Sendo assim, os hidrogéis físicos de PVA são os melhores materiais para se utilizar como matéria-prima na fabricação de biomateriais em geral (PRAMANICK et al., 2012).

A formação de hidrogéis de PVA por ciclos de congelamento ocorre em duas fases:

- 1ª fase: o polímero PVA é solubilizado em água quente (acima de 90°C) (HATAKEYEMA; YAMAUCHI, 1984; NAGURA; HAMANO; ISHIKAWA, 1989). Outros polímeros e/ou outras substâncias podem ser acrescentadas durante a solubilização de todo material (HAYES et al., 2016). O aquecimento do sistema pode ser realizado por autoclavagem (DROZDOVA et al., 2017; HATAKEYEMA et al., 2005) ou em placa de aquecimento sob agitação constante (CHEN et al., 2017; HERNÁNDEZ et al., 2004);
- 2ª fase: a solução de PVA em água, obtida na 1ª fase, passa por ciclos de congelamento. Cada ciclo consiste em armazenar o material, por algumas horas, a uma temperatura de -20°C e depois a 4°C (KOBAYASHI; TOGUCHIDA; OKA, 2003) ou 25°C (PAN; XIONG; MA, 2007). A quantidade necessárias de ciclos de congelamento para se obter o hidrogel depende das condições em que ocorreu a síntese e das características desejadas (BUTYLINA; GENG; OKSMAN, 2016).

A Figura III.13 mostra o efeito da quantidade de ciclos de congelamento na estrutura da rede polimérica obtida no hidrogel de PVA.

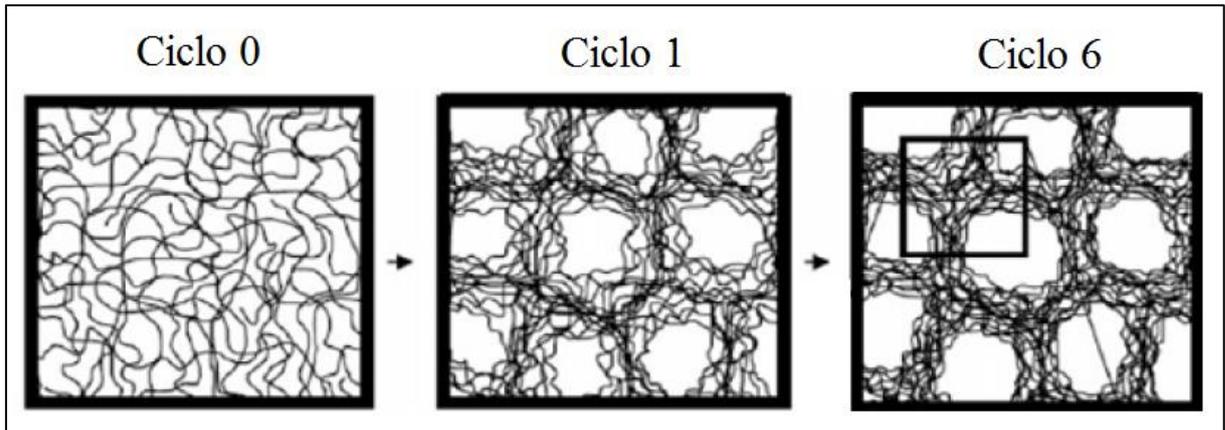


Figura III.13 – Efeito dos ciclos de congelamento na estrutura do hidrogel de PVA. Fonte: Adaptado de LIU, 2010.

A cada ciclo de congelamento realizado, a rede polimérica, antes enovelada e sem organização aparente, apresenta regiões de cristalização do PVA (MCKENNA; HORKAY, 1994; MORARIU et al., 2016). Essa organização da estrutura molecular promove maior estabilidade e propriedades elásticas ao hidrogel formado (PRAMANICK et al., 2012).

Hidrogéis de PVA porosos (físicos) têm sido utilizados como matriz para crescimento celular na formação de cartilagens sintéticas *in vitro* (GRUMEZESCU, 2016). Estudos publicados por Curley et al. (2014) e Kobayashi, Toguchida e Oka (2003) utilizaram hidrogéis de PVA na produção de tecido cartilaginoso para reposição da região do menisco (joelho).

Entretanto, os hidrogéis de PVA puro não apresentam boas condições para uso como estruturas de crescimento celular devido à dificuldade de adesão das células na superfície desses hidrogéis (KANCA et al., 2018; SHI et al., 2016). Sendo assim, para contornar esse problema, outros polímeros hidrofílicos estão sendo misturados ao PVA para produzir biomateriais aplicáveis às técnicas de engenharia de tecido (BODUGOZ-SENTURK et al., 2008; MA et al., 2009).

Capítulo 4 – Materiais e Métodos

4.1 Síntese dos Hidrogéis

A síntese de todos os hidrogéis utilizados neste trabalho foi realizada por meio da técnica de solubilização polimérica em água, seguida de ciclos de congelamento. Os polímeros utilizados para produzir as amostras de hidrogel foram: Poli Álcool Vinílico (PVA), Poli(vinil-2-pirrolidona) (PVP) e o Polióxido de etileno (PEO). No entanto, a proporção em massa de cada um desses polímeros, nas amostras, variou conforme o especificado no planejamento experimental realizado (metodologia devidamente explicada no item 4.2): 70 a 100% de PVA; 0 a 30% de PVP; e 0 a 30% de PEO, levando em consideração somente a fração polimérica do hidrogel.

A fração polimérica dos hidrogéis sintetizados variou de 10 a 20% em massa, sendo o restante do material composto somente por água, ou seja, 80 a 90% de água na composição das amostras. A proporção de água nos hidrogéis é denominada grau de hidratação e esse valor variou conforme o especificado no item 4.2.

A síntese dos hidrogéis foi iniciada adicionando-se a fração polimérica (mistura dos polímeros em pó) à quantidade de água necessária, de acordo com o grau de hidratação desejado para a amostra. Cada mistura foi agitada a 100 rpm e aquecida à temperatura de 90°C durante um período de quatro horas, com o intuito de se formar uma suspensão homogênea, facilitando a solubilização do material na etapa seguinte. A total solubilização dos polímeros em água ocorreu ao se aquecer a suspensão, obtida na primeira etapa, à temperatura de 121°C (pressão absoluta de 2,2 atm) por duas horas. A solução viscosa formada, após essas etapas de solubilização polimérica em água, foi colocada em placas petri de vidro (90 mm de diâmetro)

para formar hidrogéis com espessura de 5 mm, aproximadamente. Após isso, as amostras foram congeladas a temperatura de -20°C para iniciar a etapa dos ciclos de congelamento.

Os ciclos de congelamento consistiram em congelar e descongelar as amostras sucessivas vezes para se formarem as interações físicas entre as cadeias dos polímeros, formando a rede polimérica do hidrogel. O início de cada ciclo consistiu em congelar a amostra à temperatura de -20°C , por um período de vinte horas, e depois descongelar a amostra à temperatura de 25°C , por um período de quatro horas, finalizando-se, assim, um ciclo de congelamento.

Ao todo, as amostras foram submetidas a 15 ciclos de congelamento, conforme metodologia descrita por Pramanick et al. (2012), com o intuito de se obter hidrogéis físicos com a rede estrutural bem definida. Durante os ciclos, a formação das interações físicas provocou mudanças no aspecto das amostras, que se tornaram mais opacas e apresentavam cristais mais organizados enquanto congeladas.

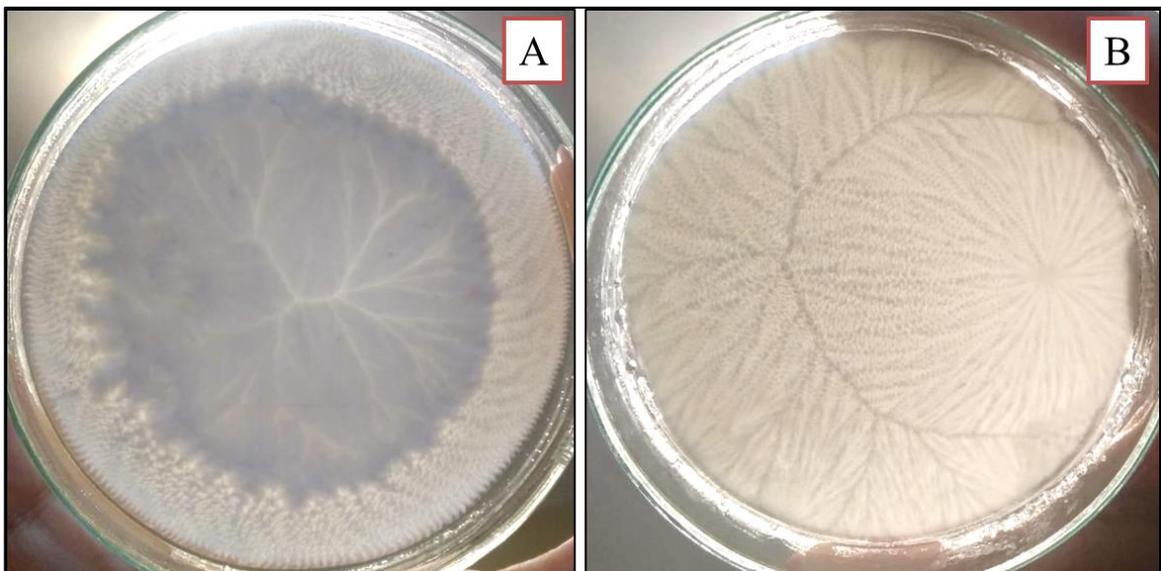


Figura IV.1 – Aspecto macroscópico observado após 5 ciclos de congelamento (A) e após 15 ciclos de congelamento (B).

4.2 Planejamento Experimental

O planejamento de experimentos é uma ferramenta muito eficiente quando se deseja realizar pesquisas científicas, pois permite a redução do número de ensaios necessários, em relação ao método de tentativa e erro (NUNES, 1998).

O planejamento experimental do tipo mistura foi realizado neste trabalho para se obter a composição polimérica ideal na confecção de um hidrogel com propriedades mecânicas similares às de uma cartilagem articular humana. A variável resposta utilizada nesse planejamento foi o valor do módulo de Young (ou elasticidade) para cada uma das amostras, obtido por meio da análise dinâmico-mecânica (DMA), descrita no item 4.3.

Os componentes avaliados na mistura foram os polímeros PVA, PVP e PEO, sendo que as proporções deles obedeceram à seguinte equação:

$$\sum_{i=1}^3 x_i = 1 \quad (3)$$

Sendo assim, a soma das proporções foi igual a 1 (100%) em todos os casos estudados. O planejamento de mistura foi do tipo Simplex-centróide com pontos axiais, com a adição de quatro réplicas no ponto central. No entanto, esse planejamento foi realizado com restrições nas proporções dos componentes, como mostra a Figura IV.2, devido ao fato que a proporção de PVA nos hidrogéis não poderia ser inferior a 70%, pois vários estudos mostraram que proporções de PVA inferiores a esse valor resultavam na formação de hidrogéis semissólidos (MANSUR; ORÉFICE; MANSUR, 2004).

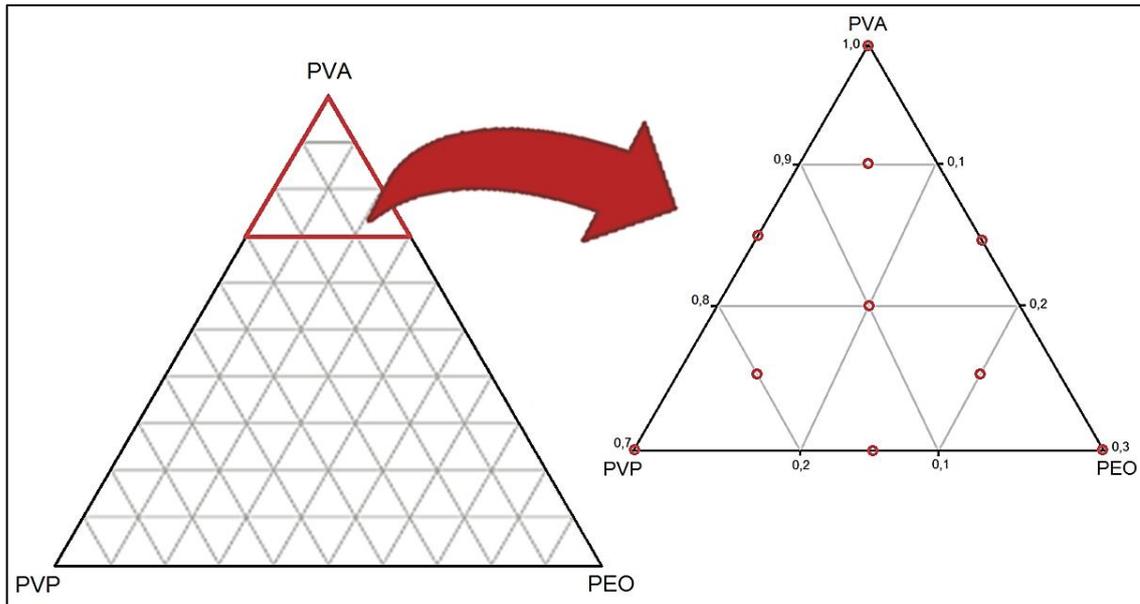


Figura IV.2 – Planejamento experimental de mistura realizado.

Entretanto, ao todo, foram realizados três grupos de experimentos com esse tipo de planejamento para se avaliar, também, a influência do grau de hidratação na variável resposta. Os graus de hidratação avaliados (teor de água existente no hidrogel) foram de 80, 85 e 90%. Sendo assim, 42 amostras foram feitas ao todo, sendo 14 para cada grupo de experimentos (um para cada grau de hidratação).

O software utilizado para a análise estatística dos resultados foi o STATISTICA13. Após o resultado da análise estatística, foram sintetizadas amostras de hidrogel com a composição ideal obtida na otimização do modelo.

4.3 Análise Dinâmico-Mecânica (DMA)

Os equipamentos que realizam a análise dinâmico-mecânica (DMA) aplicam forças na amostra analisada e mensuram a resposta viscoelástica que esse estímulo provoca (MENARD, 2008; TANZI; FARÈ, 2017). Sendo assim, as amostras de hidrogel foram analisadas em um

equipamento DMA 7, da marca Perkin Elmer (laboratório Labter), com o objetivo de se obter o valor do módulo de elasticidade das amostras.

A análise de DMA das amostras de hidrogel foi realizada utilizando-se o método de compressão por placas paralelas, de acordo com o descrito por Beck et al. (2016). As placas tinham formato de disco com diâmetro de 20 mm. As amostras de hidrogel foram preparadas em formato de disco (com o mesmo diâmetro das placas do aparelho) e com espessura de 5 mm. A análise ocorreu em temperatura constante de 37°C, aproximadamente.

Antes do início da análise, as amostras estavam imersas em tampão fosfato-salino (PBS) por 24 horas, a 37°C, aproximadamente. Essas condições ambientais impostas às amostras de hidrogel mimetizam o ambiente em que as cartilagens articulares ficam inseridas. O intuito desse procedimento é obter o valor real do módulo de elasticidade que as amostras irão apresentar quando inseridas no corpo humano.

Conforme o descrito pelo protocolo de reagentes da ANVISA (2010), a composição do tampão PBS utilizado neste trabalho foi:

- 6 g/L de cloreto de sódio;
- 0,15 g/L de cloreto de potássio;
- 1,075 g/L de fosfato de sódio dibásico dodeca-hidratado;
- 0,15 g/L de fosfato de potássio monobásico.

4.4 Análise Termogravimétrica (TGA/DTG)

O conceito de análise térmica a define como um conjunto de técnicas que permite medir as mudanças de uma propriedade física ou química de uma substância ou material em função da temperatura ou do tempo, enquanto a substância é submetida a uma programação controlada

de incrementos de temperatura. No caso da termogravimetria ou análise termogravimétrica (TGA), ela pode ser definida como um processo contínuo que mede a variação de massa (perda ou ganho) de uma substância ou material, resultante de uma transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação, decomposição, oxidação), em função da temperatura e/ou tempo (GIOLITO, 1987; e MOTHÉ et al., 2009).

As análises termogravimétricas da amostra de hidrogel, com a composição estabelecida pelo resultado da otimização do modelo obtido no planejamento experimental, foi realizada em um equipamento da marca TA, modelo Q-500 (laboratório LAPIN – IMA). O intuito dessa análise foi determinar a faixa de vaporização da água e de degradação dos componentes poliméricos contidos. A taxa de aquecimento utilizada foi de 10 °C/min e os ensaios foram realizados em uma atmosfera inerte (N₂, a uma taxa de 60 mL/min na balança e 30 mL/min na amostra).

4.5 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

A amostra otimizada do hidrogel, obtida pela metodologia descrita no item 4.2, foi submetida à análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC), baseando-se nos resultados obtidos na análise termogravimétrica (TGA).

A análise DSC (i.e., differential scanning calorimetry) é uma técnica termoanalítica, na qual a diferença na quantidade de energia necessária para elevar a temperatura de uma amostra em estudo e de uma amostra referência é medida em função da temperatura. As referidas amostra e referência são mantidas em temperaturas, aproximadamente, iguais (i.e., processo isotérmico) durante todo o experimento. Essa técnica mede as temperaturas e a taxa de calor associadas às transições dos materiais em função da temperatura e do tempo. Tais medidas fornecem informações sobre mudanças físicas e químicas que envolvem processos

endotérmicos, exotérmicos ou mudanças na capacidade calorífica (GIOLITO, 1987; e MOTHE et. al., 2009).

4.6 Determinação do Grau de Intumescimento (GI)

O grau de intumescimento pode ser descrito como a quantidade de água absorvida pelo hidrogel em determinado ambiente, com pressão osmótica conhecida. O equilíbrio de intumescimento e a variação dimensional do hidrogel são controlados pelo equilíbrio hidrofílico/ hidrofóbico do hidrogel, pela densidade de reticulação e pelas interações intermoleculares entre os segmentos do polímero e as moléculas do solvente (ALCÂNTARA, 2013).

A amostra otimizada de hidrogel foi analisada quanto ao grau de intumescimento quando inserida em tampão PBS, nas mesmas condições descritas no item 4.3. O ensaio para determinação do grau de intumescimento do hidrogel consiste em desidratar a amostra e, depois, inseri-la em ambiente aquoso por tempo suficiente para o hidrogel ficar em equilíbrio osmótico com o meio. A desidratação das amostras foi realizada em estufa, a 50°C. O ensaio foi feito em triplicata e a determinação do grau de intumescimento (GI) foi realizada de acordo com o descrito por Mark (2004):

$$GI(\%) = \frac{m_f - m_s}{m_s} \times 100 \quad (4)$$

sendo m_f igual à massa final da amostra de hidrogel após o intumescimento e m_s igual à massa final da amostra de hidrogel seca.

4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura possibilita a obtenção de imagens microscópicas de alta resolução (VOGEL, 2002). A amostra otimizada de hidrogel e uma amostra de hidrogel com 100% PVA e grau de hidratação de 80% (referência para análise do resultado) foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram desidratadas e metalizadas (superfície coberta por partículas de prata) antes da realização do MEV. O equipamento utilizado na obtenção das imagens foi um microscópio eletrônico da marca FEI Quanta 400 (Laboratório COAM – CETEM).

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

5.1 Planejamento Experimental

As amostras de hidrogel sintetizadas, conforme o descrito no item 4.1, após o término dos ciclos de congelamento foram imersas em tampão PBS para poderem ser analisadas no equipamento DMA, conforme descrito no item 4.3. No entanto, algumas amostras, ao absorverem água do meio, tornaram-se semissólidas e, por isso, não puderam ser analisadas pelo equipamento. Isso inviabilizou a realização do planejamento experimental com os hidrogéis com graus de hidratação iguais a 85 e 90%.

A Tabela V.1 mostra os resultados obtidos do de módulo de elasticidade para as amostras com grau de hidratação igual a 90%. Somente os pontos experimentais que não continham PEO em sua composição puderam ser analisados; ou seja, todos os hidrogéis com grau de hidratação igual a 90% e presença de PEO na porção polimérica se tornaram semissólidos quando imersos em PBS.

Tabela V.1 – Resultados dos Valores do Módulo de Young para as Amostras com 90% de Hidratação

Amostras	Proporção de PVA	Proporção de PVP	Proporção de PEO	Módulo de Young (MPa)
1	1	0	0	0,00214
2	0,7	0,3	0	0,00195
3	0,7	0	0,3	-
4	0,85	0,15	0	0,00220
5	0,85	0	0,15	-
6	0,7	0,15	0,15	-
7	0,8	0,1	0,1	-
8	0,8	0,1	0,1	-
9	0,8	0,1	0,1	-
10	0,8	0,1	0,1	-
11	0,8	0,1	0,1	-
12	0,9	0,05	0,05	-
13	0,75	0,2	0,05	-
14	0,75	0,05	0,2	-

A Tabela V.2 mostra os resultados obtidos dos valores de módulo de elasticidade para as amostras com grau de hidratação igual a 85%. Nesse caso, além dos pontos experimentais que não continham PEO, os dois pontos axiais com a menor quantidade de PEO (5% somente) permaneceram sólidos após serem imersos em tampão PBS.

Tabela V.2 – Resultados dos Valores do Módulo de Young para as Amostras com 85% de Hidratação

Amostras	Proporção de PVA	Proporção de PVP	Proporção de PEO	Módulo de Young (MPa)
1	1	0	0	0,00359
2	0,7	0,3	0	0,00300
3	0,7	0	0,3	-
4	0,85	0,15	0	0,00331
5	0,85	0	0,15	-
6	0,7	0,15	0,15	-
7	0,8	0,1	0,1	-
8	0,8	0,1	0,1	-
9	0,8	0,1	0,1	-
10	0,8	0,1	0,1	-
11	0,8	0,1	0,1	-
12	0,9	0,05	0,05	0,00371
13	0,75	0,2	0,05	-
14	0,75	0,05	0,2	0,00032

Por fim, todas as amostras de hidrogel com grau de hidratação igual a 80% permaneceram sólidas depois de terem sido imersas em tampão PBS. Sendo assim, para esse grupo de amostras foi possível realizar a análise estatística dos dados. A Tabela V.3 mostra os valores do módulo de elasticidade obtidos para as amostras de hidrogel com 80% de água.

É interessante notar que quanto maior o grau de hidratação, menor é o valor do módulo de elasticidade obtido para os hidrogéis, ao se comparar hidrogéis com a mesma composição polimérica. Uma possível explicação para esse fato é que a quantidade de água presente no meio, enquanto a rede polimérica é formada, pode estar atrapalhando na aproximação das cadeias poliméricas, tornando o hidrogel mais frágil. Como esses hidrogéis são formados por

interações físicas, o contato entre as cadeias poliméricas durante os ciclos de congelamento é crucial para a definição das propriedades mecânicas do hidrogel.

Tabela V.3 – Resultados dos Valores do Módulo de Young para as Amostras com 80% de Hidratação

Amostras	Proporção de PVA	Proporção de PVP	Proporção de PEO	Módulo de Young (MPa)
1	1	0	0	0,01222
2	0,7	0,3	0	0,00238
3	0,7	0	0,3	0,00249
4	0,85	0,15	0	0,00916
5	0,85	0	0,15	0,00991
6	0,7	0,15	0,15	0,00241
7	0,8	0,1	0,1	0,01101
8	0,8	0,1	0,1	0,01110
9	0,8	0,1	0,1	0,01100
10	0,8	0,1	0,1	0,01099
11	0,8	0,1	0,1	0,01109
12	0,9	0,05	0,05	0,01350
13	0,75	0,2	0,05	0,00349
14	0,75	0,05	0,2	0,00421

Sendo assim, os valores dos módulos de elasticidade das amostras de hidrogel com grau de hidratação de 80% foram analisados estatisticamente, conforme o procedimento do planejamento experimental de misturas. O modelo matemático cúbico especial foi utilizado nesse planejamento e a equação final deverá ser da seguinte forma:

$$y = \beta_A x_A + \beta_B x_B + \beta_C x_C + \beta_{AB} x_A x_B + \beta_{AC} x_A x_C + \beta_{BC} x_B x_C + \beta_{ABC} x_A x_B x_C \quad (5)$$

sendo β os valores dos coeficientes referentes ao modelo; A, B, C códigos referentes aos componentes estudados nesse planejamento (PVA, PVP e PEO, respectivamente); x igual ao valor da proporção de um componente (A, B ou C); e y igual ao valor do módulo de elasticidade (variável resposta) de acordo a composição polimérica.

A análise estatística foi realizada utilizando um nível de significância de 5%. O resultado da análise de variância (ANOVA) do ajuste dos pontos ao modelo cúbico especial foi significativo, com valor p igual a 0,0216 e erro quadrático de 0,9554. Sendo assim, os coeficientes que compõem o modelo foram avaliados quanto à significância, observando-se a tabela contendo os valores de p e o erro quadrático. A Figura V.1 mostra o gráfico de Pareto do modelo contendo todos os termos.

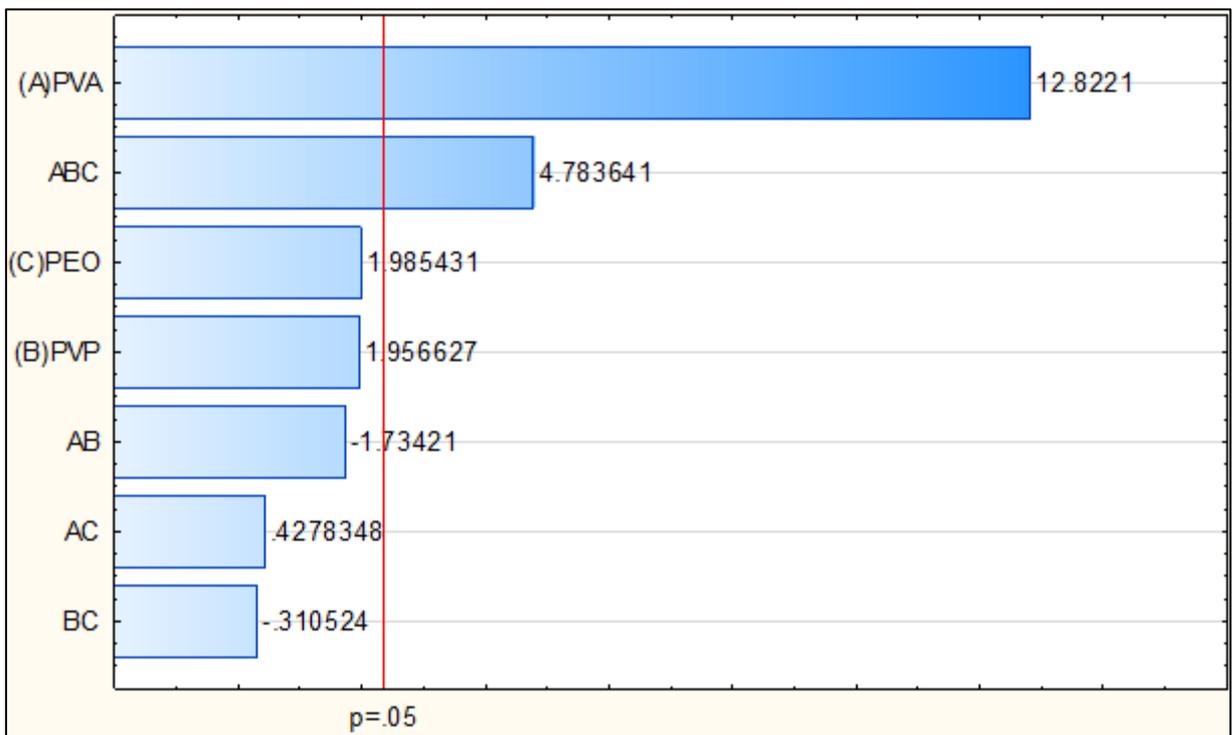


Figura V.1 – Gráfico de Pareto antes da retirada de termos do modelo.

Os termo referente à interação de PVA com PVP, PVA com PEO e PVP com PEO ($\beta_{.x_B.x_C}$) foram desconsiderados do modelo para obter melhor ajuste dos pontos. Após essa ação, o valor p do modelo ficou igual a 0,0181, o erro quadrático ficou igual à 0,9328 e com três termos do modelo ficaram com valores significativos ($p \leq 0,05$). A Figura V.2 mostra o gráfico de Pareto obtido após o ajuste do modelo. É possível observar que apenas três termos foram significativos.

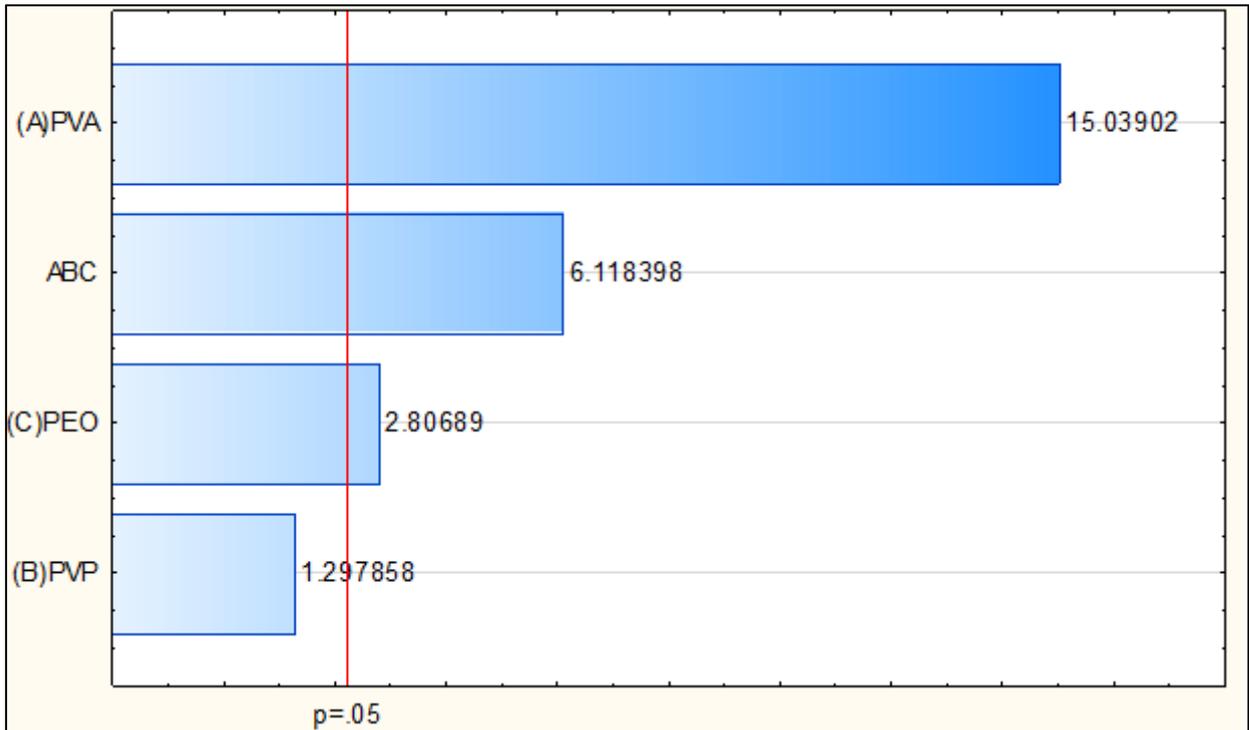


Figura V.2 – Gráfico de Pareto após a retirada de termos do modelo.

Sendo assim, o modelo matemático que relaciona a composição polimérica da amostra com o valor do módulo de elasticidade obtido pelo software estatístico foi:

$$y = 0,0139x_{PVA} + 0,001109x_{PVP} + 0,002399x_{PEO} + 0,110781x_{PVA}x_{PVP}x_{PEO} \quad (6)$$

Com os resultados obtidos pelo software, foi possível obter um gráfico de superfície de resposta, Figura V.3, mostrando como a composição influencia no valor do módulo de elasticidade observado na amostra.

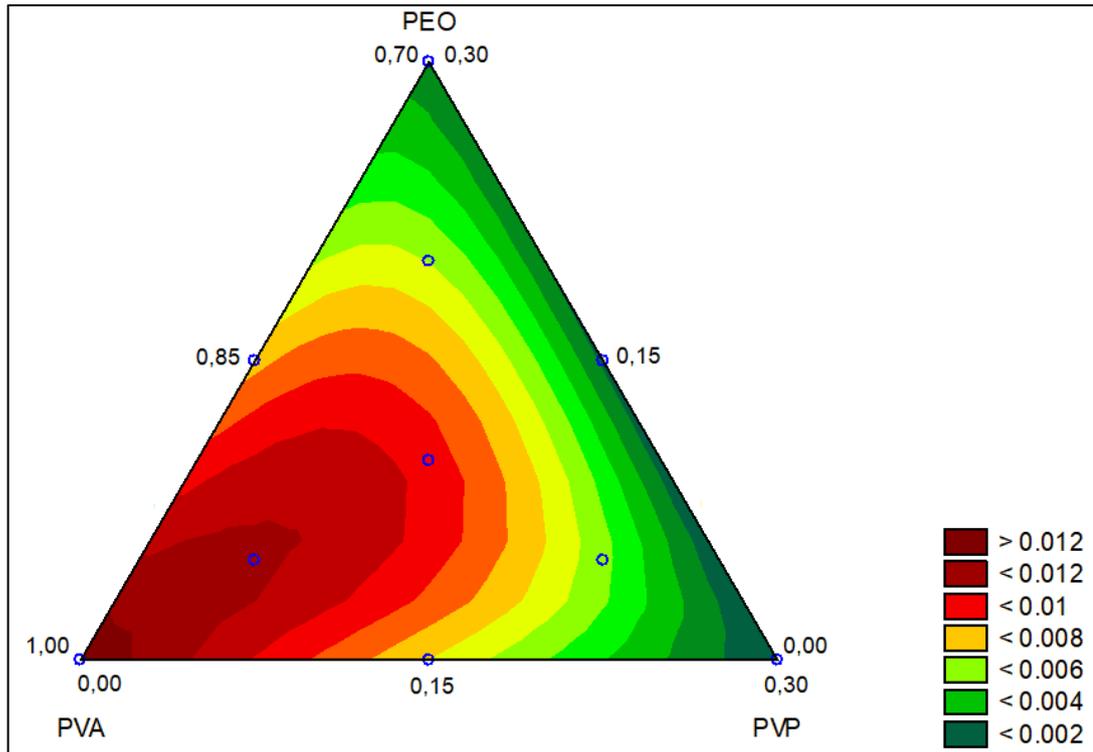


Figura V.3 – Superfície de resposta do planejamento experimental para as amostras com grau de hidratação igual a 80%.

Ao se analisar o gráfico da superfície de resposta obtido, é possível observar que quanto maior o teor de PVA na composição polimérica do hidrogel, maior o valor do módulo de elasticidade.

De acordo com o resultado oferecido pelo software, a composição polimérica que produz o hidrogel com maior módulo de elasticidade, 0,0139 MPa aproximadamente, consiste em uma região do gráfico, perto do ponto que corresponde ao hidrogel com PVA puro. No entanto, o intuito do estudo é adicionar PVP e PEO à composição do hidrogel para oferecer outras características desejadas, tais como capacidade de adesão de células e maior capacidade de intumescimento. Sendo assim, a composição escolhida dentro dessa faixa que possui os três componentes presentes foi: 98% de PVA, 0,5% de PVP e 1,5% de PEO e grau de hidratação de 80%.

5.2 Análise Dinâmico-Mecânica (DMA)

A partir dos resultados obtidos pelo planejamento experimental, foram sintetizadas amostras com a composição de 98% de PVA, 0,5% de PVP e 1,5% de PEO, para obter-se um hidrogel com o módulo de elasticidade mais próximo possível do desejado. A Figura V.4, a seguir, mostra o resultado dessa análise.

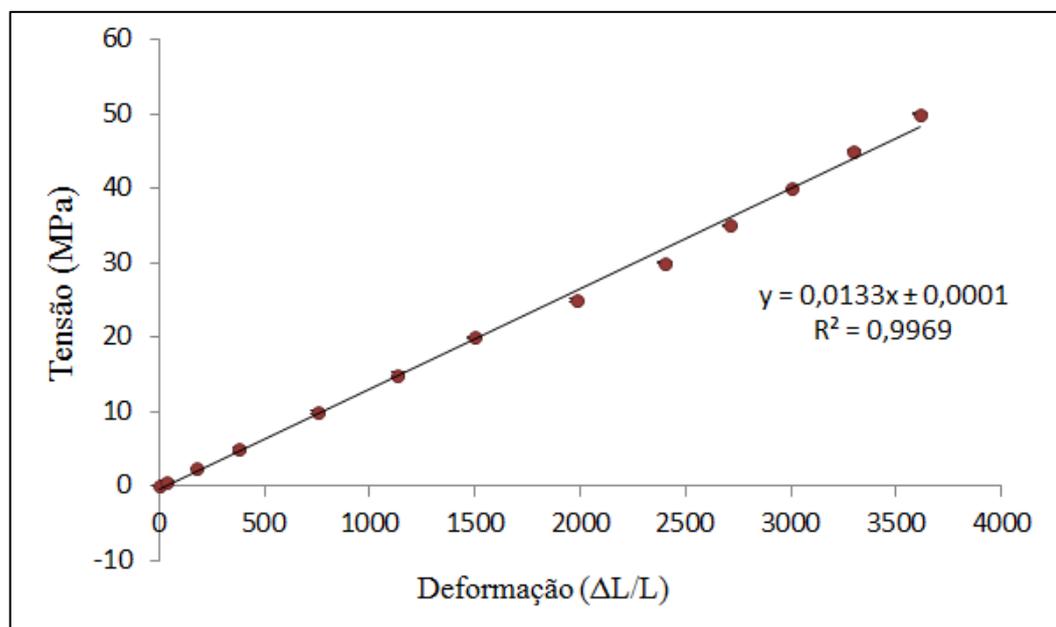


Figura V.4 – Resultado da análise de DMA para amostra de hidrogel otimizado (98% de PVA, 0,5% de PVP e 1,5% de PEO).

Ao realizar-se o ajuste linear dos valores obtidos como resultado dessa análise, foi obtida uma função com valor do coeficiente de determinação igual a 0,9968 e coeficiente angular igual a 0,0133. O valor do coeficiente angular dessa função é equivalente ao valor do módulo de elasticidade da amostra. Sendo assim, o valor do módulo de elasticidade, determinado pelo DMA, para a amostra estudada foi igual a $0,0133 \pm 0,0001$ MPa.

5.3 Análise Termogravimétrica (TGA/DTG)

O resultado da análise termogravimétrica da amostra de hidrogel otimizado pode ser observado na Figura V.5. A curva termogravimétrica apresenta três eventos termodinâmicos mais intensos, cujas temperaturas são 90,37°C, 124,91°C e 316,23°C, definidas pelo resultado da curva de DTG (derivada da curva de TGA).

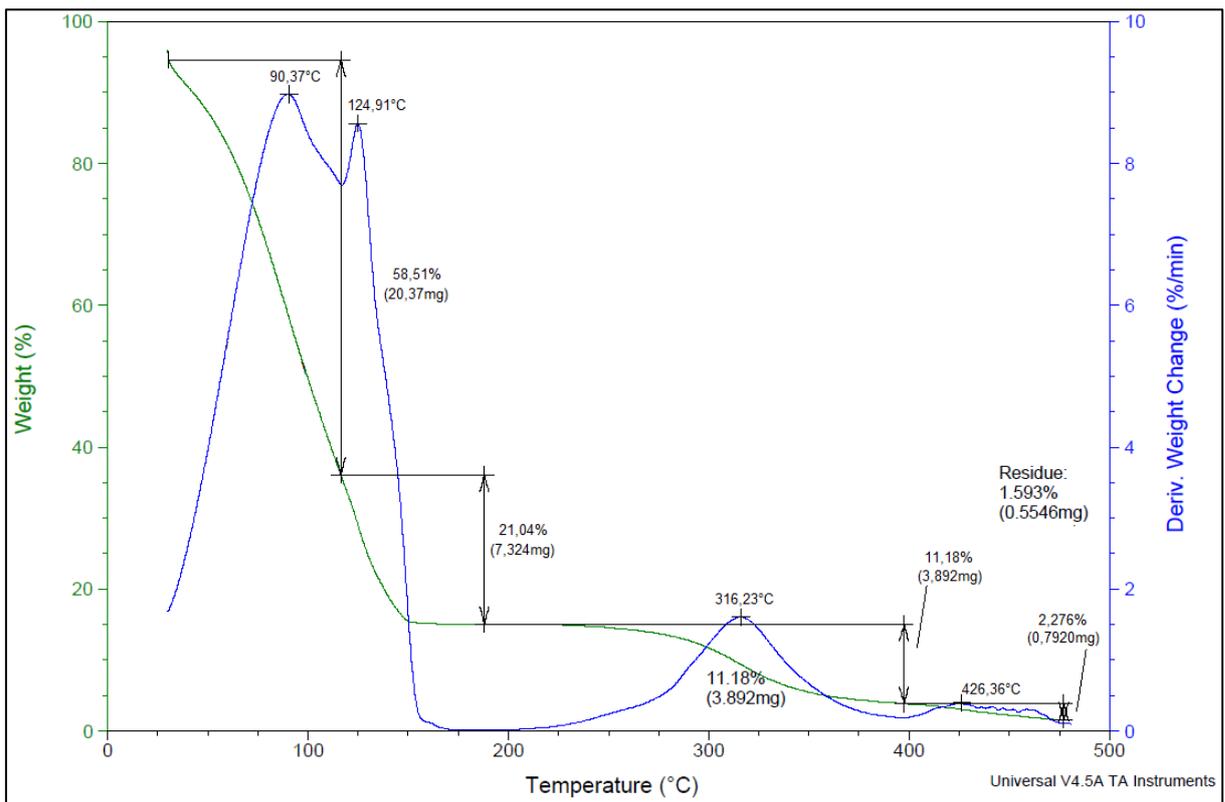


Figura V.5 – Termograma da amostra de hidrogel otimizado.

Os dois primeiros picos de degradação são, possivelmente, referentes à saída da água existente no hidrogel. A perda de massa total, ao se somar esses dois eventos, é de 79,55%, valor muito próximo ao valor do grau de hidratação dessa amostra (80%), o que ajuda a corroborar que esses eventos estão ligados com a evaporação de água da amostra.

O pico referente à temperatura de 316,23°C mostra o início da degradação dos polímeros existentes na mistura polimérica. O teor de cinzas final obtido foi de 1,593% (em massa).

Com esse resultado, foi escolhida a faixa de operação da análise em DSC: de 30 a 200°C, para se investigar os eventos térmicos referentes aos dois primeiros picos observados na curva de DTG.

5.4 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

A análise calorimétrica foi realizada para quantificar a energia absorvida ou liberada pela amostra estudada e ocorreu na faixa de temperatura entre 30 e 200°C. Essa faixa de temperatura foi escolhida baseando-se no resultado observado na análise de TGA. Essa faixa de temperatura compreende os eventos térmicos que ocorrem antes da degradação dos polímeros contidos na rede polimérica e depois da possível evaporação dos quatro tipos de água do hidrogel.

Essa análise permite observar a faixa de temperaturas em que ocorre qualquer tipo de evento no hidrogel e permite detectar se existe algum componente volátil na amostra estudada. Inicialmente, a amostra era submetida a um primeiro aquecimento, a partir de 30°C até 200°C, com uma taxa de aquecimento igual a 10°C/min. Após o primeiro aquecimento, a amostra era resfriada, a uma taxa de 10°C/min até 30°C. Por fim, a amostra era submetida a um segundo aquecimento (nas mesmas condições do primeiro aquecimento), finalizando a análise ao se atingir a temperatura de 200°C. A Figura V.6 mostra o gráfico obtido após o término da análise, contendo somente as duas curvas de aquecimento da amostra.

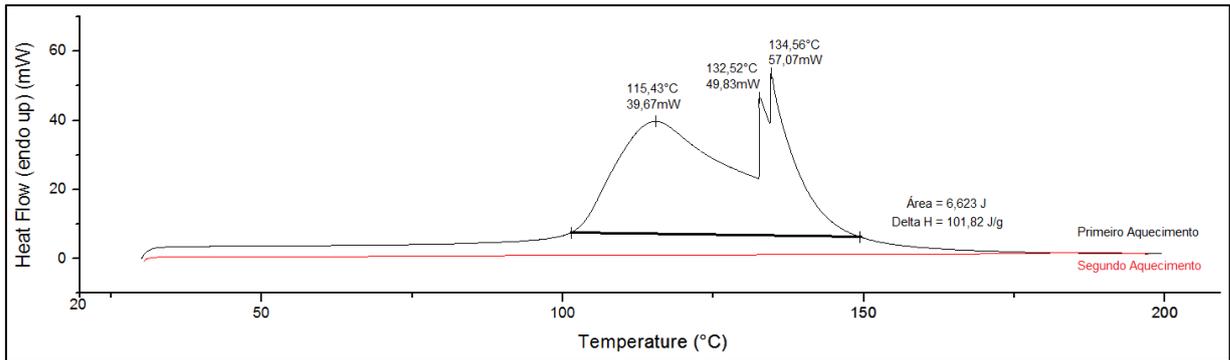


Figura V.6 – Gráfico de DSC para o hidrogel otimizado.

O gráfico de DSC obtido mostrou como resultado a existência de três picos no primeiro aquecimento. Os componentes responsáveis por esses picos volatilizaram antes da temperatura de 200°C, pois não foram detectados no segundo aquecimento.

Os picos foram observados nas temperaturas de 115,43°C, 132,52°C e 134,56°C e, conforme descrito por Hatakeyema e Yamauchi (1984), podem estar ligados à mudança na forma de interação da água com a estrutura polimérica.

Com a elevação da temperatura, a água livre e a água intersticial evaporam com facilidade, o que explica o primeiro evento térmico observado no resultado da análise de TGA (item 5.3). No entanto, a água ligada e a água adsorvida estão fortemente ligadas à estrutura polimérica e conseguem permanecer no hidrogel. No entanto, a partir de determinada temperatura (possivelmente 115,43°C, observada no resultado de DSC), esses tipos de água rompem sua ligação com a rede polimérica e começam a evaporar.

Sendo assim, os eventos observados no resultado do DSC, provavelmente, estão relacionados com a mudança na forma de interação da água com a estrutura polimérica, à medida que a temperatura aumenta.

5.5 Grau de Intumescimento (GI)

Após a realização do procedimento descrito no item 4.6, o valor obtido para o grau de intumescimento do hidrogel sintetizado foi de $136,5 \pm 0,7\%$. Isso significa que quando o hidrogel desidratado é colocado em meio PSB, a 37°C , ele absorve água equivalente a mais de 100% da massa inicial de hidrogel desidratado.

É importante lembrar que a amostra de hidrogel seco não é totalmente isenta de água. A água do tipo ligada e intersticial permanece na amostra, porque, caso contrário, o hidrogel perderia a sua estrutura original, o que não é interessante para essa análise.

Sendo assim, é possível concluir que o hidrogel com a composição estudada, ao estar em equilíbrio osmótico com um meio similar às condições do corpo humano, possui mais de 50% em água livre ou intersticial em sua composição. Esse valor é um dado importante para se estudar os mecanismos de difusão de íons e moléculas através da estrutura do hidrogel.

5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias obtidas por análise de microscopia eletrônica de varredura estão demonstradas na Figura V.7 (disponíveis no ANEXO 1). O aumento máximo obtido nessa análise foi de 15.000 vezes e, conforme é possível observar nas micrografias, não foi possível analisar a estrutura do hidrogel em escala nanométrica. Ao se tentar aumentar a resolução da análise, o feixe de elétrons rompia o material, inviabilizando a continuação da análise. No entanto, o objetivo principal, ao se realizar esta análise, foi observar a superfície do hidrogel.

A escala máxima em que os hidrogéis puderam ser observados foi de $5 \mu\text{m}$, o que possibilitou observar as diferenças entre as superfícies dos dois tipos de hidrogéis estudados.

O hidrogel composto somente de água e PVA possui a superfície irregular e poros bem distribuídos ao longo da sua estrutura. No caso da amostra de hidrogel otimizado, é possível observar que a superfície é mais homogênea e que os poros são menores que a amostra de PVA puro. Não foi possível aferir o tamanho dos poros devido à resolução das micrografias obtidas.

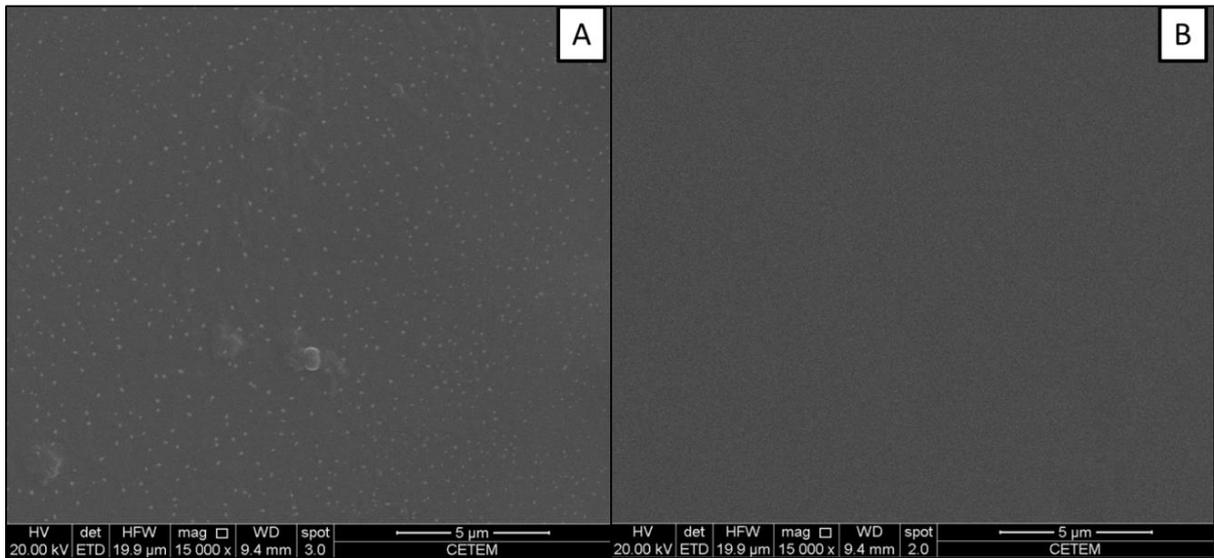


Figura V.7 – Micrografia do hidrogel de PVA puro (A) e do hidrogel otimizado (B).

Capítulo 6 – Conclusões

O trabalho desenvolvido neste estudo obteve sucesso no objetivo de sintetizar hidrogéis físicos à base de PVA, PVP e PEO para servirem de matéria-prima na confecção de cartilagens artificiais. No entanto, as amostras, com graus de hidratação acima de 80%, não resistiram ao procedimento de imersão em tampão PBS, a 37°C, tornando-se semissólidas. Essas amostras não puderam ser utilizadas na análise de dados requerida no planejamento experimental.

As amostras de hidrogel com grau de hidratação de 80% foram analisadas em um equipamento de DMA e o módulo de elasticidade foi calculado.

O resultado da análise estatística dos dados foi um modelo cúbico especial com quatro termos e valor de p igual a 0,0181. A otimização do modelo permitiu a obtenção da composição ótima para se obter o hidrogel com maior módulo de elasticidade (nesse caso, era o valor mais próximo possível do desejado). A composição do hidrogel otimizado foi de 98% de PVA, 0,5% de PVP e 1,5% de PEO, com grau de hidratação de 80%. O valor esperado para o módulo de elasticidade do hidrogel foi de 0,0139 MPa, conforme o resultado do modelo.

O hidrogel otimizado foi caracterizado por meio da realização das análises de DMA, TGA/DTG, DSC, MEV e determinação do grau de intumescimento (GI). A análise de DMA teve como resultado o valor de 0,0133 MPa para o módulo de elasticidade da amostra. Esse valor ficou muito próximo ao valor determinado pelo modelo estatístico (0,0139 MPa). No entanto, o valor do módulo de elasticidade desejado para o hidrogel sintetizado era de 0,3886, por ser o valor do módulo de elasticidade de cartilagens articulares, conforme descrito no estudo de Machado (2015).

Os resultados do TGA/DTG e do DSC mostraram que, possivelmente, a água presente no hidrogel é evaporada em duas etapas: primeiro, a água livre e a água intersticial são liberadas

aos poucos, sendo que o ápice da taxa de evaporação ocorre na temperatura de 90,37°C; depois a água ligada e a água adsorvida são liberadas, sendo que o ápice da taxa de evaporação ocorre na temperatura de 124,91°C.

Os resultados obtidos pelo MEV mostraram que a amostra de hidrogel otimizado possui superfície mais homogênea e poros menores que a amostra referência (hidrogel de PVA puro). Não foi possível observar a estrutura em escala nanométrica por meio desse tipo de análise.

Capítulo 7 – Sugestões Futuras

O presente trabalho forneceu informações sobre como os hidrogéis, contendo PVA em sua composição, são sintetizados e algumas características mecânicas deles. No entanto, algumas atribuições ainda carecem de melhoras. Alguns exemplos objetivos são: o hidrogel obtido precisa ter o valor de módulo de elasticidade adequado à utilização como matéria-prima para cartilagens artificiais e precisa ser mais resistente quando imerso em tampões mimetizadores do ambiente fluido do corpo humano.

Para isso se tornar possível, cabe como sugestão adicionar nanofibras ao hidrogel para melhorar as propriedades mecânicas e a estabilidade deste. Além disso, análises como FTIR e MEV do tipo FEG ajudariam a ter mais informações a respeito da natureza do hidrogel e de como ocorrem as interações poliméricas.

A realização de teste de fricção e de estabilidade por longos períodos, também são sugestões para complementar o estudo sobre esse tipo de material.

Referências Bibliográficas

- 1 – ABDELHALIM, Ibrahim Mohamed El-sherbiny. **Preparation, Characterization and In-vitro Evaluation of Chitosan-based Smart hydrogels for Controlled Drug Release**. 2006. 240 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade de Massey, Nova Zelândia, 2006.
- 2 – ALCÂNTARA, Mara Tânia Silva. **Hidrogéis poliméricos com nanopartículas de prata para aplicações médicas**. 2013. 165 f. Tese (Doutorado) - Curso de Tecnologia Nuclear - Materiais, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- 3 – ALMEIDA, José Filipe da Silva Lapas. **Preparação e Caracterização de Hidrogéis para Aplicações Biomédicas**. 2010. 272 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.
- 4 – AMBROSIO, L.; **Biomedical Composites**. 2ª edição, editora Woodhead Publishing, 2017.
- 5 – APARICIO, C.; GINEBRA, M-P.; **Biomineralization and Biomaterials: Fundamentals and Applications**. 1ª edição, editora Woodhead Publishing, 2016.
- 6 – BABA, Takayuki et al. Solute retention and the states of water in polyethylene glycol and poly(vinyl alcohol) gels. **Journal Of Chromatography A**, v. 1040, n. 1, p.45-51, jun. 2004.
- 7 – BAYKAL, D. et al. Tribological evaluation of hydrogel articulations for joint arthroplasty applications. **Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials**, v. 14, p.39-47, 2012.
- 8 – BAYKAL, D. et al. Evaluation of friction properties of hydrogels based on a biphasic cartilage model. **Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials**, v. 28, p.263-273, 2013.
- 9 – BECK, Emily Claire. **Development of Chondroinductive Hydrogel Pastes from Naturally Derived Cartilage Matrix**. 2008. 211 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Agrícola e Biológica, Universidade do Estado de Kansas, 2008.
- 10 – BECK, E. C. et al. Approaching the compressive modulus of articular cartilage with a decellularized cartilage-based hydrogel. **Acta Biomaterialia**, v. 38, p.94-105, 2016.
- 11 – BLACK, Jonathan. **Biological Performance of Materials: Fundamentals of Biocompatibility**. 4ª edição, Crc Press, 2006.
- 12 – BLUM, M. M.; OVAERT, T. C. Low friction hydrogel for articular cartilage repair: Evaluation of mechanical and tribological properties in comparison with natural cartilage tissue. **Materials Science And Engineering: C**, v. 33, n. 7, p.4377-4383, 2013.
- 13 – BODUGOZ-SENTURK, H. et al. The effect of polyethylene glycol on the stability of pores in polyvinyl alcohol hydrogels during annealing. **Biomaterials**, v. 29, n. 2, p.141-149, 2008.

- 14 – BONACIN, Renata Fogaça. **Hidrogéis de PVP e blendas de PVP/Polianidridos como Potenciais Curativos para Feridas Crônicas**. 2011. 192 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- 15 – BRANT, Antônio Jedson Caldeira. **Preparação e Caracterização de Hidrogéis a partir de Misturas de Soluções de Quitosana e Poli(N-vinil-2-pirrolidona)**. 2008. 170 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- 16 – BUTYLINA, S.; GENG, S.; OKSMAN, K.: Properties of as-prepared and freeze-dried hydrogels made from poly(vinyl alcohol) and cellulose nanocrystals using freeze-thaw technique. **European Polymer Journal**, v. 81, p.386-396, 2016.
- 17 – CALLISTER, W. D.; *Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução*. Editora LTC, 5ª edição, 2002.
- 18 – CHA, Chaenyung. **Design of Multi-functional Hydrogel for Cell Therapies**. 2011. 168 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade de Illinois, Urbana-champaign, 2011.
- 19 – CHEN, D. et al.: Using DMA to Simultaneously Acquire Young's Relaxation Modulus and Time-dependent Poisson's Ratio of a Viscoelastic Material. **Procedia Engineering**, v. 79, p.153-159, 2014.
- 20 – CHEN, K. et al. Biotribology behavior and fluid load support of PVA/HA composite hydrogel as artificial cartilage. **Wear**, v. 376-377, p.329-336, 2017.
- 21 – CHOI, J et al. Effects of solvent dehydration on creep resistance of poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Biomaterials**, v. 28, n. 5, p.772-780, 2007.
- 22 – CURLEY, C. et al. An evaluation of the thermal and mechanical properties of a salt-modified polyvinyl alcohol hydrogel for a knee meniscus application. **Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials**, v. 40, p.13-22, 2014.
- 23 – DARWIS, Darmawan et al. Characterization of poly(vinyl alcohol) hydrogel for prosthetic intervertebral disc nucleus. **Radiation Physics And Chemistry**, v. 63, p.539-542, 2002.
- 24 – DATTA, Anushree. **Characterization of Polyethylene Glycol Hydrogels for Biomedical Applications**. 2007. 116 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade de Pune, Índia, 2007.
- 25 – DESAI, Pooja N.. **Synthesis and Characterization of Polyionic Hydrogels**. 2005. 98 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Biomédica, Virginia Commonwealth University, College, 2005.
- 26 – DROZDOVA, M. G. et al. Macroporous modified poly (vinyl alcohol) hydrogels with charged groups for tissue engineering: Preparation and in vitro evaluation. **Materials Science And Engineering: C**, v. 75, p.1075-1082, 2017.

- 27 – DULONG, V. et al. Carboxymethylpullulan hydrogels with a ionic and/or amphiphilic behavior: Swelling properties and entrapment of cationic and/or hydrophobic molecules. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 274, n. 1-3, p.163-169, 2006.
- 28 – EBARA, M.; **Biomaterials Nanoarchitectonics**. 1ª edição, editora Elsevier, 2016.
- 29 – EBWELE, Robert O.. **Polymer Science and Technology**. Crc Press, 2000.
- 30 – FAN, C.; WANG, D.: A biodegradable PEG-based micro-cavitary hydrogel as scaffold for cartilage tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 72, p.651-660, 2015.
- 31 – FRAY, M. E. et al. Morphology assessment of chemically modified cryostructured poly(vinyl alcohol) hydrogel. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 5, p. 2035-2040, 2007.
- 32 – GADEA, J. L.; CESTEROS, L. C.; KATIME, I. Chemical–physical behavior of hydrogels of poly(vinyl alcohol) and poly(ethylene glycol). **European Polymer Journal**, v. 49, n. 11, p.3582-3589, 2013.
- 33 – GANN, M. J. Mc et al. The synthesis of novel pH-sensitive poly(vinyl alcohol) composite hydrogels using a freeze/thaw process for biomedical applications. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 372, n. 1-2, p.154-161, 2009.
- 34 – GIOLITO, I., Apostila de métodos termoanalíticos, IQ/USP, volume 2, 1987.
- 35 – GRUMEZESCU, A. M.; **Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering: Applications of Nanobiomaterial**. 1ª edição, editora Elsevier, 2016.
- 36 – GUPTA, S. et al. Composition dependent structural modulations in transparent poly(vinyl alcohol) hydrogels. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v. 74, n. 1, p.186-190, 2009.
- 37 – GUPTA, S.; SINHA, S.; SINHA, A. Composition dependent mechanical response of transparent poly(vinyl alcohol) hydrogels. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v. 78, n. 1, p.115-119, 2010.
- 38 – HASSAN, Christie M.; STEWART, Jennifer E.; PEPPAS, Nikolaos A.. Diffusional characteristics of freeze/thawed poly(vinyl alcohol) hydrogels: Applications to protein controlled release from multilaminar devices. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, v. 49, p.161-165, 2000.
- 39 – HATAKEYEMA, T; YAMAUCHI, A. Studies on bound water in poly(vinyl alcohol): hydrogel by DSC and FT-NMR. **European Polymer Journal**, vol. 20, n. 1, pag 61-64, 1984.
- 40 – HATAKEYEMA, Tatsuko et al. Gel–sol transition of poly(vinyl alcohol) hydrogels formed by freezing and thawing. **Thermochimica Acta**, v. 431, n. 1-2, p.144-148, 2005.

- 41 – HAYAMI, T. et al. Imparting cell adhesion to poly(vinyl alcohol) hydrogel by coating with hydroxyapatite thin film. **Materials Letters**, v. 61, n. 13, p.2667-2670, maio 2007.
- 42 – HAYES, J. C. et al. Biomechanical analysis of a salt-modified polyvinyl alcohol hydrogel for knee meniscus applications, including comparison with human donor samples. **Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials**, v. 56, p.156-164, 2016.
- 43 – HAYES, J. C.; KENNEDY, J. E.. An evaluation of the biocompatibility properties of a salt-modified polyvinyl alcohol hydrogel for a knee meniscus application. **Materials Science And Engineering: C**, v. 59, p.894-900, 2016.
- 44 – HENCH, Larry L.; JONES, Julian R. **Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering**. Crc Press, 2005.
- 45 – HERNÁNDEZ, R. et al. Viscoelastic properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels and ferrogels obtained through freezing–thawing cycles. **Polymer**, v. 45, n. 16, p.5543-5549, 2004.
- 46 – HOLLOWAY, J. L. et al. Analysis of the in vitro swelling behavior of poly(vinyl alcohol) hydrogels in osmotic pressure solution for soft tissue replacement. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 6, p.2477-2482, 2011.
- 47 – HOLLOWAY, J. L.; LOWMAN, A. M.; PALMESE, G. R.. Aging behavior of PVA hydrogels for soft tissue applications after in vitro swelling using osmotic pressure solutions. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 2, p.5013-5021, 2013.
- 48 – JENKINS, Mike. **Biomedical Polymers**. Woodhead Publishing, 2007.
- 49 – JENNINGS, J. A.; BUMGARDNER, J. D.; **Chitosan Based Biomaterials**. volume 1, 1ª edição, editora Woodhead Publishing, 2017.
- 50 – JIANG, X.; WANG, C.; HAN, Q.: Molecular dynamic simulation on the state of water in poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Computational And Theoretical Chemistry**, v. 1102, p.15-21, 2017.
- 51 – JOSHI, A. et al. Functional compressive mechanics of a PVA/PVP nucleus pulposus replacement. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p.176-184, 2006.
- 52 – KANCA, Y. et al. Tribological properties of PVA/PVP blend hydrogels against articular cartilage. **Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials**, v. 78, p.36-45, 2018.
- 53 – KIM, Byung Chul. **The synthesis and characterization of hydrogel and polypyrrole blends**. 1999. 251 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade de Wollongong, 1999.
- 54 – KOBAYASHI, M.; TOGUCHIDA, J.; OKA, M. Development of an artificial meniscus using polyvinyl alcohol-hydrogel for early return to, and continuance of, athletic life in sportspersons with severe meniscus injury. I: mechanical evaluation. **The Knee**, v. 10, p.47-51, 2003.

- 55 – KOBAYASHI, M.; TOGUCHIDA, J.; OKA, M. Preliminary study of polyvinyl alcohol-hydrogel (PVA-H) artificial meniscus. **Biomaterials**, v. 24, p.639-647, 2003.
- 56 – KOSUKEGAWA, H. et al. Friction of 316L stainless steel on soft-tissue-like poly(vinyl alcohol) hydrogel in physiological liquid. **Tribology International**, v. 82, p.407-414, 2015.
- 57 – LEE, Chih-Ta; KUNG, Po-Han; LEE, Yu-der. Preparation of poly(vinyl alcohol)-chondroitin sulfate hydrogel as matrices in tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, n. 3, p.348-354, 2005.
- 58 – LEES, D.; PARTINGTON, P.: Articular cartilage, Orthopaedics and Trauma, 2016.
- 59 – LI, Mengxing. **Thin films of Stimuli-responsive Hydrogels**. 2014. 208 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Pierre e Marie Curie, 2014.
- 60 – LI, R-K.; WEISEL, R. D.; **Cardiac Regeneration and Repair: Biomaterials and Tissue Engineering**. volume 2, 1ª edição, editora Woodhead Publishing, 2014.
- 61 – LI, W. et al. Preparation and characterization of PVA-PEEK/PVA- β -TCP bilayered hydrogels for articular cartilage tissue repair. **Composites Science And Technology**, v. 128, p.58-64, 2016.
- 62 – LIU, Yurong. **Composite hydrogel - nanofibre vessels for vascular graft applications**. 2010. 173 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Mecânica, Universidade da Cidade de Dublin, 2010.
- 63 – LIU, S. Q. et al. Biomimetic hydrogels for chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells to neocartilage. **Biomaterials**, v. 31, n. 28, p.7298-7307, 2010.
- 64 – MA, Ru-Yin; XIONG, Dang-sheng. Synthesis and properties of physically crosslinked poly (vinyl alcohol) hydrogels. **Journal Of China University Of Mining And Technology**, v. 18, p.271-274, 2008.
- 65 – MA, R. et al. Novel PVP/PVA hydrogels for articular cartilage replacement. **Materials Science And Engineering: C**, v. 29, n. 6, p.1979-1983, 2009.
-
- 66 – MA, Y.; B., T.; WANG, F. The physical and chemical properties of the polyvinylalcohol/polyvinylpyrrolidone/hydroxyapatite composite hydrogel. **Materials Science And Engineering: C**, v. 59, p.948-957, 2016.
- 67 – MACHADO, Joana Catarina Ferreira. **Cartilagens do Joelho e da sua Interação com os Tecidos Circundantes**. 2015. 149 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Biomédica, Universidade do Porto, Porto, 2015.
- 68 – MAIOLO, A. S. et al. Development and characterization of Poly(vinyl alcohol) based hydrogels for potential use as an articular cartilage replacement. **Materials Science And Engineering: C**, v. 32, n. 6, p.1490-1495, 2012.

69 – MANSUR, H. S.; ORÉFICE, R. L.; MANSUR, A. A. P. Characterization of poly(vinyl alcohol)/poly(ethylene glycol) hydrogels and PVA-derived hybrids by small-angle X-ray scattering and FTIR spectroscopy. **Polymer**, v. 45, n. 21, p.7193-7202, 2004.

70 – MARK, H. F., **Encyclopedia of Polymer Science and Technology**. 3ª edição, editora Wiley-Interscience, 2004.

71 – MASRI, C.; CHAGNON, G.; FAVIER, D. Influence of processing parameters on the macroscopic mechanical behavior of PVA hydrogels. **Materials Science And Engineering: C**, v. 75, p.769-776, 2017.

72 – MATYJASZEWSKI, K.; MOLLER, M.; **Polymer Science: A Comprehensive Reference**. 1ª edição, volume 9, editora Elsevier, 2013.

73 – MCKENNA, Gregory B.; HORKAY, Ferenc. Effect of crosslinks on the thermodynamics of poly(vinyl alcohol) hydrogels. **Polymer**, v. 35, n. 26, pag. 5737-5742, 1994.

74 – MENARD, Kevin P., **Dynamic Mechanical Analysis: A practical introduction**. 2ª edição, Crc Press, 2008.

75 – MORARIU, S. et al. Tailoring the properties of poly(vinyl alcohol)/poly(vinylpyrrolidone) hydrogels for biomedical applications. **European Polymer Journal**, v. 84, p.313-325, 2016.

76 – MOTHE, C. G.; AZEVEDO, A. D., **Análise Térmica de Materiais**, editora Artliber, 2009.

77 – MUTA, H. et al., An IR study on ion-specific and solvent-specific swelling of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) gel. **Polymer**, v. 43, p.103-110, 2002.

78 – NAGURA, Masanobu; HAMANO, Tomoki; ISHIKAWA, Hiroshi. Structure of poly(vinyl alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing and melting. **Polymer**, vol. 30, pag. 762-765, 1989.

79 – NAKAOKI, T.; YAMASHITA, H. Bound states of water in poly(vinyl alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing and melting method. **Journal Of Molecular Structure**, v. 875, n. 1-3, p.282-287, 2008.

80 – NAKASHIMA, K.; SAWAE, Y.; MURAKAMI, T. Effect of conformational changes and differences of proteins on frictional properties of poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Tribology International**, v. 40, n. 10-12, p.1423-1427, 2007.

81 – NGUYEN, L. H. et al. Engineering articular cartilage with spatially-varying matrix composition and mechanical properties from a single stem cell population using a multi-layered hydrogel. **Biomaterials**, v. 32, n. 29, p.6946-6952, 2011.

82 – NGUYEN, Q. T. et al. Cartilage-like mechanical properties of poly(ethylene glycol)-diacrylate hydrogels. **Biomaterials**, v. 33, n. 28, p.6682-6690, 2012.

83 – NORDIN, Margareta; FRANKEL, Victor M. **Biomecânica Básica do Sistema Musculoesquelético**. 3ª edição, Guanabara Koogan, 2003.

84 – NORTON, A. B.; HANCOCKS, R. D.; GROVER, L. M.. Poly (vinyl alcohol) modification of low acyl gellan hydrogels for applications in tissue regeneration. **Food Hydrocolloids**, v. 42, p.373-377, 2014.

85 – NUNES, Danielle Barcos. **Rotinas para a Otimização Experimental de Misturas**. 1998. 174 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Produção, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

86 – OSADA, Y.; KAJIWARA, K.; **Gels Handbook**. Academic Press, 1ª edição, 2001.

87 – PAN, Yu-Song; XIONG, Dang-Sheng; MA, Ru-Yin. A study on the friction properties of poly(vinyl alcohol) hydrogel as articular cartilage against titanium alloy. **Wear**, v. 262, n. 7-8, p.1021-1025, 2007.

88 – PARK, H. et al. Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 1, p.4779-4786, 2013.

89 – PARK, H. et al. Alginate hydrogels modified with low molecular weight hyaluronate for cartilage regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 162, p.100-107, 2017.

90 – PARMAR, P. A. et al. Collagen-mimetic peptide-modifiable hydrogels for articular cartilage regeneration. **Biomaterials**, v. 54, p.213-225, 2015.

91 – PATACHIA, S.; VALENTE, A. J. M.; BACIU, C. Effect of non-associated electrolyte solutions on the behaviour of poly(vinyl alcohol)-based hydrogels. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 2, p.460-467, 2007.

92 – PERALE, G. e HILBORN, J.; **Bioresorbable Polymers for Biomedical Applications. From Fundamentals to Translational Medicine**. 1ª edição, editora Woodhead Publishing, 2017.

93 – PLUNKETT, Kyle Newton. **Hydrogels for Biomacromolecule Immobilization and Sensing**. 2005. 127 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade de Illinois, Urbana-champaign, 2005.

94 – POOLE-WARREN, L.; MARTENS, P.; GREEN R.; **Biosynthetic Polymers for Medical Applications**. 1ª edição, editora Woodhead Publishing, 2016.

95 – PRAMANICK, A. K. et al. Topographical heterogeneity in transparent PVA hydrogels studied by AFM. **Materials Science And Engineering: C**, v. 32, n. 2, p.222-227, 2012.

96 – PUSPITASARI, T. et al. Structural Organization of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Obtained by Freezing/Thawing and γ -Irradiation Processes: A Small-Angle Neutron Scattering (SANS) Study. **Procedia Chemistry**, v. 4, p.186-193, 2012.

- 97 – QI, X. et al. Investigation of Salecan/poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freeze/thaw method. **Carbohydrate Polymers**, v. 118, p.60-69, 2015.
- 98 – QUINTERO, S. M. M. et al. Swelling and morphological properties of poly(vinyl alcohol) (PVA) and poly(acrylic acid) (PAA) hydrogels in solution with high salt concentration. **Polymer**, v. 51, n. 4, p.953-958, 2010.
- 99 – REMYA, N. S.; NAIR, P. D.. Engineering cartilage tissue interfaces using a natural glycosaminoglycan hydrogel matrix — An in vitro study. **Materials Science And Engineering: C**, v. 33, n. 2, p.575-582, 2013.
- 100 – REN, K. et al. Injectable glycopolypeptide hydrogels as biomimetic scaffolds for cartilage tissue engineering. **Biomaterials**, v. 51, p.238-249, 2015.
- 101 – RODRIGUES, A. A. et al. In vivo evaluation of hydrogels of polyvinyl alcohol with and without carbon nanoparticles for osteochondral repair. **Carbon**, v. 50, n. 6, p.2091-2099, 2012.
- 102 – RODRIGUES, L. e MOTA, M.; **Bioinspired Materials for Medical Applications**. 1ª edição, editora Woodhead Publishing, 2017.
- 103 – RUYS, A. J.; **Biomimetic Biomaterials Structure and Applications**. 1ª edição, editora Woodhead Publishing, 2013.
- 104 – SANNA, Roberta. **Synthesis and characterization of new polymeric materials for advanced applications**. 2012. 229 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade de Sassari, 2013.
- 105 – SARDINHA, V. M. et al. Tribological characterization of polyvinyl alcohol hydrogel as substitute of articular cartilage. **Wear**, v. 301, n. 1-2, p.218-225, 2013.
- 106 – SARKER, Bapi. **Advanced Hydrogels Concepts Based on Combinations of Alginate, Gelatin and Bioactive Glasses for Tissue Engineering**. 2015. 206 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade de Friedrich-alexander, Nuremberg, 2015.
- 107 – SASAKI, S.; MURAKAMI, T.; SUZUKI, A.. Frictional properties of physically cross-linked PVA hydrogels as artificial cartilage. **Biosurface And Biotribology**, v. 2, n. 1, p.11-17, 2016.
- 108 – SHEEHY, E. J. et al. Engineering cartilage or endochondral bone: A comparison of different naturally derived hydrogels. **Acta Biomaterialia**, v. 13, p.245-253, 2015.
- 109 – SHI, Y.; XIONG, D. Microstructure and friction properties of PVA/PVP hydrogels for articular cartilage repair as function of polymerization degree and polymer concentration. **Wear**, v. 305, n. 1-2, p.280-285, 2013.
- 110 – SHI, Y.; XIONG, D.; ZHANG, J. Effect of irradiation dose on mechanical and biotribological properties of PVA/PVP hydrogels as articular cartilage. **Tribology International**, v. 78, p.60-67, 2014.

- 111 – SHI, Y. et al. Swelling, mechanical and friction properties of PVA/PVP hydrogels after swelling in osmotic pressure solution. **Materials Science And Engineering: C**, v. 65, p.172-180, 2016.
- 112 – SPILLER, K. L. et al. Superporous hydrogels for cartilage repair: Evaluation of the morphological and mechanical properties. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 1, p.17-25, 2008.
- 113 – STAUFFER, Shauna R.; PEPPAS, Nikolaos A.. Poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freezing-thawing cyclic processing. **Polymer**, v. 33, n. 18, p.3932-3936, 1992.
- 114 – SWAIN, S. K.; BHATTACHARYYA, S.; SARKAR, D.: Fabrication of porous hydroxyapatite scaffold via polyethylene glycol-polyvinyl alcohol hydrogel state. **Materials Research Bulletin**, v. 64, p.257-261, 2015.
- 115 – TANZI, M. C.; FARÈ, S.; **Characterization of Polymeric Biomaterials**. 1ª edição, editora Woodhead Publishing, 2017.
- 116 – THOMAS, B. H. et al. Hydrophilic–hydrophobic hydrogels for cartilage replacement. **Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials**, v. 2, n. 6, p.588-595, 2009.
- 117 – URUSHIZAKI, Fumio et al.; Swelling and mechanical properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 58, n. 1, p.135-142, 1990.
- 118 – VOGEL, A. I. Análise Química Quantitativa, Editora LTC, 6ª edição, 2002.
- 119 – WANG, Q.: **Smart Materials for Tissue Engineering: Fundamental Principles**. Royal Society Of Chemistry, 2017.
- 120 – WANG, J. et al. Fabrication of injectable high strength hydrogel based on 4-arm star PEG for cartilage tissue engineering. **Biomaterials**, v. 120, p.11-21, 2017.
- 121 – WANG, Xinyi. **Hyaluronic Acid-based Hydrogels for Cartilage Repair**. 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Materiais, Universidade de Delaware, Si, 2012.
- 122 – WU, G. et al. In vitro behaviors of hydroxyapatite reinforced polyvinyl alcohol hydrogel composite. **Materials Chemistry And Physics**, v. 107, n. 2-3, p.364-369, 2008.
- 123 – XIAO, Congming; ZHOU, Gaoyan. Synthesis and properties of degradable poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Polymer Degradation And Stability**, v. 81, n. 2, p.297-301, 2003.
- 124 – YANG, J. et al. Cell-laden hydrogels for osteochondral and cartilage tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 57, p.1-25, 2017.

125 – YIN, Pei. **Hydrogel-based Nanocomposites and Laser-assisted Surface Modification for Biomedical Application**. 2012. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Bioquímica, Universidade de Western Ontario, Ontario, 2012.

126 – YOSHII, F. et al. Heat resistance poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Radiation Physics And Chemistry**, v. 46, n. 2, p.169-174, 1995.

127 – ZHANG, D. et al.: Research on the Long Time Swelling Properties of Poly (vinyl alcohol)/Hydroxylapatite Composite Hydrogel. **Journal of Bionic Engineering**, v. 6, p. 22-28, 2009.

128 – ZHENG, Y. et al. The surface lubricative properties of PVA/PVP hydrogels treated with radiation used as artificial cartilage. **Applied Surface Science**, v. 255, n. 2, p.568-570, 2008.

ANEXO 1 – Micrografias

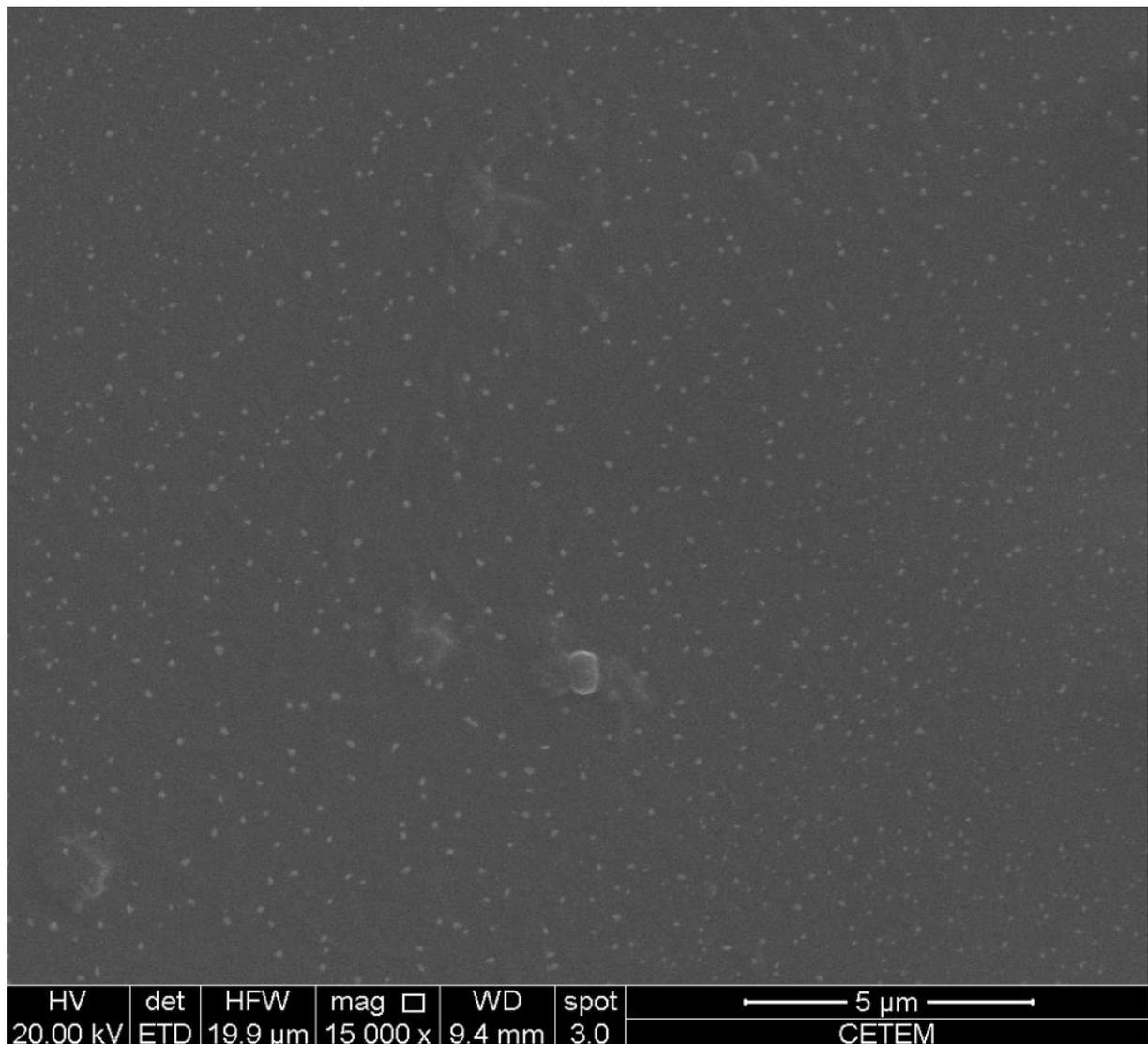


Figura A.1 – Micrografia de hidrogel de PVA puro.

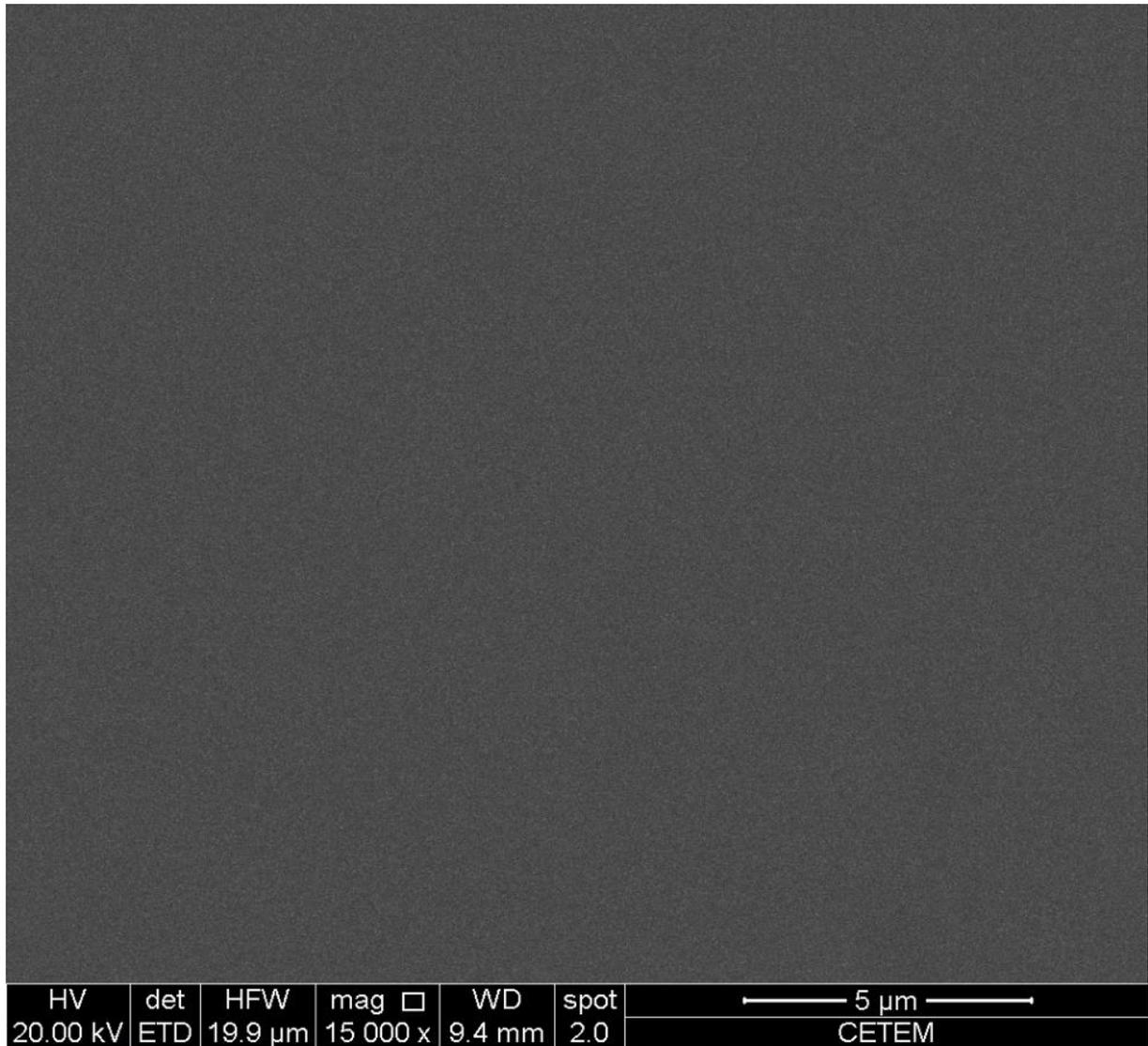


Figura A.2 – Micrografia de hidrogel otimizado.