

**MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

LUÍZA BRAGA FERREIRA DOS SANTOS

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCOMPÓSITOS A BASE DE
NANOHIĐROXIAPATITA E HIĐROGÉIS TERMOSENSÍVEIS**

Rio de Janeiro

2019

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

LUÍZA BRAGA FERREIRA DOS SANTOS

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCOMPÓSITOS A BASE DE
NANOHIĐROXIAPATITA E HIĐROGÉIS TERMOSENSÍVEIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências dos Materiais

Orientador: Prof. Carlos Nelson Elias - D.Sc.

Rio de Janeiro
2019

c2019

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

Praça General Tibúrcio, 80 – Praia Vermelha

Rio de Janeiro – RJ CEP: 22290-270

Este exemplar é de propriedade do Instituto Militar de Engenharia, que poderá incluí-lo em base de dados, armazenar em computador, microfilmар ou adotar qualquer forma de arquivamento.

É permitida a menção, reprodução parcial ou integral e a transmissão entre bibliotecas deste trabalho, sem modificação de seu texto, em qualquer meio que esteja ou venha a ser fixado, para pesquisa acadêmica, comentários e citações, desde que sem finalidade comercial e que seja feita a referência bibliográfica completa.

Os conceitos expressos neste trabalho são de responsabilidade do(s) autor(es) e do(s) orientador(es).

620.1 Santos, Luíza Braga Ferreira dos

S237s Síntese e caracterização de biocompósitos a base de nanohidroxiapatita e hidrogeis termosensíveis / Luíza Braga Ferreira dos Santos; orientada por Carlos Nelson Elias – Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2019.

96p.: il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2019.

1. Curso de Ciência dos Materiais – teses e dissertações. 2. Regeneração óssea. 3. Biomateriais. I. Elias, Carlos Nelson. II. Instituto Militar de Engenharia. III. Título.

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

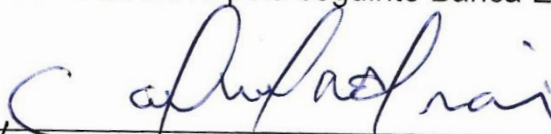
LUÍZA BRAGA FERREIRA DOS SANTOS

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCMPÓSITOS DE NANOHIPOXIPATITA E HIPOGEIS TERMOSENSIVEIS

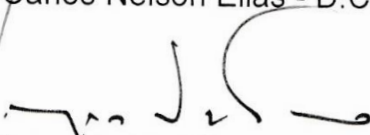
Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Ciência dos Materiais.

Orientadores: Prof. Carlos Nelson Elias – D.C.

Aprovada em 05 de fevereiro de 2019 pela seguinte Banca Examinadora:



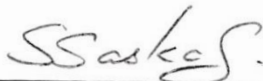
Prof. Carlos Nelson Elias - D.C. do IME – Presidente



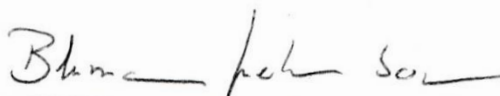
Prof. Sergio Neves Monteiro – Ph.D. do IME



Profª. Maria Elisa Rodrigues Coimbra – D.C. do IME



Profª. Sybele Saska Specian – D.C. do UNESP – Instituto de Química



Profª. Bluma Guenther Soares – D.C. da UFRJ/IMA

Rio de Janeiro

2019

Dedico ao meu esposo, meus pais e meu irmão.

AGRADECIMENTOS

E nas reviravoltas da vida consegui concluir meu mestrado, foram tantos fatos que ocorreram nesses dois últimos anos, que fica até difícil listá-los, então vou apenas agradecer a todos que me ajudaram a concluir mais essa etapa na minha vida.

Primeiramente agradeço a Deus, que mesmo mudando meus planos, me deu força e abriu muitas portas para eu finalizar esse projeto. Em seguida, agradeço ao meu marido Diego, por me apoiar, me incentivar e principalmente aceitar viver novamente a distância, para que eu conseguisse concluir meu mestrado, me colocando sempre à frente das suas escolhas. Agradeço aos meus pais Sergio e Soraia, por ajudarem nessa tarefa de concluir esse projeto, e ao meu irmão Hugo por sempre me incentivar e acreditar que sou capaz de ir muito além das minhas expectativas. Vocês são e sempre continuaram sendo os pilares das minhas conquistas. Agradeço também aos meus familiares: tio e tias, primos e primas, e vovô que mesmo estando longe se fazem perto.

Deixo minha gratidão para minha cunhada Lilian que me acolheu em sua casa nos primeiros momentos e sempre me acolhe quando preciso. A minha sogra Célia por sempre me manter em suas orações.

Ao meu orientador Elias, por acreditar no meu projeto e sempre me incentivar a ir além, o senhor é um exemplo de pessoa e determinação.

As elietes Francielly, Emilia e Paula, parceiras de laboratório e de vida, passamos por muitas coisas juntas, deixando todos os problemas ficarem mais doces.

Ao Hector, por ser o braço direito do professor e sempre nos ajudar com esse jeitinho carinhoso de ser. Aos membros do BioMat, pela troca de conhecimentos a cada reunião e pelas festinhas realizadas no laboratório.

As imetitas Larissa, Michele, Marcelly, Luana, Suzana e Natalia, pelo companheirismo, os choros e risadas nos corredores do IME.

Aos professores, que foram os transmissores de todo o conhecimento adquirido durante esse período.

Ao Flávio por todo auxílio e aprendizado no MEV.

A Livia do IMA, pelo auxílio na aquisição da análise de TGA.

A UFF, por sempre abrir as portas para mim, em especial ao laboratório LaREMn, LDRX e LAME.

E agradeço também a banca pelo aceite deste trabalho e pelas as sugestões que serão feitas para a melhoria deste.

Por fim, não menos importante, todos os meus amigos de vida: da escola, vizinhança, universidade, intercambio, e do IME, obrigada por fazerem parte da minha história.

“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

ALBERT EINSTEIN

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	10
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	15
LISTA DE SIGLAS	16
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Objetivo do Estudo.....	20
1.1.1. Objetivo Geral	20
1.1.2. Objetivos Específicos	21
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 Biomateriais	22
2.2 Cenário mundial	26
2.3 Polímeros.....	28
2.3.1 Hidrogel.....	30
2.3.2 Hidrogel de Poli(N-isopropilacrilamida)	31
2.4 Hidroxiapatita	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1. Aspectos gerais	37
3.2. Materiais utilizados	38
3.2.1. Equipamentos	38
3.2.2. Síntese dos Hidrogéis	38
3.2.3. Síntese da Nanohidroxiapatita.....	41
3.2.4. Síntese dos Biocompósitos.....	42
3.3. Caracterizações dos compostos sintetizados	42
3.3.1. Grau de Intumescimento	43
3.3.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	43
3.3.3. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	44
3.3.4. Espectroscopia por energia dispersiva (EDS)	44

3.3.5.	Difração de raios-X (DRX)	45
3.3.6.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	45
3.3.7.	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	46
3.3.8.	Análise Termogravimétrica (TGA)	47
3.3.9.	Derivada da Análise de TG (DTG)	47
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	Resultado Geral.....	48
4.2	Grau de intumescimento	49
4.3	Análise de Composição Química	51
4.4	Análise Microestrutural	60
4.5	Análise Morfológica	63
4.6	Análise Termogravimétrica	74
5.	CONCLUSÕES	78
6.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	80
7.	REFERÊNCIAS	81
8.	APENDICE	89
8.1	Espectros de absorção no infravermelho dos hidrogéis de PNIPAAm	89
8.2.	Espectros de absorção no infravermelho dos biocompósitos	90
8.3	Difratogramas de Raios-X dos hidrogéis de PNIPAAm	91
8.4	Difratogramas de Raios-X dos biocompósitos	92
8.5	Análise termogramétrica (TGA) dos hidrogéis PNIPAAm e derivada da análise termogramétrica (DTG).....	93
8.6	Análise termogramétrica (TGA) dos biocompósitos e derivada da análise termogramétrica (DTG).....	95

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1:	Tríade da Engenharia de Tecidos. Adaptado de Vallet-Regi <i>et al.</i> , 2011.	25
Figura 2.2:	Representação da classificação dos polímeros em (a) homopolímero, (b) copolímero e (c) blenda, respectivamente. (feita pelo autor)	29
Figura 2.3:	Representação da estrutura espacial dos polímeros em (a) cadeia linear, (b) ramificada e (c) reticulada, respectivamente. (retirado de ODIAN, 2004)	29
Figura 2.4:	Mecanismo de polimerização, onde I representa os iniciadores, R* representa as espécies reativas e Y representa a ramificação da cadeia. (retirado de ODIAN, 2004).....	32
Figura 2.5:	Representação da fórmula estrutural do PNIPAAm.....	32
Figura 2.6:	Célula unitária hexagonal da HA. Fonte: Adaptado de Costa <i>et al.</i> , 2009	35
Figura 4.1:	Montagem do sistema usado na síntese do hidrogel H3.1. a) Imagem do sistema montado para a síntese do hidrogel antes da gelificação; b) hidrogel após a gelificação.	48
Figura 4.2:	Variação do intumescimento dos hidrogéis a temperatura ambiente e com aquecimento acima de 37°C (aq). (a) hidrogéis sintetizados com agitação; (b) hidrogéis sintetizados sem agitação.....	50
Figura 4.3:	Variação do intumescimento dos biocompósitos a temperatura ambiente e com aquecimento acima de 37°C (aq). (a) hidrogéis sintetizados com agitação; (b) hidrogéis sintetizados sem agitação.	51
Figura 4.4:	Espectro de RMN ¹ H (500MHz, D ₂ O) do hidrogel H1.	53
Figura 4.5:	Espectro de absorção no infravermelho dos hidrogéis de PNIPAAm.	54
Figura 4.6:	Espectro de absorção no infravermelho da nanohidroxiapatita.....	55
Figura 4.7:	Espectro de absorção no infravermelho dos biocompósitos de PNIPAAm e nanoHa.	56
Figura 4.8:	Espectro de absorção no infravermelho do biocompósito HN1.0.3, do hidrogel H1 e da nanoHa.	56
Figura 4.9:	Espectro obtido na análise com EDS, tabela da composição química	

	e imagem da região onde foi realizada a análise do hidrogel H1.1. .57
Figura 4.10:	Espectro obtido na análise com EDS, tabela da composição química imagem da região onde foi realizada a análise da nanohidroxiapatita57
Figura 4.11:	Espectro obtido na análise com EDS, tabela da composição química e imagem da região onde foi realizada a análise do HN3.0.3.58
Figura 4.12:	Mapeamento da composição química do biocompósito HN1.0.3 com identificação da distribuição do cálcio (rosa), fósforo (verde), oxigênio (laranja) e carbono (vermelho). Aumentos de 10.000x e 20.000x..... 58
Figura 4.13:	Mapeamento da composição química do biocompósito HN1.1.3 com identificação da distribuição do cálcio (rosa), fósforo (verde), oxigênio (laranja) e carbono (vermelho). Aumentos de 10.000x e 20.000x.59
Figura 4.14:	Mapeamento da composição química do biocompósito HN2.0.3 com identificação da distribuição do cálcio (rosa), fósforo (verde), oxigênio (laranja) e carbono (vermelho). Aumentos de 10.000x e 20.000x.59
Figura 4.15:	Mapeamento da composição química do biocompósito HN2.1.3 com identificação da distribuição do cálcio (rosa), fósforo (verde), oxigênio (laranja) e carbono (vermelho). Aumentos de 10.000x e 20.000x.59
Figura 4.16:	Mapeamento da composição química do biocompósito HN3.0.3 com identificação da distribuição do cálcio (rosa), fósforo (verde), oxigênio (laranja) e carbono (vermelho). Aumentos de 10.000x e 20.000x.60
Figura 4.17:	Mapeamento da composição química do biocompósito HN4.0.3 com identificação da distribuição do cálcio (rosa), fósforo (verde), oxigênio (laranja) e carbono (vermelho). Aumentos de 10.000x e 20.000x.60
Figura 4.18:	Difratograma de raios-x dos hidrogéis de PNIPAAm.61
Figura 4.19:	Difratograma de raios-x da nanohidroxiapatita.62
Figura 4.20:	Difratograma de Raios-X dos biocompósitos.62
Figura 4.21:	Imagens de MEV da seção transversal do H2.1 com vista da superfície, aumentos de 600, 2.500 e 8.000x, respectivamente.63
Figura 4.22:	Imagens de MEV da seção transversal do H3.1, aumentos de 600, 2.500 e 5.000x, respectivamente.64
Figura 4.23:	Imagens de MEV do H4 em diferentes regiões, com as medidas entre

	as camadas e aumentos de 600, 1.200, 2.400 e 5.000x, respectivamente.	64
Figura 4.24:	Imagens de MEV do H2.1, aumentos de 600, 2.500 e 5.000x, respectivamente.	65
Figura 4.25:	Imagens de MEV do H3.1, com as medidas entre as camadas e aumentos de 600, 2.500 e 5.000x, respectivamente.	65
Figura 4.26:	Imagens de MEV do H4, aumentos de 600 e 2.500x, respectivamente.	65
Figura 4.27:	Morfologia do hidrogel H1. Aumentos de 600, 2.500, 5.000 e 10.000x, respectivamente.	66
Figura 4.28:	Imagens de MEV do H1.1, as três primeiras imagens são referentes a área 1 e as duas últimas referentes a área 2.	67
Figura 4.29:	Imagens de MEV do H2, as três primeiras imagens são referentes a área 1 e as duas últimas referentes a área 2.	68
Figura 4.30:	Morfologias do hidrogel H3. As três morfologias superiores são da região 1 e as duas inferiores da região 2.	69
Figura 4.31:	Morfologias da nanohidroxiapatita. Aumentos de 8.000, 60.000 e 120.000x, respectivamente.	69
Figura 4.32:	(a) Morfologia da nanohidroxiapatita identificada no MET; (b) padrão de difração da nanohidroxiapatita.	70
Figura 4.33:	Morfologias do biocompósito HN1.0.3. Aumentos de 5.000, 20.000 e 40.000x, respectivamente.	71
Figura 4.34:	Imagens de MEV do biocompósito HN1.1.3, aumentos de 5.000, 20.000 e 40.000x, respectivamente.	71
Figura 4.35:	Imagens de MEV do biocompósito HN2.0.3, aumentos de 5.000, 20.000 e 40.000x, respectivamente.	72
Figura 4.36:	Imagens de MEV do biocompósito HN2.1.3, aumentos de 5.000, 20.000 e 40.000x, respectivamente.	72
Figura 4.37:	Morfologias do biocompósito HN3.0.3. Aumentos de 5.000, 20.000 e 40.000x, respectivamente.	73
Figura 4.38:	Morfologias do biocompósito HN3.1.3. Aumentos de 5.000, 20.000 e 40.000x, respectivamente.	73
Figura 4.39:	Morfologias do MEV do biocompósito HN4.0.3. Aumentos de 10.000,	

	20.000 e 40.000x, respectivamente.	73
Figura 4.40:	(a) Curvas das análises termográmétricas (TGA) dos hidrogéis PNIPAAm; (b) derivada da análise termográmétrica (DTG)	75
Figura 4.41:	(a) Curvas das análises termográmétricas (TGA) da nano-hidroxiapatita; (b) derivada da análise termográmétrica (DTG)	76
Figura 4.42:	(a) Curvas das análises termográmétricas (TGA) dos biocompósitos; (b) derivada da análise termográmétrica (DTG)	77

LISTA DE TABELAS

Gráfico 1.1:	Prospectiva da população mundial de ambos os sexo com relação ao ano da pesquisa e a faixa etária.	25
Gráfico 1.2:	Média da taxa de crescimento populacional por faixa etária entre os anos de 1950 e 2015.	26
Tabela 3.1:	Equipamentos utilizados nas caracterizações dos materiais.....	38
Tabela 3.2:	Reagentes precursores dos hidrogéis.....	39
Tabela 3.3:	Dados estequiométricos dos reagentes.	40
Tabela 3.4:	Reagentes precursores da nanohidroxiapatita.	41
Tabela 3.5:	Dados estequiométricos dos reagentes usados na síntese do biocompósito.	42
Tabela 4.1:	Resultados dos espectros de ^1H RMN (500MHz, D_2O) para os hidrogéis H1, H2.1, H3.1, H4.	52
Tabela 4.2:	Valores de T_{onset} e T_{max} dos hidrogéis PNIPAAm.	75
Tabela 4.3:	Valores de T_{onset} e T_{max} dos biocompósitos.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABREVIATURAS

APS	-	Ammonium persulfate (persulfato de amônio)
HA	-	Hidroxiapatita
MBA	-	N-N'-metileno(bis)acrilamida
MSC	-	Células tronco mesenquimais
NIPAM	-	N-isopropilacrilamida
NMB	-	Metabissulfito de sódio
PAAM	-	Poli(acrilamida)
PET	-	Polietileno
PMMA	-	Polimetilmetacrilato
PNIPAAm	-	Poli(N-isopropilacrilamida)
PVA	-	Poli(vinil)álcool
PVC	-	Policloreto de vinil

SÍMBOLOS

^1H	-	Hidrogênio
T_c	-	Temperatura de cristalização
MHz	-	Mega Hertz
ppm	-	partes por milhão
rpm	-	rotação por minuto
T_c	-	Temperatura de cristalização
T_m	-	Temperatura de fusão cristalina
δ	-	deslocamentos químicos
λ - Lambda	-	lambda
ΔH_m	-	entalpia de fusão cristalina

LISTA DE SIGLAS

DRX	-	Difração de raios-X
DTG -	-	Derivada da Análise Termogravimétrica
EDS	-	Energia Dispersiva de Raios-X
FTIR-ATR	-	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier no modo Refletância total atenuada
GI	-	Grau de intumescimento
IPN	-	Polímeros Interpenetrantes
LCST	-	Lower Critical Solution Temperature (Temperatura de Solução Crítica Inferior)
MAPLE	-	Modificação de superfície baseada no uso de laser
MEV	-	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	-	Microscopia Eletrônica de Transmissão
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
TGA	-	Análise Termogravimétrica

RESUMO

O aumento da taxa de envelhecimento da população, e o número crescente pessoas portadoras de doenças que acarretam na perda de massa óssea, tem elevado o número de casos de fratura óssea, despertando preocupação no meio científico. Portanto, a busca por novos materiais que promovam a regeneração óssea, acarretando na constituição do tecido ósseo é constante, assim os biocompósitos tem se apresentado uma boa alternativa para essas enfermidades. No presente trabalho, foi realizado a síntese de sete hidrogéis termosensíveis a base de poli(Nisopropilacrilamida)– PNIPAAm e sete biocompósitos a base de PNIPAAm e nanohidroxiapatita (nanoHA), onde alterou-se as concentrações estequiométricas dos reagentes e os parâmetros de síntese, obtendo hidrogéis e biocompósitos com diferentes características que foram investigadas pelas análises de estrutura química, morfológica, grau de intumescimento e estabilidade térmica. Os resultados obtidos demonstraram que os hidrogéis e biocompósitos apresentam uma semelhança na composição química, porém possuem estruturas físicas diferente. O grau de intumescimento após 60 minutos variou de 1400% (H1.1) para géis menos rígidos e 600% (H2.1) para géis mais duros, caindo consideravelmente para 200% e 300% quando aquecidos. Já para os biocompósitos essa variação foi menor, de 1100% (HN1.1.3) para 300%, no caso de géis menos rígidos, e de 700% (HN2.1.3) para 500%, quando mais rígidos. Foram encontradas morfologias tridimensionais organizadas para hidrogéis sintetizados com agitação e desorganizados para os sintetizados sem; para os biocompósitos foi possível visualizar nanopartículas dispersas em toda a superfície dos géis. Por meio do MET e DRX, caracterizou-se a nanohidroxiapatita com tamanhos de 30nm e na forma de bastões e círculos. Na análise termogravimétrica, o maior valor encontrado para a T_{max} foi de 389 °C para o H2.0 e 414 °C para o HN2.0.3, o H4 apresentou o menor valor de T_{max} (376 °C), indicando tamanhos de cadeia menores e mais reticulados. Todos os biocompósitos apresentaram temperatura de degradação maior do que os hidrogéis, sendo um indicativo da interação entre a matriz polimérica e a cerâmica.

ABSTRACT

The increase in aging rate of population, and the growing number of people with diseases that results in the loss of bone mass, whose issue increased the number of bone fracture's case, arousing concern in the scientific community. Therefore, the search for new materials which might promote bone regeneration, resulting in the formation of bone tissue is constant, so the biocomposites have presented a good alternative for these diseases. In the present work, was carry out the synthesis of seven thermosensitive hydrogels of poly (Nisopropylacrylamide) - PNIPAAm and seven biocomposites based on PNIPAAm and nanohydroxyapatite (nanoHA), where were changed the stoichiometric concentrations of the reagents and the synthesis parameters were changed, obtaining hydrogels and biocomposites with different characteristics that were investigated by analyzes of chemical structure, morphology, degree of swelling and thermal stability. The results obtained demonstrated that the hydrogels and biocomposites present a similarity in the chemical composition, but they have different physical structures. The degree of swelling after 60 minutes ranged from 1400% (H1.1) for less rigid gels and 600% (H2.1) for harder gels, dropping considerably to 200% and 300% when heated. For biocomposites, this variation was lower, from 1100% (HN1.1.3) to 300%, in the case of less rigid gels, and from 700% (HN2.1.3) to 500% when more rigid. Organized three-dimensional morphologies were found for hydrogels synthesized with agitation and disorganized for the synthesized without; for the biocomposites it was possible to visualize nanoparticles dispersed throughout the gels surface. Through TEM and XRD, the nanohydroxyapatite was characterized with sizes of 30nm and in the form of sticks and circles. In the thermogravimetric analysis, the highest value found for T_{max} was 389 °C for H2.0 and 414 °C for HN2.0.3; H4 presented the lowest T_{max} (376 °C), indicating smaller and more crosslinked chain sizes . All the biocomposites presented a degradation temperature higher than the hydrogels, being an indicative of the interaction between the polymer matrix and the ceramic.

1. INTRODUÇÃO

A busca por novos materiais para tratar e/ou estimular a regressão de um determinado caso clínico, apresenta considerável crescimento. Os dados disponíveis na literatura, mostram que o aumento da expectativa de vida e o sobressalto da taxa de crescimento da população idosa (Nações Unidas, 2017) elevam o número de pessoas portadoras de doenças que acarretam na perda de massa óssea, tendo como consequências dor e sofrimento a esses indivíduos. (KLING, 2014)

Os biomateriais são usados como uma alternativa para tratar, ou substituir qualquer tecido do corpo. Juntando compatibilidade com funcionalidade, esta classe de materiais tem se mostrado promissora no desenvolvimento de novos materiais para aplicações médicas, dentre elas enxerto ósseo, cateter, implantes ortopédicos e odontológicos. (SHADJOU e HASANZADEH, 2015; SHI, 2013) Dentre as diversas aplicações merece destaque os hidrogéis, que são polímeros constituídos a partir da polimerização de monômeros capazes de formar ligações cruzadas entre si, estas ligações são conhecidas como reticulações. Estes hidrogéis possuem características hidrofílicas adequadas para absorver água ou fluidos biológicos. (HAQ *et al.*, 2017; OTTENBRITE *et al.*, 1996)

O poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), é um hidrogel termossensível, que se enquadra na classe de *smart materials*, exibe comportamento de contração/expansão influenciado pela variação da temperatura, uma vez que a sua temperatura de solução crítica inferior (LCST) é em torno de 33 °C. Esta propriedade faz com que, este polímero possua aplicações biologicamente relevantes, portanto, esta característica tornou-o amplamente estudado para aplicações na medicina. Dados da literatura indicam que este material possui propriedades como hidrofiliabilidade, biocompatibilidade, não toxicidade e capacidade de ser injetável com dispositivos de pequenos diâmetros. Além disto, as condições de síntese permitem a preparação de materiais com diferentes características, apenas variando a concentração de monômeros, agente reticulante, iniciadores redox e/ou temperatura. (HAQ *et al.*, 2017; ICRIVERZI *et al.*, 2018)

A hidroxiapatita sintética é uma cerâmica que mimetiza o tecido ósseo, principalmente quando em tamanho nanométrico, pois grande parte do mineral do osso é composto por hidroxiapatita carbonatada nano-estruturada. Além disso,

partículas em tamanho nano possuem maior superfície de contato, o que aumenta sua interação com o meio. Dentre suas aplicações, a hidroxiapatita é utilizada como enxerto ósseo, em razão da sua importante característica de osteocondução. Porém, ela apresenta a desvantagem de migrar para outras regiões do corpo, diminuindo sua eficiência. (CHANDRASEKAR *et al.*, 2013; KASTEN *et al.*, 2013)

Sendo assim, a falta de um tratamento eficaz, associado a regressão das disfunções que levam a perda de massa óssea, tornam este trabalho relevante. Desta forma, visando somar as propriedades do PNIPAAm, como biocompatibilidade e capacidade de ser injetável, com as da nanohidroxiapatita para promover a regeneração óssea, sintetizou-se uma classe de hidrogéis e biocompósitos a base de PNIPAAm contendo nanohidroxiapatita. Nas preparações dos hidrogéis foram usadas diferentes concentrações estequiométricas dos reagentes e alterou-se condições da síntese. Foram obtidos sete hidrogéis e sete biocompósitos com diferentes características físicas, sendo doze destes não descritos pela literatura. Investigou-se as propriedades destes compostos com relação a morfologia, grau de intumescimento, estrutura cristalina e análise térmica.

1.1. OBJETIVO DO ESTUDO

1.1.1. OBJETIVO GERAL

Os objetivos deste trabalho foram sintetizar e caracterizar a composição química, morfologia, estrutura cristalina, bem como as propriedades térmicas de uma classe de hidrogéis e de biocompósitos a base de nanohidroxiapatita e polímero, derivados do monômero N-isopropilacrilamida para aplicações médicas, dentre elas, substituto ósseo sintético.

1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Sintetizar via reação de polimerização por radicais livres, uma série de hidrogéis e biocompósitos poliméricos a base de nanohidroxiapatita, ambos derivados do monômero N-isopropilacrilamida (NIPAM), variando a concentração de agente reticulante, iniciadores redox, e alterando uma condição de síntese.

Caracterizar os géis obtidos para:

- ❖ Determinar a composição química com o emprego da ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e energia dispersiva de raios-x (EDS);
- ❖ Quantificar o grau de intumescimento;
- ❖ Caracterizar a estrutura cristalina por meio da difração de raios x (DRX);
- ❖ Determinar a estabilidade térmica do material, utilizando ensaios termogravimétricos (TGA) e derivada da análise termogravimétrica (DTG);
- ❖ Caracterizar a morfologia, utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET);

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOMATERIAIS

Uma das primeiras tentativas em definir o conceito biomaterial foi na *Consensus Conference of the European Society* em 1986, de acordo com Willian (1987), no qual definia-se um biomaterial como “um material não viável, utilizado em dispositivos médicos, destinado a interagir com o sistema biológico”. Com o passar dos anos, essa definição foi considerada menos abrangente e foi alterada para englobar maiores especificações, até chegar na definição mais aceita. A definição apresentada por Helmus e Tweden (1995), elucida um biomaterial como “qualquer substância (outra que não droga) ou combinação de substâncias, sintéticas ou naturais em origem, que possa ser usada por um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo”. Assim, pode-se entender que biomaterial seria a junção de biocompatibilidade com funcionalidade. (HELMUS e TWEDEN, 1995; KATTI, 2004; WILLIAN, 1987; SHI, 2013)

Um biomaterial pode estimular algumas respostas no hospedeiro logo após sua aplicação. O grau e a forma destas respostas fisiológicas, podem classificar o biomaterial em relação ao tecido ósseo como: (DUCHEYNE e CUCKLER, 1992; HOLLINGER, 2011)

- ❖ Bioinerte: promove formação de tecido fibroso na interface biomaterial-tecido. Estão entre os materiais bioinertes, as ligas ferrosas, alumina, zircônia, inox, poliamida, poliuretano e polietileno.
- ❖ Bioativo: permite a formação de matriz óssea na interface biomaterial-osso (osteogênese). Entretanto, a bioatividade só é adquirida por meio das camadas de óxido formadas na superfície dos materiais. Neste grupo temos o tântalo, o nióbio e o titânio.
- ❖ Bioreativo: promove uma interação entre o implante e o tecido ósseo, levando a osteogênese. Devido a sua similaridade química, a parte mineral do tecido ósseo se liga diretamente ao implante, promovendo a

osteocondução. Dentre os materiais desta classe estão os fosfatos de cálcio, biovidros e hidroxiapatita.

Um biomaterial sintético, pode ser dividido em quatro classes de acordo com sua composição: metálico, cerâmico, compósito e polimérico. (TEOH, 2004)

O biomaterial metálico, é caracterizado por ligações químicas metálicas e possui uma vasta aplicabilidade nas áreas da odontologia e ortopedia, como por exemplo, implantes dentários, parafusos e pinos para reparos ósseos, marcapassos e para a substituição total ou parcial de articulações. Dentre os materiais mais utilizados, merece destaque o aço inoxidável, titânio e suas ligas, que apresentam alta biocompatibilidade, boas propriedades mecânicas e resistência à corrosão. (KHORASANI *et al.*, 2015; TEOH, 2004)

O biomaterial cerâmico, por ter composições semelhantes aos minerais do osso, tem sido o material que melhor promove a osseocondução (evento que promove a formação de osso). Possui alta aplicabilidade nas áreas odontológicas e ortopédicas; é classificado como absorvível e não-absorvível e pode ser utilizado para preenchimento de defeitos ósseos e recobrimento de implantes dentários e próteses ortopédicas. Dentre os materiais mais usados, destaca-se a hidroxiapatita e o biovidro, por serem bioreativos. (PARIDA e MISHIRA, 2012; VENKATESAN e KIN, 2014)

O biomaterial compósito, pode ser entendido como um composto que contenha dois ou mais tipos de biomateriais. A vantagem deste material, é que se pode fazer uma combinação de constituintes para melhorar uma certa propriedade. As aplicações são preenchimento dentário, cimento ósseo e implantes ortopédicos com superfície porosa. Existem na literatura, alguns materiais com combinações entre cerâmicos e polímeros, tais como hidroxiapatita com colágeno ou poliácido láctico ou policaprolactona, e cimentos ósseos com polietileno de alto-ultra-peso-molecular. (CALLISTER, 2000; PARIDA e MISHIRA, 2012)

O biomaterial polimérico, por dispor de fácil manufatura para produzir diferentes formas e tamanhos de material, tem encontrado grandes aplicações como material protético, encapsulamento de fármacos, materiais dentários, produtos para a engenharia de tecidos, entre outros. Os biomateriais poliméricos sintéticos mais utilizados são o poli(cloreto de vinila) como dispositivos para diálise e cânula. O poli(metacrilato de metila) como cimento ósseo, enxertos e membrana para

dialisador de sangue. O politetrafluoretileno como cateter e enxertos vasculares artificiais; o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) ser usado para encapsulamento de drogas com liberação controlada e o poli(tetrafluoretileno) (PTFE) ser usado como barreira regenerativa. (PARIDA e MISHIRA, 2012; WANG *et al.*, 2017)

Todos os biomateriais citados são usados com o objetivo de unir compatibilidade com funcionalidade, originando materiais que auxiliam na melhora da qualidade de vida da população. Juntamente com a área de biomateriais, a Engenharia de Tecido aborda alternativas para a reconstrução de tecidos e órgãos que foram severamente danificados e/ou perdidos por doenças; além de responsável por pelo desenvolvimento de novos materiais ou dispositivos capazes de apresentar interações específicas com os tecidos biológicos, e reparar tais enfermidades. (STOCK e VACANTI, 2001)

A Engenharia de Tecidos é constituída pela união de três componentes principais, conhecidos como “tríade da Engenharia de Tecidos” e são compostos por materiais de suporte, células alvo e fatores de crescimento, que podem ser químicos (peptídeos, proteínas, etc), mecânicos ou físicos (Fig.2.1). Os materiais de suporte na forma de arcabouços, são um dos principais componentes e eles podem ser definidos como estruturas tridimensionais (3D), constituídas por metais, cerâmicos e/ou polímeros. Os materiais de suporte podem ou não possuir matrizes porosas (em sua maioria, matrizes poliméricas), dentre a aplicação no tecido ósseo, visam mimetizar este tecido para suportar o desenvolvimento de um novo osso, simultâneo ao restabelecimento da regeneração da função biomecânica original. (O'BRIEN, 2011, SHADJOU e HASANZADEH, 2015, VALLET-REGI *et al.*, 2011)

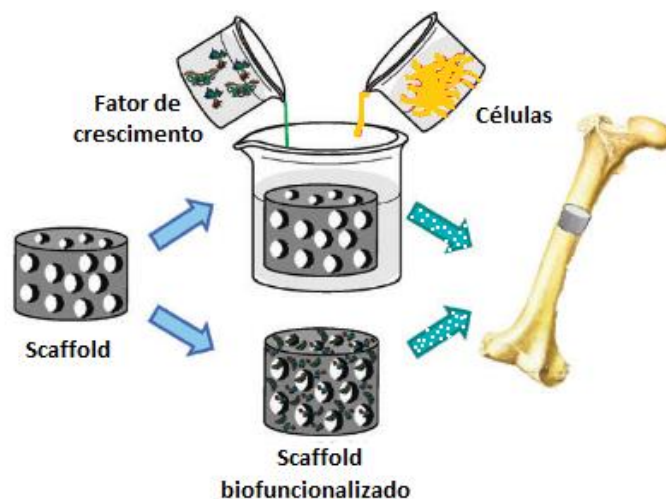


Figura 2.1: Tríade da Engenharia de Tecidos. Adaptado de Vallet-Regi *et al.*, 2011.

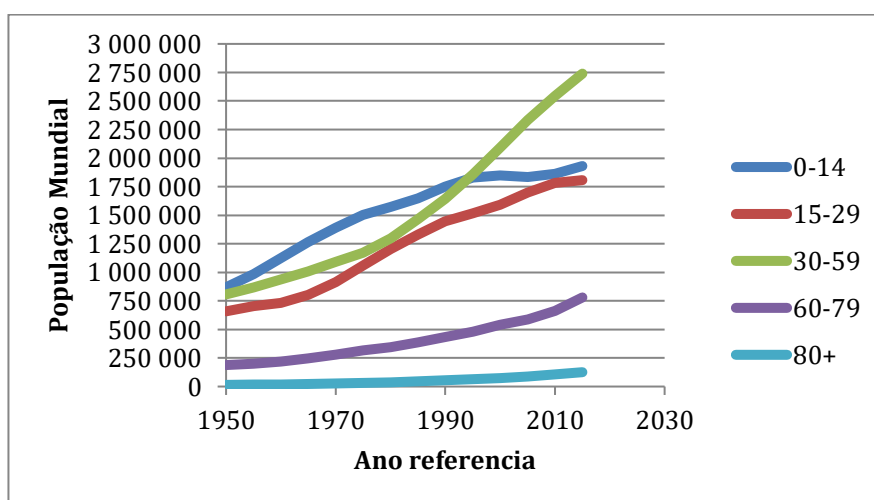
Os materiais de suporte são usados como uma alternativa para superar as limitações apresentadas pelos diferentes tipos de enxertos ósseo. Eles podem ser classificados e definidos como: autógenos (tecido ósseo retirado do próprio indivíduo), homogêneos (tecido proveniente de um banco de tecidos, no qual os indivíduos são geneticamente diferentes mas são da mesma espécie) e alógenos (tecido de origem de outra espécie). A primeira alternativa, apesar de apresentar melhor resultado, como diminuir o risco de rejeição, do que as demais, pode causar muita dor ao paciente, além da quantidade limitada de osso a ser retirada. Já as duas últimas opções apresentam algumas dificuldades, como disponibilidade de doadores, imunogenicidade, e incompatibilidade com o substituto. (LEWANDROWSKI *et al.* 2000; MCAULIEFFE, 2003; O'BRIEN, 2011; USKOKOVIC, 2015)

Por dispensarem um doador, serem considerados superiores aos autógenos e possuírem uma grande disponibilidade, tendo a sua origem totalmente sintética, os materiais aloplásticos vem sendo amplamente utilizados. Para a aplicação em enxerto ósseo destacam-se o polietileno poroso, telas de titânio, hidroxiapatita e biovidro. (DETSCH *et al.*, 2018; NEVITT *et al.*, 2018)

2.2 CENÁRIO MUNDIAL

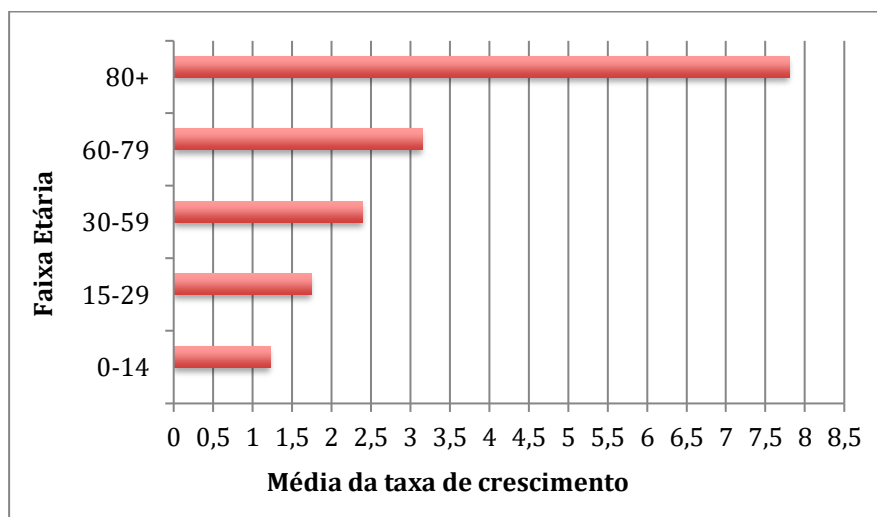
De acordo com relatório das Nações Unidas (2017), o envelhecimento da população mundial e a estimativa de vida aumentam progressivamente (gráfico 2.1). Sendo que, a taxa de crescimento da população idosa tem sobressaltado a de jovens e adultos, como pode ser comprovada pelos dados do gráfico 2.2, no qual esta taxa para a população idosa é cerca de 3 vezes maior do que para a população jovem. Assim, doenças crônico-degenerativas, como a osteoporose, principalmente em mulheres na pós-menopausa, acompanham essa taxa de crescimento. (KLING *et al.*, 2014)

Gráfico 2.1: Prospectiva da população mundial de ambos os sexo com relação ao ano da pesquisa e a faixa etária.



(Gráfico feito pela autora)

Gráfico 2.2: Média da taxa de crescimento populacional por faixa etária entre os anos de 1950 e 2015



(Gráfico feito pela autora)

Em alguns países, como os Estados Unidos da América, a osteoporose é um dos principais problemas de saúde, afetando cerca de 10 milhões de adultos e estima-se que este número irá aumentar em até 50% em 2025. Esta doença, caracterizada pela perda de massa óssea, que causa ao paciente dores crônicas e limitação funcional, possui tratamentos a longo prazo, ministrando bisfosfonatos, calcitonina e pela reposição de estrogênio. Entretanto, sua eficiência tem deixado a desejar, muitas vezes efeitos colaterais, como toxicidade renal ou osteonecrose da mandíbula (associada a pacientes com câncer), faz com que o paciente interrompa o tratamento. Em alguns casos, o tratamento recomendado é o enxerto ósseo. (CAWTHON *et al.*, 2011; FRAZÃO *et al.*, 2006; KLING *et al.*, 2014; WADE *et al.*, 2014)

Ainda não existe uma solução para o problema de danos ao tecido ósseo devido a osteoporose e osteoartrite, bem como lesões provocadas por acidentes ou envelhecimento. O que tem levado a um grande número de estudos em desenvolvimento para melhorar este cenário com a busca por novos agentes/materiais capazes de tratar e retardar a perda de massa óssea. Alguns biomateriais vem sendo empregados e/ou estudados, destacam-se: (ARCOS *et al.*, 2014; LESSON *et al.*, 1993; LODÉ *et al.*, 2018; PARIDA *et al.*, 2012)

- ❖ Implantes metálicos com maior superfície de contato entre o osso e o implante, no tratamento cirúrgico de fraturas osteoporótica. Entretanto,

esta alternativa não abrange pacientes em caso grave, pois pode aumentar a chance de fratura do osso já fraturado;

- ❖ Cimentos a base de polimetilmetacrilato (PMMA) para reforçar a fixação do implante. Todavia necrose termal devido a uma reação exotérmica são relatadas;
- ❖ Cimentos a base de biocerâmicas, como fosfatos de cálcio, para promover uma melhor regeneração óssea.

Uma combinação de biomateriais com terapia celular e fármaco de liberação controlada, tem sido de enorme interesse no mundo científico. Compósitos baseados em polímeros e cerâmicas para desenvolvimento de *scaffolds* porosos visam juntar qualidades de ambas as classes e assim promover um recipiente adequado para o crescimento do tecido ósseo.

2.3 POLIMEROS

Os polímeros são uma classe de macromoléculas que podem ser de origem natural, como o látex e o colágeno, ou sintética, como polietileno (PET) e poli(cloreto de vinila) (PVC). As suas propriedades químicas, físicas e mecânicas, por exemplo, boa resistência à degradação ao ar atmosférico e fabricação em larga escala com temperaturas baixas, fazem com que este tipo de material tenha uma vasta aplicabilidade. (GRULKE, 1994; MATYJASZEWSKI e TSAREVSKY, 2014; SHIT e SHAH, 2014)

O tamanho de uma cadeia polimérica, depende do grau de polimerização, ou seja, número de meros (menor unidade de repetição) ligados, podendo atingir massas molares da ordem de 10^3 a 10^6 . Os polímeros podem ser classificados em inúmeras categorias relacionadas à: (AKCELRUD, 2007; BILLMAYER, 1994; BRASKEN, 2002; GRULKE, 1994; ODIAN, 2004; RODRIGUES, 1982;)

- ❖ Monômeros: quando o polímero é formado por apenas um tipo de mero, ele é conhecido como homopolímero, a partir de dois ou mais meros, já passa a ser chamado de copolímero. Os polímeros interpenetrantes (IPN) ou blenda, são formados por cadeias poliméricas de um dado polímero A

penetram e se emaranham com as cadeias de um outro polímero B. No processo de polimerização, a ligação química (ligações covalentes) prevalece nos homopolímeros e copolímeros, já nas blendas prevalece as ligações secundárias, ou seja interações, como pode ser demonstrado figurativamente pela imagem abaixo (Fig. 2.2).

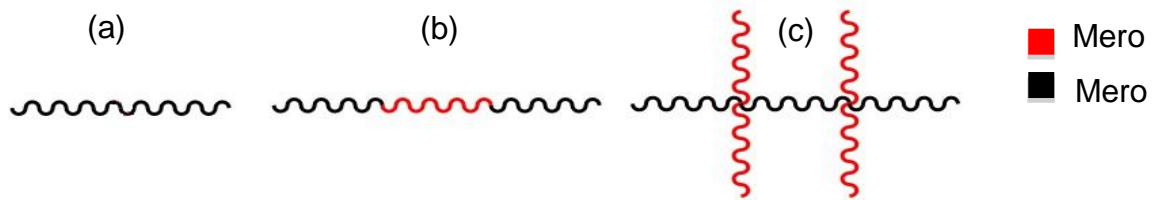


Figura 2.2: Representação da classificação dos polímeros em (a) homopolímero, (b) copolímero e (c) blenda, respectivamente. (feita pelo autor)

- ❖ Estrutura espacial: uma das principais características responsável pelas propriedades mecânicas e térmicas. Um polímero pode apresentar uma cadeia linear, ramificada ou reticulada. A cadeia simples ou linear é definida com um polímero que não possui ligações primárias entre as cadeias vizinhas (fora do eixo principal). Já a cadeia ramificada possui cadeias laterais ligadas ao eixo principal. Na cadeia reticulada, as longas cadeias poliméricas estão ligadas entre si por ligação covalente, conhecidas como ligações cruzadas ou cross-linking.

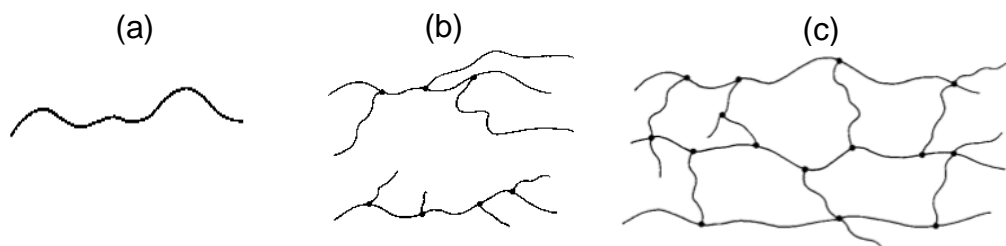


Figura 2.3: Representação da estrutura espacial dos polímeros em (a) cadeia linear, (b) ramificada e (c) reticulada, respectivamente. (retirado de ODIAN, 2004)

- ❖ Estados físicos: os polímeros podem apresentar três estados físicos, o sólido, no qual o polímero pode possuir uma estrutura semicristalina ou amorfa, o borracha e o estado líquido viscoso, também conhecido como "melt". Sendo que uma das propriedades mais relevantes dos polímeros é a viscosidade e ela está diretamente ligada à variação de temperatura.

- ❖ Desempenho em altas temperaturas: podendo ser classificado como termorrígido ou termoplástico. Os polímeros que possuem a propriedade de ser remoldados ou escoar, devido à aplicação de pressão e/ou calor são conhecidos como termoplásticos. Já os polímeros que quando aquecidos, apresentam um efeito de ligações cruzadas, aumentando consequentemente sua rigidez são chamados de termorrígidos.
- ❖ Reações polimerização: podem ocorrer de duas formas, a polimerização por cadeia ou adição e polimerização por etapas ou condensação. Na polimerização por condensação, espécies moleculares reagem entre si gerando grandes moléculas com a eliminação de pequenas moléculas, como por exemplo água. Já na polimerização por crescimento em cadeia, é necessário iniciadores tais como peróxidos e agentes redox, que dão início a propagação da cadeia polimérica.

Assim, diversos critérios devem ser levado em consideração ao selecionar-se um material polimérico para determinada aplicação, pois cada polímero tem a sua particularidade, que depende das formas que sua cadeia pode assumir, da rigidez estrutural, polaridade, entre outros fatores.

Devido a grande versatilidade e fácil manuseio, o número de materiais poliméricos utilizados na produção de biomateriais é crescente. Entretanto, por não se apresentarem, na maioria dos casos, favoráveis a interação celular com o tecido hospedeiro, a classe de compósitos chega para tentar minimizar essa carência.

2.3.1 HIDROGEL

Os hidrogéis, podem ser definidos como uma classe polimérica que possui redes homopoliméricas ou copolímeras, com estrutura tridimensional, e com características hidrofílicas capazes de absorver água ou fluidos biológicos. A sua hidrofiliidade é atribuída à presença de grupos eletronegativos, tais como -OH, -CONH, -CONH₂, e -SO₃H em polímeros que formam estruturas de hidrogel. Por causa da contribuição desse tipo de grupamento funcional, o gel se hidrata em diferentes graus, as moléculas de água vão ocupando espaço e assim a rede inicia

sua expansão, por vezes, mais do que 20% em massa, maior que o seu peso total. A elasticidade da rede contrabalança o seu alongamento, impedindo a destruição da mesma. O grau de expansão dos hidrogéis pode ser afetado por alguns fatores dentre eles o teor de reticulação, alta densidade de ligações cruzadas que os tornam mais rígidos, ou seja, expandem menos. A mobilidade da cadeia polimérica é impedida pelas reticulações, assim quanto maior o grau de reticulação na rede polimérica, menor será o grau de expansão. (GALPERIN *et al.*, 2010; HAQ *et al.*, 2017; OTTENBRITE *et al.*, 1996).

Existe um grande número de hidrogéis poliméricos considerado smart materials, pois sofrem drásticas mudanças no volume devido a estímulos externos, podendo ser sensíveis a: alteração do solvente, pH, campo eletromagnético e/ou temperatura. Por possuírem uma microestrutura semelhante aos dos tecidos naturais, os hidrogéis têm sido aplicados em vários campos biomédicos, tais como, liberação controlada de drogas e engenharia de tecidos. (HAMIDI *et al.*, 2008; HAQ *et al.*, 2017; MELO *et al.*, 2012; OTTENBRITE *et al.*, 1996).

2.3.2 HIDROGEL DE POLI(N-ISOPROPILACRILAMIDA)

O poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) é um hidrogel termossensível, cujo a capacidade de exibir um comportamento de contração/expansão está diretamente ligado a variação de temperatura. Tendo sido primeiramente relatado na literatura em 1956, o PNIPAAm é derivado do monômero N-isopropilacrilamida (NIPAM) e sua polimerização ocorre por crescimento em cadeia. O mecanismo de polimerização ocorre em três etapas, iniciação, propagação e terminação, representados pela figura 2.4. Na primeira etapa, iniciadores geram espécies reativas, na segunda etapa essas espécies são adicionadas aos monômeros, quebrando a ligação π e gerando novas espécies reativas, este processo se propaga até a terceira etapa, onde a cadeia pode ser finalizada pela ligação de duas cadeias em crescimento. (GRULKE, 1994; ODIAN, 2004)

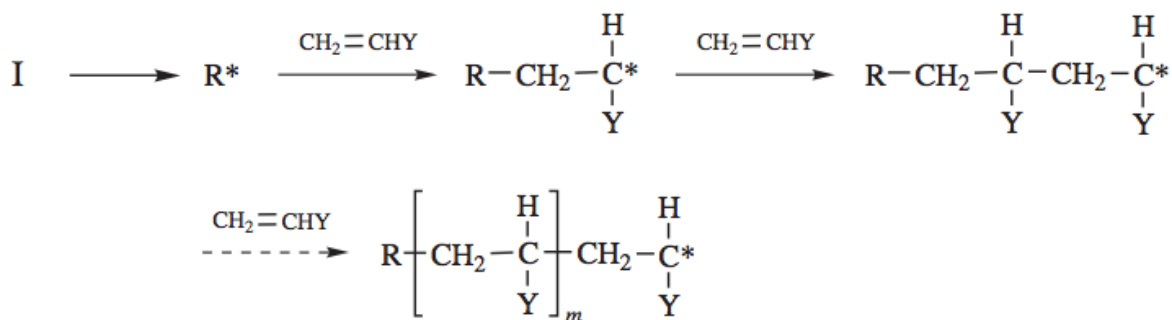


Figura 2.4: Mecanismo de polimerização, onde I representa os iniciadores, R* representa as espécies reativas e Y representa a ramificação da cadeia. (retirado de ODIAN, 2004)

O PNIPAAm (fig. 2.5) possui uma característica bastante peculiar, um ponto de transição conhecido como Temperatura de Solução Crítica Inferior (*Lower Critical Solution Temperature* - LCST), em torno de 33 °C; temperaturas abaixo desse valor o gel expande até o equilíbrio e acima desse valor, ele se contrai, pois ele deixa de ser hidrofílico para se tornar hidrofóbico, expulsando parte da água absorvida. Esta característica tornou o PNIPAAm um dos hidrogéis mais estudados para aplicação no campo medicinal, nos últimos tempos. (AHMED, 2015; TANAKA, 1984; THANG *et al.*, 2008)

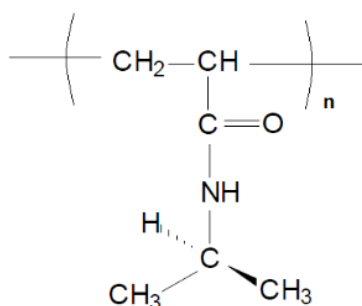


Figura 2.5: Representação da fórmula estrutural do PNIPAAm.

Teixeira e Freitas (1991) e Balakrishnan (2016) em seus estudos, verificaram que a concentração do iniciador influencia inversamente no tempo de gelificação, pois o aumento da concentração fornecerá um número maior de centros ativos. Já Tanaka *et al.* (2002), observaram que existe uma relação das propriedades óticas do gel PNIPAAm com a temperatura de preparo, no qual o gel passa de transparente para opaco com o aumento dessa temperatura, o que corrobora com Rathjen *et al.*

(1995), no qual concluíram que os hidrogéis preparados em temperaturas elevadas terão menor grau de expansão, pois a não homogeneidade presente, quebram a continuidade do polímero e reduzem sua elasticidade.

Haq et al. (2017) reportaram em sua revisão, as técnicas para tentar melhorar as propriedades mecânicas do PNIPAAm, visto que este hidrogel não é biodegradável e apresenta baixa resistência mecânica portanto, dificulta ser aplicado como material de suporte para crescimento celular, logo, existe uma busca continua para melhorar as propriedades desse material podendo assim apresentar propriedades mecânicas similares a do tecido hospedeiro. Existem relatos que a temperatura de síntese e as concentrações dos reagentes podem alterar drasticamente as propriedades mecânicas dos hidrogéis. Takigawa et al. (1998) e Puleo et al. (2013), relataram que seus hidrogéis sintetizados a temperaturas entre 20-25°C (temperaturas ambientes), apresentaram modulo de Young em torno de 9 KPa, já Matzelle et al. (2003), concluiu que aumentando a concentração de agente reticulante para aproximadamente 5% da razão molar, o modulo de elasticidade passou a ser em torno de 350 KPa. Colaborando com este estudo, Fei et al. (2013), encontrou o modulo de Young em torno de 81 KPa para seus hidrogéis sintetizados a 33,9 °C. Assim, o aumento em torno de 9 °C, na temperatura de síntese aumentou em aproximadamente 9x o modulo de elasticidade e o aumento na concentração do agente reticulante aumentou substancialmente em torno de 40x o modulo relatado por Takigawa (1998) e Puleo (2013).

Uma outra estratégia adotada por muitos pesquisadores é a síntese de IPNs ou copolímeros, incorporando um segundo polímero com propriedades conhecidas, na rede do PNIPAAm. Zhang et al (2003) observaram em sua blenda a base de PNIPAAm e PVA que a resposta da taxa de intumescimento frente a mudança de temperatura é mais rápida no seu IPN do que no hidrogel puro. Os IPNs relatados por Djonlagic et al. (2004), utilizando diferentes poli(acrilamida) (PAAM), constataram que a resistência a tração aumenta para os hidrogéis contendo PAAM neutros ou catiônicos e diminui para os hidrogéis com PAAM aniônicos. Em contrapartida, Stile et al. (1999), observaram que tanto seus copolímeros poli(N-isopropil-co-acido acrílico) quanto o PNIPAAm, semeados com condrócitos bovinos, puderam ser injetados através de uma seringa de 2mm de diâmetro de

abertura, e esses materiais suportaram a formação de tecido semelhante a cartilagem no estudo *in vitro*.

Uma recente investigação realizada por Icriverzi et al. (2018) sobre o comportamento de células tronco mesenquimais (MSC) frente a uma série de hidrogéis de PNIPAAm que foram produzidos por modificação de superfície baseada no uso de laser (MAPLE), alterando assim, as terminações desses géis com diferentes grupos funcionais, demonstraram que o PNIPAAm e seus derivados não apresentaram citotoxicidade e que no processo de aderência celular há o desenvolvimento de fibras de actina. Esse processo permitiu o condicionamento do crescimento inicial das MSC, confirmando que a adesão celular é modulada pelas proteínas adsorvidas pela superfície do biomaterial. Estudos recentes concluíram que nenhum efeito colateral evidente surge quando os hidrogéis de PNIPAAm são adicionados na matriz celular, mesmo após a internalização nos lisossomos. Ademais, a resposta citotóxica é geralmente correlacionada ao PNIPAAm disponível comercialmente, onde é provavelmente associada à presença de impurezas na matriz polimérica tais como monômero e iniciador de radical, e não no próprio polímero. Logo, essa série de hidrogéis apresentam um potencial biomaterial para o uso em medicina regenerativa. (COOPERSTEIN e CANAVAN, 2013; NAHA et al., 2010; TEMPASTI et al., 2018)

2.4 HIDROXIAPATITA

A hidroxiapatita (HA) é um componente mineral natural encontrado nos ossos e dentes, geralmente exibindo uma estrutura cristalina hexagonal. A HA é um material cerâmico e pode ser sintetizada por vários métodos, dentre eles: processo sol-gel, reação em estado sólido, métodos hidrotermais, co-precipitação, sendo que a maioria destas rotas se baseiam em duas etapas: a primeira é o processamento que acarreta na precipitação dos cristais de fosfato de cálcio na fase monoclinica e a segunda, o processo de sinterização em altas temperaturas, para o crescimento e estabilização dos cristalitos (CATROS *et al.*, 2010; MIHOC e MITU, 2017). A HA sintética exibe propriedades de osseointegração, osteocondução e

biocompatibilidade, sendo assim amplamente utilizada na reparação e/ou substituição de tecidos duros, devido a sua similaridade com osso, nos parâmetros de composição mineral, morfologia e cristalinidade (LEE *et al.*, 2006).

A composição química da HA é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com razão Ca/P igual a 1,67, sendo o fosfato de cálcio mais estável e o menos solúvel de todos. Podendo apresentar duas fases: hexagonal ou monoclinica, ambas são biocompatíveis, entretanto a forma hexagonal é a mais comum devido a sua maior estabilidade. A figura 2.6, mostra a representação da célula unitária hexagonal da HA, sua estrutura permite substituições catiônicas e aniônicas com facilidade, no qual os íons de cálcio podem ser substituídos por cátions bivalentes como Cu^{2+} e Fe^{2+} . Já as substituições aniônicas, permitem a troca dos grupos fosfatos por carbonatos e vanadatos; e as hidroxilas por carbonatos, flúor e cloro. Essas substituições podem levar a mudanças da cristalinidade, dos parâmetros de rede, das dimensões dos cristais, e até mesmo alterar a solubilidade da hidroxiapatita. (COSTA *et al.*, 2009)

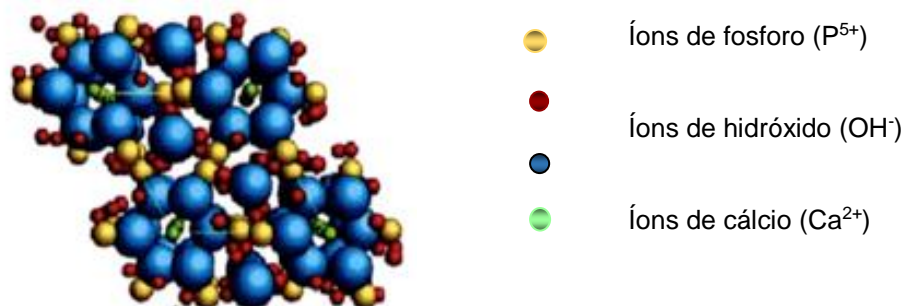


Figura 2.6: Célula unitária hexagonal da HA. Fonte: Adaptado de Costa *et al.*, 2009

O número de estudos sobre as propriedades e aplicações da nanohidroxiapatita (nanoHA) tem crescido consideravelmente, pois a parte mineral do osso é composta por cristais de hidroxiapatita carbonatada nano-estruturada, que totalizam 65% do seu peso total, assim a nanoHA se torna uma excelente candidata a mimetizar o tecido ósseo. (COWIN *et al.*, 2001; KASTEN *et al.*, 2003; YAZDANI *et al.*, 2018)

Catros *et al.* (2010) demonstraram em seus estudos a síntese em temperatura ambiente e a caracterização da nanoHA e a testaram *in vitro* frente a células MG63 (células de osteossarcoma humano) semelhantes aos osteoblastos, e *in vivo* frente a um defeito crítico no osso calvaria de ratos. Eles concluíram pelo teste *in vitro* que a nanoHA foi biocompatível e permitiu a proliferação inicial das células, já no teste *in*

vivo, observou-se a formação de um novo tecido ósseo, diferente do controle, que apresentou formação apenas de tecido fibroso. As propriedades de biocompatibilidade e biofuncionalidade da hidroxiapatita já são conhecidas na literatura, e ela já vem sendo usada nas áreas médicas e odontológicas, como enxerto e recobrimento de implantes endo-osseos, entretanto a dispersão das HA para tecidos moles, tem acarretado na perda dessas partículas, e assim, na diminuição de sua eficácia. Logo, existem diversos interesses em melhorar a sua aplicabilidade, tanto para diminuir a perda de partículas de HA do local desejado, quanto para revestir próteses metálicas de forma a promover uma ligação interfacial estável entre o tecido vivo e o implante. (CHANDRASEKAR *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2009)

Muitos trabalhos tem sido desenvolvidos na tentativa de criar novos biomateriais a base de compósitos formados pela HA e diferentes polímeros. Boldt *et al.* (2010), desenvolveram um biocompósito a base de poli(3-hidroxibutirato) e HA, que se apresentou osteoindutora. Inúmeros trabalhos, relatam biocompósitos de poli ácido láctico e nanoHA, Hong *et al.* (2005) relatou que com 4% em massa do polímero, já melhora a resistência a tração do material. Zhang *et al.* (2010), constatou que resistência a compressão melhora cerca de 4x frente ao valor encontrado para o polímero puro. Por fim, Abdal-Hay *et al.* (2013), observou proliferação de células de osteoblastos MC3T3 neste biocompósito na forma de microesferas. Outros polímeros tais como polietileno, poli álcool vínic e poliuretano, também já são relatados na literatura como materiais associados a nanoHa para a formação de biocompósitos, todos tiveram melhora em suas propriedades mecânicas e apresentaram boa atividade biológica e adesão celular. (WANG *et al.*, 2017)

Os hidrogéis também fazem parte do grupo de biocompósitos produzidos juntamente com a HA. Han *et al.* (2017), sintetizaram um biocompósito de poli(acrilamida e hidroxiapatita por atividade fotocatalítica e adicionaram nitreto de titânio, esse novo hidrogel apresentou boa dispersão da Ha na matriz polimérica e uma melhor bioatividade comparada ao biocompósito sem adição de TiN. You *et al.* (2018), produziram biocompósitos a base de alginato e utilizaram citrato de sódio como agente dispersante da hidroxiapatita, o hidrogel obtido apresentou bioatividade, promovendo a secreção do colágeno tipo X e deposição de condrócitos, após estes resultados, o biocompósito foi impresso por uma matriz 3D

em um arcabouço poroso que apresentou formação de cartilagem calcinada no teste *in vivo*. Muitos trabalhos tem sido relatados envolvendo biocompósitos a base do hidrogel PNIPAAm e hidroxiapatita. Tempesti *et al.* (2018), desenvolveram microgeis de PNIPAAm e nanoHA para oclusão de túbulos dentários. Devido ao LCST o biocompósito que foi inserido em menor tamanho, preenchendo os túbulos expostos, após o tratamento os túbulos dentários não estavam mais expostos. Ribeiro *et al.* (2017), sintetizaram biocompósitos de PNIPAAm e HA via polimerização eletroquímica, que foram dopados com o antibiótico oxacilina. O material obtido não apresentou citotoxicidade frente a célula MG63 e apresentou atividade bacteriana contra *S. aureus* e *P. Aeruginosa*. Como conclusão, as diferentes concentrações de HA presentes na matriz polimérica, interferiram na liberação do antibiótico, sendo que quanto maior for concentração de HA menos a oxacilina é liberada no organismo.

A HA, também tem despertado o interesse da área de cosméticos, o produto denominado Radiesse, que é a mistura de HA com glicerina, originou a HA injetável e tem sido amplamente utilizada para promover o rejuvenescimento facial e das mãos. (ALETAHA *et al.*, 2017; GRAIVIER *et al.*, 2018)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ASPECTOS GERAIS

Neste capítulo será descrito a síntese do PNIPAAm e do biocompósito realizada no Laboratório de Química do Instituto Militar de Engenharia (IME). A síntese da hidroxiapatita foi realizada no Laboratório de cerâmicos do IME. As técnicas de análises para a caracterização dos hidrogéis, biocompósitos e nanoHa foram feitas em outras Instituições. A espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) foi realizada no Laboratório LAREMN, difração de raios-X no LDRX e espectroscopia no infravermelho no LAME, pertencentes à Universidade Federal Fluminense (UFF). As análises por microscopia eletrônica de varredura e transmissão, o grau de intumescimento e a análise química semi-quantitativa com EDS foram realizadas no

IME. As análises termogravimétricas foram realizadas no Instituto de Macromoléculas (IMA) da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.2. MATERIAIS UTILIZADOS

3.2.1. EQUIPAMENTOS

As especificações dos equipamentos utilizados nas análises dos compósitos são apresentadas na tabela 3.1.

Tabela 3.1: Equipamentos utilizados nas caracterizações dos compostos sintetizados.

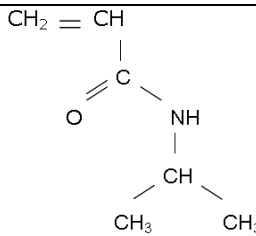
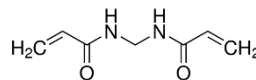
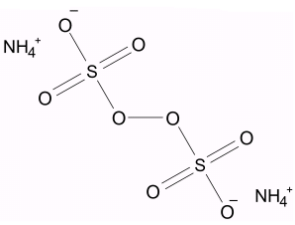
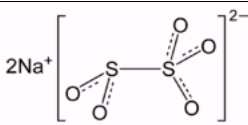
Equipamento	Marca	Especificação
Ressonância Magnética Nuclear	Varian VNMRS	Operado em 500 MHz
Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier	Varian 660 IR	Operado em modo de refletância total atenuada (ATR)
Energia Dispersiva de Raios-X	MEV FEI Quanta FEG 250	Utilizado o Software Quantax CrystAlign
Difração de Raios-X	Bruker-AXS D8 Advance	Utilizado emissão de radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54060$)
Microscopia Eletrônica de Varredura	MEV FEI Quanta FEG 250	Operado com distância de trabalho de 9 mm
Microscopia Eletrônica de Transmissão	Joel Jem-2100	Operado em 100 kev
Análise Termogravimétrica	TA Instruments TGAQ500	Operado com a velocidade de aquecimento de 15°C

3.2.2. SÍNTESE DOS HIDROGÉIS

As sínteses dos hidrogéis foram realizadas variando somente uma condição da metodologia de cada vez e posteriormente, a concentração estequiométrica dos reagentes. Como monômero utilizou-se o N-isopropilacrilamida, o agente reticulante

foi o N-N'-metileno(bis)acrilamida e os iniciadores redox utilizados foram o persulfato de amônio e o metabissulfito de sódio. Todos os reagentes foram utilizados sem purificação prévia. A informação de cada reagente precursor, tais como estrutura, fabricante e grau de pureza são discriminados na tabela 3.2.

Tabela 3.2: Reagentes precursores dos hidrogéis.

Reagente	Fórmula estrutural	Massa Molar (g/mol)	Fabricante	Grau de Pureza (%)
N-isopropilacrilamida (NIPAM)		113	Sigma-Aldrich	97
N-N'-metileno(bis)acrilamida (MBA)		154	Sigma-Aldrich	99,5
Persulfato de amônio (APS)		228	Gold FM	>98
Metabissulfito de sódio (NMB)		190	Farmos	>97

A síntese do hidrogel PNIPAAm foi feita via radical livre, em solução aquosa e atmosfera inerte de nitrogênio, diferente da metodologia de síntese baseada em Queiroz (2011), no qual propõe-se borbulhamento por nitrogênio e copolimerização com acrilamida.

Inicialmente, foram pesados o NIPAM e o MBA. A seguir, foram diluídos em aproximadamente 5 mL de água deionizada e colocados em um balão de vidro de 50 mL. O balão foi fechado e colocado em atmosfera inerte de nitrogênio, durante 5 minutos, em seguida, os iniciadores APS e NMB foram pesados e diluídos em aproximadamente 5 mL de água deionizada e adicionados ao balão. O meio

reacional foi colocado em banho-maria à 50°C. O tempo de gelificação variou com cada amostra. Durante a gelificação pode-se observar que a solução passa de cristalina para um tom branco bastante viscoso. Na primeira condição de síntese, a reação foi realizada com agitação e na segunda sem agitação. O tempo reacional foi de 20 minutos. Logo após, o hidrogel permaneceu em repouso por 24 horas na temperatura ambiente para a completa gelificação. O passo seguinte foi a lavagem do gel para a eliminação de quaisquer resíduos com emprego da centrifuga em 3.500 rpm, seguido da lavagem 3 vezes com aproximadamente 15 mL de água deionizada com descarte do sobrenadante. Em seguida, o gel foi colocado na estufa à 60 °C para remoção de toda a água residual. Todos os reagentes foram pesados nas quantidades estequiométricas descritas na tabela 3.3. Optou-se por variar a concentração de iniciadores redox para favorecer o aumento de centros ativos com o aumento desta concentração, e variou-se também a concentração de agente reticulante, quanto maior a concentração deste agente, maior tende a ser o número de ligações cruzadas e assim mais rígido se torna o hidrogel. Logo a partir da concentração conhecida para a obtenção do hidrogel H1, já comercial, variou-se as demais concentrações.

Tabela 3.3: Dados estequiométricos dos reagentes.

Hidrogel	NIPAM (mol x 10 ⁻⁴)	MBA (mol x 10 ⁻⁴)	APS (mol x 10 ⁻⁴)	NMB (mol x 10 ⁻⁴)	Razão em %
H1*	22,1	1,32	0,76	0,97	100x6,0x3,4x4,4
H2	22,9	2,39	0,74	1,10	100x10,4x3,2x4,8
H3	22,2	4,46	0,59	0,76	100x20,1x2,7x3,4
H1.1	22,1	1,35	0,78	0,97	100x6,1x3,5x4,3
H2.1*	66,6	6,76	2,26	3,36	100x10,1x3,4x5,0
H3.1*	67,1	13,3	1,71	2,21	100x19,8x2,6x3,3
H4*	66,5	13,3	2,29	2,26	100x20,0x3,4x3,4

* Foi sintetizado sem agitação.

3.2.3. SÍNTESE DA NANOHIĐROXIAPATITA

A síntese da nanohidroxiapatita foi baseada na proposta de Bigi *et al.* (2004). Todos os reagentes foram utilizados sem purificação prévia e a informação de cada reagente precursor, tais como estrutura, fabricante e grau de pureza são apresentados na tabela 3.4.

Tabela 3.4: Reagentes precursores da nanohidroxiapatita.

Reagente	Formula estrutural	Massa Molar (g/mol)	Fabricante	Grau de Pureza (%)
Nitrato de cálcio tetrahidratado	$\left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O}^- - \text{N}^+ - \text{O}^- \end{array} \right]_2 \left[\text{Ca}^{2+} \right] 4\text{H}_2\text{O}$	236,15	Sigma-Aldrich	>99
Fosfato de amônio bibásico	$\left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O}^- - \text{P} - \text{O}^- \\ \\ \text{OH} \end{array} \right] \left[\text{NH}_4^+ \right]_2$	132,6	Dinâmica	99
Hidróxido de amônio	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{N}^+ \\ \\ \text{H} \end{array} \text{OH}^-$	35,04	Dinâmica	24-26

A reação para síntese da nanoHA foi realizada em um béquer de 500 mL, ao qual foi adicionado uma solução aquosa de 1M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, o pH foi ajustado para básico utilizando hidróxido de amônio e a reação foi aquecida até aproximadamente 80 °C. Simultaneamente, preparou-se uma solução aquosa de 0,6 M de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, o pH também foi ajustado para básico com o hidróxido de amônio, esta solução foi adicionada à solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. A reação foi mantida a uma faixa de temperatura acima de 80 °C sob agitação. A formação de precipitado foi observada assim que iniciou a adição do fosfato. Em seguida, a reação permaneceu em repouso por aproximadamente 20 horas e o precipitado foi lavado com água deionizada e centrifugado por 15 minutos. Posteriormente, o precipitado foi colocado na estufa a 60 °C para remoção da água residual.

3.2.4. SÍNTESE DOS BIOCOMPÓSITOS

A síntese dos biocompósitos foi adaptada da metodologia descrita por Ribeiro *et al.* (2017). A nanohidroxiapatita foi pesada e adicionada a um béquer com aproximadamente 10 mL de água deionizada. Esta solução ficou por 10 min em banho de ultrassom, para promover dispersão das nanoHA, em seguida ela foi adicionada ao monômero NIPAM, na razão molar de 30% m/m. A seguir, realizou-se a síntese de polimerização via radicais livres, como descrito anteriormente. Com base nas proporções dos componentes, os compósitos receberam as designações HN1.1.3, HN 2.0.3 e HN 3.0.3, os quais foram sintetizados com agitação. Os demais compósitos foram sintetizados sem agitação. As designações e as proporções dos reagentes pesados nas quantidades estequiométricas são apresentadas na tabela 3.5.

Tabela 3.5: Dados estequiométricos dos reagentes usados na síntese dos biocompósitos.

Hidrogel	NIPAM (molx 10 ⁻⁴)	MBA (molx 10 ⁻⁴)	APS (molx 10 ⁻⁴)	NMB (molx10 ⁻⁴)	Razão em %	nanoHa (molx10 ⁻⁴)
HN1.0.3*	66.6	4,02	2,32	2,95	100x6.0x3.5x4.4	3,23
HN2.0.3	68.8	7,19	2,23	3,31	100x10.4x3.2x4.8	3,33
HN3.0.3	66.6	13,3	1,71	2,26	100x19.9x2.6x3.4	3,22
HN1.1.3	66.5	4,05	2,37	2,96	100x6.1x3.6x 4.5	3,21
HN2.1.3*	66.6	6,78	2,27	3,37	100x10.2x3.4x5.1	3,21
HN3.1.3*	67.0	13,3	1,72	2,22	100x19.9x2.6x3.3	3,25
HN4.0.3*	66.5	13,4	2,31	2,31	100x20.1x3.5x3.5	3,22

* Foi sintetizado sem agitação.

3.3. CARACTERIZAÇÕES DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

3.3.1. GRAU DE INTUMESCIMENTO

O grau de intumescimento é também chamado de grau de expansão mássico, o qual pode ser medido pela razão da massa do gel seco (M_g) e da massa do gel expandido (M_{ge}) (quando ele absorve o máximo de água possível). O grau de intumescimento (GI) no equilíbrio pode ser calculado usando a Eq. (1). (AQUADA, 2009)

$$GI (\%) = \frac{M_{ge} - M_g}{M_g} \times 100 \quad \text{EQ.1}$$

Neste teste, aproximadamente 200 mg de cada amostra seca foi colocado em um béquer de 50 mL e adicionado solução tampão de fosfato (PBS) até completar 30 mL para que os géis puderam expandir à temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$) e em aquecimento ($\sim 37^\circ\text{C}$). Os testes foram realizados no intervalo de tempo de 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 e 120 minutos, tempos considerados suficientes para que os géis alcançassem o equilíbrio de expansão. Os géis foram removidos dos respectivos béqueres com o auxílio de uma espátula e utilizou-se um papel absorvente para a remoção do excesso de água presente na superfície. Em seguida, foram colocados em um vidro de relógio previamente pesado. Esse procedimento de pesagem foi realizado em triplicata. Para a remoção da água absorvida, os géis permaneceram na estufa a 60°C durante aproximadamente 2 horas. Em seguida, o sistema gel-vidro de relógio foi novamente pesado e, uma vez conhecida a massa do vidro de relógio, determinou-se a massa do gel seco e assim calculou-se a capacidade de expansão empregando-se a equação 1.

3.3.2. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

O emprego da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN) permite obter um espectro para determinar o número de hidrogênio e sua quantificação.

Os espectros de (RMN ^1H) foram obtidos no espectrômetro da marca Varian VNMRS e operado na frequência de 500 MHz, com variação de temperatura e utilizando água deuterada como solvente. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm).

3.3.3. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A análise por espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi realizada para obter informações sobre as vibrações correspondentes às ligações químicas que permitem identificar os principais agrupamentos funcionais presentes nas moléculas. O espectrômetro da marca VARIAN e modelo 660 IR, foi utilizado na faixa de IR média de 400 a 4000 cm^{-1} , com 32 scans e resolução de 4 cm^{-1} . Foi utilizado o FTIR-ATR, modo de refletância total atenuada, se baseia em um feixe de radiação que passa de um meio mais denso (cristal de ATR) para um meio menos denso (amostra), no qual ocorre reflexão. Para a realização desta análise foram pesados aproximadamente 3 mg dos hidrogéis, biocompósitos e nanoHa na forma de pó.

3.3.4. ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA (EDS)

O sistema EDS usa uma microssonda acoplada ao MEV, a qual permite uma análise química semi-quantitativa dos elementos presentes na amostra. Esta técnica permite também o mapeamento da distribuição dos componentes químicos na amostra. Neste trabalho, esta técnica foi empregada com uso do detector Bruker, controlado pelo Software Quantax CrystAlign, acoplado ao MEV FEG Quanta FEG 250.

3.3.5. DIFRAÇÃO DE RAIO-X (DRX)

A técnica de DRX permite a obtenção de difratogramas que permite a caracterização do grau de cristalinidade da amostra e os parâmetros de rede da mesma. No presente trabalho foi utilizado o difratômetro modelo D8 Advance do fabricante Bruker-AXS, radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,54060 \text{ \AA}$), temperatura ambiente, 40 kV e corrente de 30 mA. A faixa de análise para os polímeros ficou entre $2\theta = 5^\circ$ a 60° e para a nanohidroxiapatita entre $2\theta = 10^\circ$ a 70° com o passe de 0,02. O software X'Pert Data Viewer foi utilizado para determinar a área do halo amorfo e dos picos cristalinos para estimar o grau de cristalinidade dos hidrogéis, este programa também foi utilizado o refinamento pelo método de Rietveld no difratograma da nanoHa. Foi utilizado o método descrito por de Ruland (1961), no qual aplica-se a seguinte equação para determinar o grau de cristalinidade:

$$X_c = A_c / (A_c + A_a) \times 100 \quad \text{EQ. 2}$$

onde A_c representa a soma das áreas dos picos cristalinos e A_a corresponde à área do halo amorfo.

Todas as amostras foram maceradas para obtenção de pós finos para não apresentarem uma orientação preferencial.

3.3.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para realização desta análise foi necessária a preparação das amostras, visto que o MEV disponível não dispunha do modo ambiental. Cada amostra de hidrogel e biocompósito permaneceram durante 24 horas em água deionizada, para que apresentassem alto grau de intumescimento, em seguida foram transferidas para um eppendorf e colocadas rapidamente sobre o nitrogênio líquido durante aproximadamente 1 minuto. Posteriormente, foram liofilizadas durante 3 dias, para completa remoção da água.

A amostra de nanoHa foi colocada em um béquer com aproximadamente 15 mL de etanol e levada ao banho de ultrassom por 15 min. A seguir, gotejou-se em um

vidro de relógio algumas gotas desta solução, que posteriormente foi seca em uma estufa, obtendo assim um pó disperso sobre o vidro de relógio. Colocou-se um pedaço da fita de carbono no vidro para essas partículas dispersas aderissem a ela.

Por meio da MEV obteve-se a morfologia das amostras. Como os polímeros sintetizados e a nanohidroxiapatita não são condutores, foi necessário o recobrimento com um filme de platina para as análises da nanoHa e hidrogéis, e de ouro para as análises dos biocompósitos.

O equipamento utilizado foi MEV FEI Quanta FEG 250, parametrizado e ajustado conforme as características individuais de cada amostra. Na operação, a voltagem utilizada variou de acordo com a amostra, pois algumas apresentaram carregamento. A distância de trabalho foi de aproximadamente 9,0 mm.

3.3.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A caracterização das estruturas das nanoHAs, foi conduzida empregando a microscopia eletrônica de transmissão (MET), com um microscópio eletrônico Jeol, modelo Jem-2100, operando em 100 KeV. Esta técnica é de grande importância para a caracterização de amostras em escala nanométrica. No MET foi possível obter resolução da ordem de nanômetros, além de obter imagens por difração de elétrons em área selecionada (select area electron diffraction - SAED) para ter-se as informações sobre cristalinidade e orientações dos planos cristalinos da amostra.

Para a realização desta análise a amostra foi preparada da seguinte forma: adicionou-se 8mg de nanoHA em aproximadamente 10 mL de etanol, a solução foi colada no banho de ultrassom por 10 minutos para dispersão dos agregados das nanopartículas. Em seguida, gotejou-se uma gota dessa solução sobre a grade de cobre, a qual foi levada a estufa por 10 minutos.

3.3.8. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A investigação por TGA permite realizar o monitoramento da porcentagem de perda de massa ou degradação de uma determinada amostra em função da temperatura ou velocidade de aquecimento, esta técnica também permite a medição da estabilidade térmica. Aproximadamente de 5,0 mg de cada amostra foram pesadas e colocadas em uma cápsula de platina e colocadas no aparelho (Analisador Termogravimétrico TA Instruments TGA Q500). Os compostos foram submetidos à temperaturas entre 25 à 700 °C, com velocidade de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera de nitrogênio.

3.3.9. DERIVADA DA ANÁLISE DE TG (DTG)

É a primeira derivada feita da curva fornecida pela TG, ou seja, a derivada da variação da massa em relação ao tempo (dm/dt), o que permite melhor visualização dos eventos ocorridos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RESULTADO GERAL

Com a metodologia adaptada de Queiroz (2010) foi possível obter todos os hidrogéis. A nanohidroxiapatita foi obtida com base na metodologia proposta por Bigi *et al.* (2004). Os biocompósitos foram obtidos com base na metodologia descrita por Ribeiro *et al.* (2017).

Durante a síntese observou-se que durante a gelificação ocorreu alteração da cor da solução, a qual inicialmente era transparente e ficou branca (figura 4.1). Macroscopicamente, notou-se também uma morfologia diferente entre os hidrogéis sintetizados com e sem agitação. Nos hidrogéis sintetizados sem agitação, ocorreu a formação de um filme e nos hidrogéis sintetizados com agitação, a formação de pequenos aglomerados. As metodologias de síntese influenciaram em alguns resultados da difração de raios-x e na morfologia comprovada pela MEV. Entretanto, todos os hidrogéis apresentaram as mesmas bandas no espectro de FTIR. Na análise por RMN, os hidrogéis apresentaram sinais em regiões semelhantes, demonstrando se tratar de materiais com a mesma composição química. Também foi possível caracterizar e determinar o tamanho aproximado das nanopartículas de hidroxiapatita, e obteve-se seu padrão de difração utilizando a técnica de SAED.

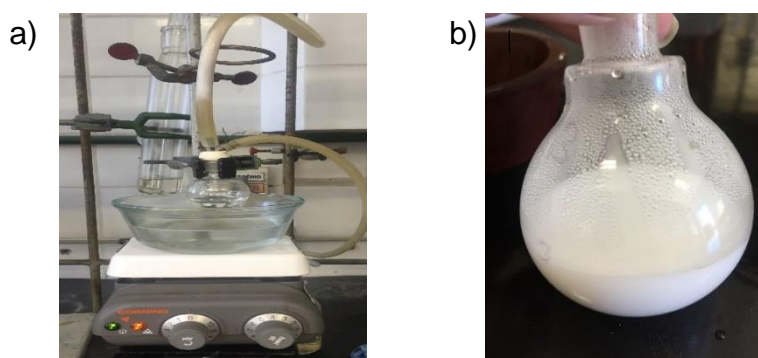


Figura 4.1: Montagem do sistema usado na síntese do hidrogel H3.1. a) Imagem do sistema montado para a síntese do hidrogel antes da gelificação; b) hidrogel após a gelificação.

Os biocompósitos apresentaram características macroscópicas semelhantes aos hidrogéis sintetizados. Foi possível observar por meio dos resultados de FTIR que os biocompósitos apresentaram em seus espectros as bandas do hidrogel e da nanoHA. No difratograma de raios-X, observou-se dois halos amorfos característica do hidrogel e os picos referentes a nanoHA. Por meio do EDS foi possível realizar o mapeamento da composição química com os elementos cálcio e fosforo distribuídos na estrutura dos géis.

4.2 GRAU DE INTUMESCIMENTO

Na figura 4.2 a variação do intumescimento dos hidrogéis em função do tempo. Pode-se observar o comportamento oscilatório de inchar-desinchar dos hidrogéis, que se tornou cada vez menos pronunciada com o tempo. Observou-se, uma menor taxa de oscilação para os hidrogéis que foram aquecidos a temperaturas superiores ao LCST, do que para a temperatura ambiente. Isso se deve a característica do hidrogel se reorganizar e se tornar menos hidrofílico às temperaturas superiores a 33 °C.

A cinética de hidratação-desidratação dos hidrogéis H2.1 e H4, mostrou que tanto na temperatura ambiente quanto no aquecimento, a curva da capacidade de inchamento tende a se tornar constante após 60 minutos. Os hidrogéis H2.1 e H4 apresentaram as menores variações da capacidade de intumescimento, provavelmente isso se deve ao fato de possuírem maior concentração de iniciadores redox.

Os hidrogéis H1 e H1.1 foram os que apresentaram maior capacidade de intumescimento e a maior variação dessa capacidade com a variação da temperatura. Este comportamento pode ser associado a menor concentração de MBA presente em suas estruturas poliméricas; quanto menor a concentração do agente reticulante, menos rígido se torna o hidrogel, ou seja, maior será sua capacidade de inchamento.

Os resultados mostraram que a agitação durante a síntese influenciou no comportamento do hidrogel. Com o emprego da agitação os hidrogéis apresentaram

maior oscilação na capacidade de intumescimento somado a maiores valores dessa capacidade.

Os hidrogéis sintetizados sem agitação, em sua maioria, apresentaram uma oscilação tendendo a zero após 60 minutos e uma menor variação da capacidade de intumescimento comparado com a variação da temperatura.

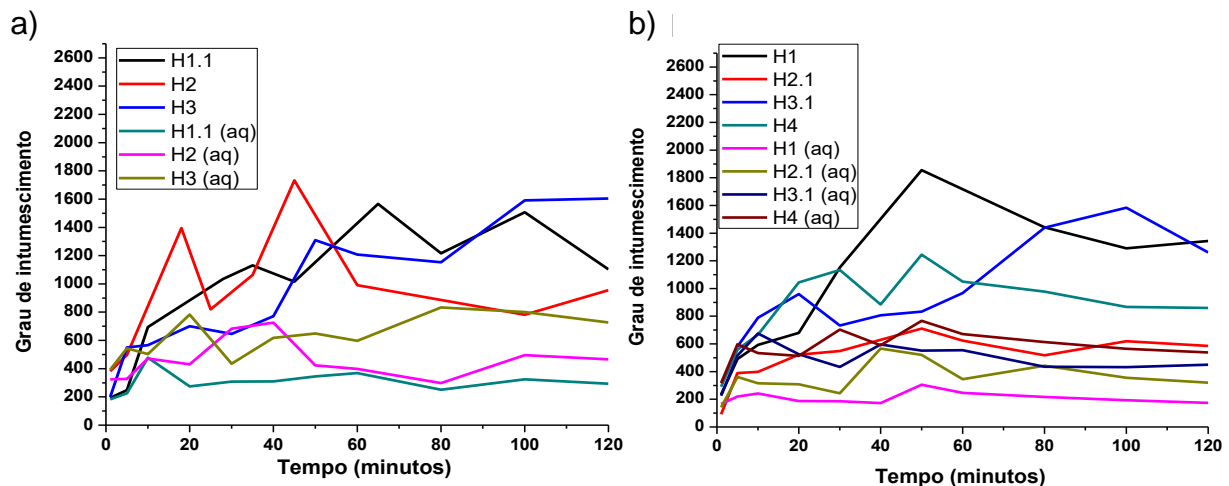


Figura 4.2: Variação do intumescimento dos hidrogéis a temperatura ambiente e com aquecimento acima de 37°C (aq). (a) hidrogéis sintetizados com agitação; (b) hidrogéis sintetizados sem agitação.

Os biocompósitos apresentaram um grau oscilatório de inchar-desinchar menor do que os hidrogéis (figura 4.3). Este comportamento possivelmente ocorre por causa da ocupação das nanoHas na estrutura dos géis. A influência da concentração do agente reticulante continuou válida para os biocompósitos, visto que tanto o HN1.0.3 quanto o HN1.1.3 mantiveram-se com o maior grau de inchamento e maior variação deste propriedade em relação a temperatura. O HN1.1.3 e HN2.0.3 APÓS 60 minutos, apresentaram o mesmo comportamento. Após 40 minutos de aquecimento, todos os biocompósitos apresentaram um comportamento com a oscilação da capacidade de intumescimento tendendo a zero, demonstrando assim, uma cinética de hidratação mais estável.

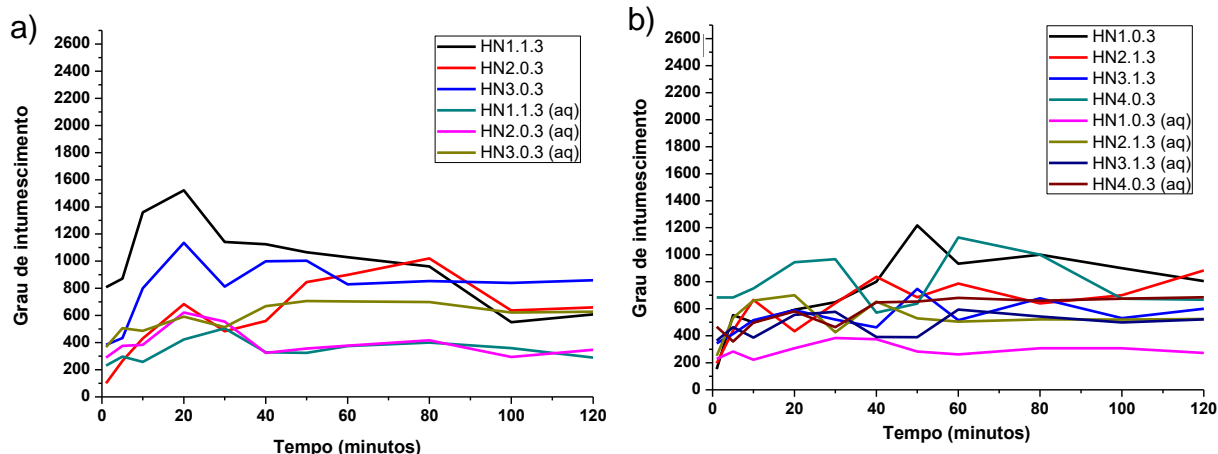


Figura 4.3: Variação do intumescimento dos biocompósitos a temperatura ambiente e com aquecimento acima de 37°C (aq). (a) hidrogéis sintetizados com agitação; (b) hidrogéis sintetizados sem agitação.

4.3 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Somente as análises por RMN de ^1H dos hidrogéis H1, H2.1, H3.1 e H4 foram realizadas, uma vez que os demais hidrogéis não se solubilizaram no solvente para possibilitar esta análise. Na tabela 4.1 são apresentados os valores encontrados para os deslocamentos químicos (δ), a razão de integração e desdobramentos referentes aos hidrogênios presentes nos compostos.

Tabela 4.1: Resultados das análises dos espectros de ^1H RMN (500MHz, D₂O) para os hidrogéis H1, H2.1, H3.1, H4.

Hidrogel	Deslocamento Químico (ppm)	Razão de integração/ nº de hidrogênio envolvidos	multiplicidade
H1	1,22	6,04/6	multipleteo
	1,66	1,89/2	multipleteo
	2,09	1,17/1	multipleteo
	3,98	1,00/1	multipleteo
H2.1	1,08	6,00/6	multipleteo
	1,64	2,19/2	multipleteo
	1,96	1,17/1	multipleteo
	3,83	1,16/1	multipleteo
H3.1	1,22	5,93/6	multipleteo
	1,78	1,98/2	multipleteo
	2,10	1,33/1	multipleteo
	3,97	1,00/1	multipleteo
H4	1,21	6,00/6	multipleteo
	1,68	2,32/2	multipleteo
	2,11	1,12/1	multipleteo
	3,98	0,85/1	multipleteo

Na tabela 4.1, pode-se observar que o deslocamento químico apresentado entre os hidrogéis são semelhantes. Este resultado era esperado, pois a região em que os hidrogênios se encontram não difere entre os hidrogéis sintetizados. Como os espectros de RMN não diferem muito entre si, o espectro de RMN do H1, é apresentado como exemplificação na figura 4.4. Observa-se um multipleteo, com a área de integração para os 6 hidrogênios em 1,23 ppm, os quais são referentes aos hidrogênios do grupo metila (-CH₃). O multipleteo em 1,66 ppm é característicos dos hidrogênios do grupo metileno (-CH₂), o multipleteo em 2,09 ppm é para o hidrogênio vizinho ao oxigênio do grupo amida, e o multipleteo em 3,98 ppm, refere-se ao hidrogênio vizinho ao nitrogênio do grupo amida. O hidrogênio da amida não

apareceu no espectro, provavelmente por estar associado aos hidrogênios trocáveis do solvente D₂O, o que acarreta em uma pequena intensidade de sinal. (PAVIA *et al.*, 2010)

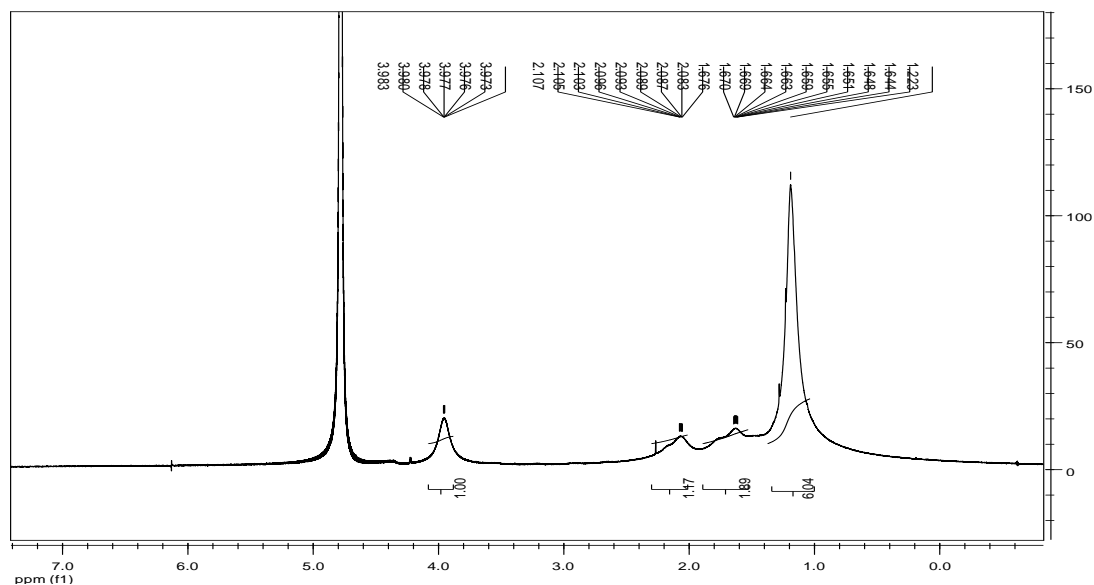


Figura 4.4: Espectro de RMN ¹H (500MHz, D₂O) do hidrogel H1.

Na figura 4.5 são apresentados os espectros no FTIR em ATR dos hidrogéis PNIPAAm. No anexo 8.1 encontram-se os espectros individuais dos hidrogéis. Com base no espectro dos hidrogéis, nota-se que todos apresentaram as mesmas bandas características. A presença de bandas características em 3285 cm⁻¹ é associada ao estiramento e em 1532 cm⁻¹ à deformação angular da ligação N-H da amida secundária. A banda em 3080 cm⁻¹ é referente ao desdobramento da ligação N-H. A falta de um pico entre 1675 - 1645 cm⁻¹, que seria referente à ligação C=C, descartam a possibilidade da presença do reagente NIPAM no hidrogel. As bandas em 2865, 2930 e 2969 cm⁻¹ são referentes ao estiramento C-H. A banda em 1635 cm⁻¹ é característica do estiramento C=O da carbonila da amida. A deformação angular da ligação C-H da metila e do grupo isopropílico encontram-se em 1469 e 1363 cm⁻¹, respectivamente.

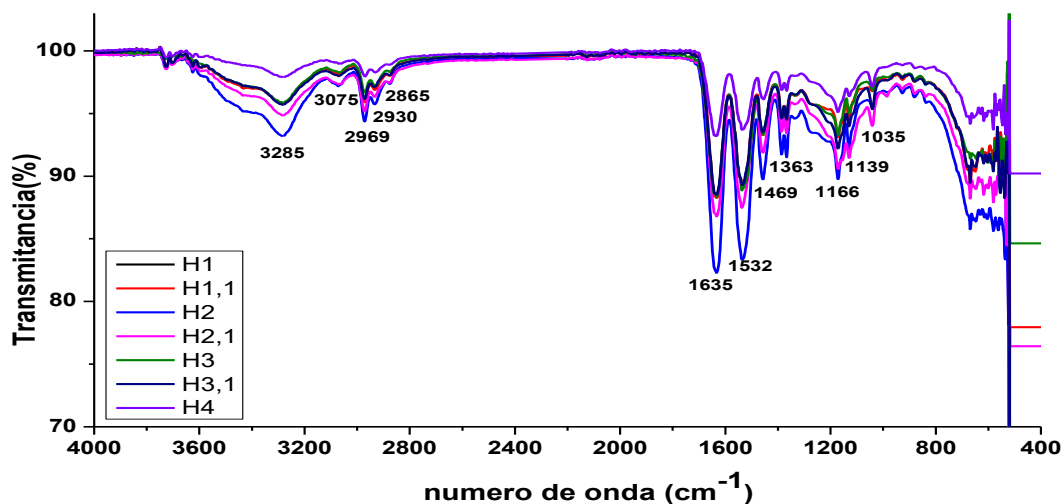


Figura 4.5: Espectro de absorção no infravermelho dos hidrogéis de PNIPAAm.

O espectro de absorção no infravermelho para a nanohidroxiapatita é apresentado na figura 4.6. A pequena banda em 3428 cm^{-1} corresponde à vibração dos íons OH^- livres, que não participam de ligações secundárias. A banda larga em 3222 cm^{-1} , corresponde aos modos de deformação axial da hidroxila na ligação hidrogênio. As bandas em $560, 603\text{ cm}^{-1}$ referem-se à deformação anti-simétrica do $\nu_4\text{ PO}_4^{3-}$. As bandas em 1020 e 1095 cm^{-1} são atribuídas à vibração dos grupos $\nu_3\text{ PO}_4^{3-}$. Os comprimentos de onda em $1331, 1394$ e 822 cm^{-1} são característicos da vibração CO_3^{2-} . A presença da vibração CO_3^{2-} pode ter sido favorecida pela metodologia usada na síntese e sua presença pode causar redução no tamanho dos cristais e aumento da solubilidade do material. As bandas vibracionais encontradas se assemelham as relatadas por Silversetin (2007), Poinern (2012) e Chandrasekaran (2013), que caracterizam a nanoHa.

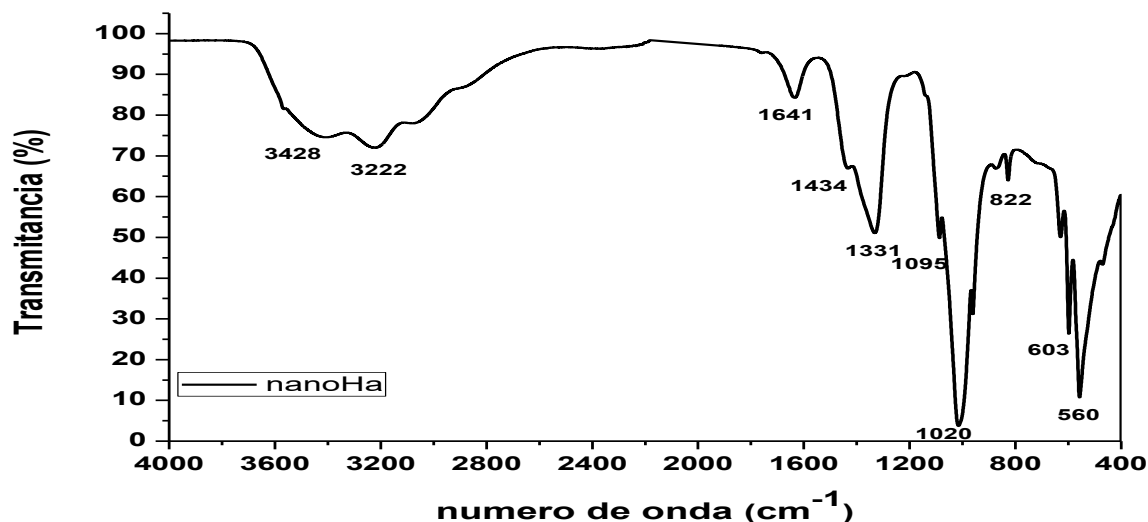


Figura 4.6: Espectro de absorção no infravermelho da nanohidroxiapatita.

Os espectros de FTIR dos biocompósitos (figura 4.7) mostraram o somatório das bandas dos hidrogéis com a da nanoHA. As bandas características da nanoHA são em 1099 e 1028 cm^{-1} referentes às vibrações dos grupos fosfatos $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$. As bandas em 602 e 563 cm^{-1} referem-se aos modos de deformação anti-simétrica do PO_4^{3-} . Em 3438 cm^{-1} a pequena banda corresponde à vibração dos íons OH^- . Em 876 cm^{-1} a pequena banda é característica da vibração CO_3^{2-} . As bandas características dos hidrogéis são: 3287 cm^{-1} associada ao estiramento e em 1539 cm^{-1} à deformação angular da ligação N-H da amida secundária. A banda em 3077 cm^{-1} é referente ao desdobramento da ligação N-H. As bandas em 2966, 2933 e 2865 cm^{-1} são referentes ao estiramento C-H. A banda em 1630 cm^{-1} é característica do estiramento C=O da carbonila da amida. A deformação angular da ligação C-H da metila e do grupo isopropílico encontram-se em 1457 e 1375 cm^{-1} , respectivamente. Nota-se extrema semelhança nos valores encontrados nos espectros das figuras 4.5 e 4.6 com o espectro da figura 4.7, indicando que os biocompósitos foram sintetizados com sucesso. No anexo 8.2 são apresentados os espectros individuais dos biocompósitos.

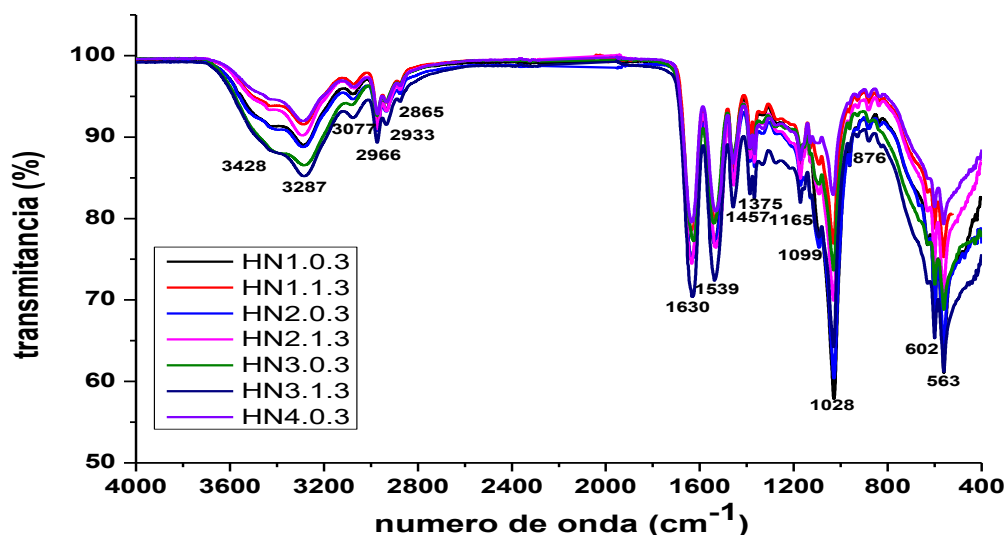


Figura 4.7: Espectro de absorção no infravermelho dos biocompósitos de PNIPAAm e nanoHa.

Pode ser observado na figura 4.8 o somatório das bandas da nanoHA com o hidrogel. Nesta figura é possível identificar a sobreposição dos espectros de FTIR do H1, HN 1.0.3 e nanoHa, porém apresentam intensidades diferentes. Neste espectro é possível observar uma banda larga em aproximadamente 3287cm^{-1} , a qual é referente ao estiramento da ligação da amida secundária e não das hidroxilas associadas a nanoHa. Na figura é possível também identificar a diminuição da banda referente ao grupo carbonato em 876cm^{-1} .

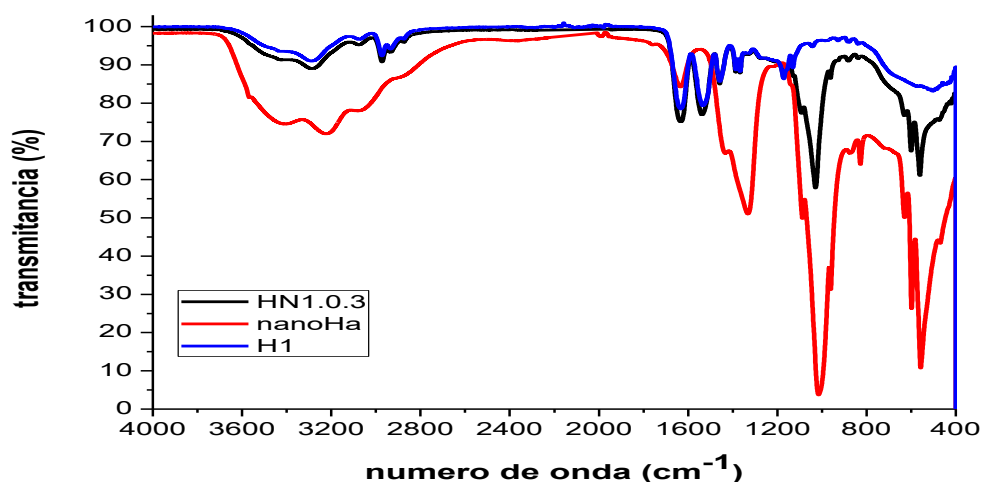


Figura 4.8: Espectro de absorção no infravermelho do biocompósito HN1.0.3, do hidrogel H1 e da nanoHa.

Os resultados das análises qualitativa com EDS mostraram que todos os hidrogéis apresentaram em sua composição o carbono, oxigênio e platina (material de recobrimento). A não detecção de outros elementos químicos, indica a ausência de impurezas oriundas da síntese. Os hidrogéis H4 e H3 não apresentaram nitrogênio em sua composição, provavelmente por serem muito porosas e a quantidade de nitrogênio não foi suficiente para detecção. A figura 4.9 apresenta a exemplificação do espectro de EDS do H1.1.

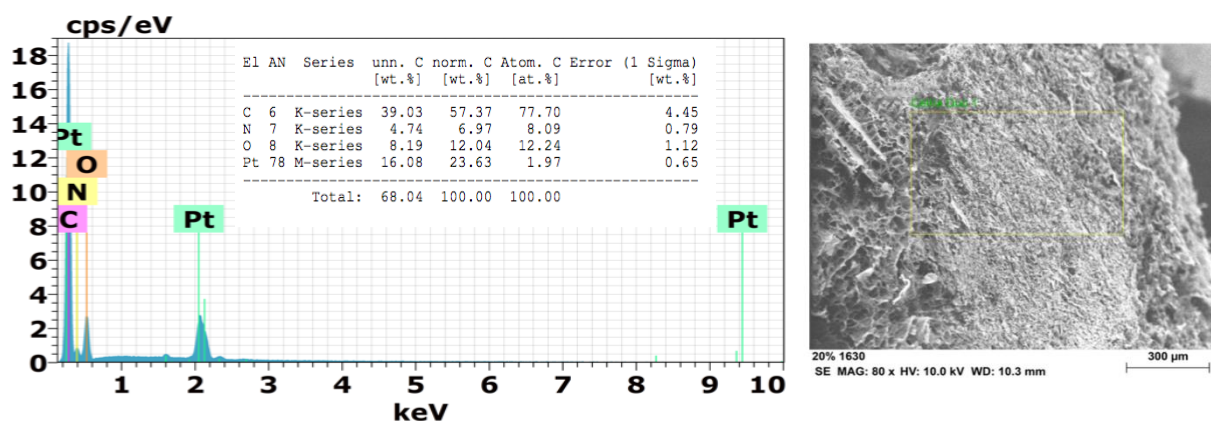


Figura 4.9: Espectro obtido na análise com EDS, tabela da composição química e imagem da região onde foi realizada a análise do hidrogel H1.1.

A figura 4.10 trás o espectro de EDS da análise da nanohidroxiapatita e os percentuais de cálcio, fósforo e oxigênio. Nota-se também uma pequena quantidade de carbono, isso ocorre devido à presença de CO_3^{2-} já comprovada pela análise de FTIR.

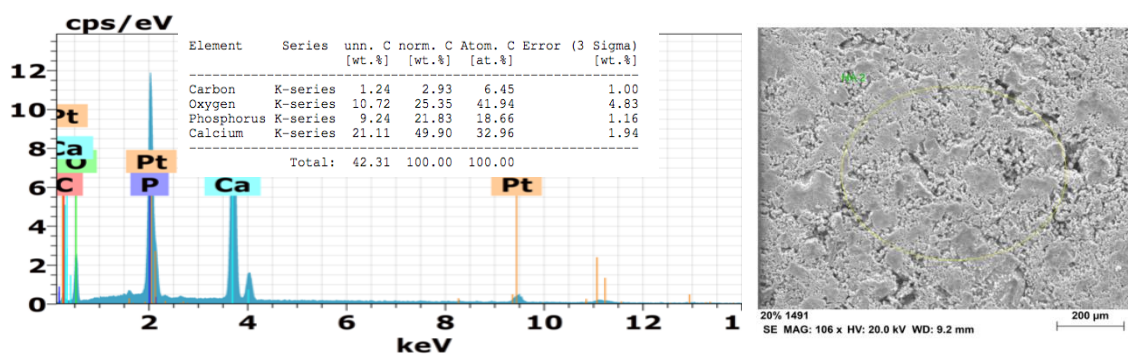


Figura 4.10: Espectro obtido na análise com EDS, tabela da composição química e imagem da região onde foi realizada a análise da nanohidroxiapatita.

O espectro de EDS apresentado na figura 4.11 é análise do biocompósito HN3.0.3. Nesta análise foi utilizado um filme de ouro para a obtenção do espectro. Observa-se a presença de cálcio e fósforo. A presença de carbono e oxigênio podem estar relacionadas tanto à composição do hidrogel quanto da nanoHA.

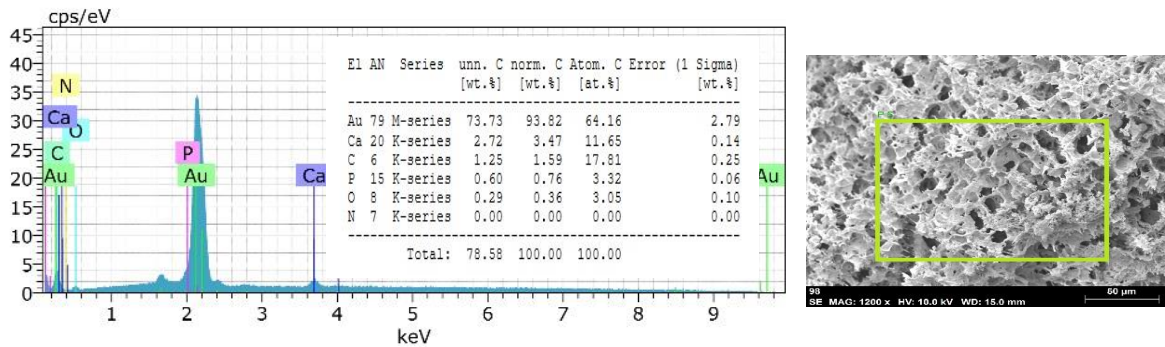


Figura 4.11: Espectro obtido na análise com EDS, tabela da composição química e imagem da região onde foi realizada a análise do HN3.0.3.

Nas figuras 4.12 à 4.17 são mostrados os mapeamentos das composições químicas dos biocompósitos realizados com EDS. Nos espectros é possível identificar a presença do cálcio em rosa, fósforo em verde, oxigênio em laranja e carbono em vermelho. Apesar da presença destes elementos (Ca, P, O e C) terem sido identificadas em todos os biocompósitos, a distribuição do cálcio e fósforo foi mais homogênea, exceto nos biocompósitos HN1.0.3, HN1.1.3, HN2.1.3 e HN4.0.3 em que a distribuição foi mais heterogênea.

Os biocompósitos HN2.0.3 e HN3.0.3 apresentaram regiões com aglomerados de fósforo e/ou cálcio.

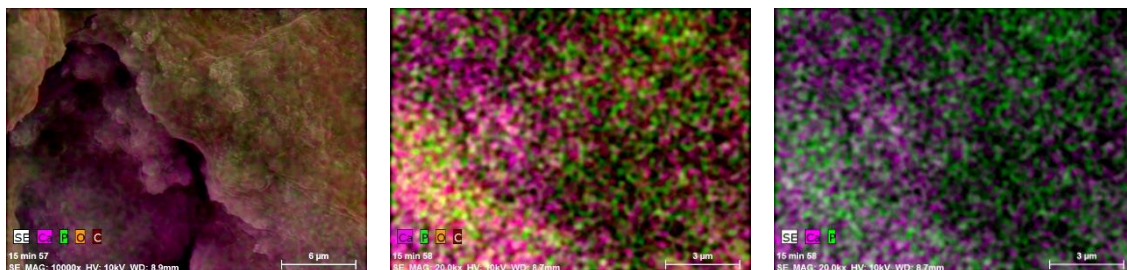


Figura 4.12: Mapeamento da composição química do biocompósito HN1.0.3 com identificação da distribuição do cálcio (rosa), fósforo (verde), oxigênio (laranja) e carbono (vermelho). Aumentos de 10.000x e 20.000x.

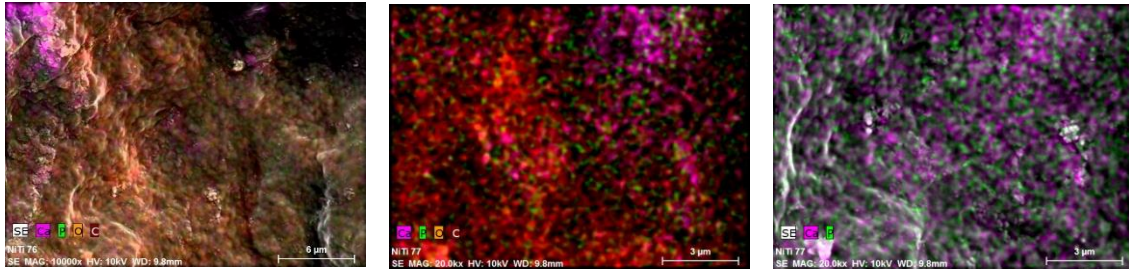


Figura 4.13: Mapeamento da composição química do biocompósito HN1.1.3 com identificação da distribuição do cálcio (rosa), fósforo (verde), oxigênio (laranja) e carbono (vermelho). Aumentos de 10.000x e 20.000x.

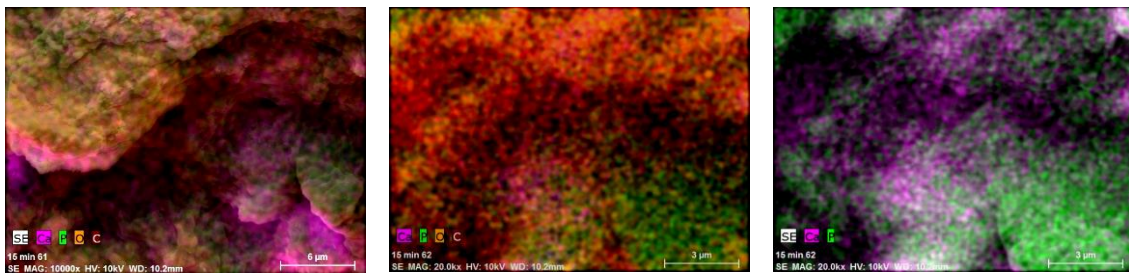


Figura 4.14: Mapeamento da composição química do biocompósito HN2.0.3 com identificação da distribuição do cálcio (rosa), fósforo (verde), oxigênio (laranja) e carbono (vermelho). Aumentos de 10.000x e 20.000x.

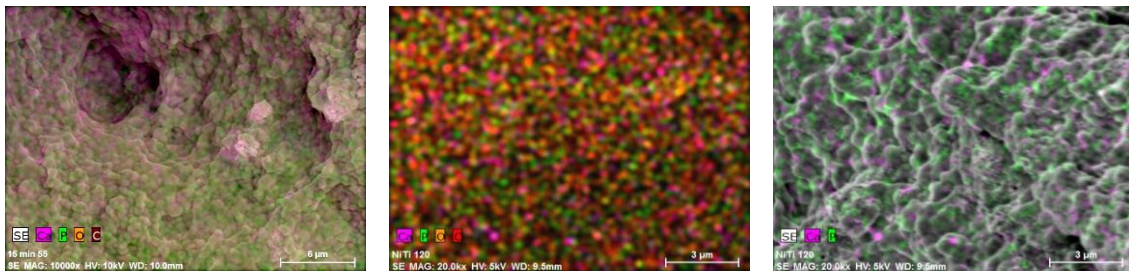


Figura 4.15: Mapeamento da composição química do biocompósito HN2.1.3 com identificação da distribuição do cálcio (rosa), fósforo (verde), oxigênio (laranja) e carbono (vermelho). Aumentos de 10.000x e 20.000x.

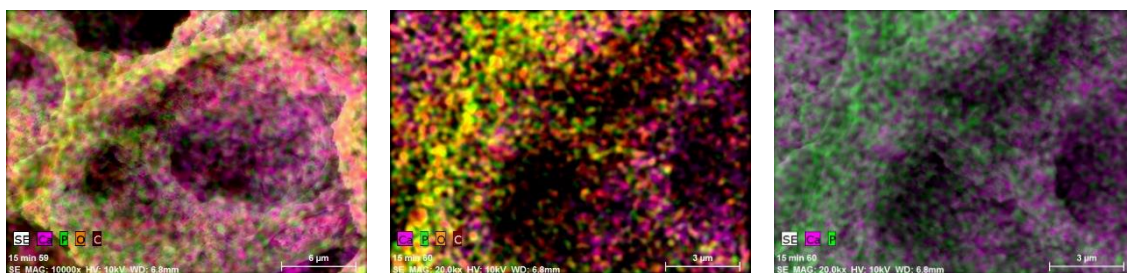


Figura 4.16: Mapeamento da composição química do biocompósito HN3.0.3 com identificação da distribuição do cálcio (rosa), fósforo (verde), oxigênio (laranja) e carbono (vermelho). Aumentos de 10.000x e 20.000x.

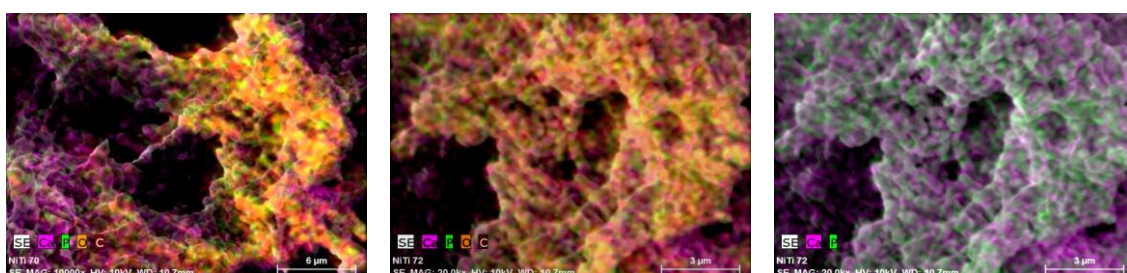


Figura 4.17: Mapeamento da composição química do biocompósito HN4.0.3 com identificação da distribuição do cálcio (rosa), fósforo (verde), oxigênio (laranja) e carbono (vermelho). Aumentos de 10.000x e 20.000x.

4.4 ANÁLISE MICROESTRUTURAL

Com base nos difratogramas mostrados na figura 4.18, pode-se observar que todos os hidrogéis apresentaram um halo amorfo, característico do PNIPAAm. Observou-se também, o aparecimento de picos cristalinos para os hidrogéis H2.1, H3.1 e H4. Os espectros mostram que estes hidrogéis possuem regiões semi-cristalinas, resultados estes que não são citados pela literatura. Assim, para estes hidrogéis foi determinado o grau de cristalinidade utilizando o método de Ruland, e encontrou-se os valores de 7,3, 5,5 e 5,6% para os hidrogéis H2.1, H3.1 e H4, respectivamente. No anexo 8.3 são apresentados os difratogramas individuais dos hidrogéis.

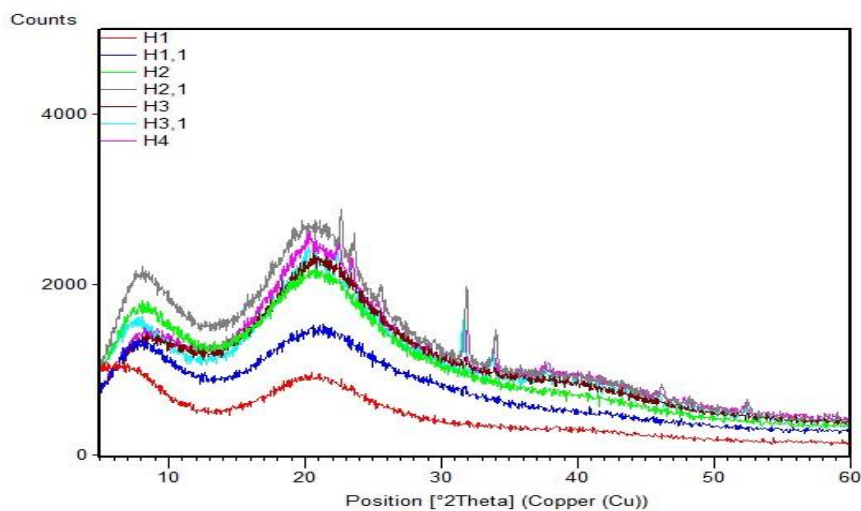


Figura 4.18: Difratoograma de raios-x dos hidrogéis de PNIPAAm.

Na figura 4.19 é apresentado o difratograma da nanohidroxiapatita. Utilizou-se a ficha cristalográfica 26205- ICSD reportado por Sudarsanan e Young (1969) e disponível na base de dados do Portal da CAPES (Inorganic Crystal Structure Database), para o refinamento de Rietveld, no qual o *goodnees* alcançado foi de 2,537. Esta ficha se refere a hidroxiapatita hexagonal, pode-se observar que todos os picos são semelhantes aos apresentados no banco de dados (em verde). Os picos estreitos e mais intensos em $2\theta = 25,9^\circ$, $31,8^\circ$ e $32,9^\circ$ para os planos (002; 211; 300) são característicos do cristal hexagonal. Tanto os planos quanto a forma do difratograma se assemelham ao apresentado por Poinern (2012).

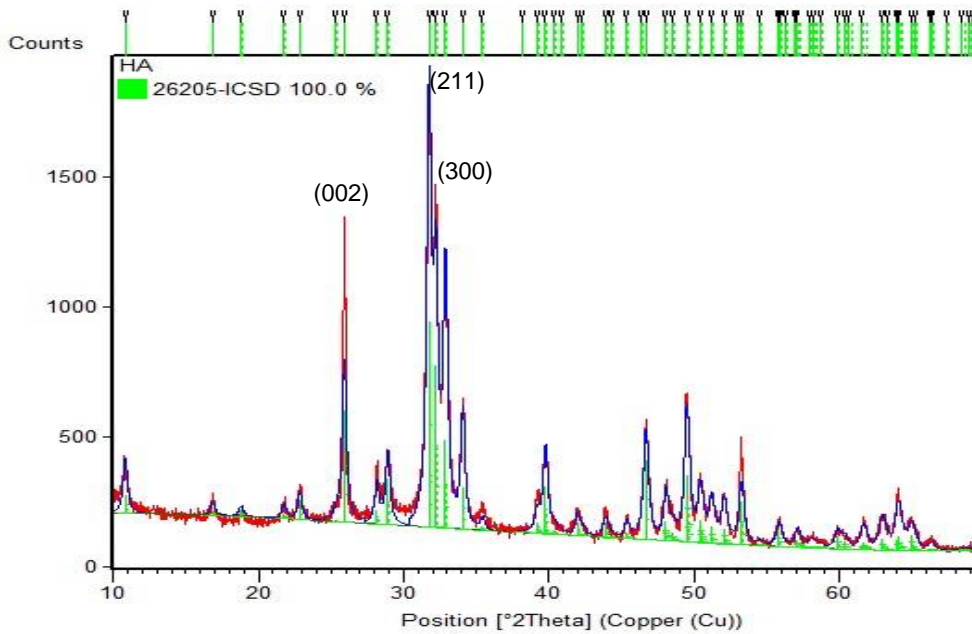


Figura 4.19: Difratoograma de raios-x da nanohidroxiapatita.

Os difratogramas dos biocompósitos são apresentados na figura 4.20. A presença de dois halos amorfos nos difratogramas são característicos do hidrogel PNIPAAm, diferente do observado para os hidrogéis H2.1, H3.1 e H4. Os biocompósitos HN2.1, HN3.1 e HN4 não apresentaram picos cristalinos referentes aos hidrogéis. Não houve alteração na estrutura das nanoHa pelo processo de síntese dos biocompósitos. Pode-se observar nos difratogramas mostrados na figura 4.20 que não houve o alargamento ou aumento na intensidade dos picos referentes às nanoHa.

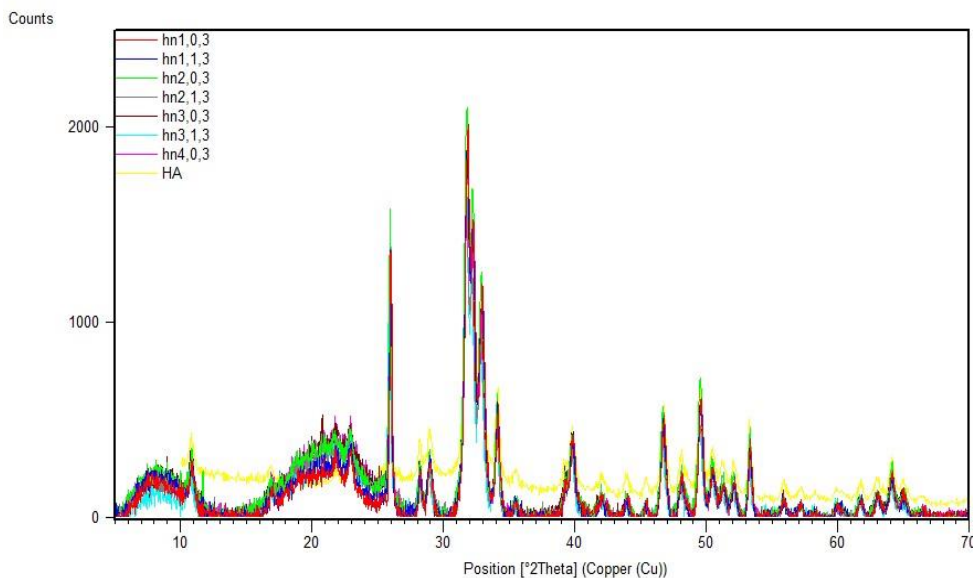


Figura 4.20: Difratoograma de Raios-X dos biocompósitos.

4.5 ANÁLISE MORFOLOGICA

Nas análises das morfologias das diferentes regiões dos hidrogéis mostram que existem diferenças significativas entre elas. Os hidrogéis H2.1, H3.1 e H4, ambos obtidos sem agitação, apresentaram morfologia com estrutura organizada, notando-se formação de uma estrutura lamelar com camadas e cavidades regulares, e com a presença de elevada porosidade nas superfícies das cavidades (figura 4.21, 4.22 e 4.23).

A morfologia do hidrogel H4 apresentou um padrão na formação das camadas, com distância homogênea entre as camadas da ordem de 11 μm (figura 4.23). Nas paredes das camadas foi identificada a presença de uma estrutura globular. A superfície deste hidrogel apresentou elevada rugosidade.

Como as amostras foram preparadas utilizando o método de liofilização, é possível observar pelas imagens de MEV, o rompimento das paredes finas que estariam interconectadas entre as camadas, esse rompimento provavelmente ocorreu devido a metodologia de preparo adotada.

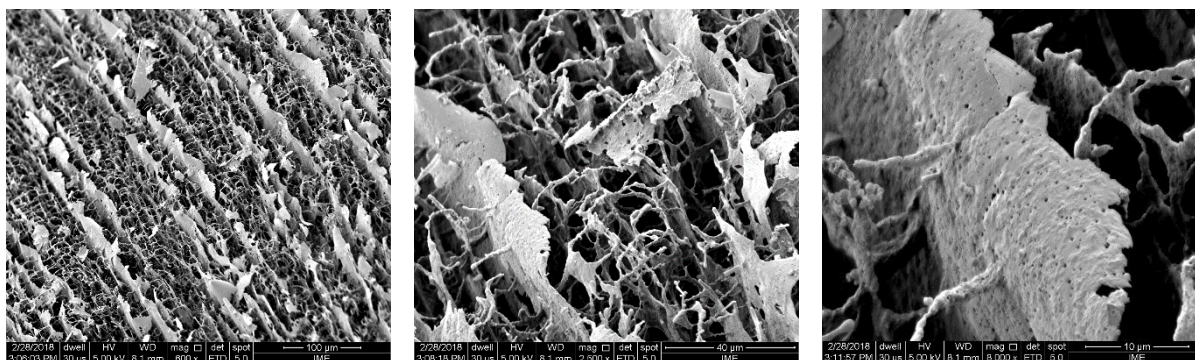


Figura 4.21: Imagens de MEV da seção transversal do H2.1 com vista da superfície, aumentos de 600, 2.500 e 8.000x, respectivamente.

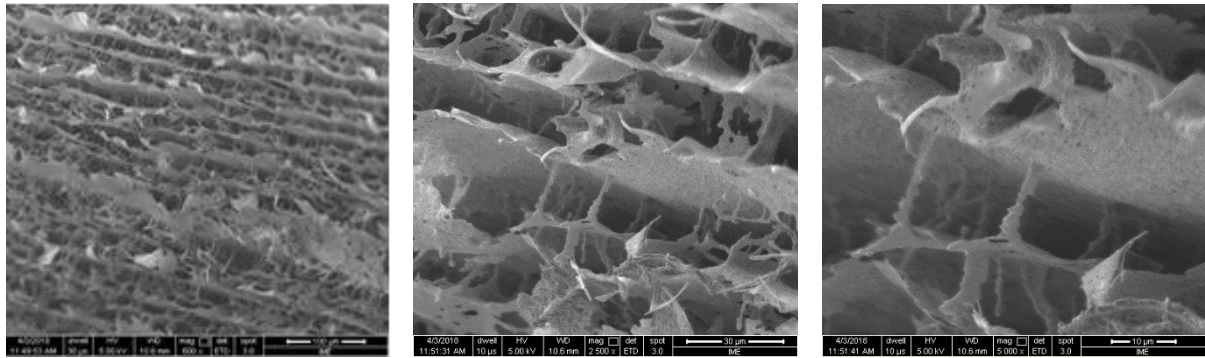


Figura 4.22: Imagens de MEV da seção transversal do H3.1, aumentos de 600, 2.500 e 5.000x, respectivamente.

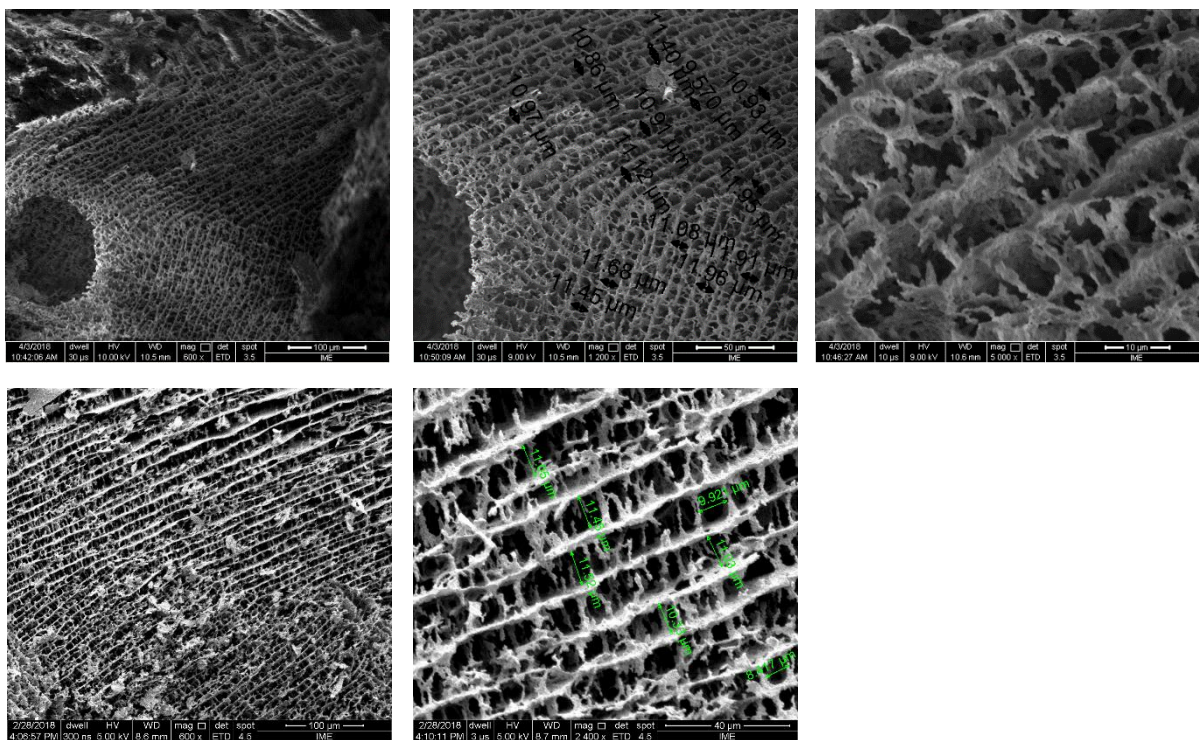


Figura 4.23: Imagens de MEV do H4 em diferentes regiões, com as medidas entre as camadas e aumentos de 600, 1.200, 2.400 e 5.000x, respectivamente.

Embora tenham sido observadas regiões desordenadas nos hidrogéis, os mesmos mantiveram uma morfologia tridimensional com grande número de cavidades e poros na superfície dessas cavidades (figuras 4.24, 4.25 e 4.26).

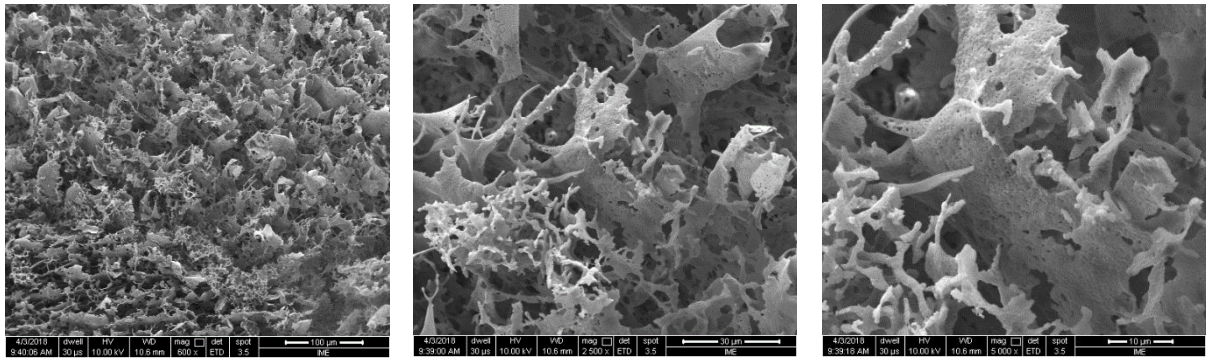


Figura 4.24: Imagens de MEV do H2.1, aumentos de 600, 2.500 e 5.000x, respectivamente.

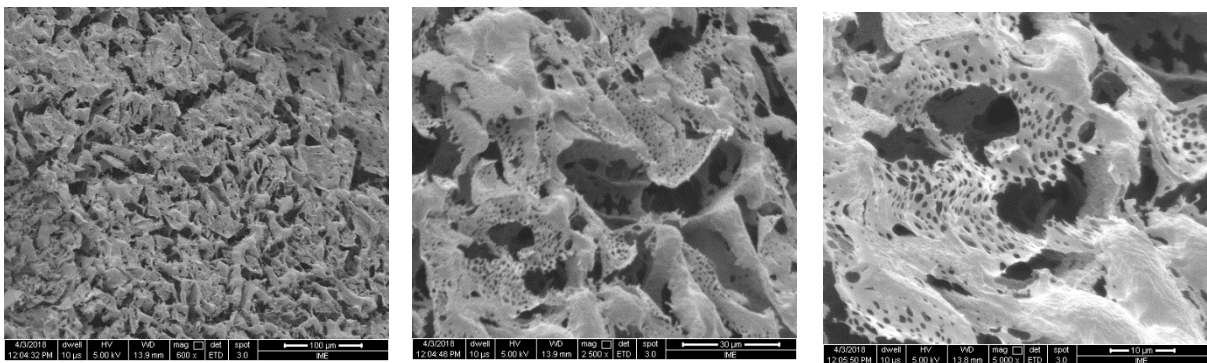


Figura 4.25: Imagens de MEV do H3.1, com as medidas entre as camadas e aumentos de 600, 2.500 e 5.000x, respectivamente.

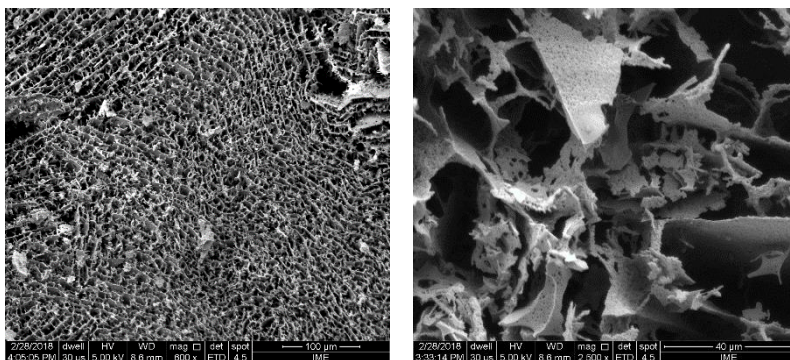


Figura 4.26: Imagens de MEV do H4, aumentos de 600 e 2.500x, respectivamente.

O hidrogel H1, apesar de ter sido sintetizado sem agitação, ele apresentou diferença em relação aos demais. Neste hidrogel não foram regiões organizadas, corroborando com o resultado de DRX em que observou-se a ausência de picos

cristalinos no difratograma. Pode-se observar na figura 4.27, que o H1 apresentou uma morfologia com cavidades de diferentes tamanhos e uma superfície rugosa.

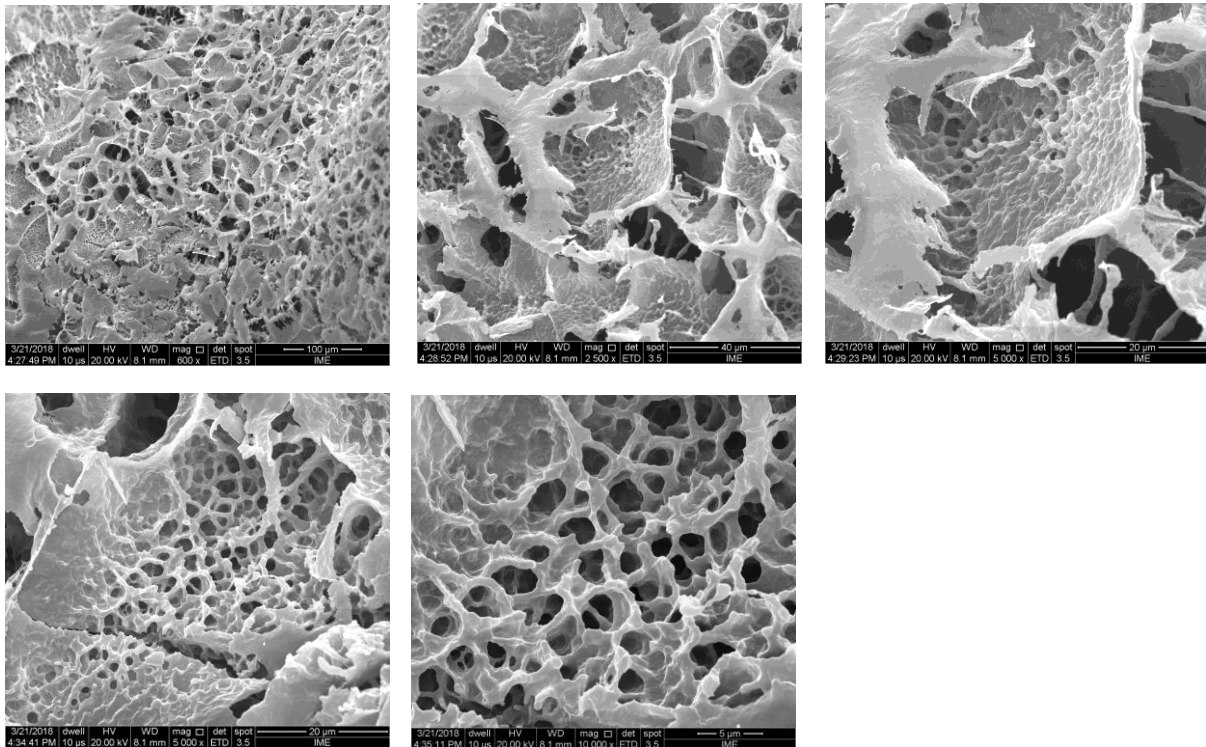


Figura 4.27: Morfologia do hidrogel H1. Aumentos de 600, 2.500, 5.000 e 10.000x, respectivamente.

Os demais hidrogéis apresentaram uma estrutura sem ordenamento e diferenças entre si. Nas figuras 4.28, 4.29 e 4.30 pode-se identificar duas regiões com morfologias distintas, estas regiões foram denominadas como área 1 e 2. O hidrogel H1.1 (fig. 4.28) apresentou cavidades de diversos tamanhos na região 1 e na região 2 foram identificados flakes sobrepostos com ausência de cavidades. O hidrogel H2 (fig. 4.29) possui uma morfologia com característica organizada, com camadas diagonais na região 1 e uma morfologia como se fosse “teias de aranha” entre as cavidades na região 2. No hidrogel H3 (fig. 4.30) foi identificada na região 1 uma superfície globular e morfologia totalmente desorganizada, com cavidades que semelhante a uma esponja; a região 2 foi diferente com uma superfície lisa e com muitas cavidades. Constatou-se que a superfície dos hidrogéis H1.1 e H2 não possuem porosidade.

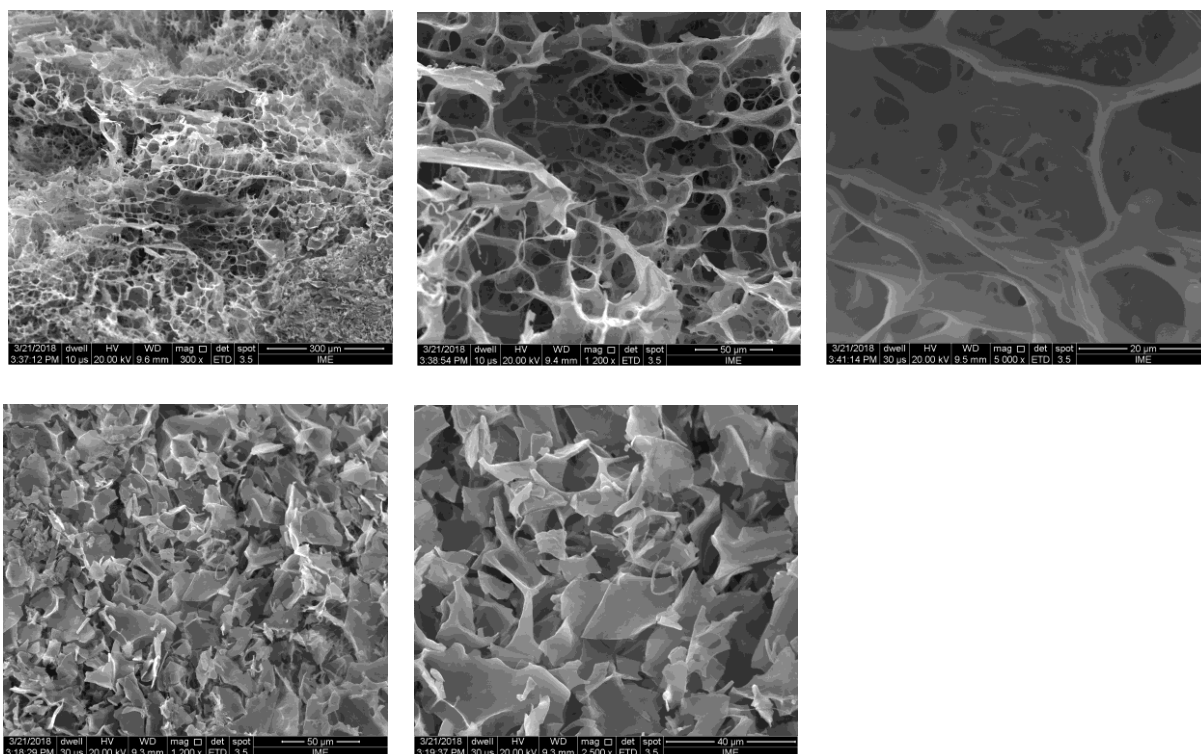


Figura 4.28: Imagens de MEV do H1.1, as três primeiras imagens são referentes a área 1 e as duas últimas referentes a área 2.

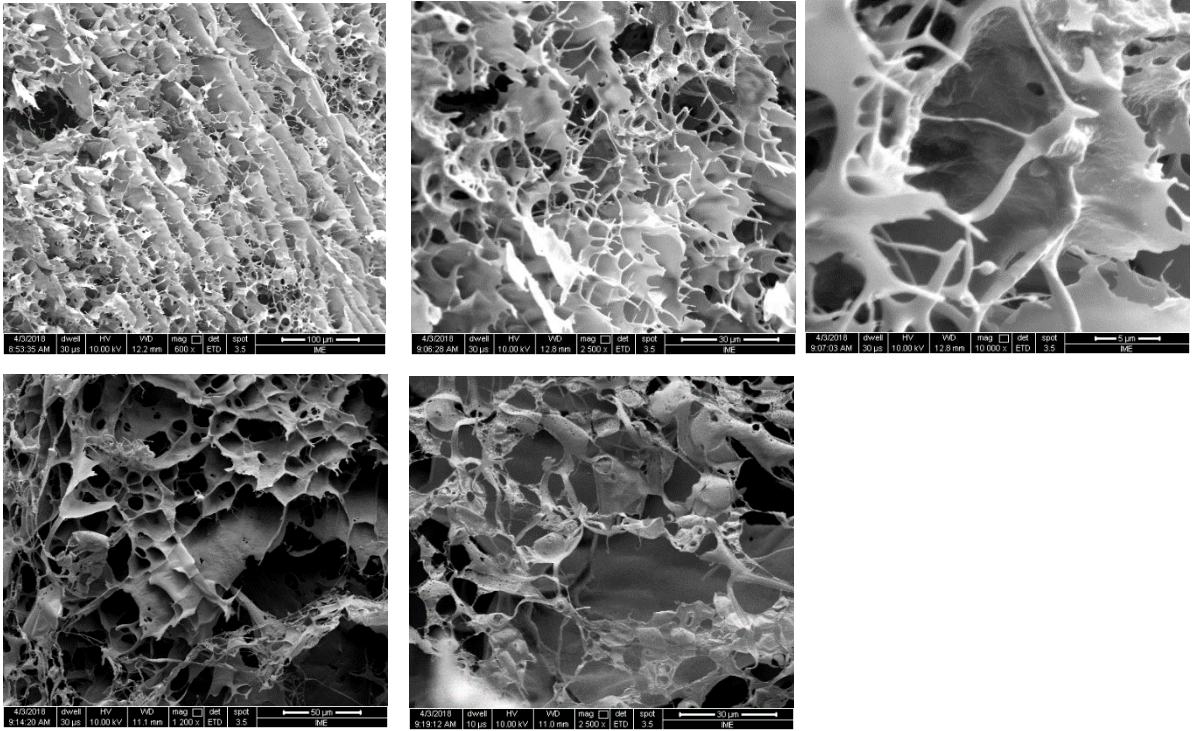


Figura 4.29: Imagens de MEV do H2, as três primeiras imagens são referentes a área 1 e as duas últimas referentes a área 2

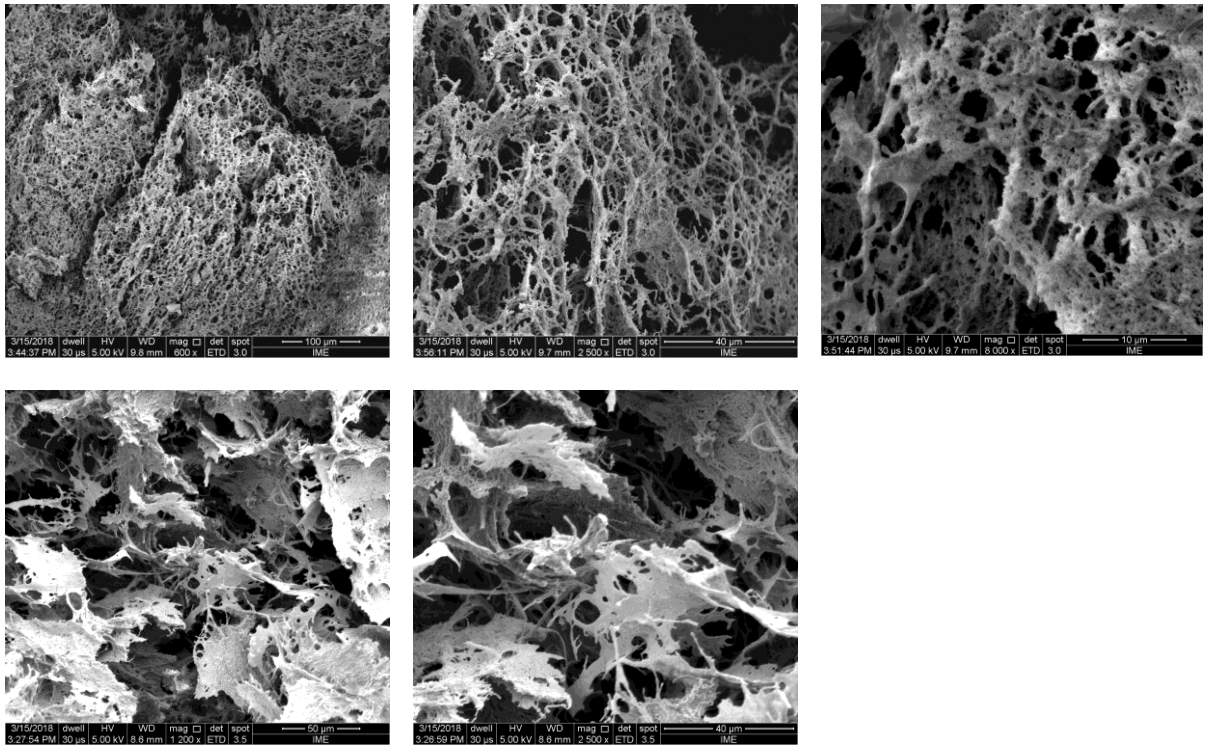


Figura 4.30: Morfologias do hidrogel H3. As três morfologias superiores são da região 1 e as duas inferiores da região 2.

A figura 4.31 mostra as morfologias da nanohidroxiapatita. Pode-se observar a presença de regiões com aglomerados de partículas e em algumas foi possível detectar nanopartículas isoladas. Deve-se destacar as geometrias circulares e em bastões, com o tamanho médio de partícula de aproximadamente 60 nm.

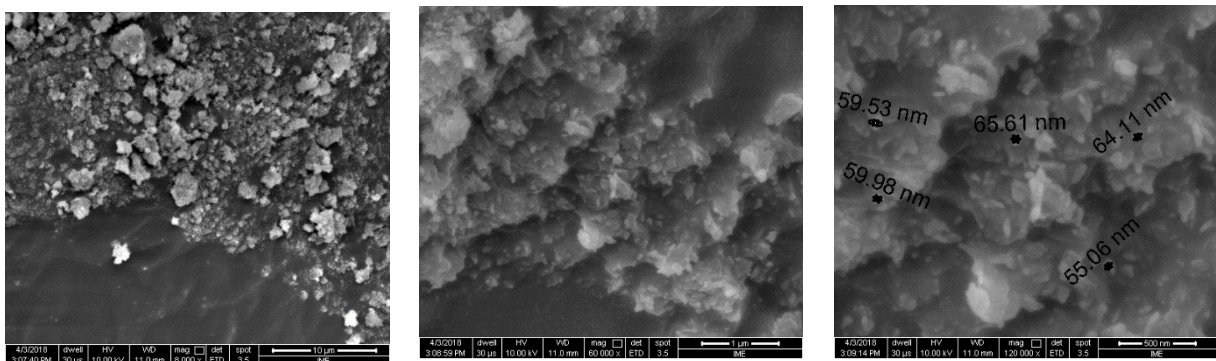


Figura 4.31: Morfologias da nanohidroxiapatita. Aumentos de 8.000, 60.000 e 120.000x, respectivamente.

Na fig.4.32a as nanopartículas de hidroxiapatita possuem formas circular e bastões com tamanho entre 25 e 30 nm aproximadamente. Este resultado corrobora com a mesma ordem de grandeza encontrada na análise com o MEV. Pela SAED, obteve-se o padrão de difração (fig. 4.32b), no qual as estruturas dos anéis de difração são consistentes com a natureza de uma amostra policristalina.

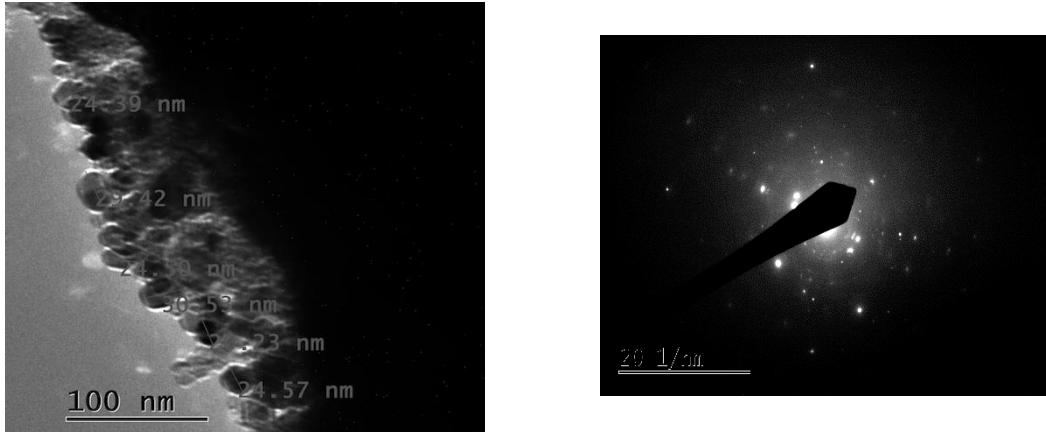


Figura 4.32: (a) Morfologia da nanohidroxiapatita identificada no MET; (b) padrão de difração da nanohidroxiapatita.

As regiões dos biocompósitos apresentaram morfologias totalmente desordenadas, com ausência de porosidade nas superfícies, característica esta distinta da morfologia de alguns hidrogéis. Foi possível visualizar tanto aglomerados de nanoHA quanto partículas isoladas em todos os biocompósitos. O HN1.0.3 e HN1.1.3 (fig. 4.33 e fig. 4.34, respectivamente) apresentaram semelhanças, com uma superfície rugosa, e camadas circulares mais finas distribuídas por todo o composto. Essas regiões circulares foram melhor observadas no aumento de 40.000x. A principal diferença entre estes compósitos é o fato do HN1.0.3 apresentar em sua morfologia um maior número de cavidades do que o HN1.1.3.

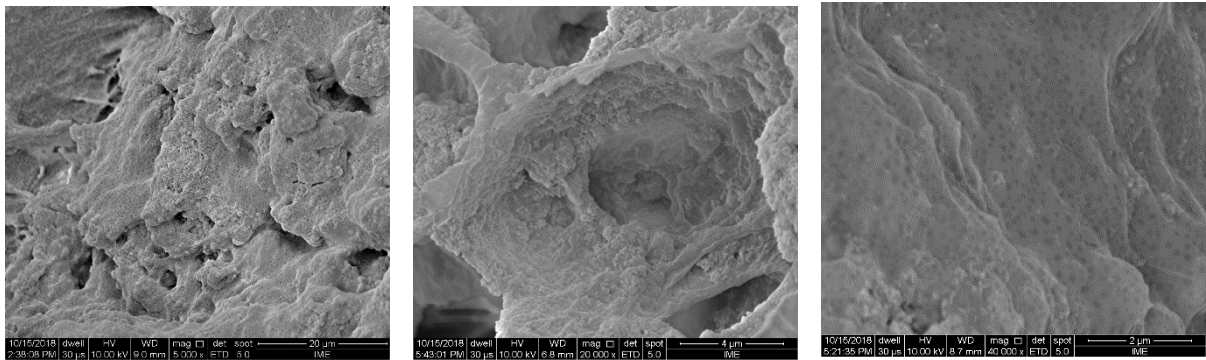


Figura 4.33: Morfologias do biocompósito HN1.0.3. Aumentos de 5.000, 20.000 e 40.000x, respectivamente.

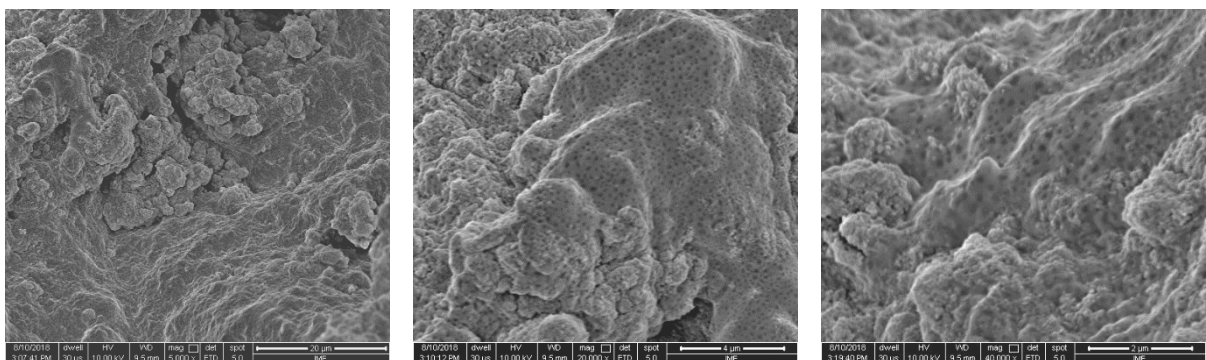


Figura 4.34: Imagens de MEV do biocompósito HN1.1.3, aumentos de 5.000, 20.000 e 40.000x, respectivamente.

Mostra-se na figura 4.35 as morfologias do HN2.0.3, que se assemelham a várias placas rugosas que se sobrepõem. Com a sobreposição dessas placas foram formadas microcavidades com diferentes tamanhos. Em aumento de 20.000x pode-se observar que as placas formadas possuem uma estrutura porosa. É possível observar com aumento de 40.000x, um acúmulo de partículas de nanoHa com tamanho aproximado de 875.3 nm na ponta de uma destas placas. A morfologia do biocompósito HN2.1.3 (Fig 4.36) é totalmente diferente do HN2.0.3 (Fig. 4.35) se apresentando com uma morfologia globular, altamente rugosa e com elevada presença de cavidades, que parecem possuir uma grande profundidade.

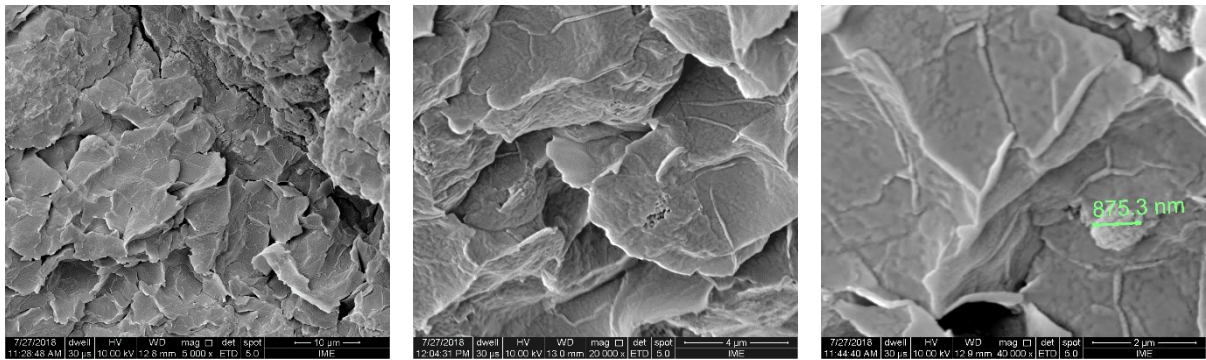


Figura 4.35: Imagens de MEV do biocompósito HN2.0.3, aumentos de 5.000, 20.000 e 40.000x, respectivamente.

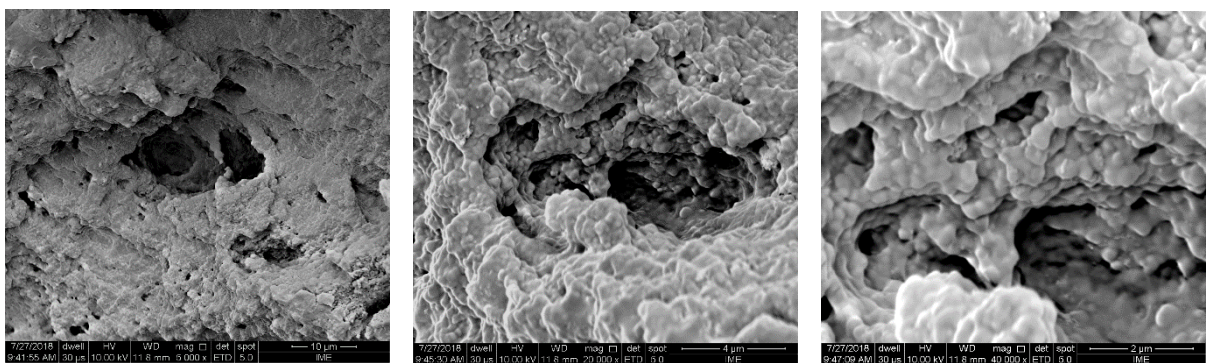


Figura 4.36: Imagens de MEV do biocompósito HN2.1.3, aumentos de 5.000, 20.000 e 40.000x, respectivamente.

O compósito HN3.0.3 mostrado na figura 4.37, apresentou uma morfologia com um grande número de cavidades e superfície com baixa rugosidade. Nota-se o rompimento de algumas paredes que estariam interconectadas. Com aumento de 40.000x é possível observar as dispersões das nanoHa na parede do hidrogél.

O compósito HN3.1.3 (fig. 4.38) apresentou semelhança com o H3, com uma estrutura globular e muitas cavidades. Entretanto, o compósito HN4.0.3 (fig. 4.39), apesar de apresentar morfologia semelhante à do HN3.1.3, apresentou maior número de cavidades. Observa-se que tanto o HN3.0.3 quanto o HN3.1.3 e HN4.0.3 apresentam cavidades com elevada profundidade.

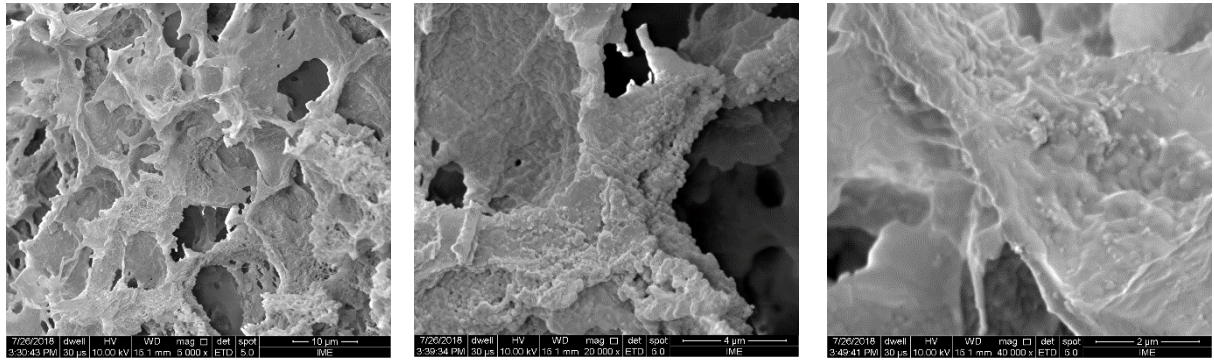


Figura 4.37: Morfologias do biocompósito HN3.0.3. Aumentos de 5.000, 20.000 e 40.000x, respectivamente.

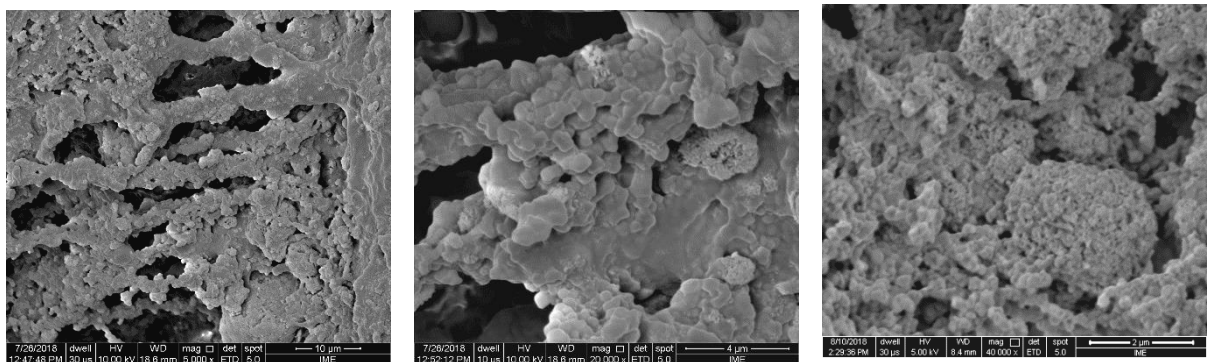


Figura 4.38: Morfologias do biocompósito HN3.1.3. Aumentos de 5.000, 20.000 e 40.000x, respectivamente.

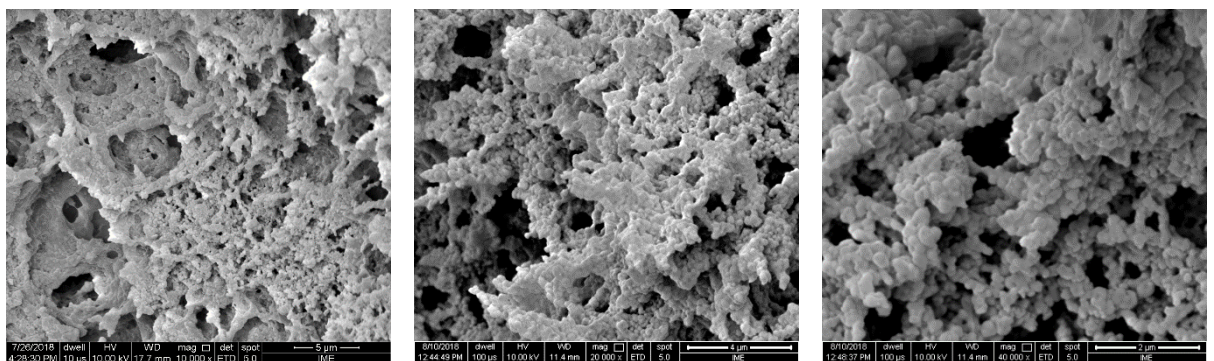


Figura 4.39: Morfologias do MEV do biocompósito HN4.0.3. Aumentos de 10.000, 20.000 e 40.000x, respectivamente.

4.6 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

Na análise termogravimétrica (Fig. 4.40) pode-se verificar que os hidrogéis sofreram degradações diferentes. Os hidrogéis H1, H1.1, H2.1, H3.1 e H4, durante os ensaios degradaram com um evento a mais que os demais. A primeira perda de massa a temperatura inferior à 150 °C é relativa a água adsorvida na amostra e todos os hidrogéis apresentaram essa perda. Os demais eventos de degradação ocorreram nas temperaturas discriminadas na tabela 4.2 com os valores de T_{onset} e T_{max} . Pode-se observar que o segundo evento de degradação ocorreu abaixo de 300 °C para os hidrogéis H1, H1.1, H 3.1 e H4 e em torno de 380°C para os hidrogéis H2 e H3. Um terceiro evento ocorreu abaixo de 415°C para os hidrogéis H1, H1.1, H2.1, H 3.1 e H4. De acordo com Lucas *et al.* (2001), a existência de um evento a mais de degradação, pode ser indicativo que estes hidrogéis possuem cadeias menores e com uma maior distribuição de tamanho. O último evento de degradação é referente à cadeia dos polímeros, quanto maior for o valor encontrado para o T_{max} , maior será o tamanho da cadeia principal, assim entende-se que o H2 e H3 possuem cadeias poliméricas de maior tamanho do que os outros hidrogéis. Ademais, os hidrogéis (H1.1, H2 e H3) que foram sintetizados com agitação apresentaram uma maior estabilidade térmica do que os que foram sintetizados sem agitação. Os hidrogéis H2 e H3 foram mais estáveis, com temperaturas de degradação em torno de 104 e 111°C, respectivamente. Corroborando com o resultado do grau de intumescimento, onde o H2.1 apresentou o menor valor de expansão mássica, somada ao maior valor de temperatura de degradação, aproximadamente 412 °C, ele é o hidrogel que possui o maior número de ligações cruzadas, dificultando assim a entrada de água na molécula durante o intumescimento e o deixando mais rígido, mesmo não sendo o hidrogel com maior concentração de agente reticulante, o H2.1 possui a maior concentração de iniciadores redox, seguindo de segunda maior concentração de MBA. O H4 apresentou o menor valor para T_{max} e para a variação na capacidade de inchar-desinchar, sendo esses fatores um indicativo que ele possui um tamanho de cadeia pequeno, porém altamente reticulada. As curvas individuais de cada hidrogel são apresentadas no anexo 8.5.

Tabela 4.2: Valores de T_{onset} e T_{max} dos hidrogéis PNIPAAm.

Amostra	1º evento	2º evento		3º evento		
	T_{max} (°C)	T_{onset} (°C)	T_{max} (°C)	T_{onset} (°C)	T_{max} (°C)	Resíduo
H1	54	262	286	360	397	5
H1.1	74	265	291	349	381	7
H2	104	342	389	-	-	4
H2.1	56	271	307	378	412	5
H3	111	346	381	-	-	10
H3.1	61	259	279	350	383	10
H4	65	260	281	351	376	5

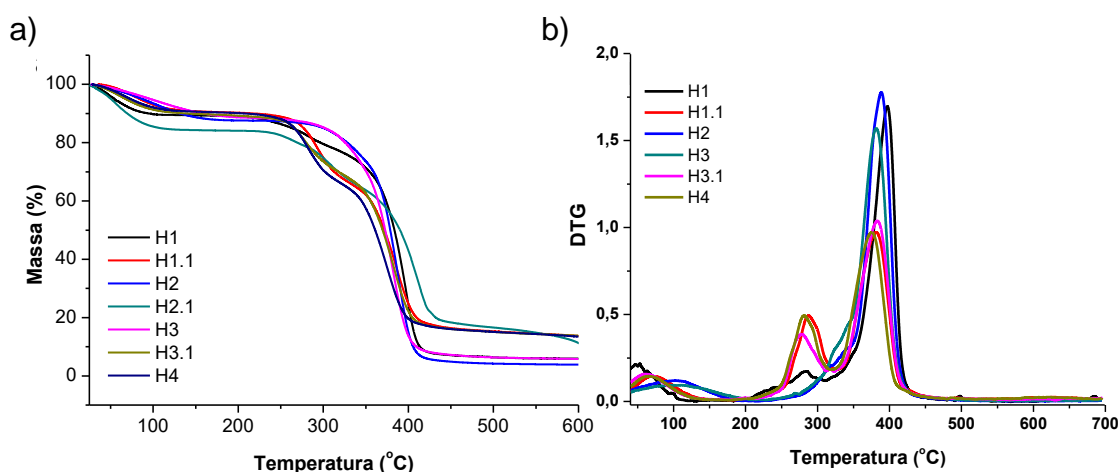


Figura 4.40: (a) Curvas das análises termogravimétricas (TGA) dos hidrogéis PNIPAAm; (b) derivada da análise termogravimétrica (DTG)

Como pode ser visto pela análise termogravimétrica da nanoHa (Fig. 4.41), ela é altamente estável termicamente, seu único evento de degradação com a T_{max} em 193 °C é referente a água adsorvida na molécula, com o percentual em massa de 20%.

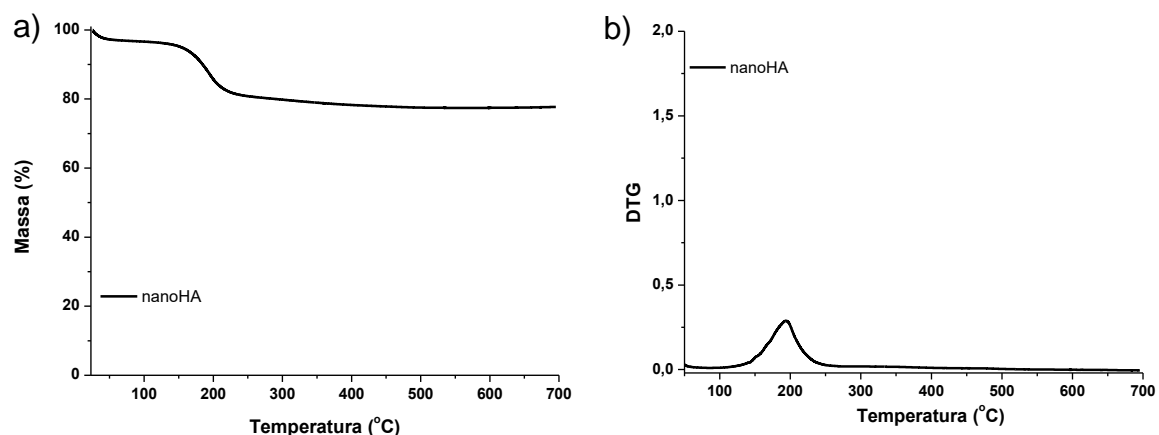


Figura 4.41: (a) Curvas das análises termogravimétricas (TGA) da nanohidroxiapatita; (b) derivada da análise termogravimétrica (DTG)

Os biocompósitos apresentaram um comportamento de degradação diferente dos hidrogéis; como pode ser visto pela figura 4.42, as curvas de TGA e DTG, mostram que apenas o HN1.0.3 e HN3.1.3 apresentaram dois eventos de degradação, os demais apresentaram três eventos. Na tabela 8, consta todos os valores de T_{onset} e T_{max} dos biocompósitos. O primeiro evento de degradação, inferior a 60 °C, apresentado por todos os biocompósitos, refere-se à volatilização da água. O segundo evento exibido pelo HN1.1.3, HN2.0.3, HN2.1.3, HN3.0.3 e HN4.0.3, no qual a temperatura de degradação foi entre 287 – 337 °C, é um indicativo da presença de cadeias poliméricas de menor tamanho, e o terceiro evento para esses compostos, refere-se a degradação das cadeias longas, tendo em vista que área da DTG para o terceiro evento é maior do que para o segundo evento, considera-se que há uma maior quantidade de cadeias longas do que de cadeias poliméricas pequenas para esses materiais.

A quantidade de resíduos é referente a quantidade de nanoHA incorporada no hidrogel, apenas o HN1.1.3 não apresentou uma porcentagem em massa de resíduo superior a 20%, como adicionou-se 30% em massa de nanoHA no processo de síntese do biocompósito, conclui-se que ocorreram perdas durante a lavagem do material que promoveram a redução da massa da nanoHA. Ao comparar a tabela 4.2 com a tabela 4.3, observa-se que os biocompósitos apresentaram temperaturas de degradação superiores aos seus respectivos hidrogéis, isso pode ser um indicativo de ligações secundárias fortes estabelecidas entre a nanoHa e a matriz

polimérica do PNIPAAm; esse fato só não foi observado para o HN1.1.3, provavelmente por possuir menor concentração de nanoHa em sua estrutura. As curvas individuais de cada biocompósito são apresentadas no anexo 8.6.

Tabela 4.3: Valores de T_{onset} e T_{max} dos biocompósitos.

Amostra	1º evento	2º evento		3º evento		
	T_{max} (°C)	T_{onset} (°C)	T_{max} (°C)	T_{onset} (°C)	T_{max} (°C)	Resíduo
HN1.0.3	50	315	411	-	-	28
HN1.1.3	51	252	287	322	380	10
HN2.0.3	51	294	332	362	414	23
HN2.1.3	50	302	337	367	412	24
HN3.0.3	49	305	334	364	411	22
HN3.1.3	47	350	399	-	-	23
HN4.0.3	47	292	333	366	413	24

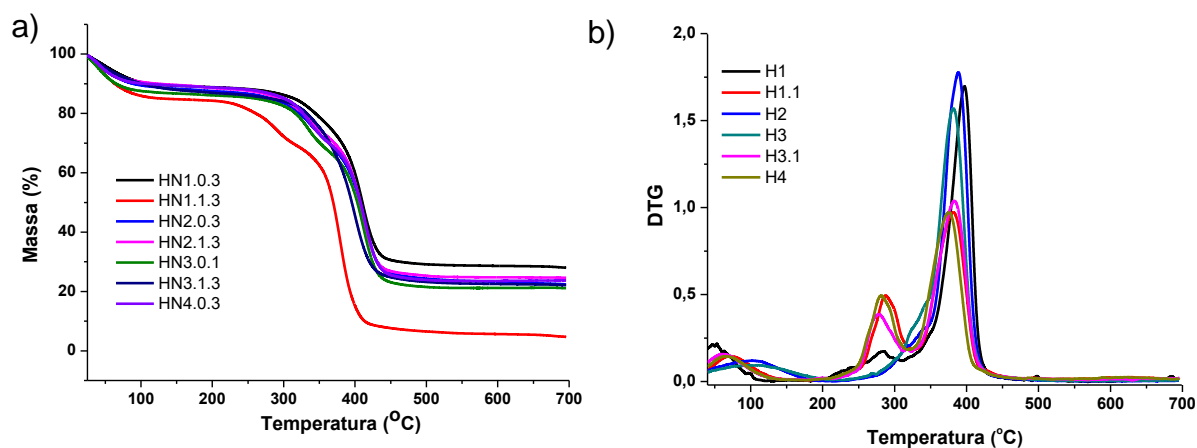


Figura 4.42: (a) Curvas das análises termogrâmétricas (TGA) dos biocompósitos; (b) derivada da análise termogrâmétrica (DTG)

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nas sínteses dos hidrogéis, nanohidroxiapatita e compósitos, pode-se concluir que:

- ❖ Todos os hidrogéis, nanohidroxiapatita e biocompósitos foram obtidos sem presença de impurezas.
- ❖ Obteve-se sete hidrogéis e sete biocompósitos com diferentes propriedades físicas;
- ❖ Os hidrogéis sintetizados com agitação apresentaram maior grau oscilatório em inchar-desinchar e maior capacidade de intumescer em relação aos sintetizados sem agitação;
- ❖ A concentração de agente reticulante influenciou no grau de intumescimento e rigidez dos hidrogéis;
- ❖ Os biocompósitos apresentaram menor grau de intumescimento e capacidade oscilatória do que os hidrogéis;
- ❖ Todos os hidrogéis e biocompósitos apresentaram uma morfologia tridimensional, variando a presença e quantidade de cavidades e porosidade na superfície do gel;
- ❖ Os biocompósitos e hidrogéis apresentaram alta estabilidade térmica;
- ❖ A nanohidroxiapatita apresentou características semelhantes a apresentada pela literatura. Com estrutura cristalina hexagonal, porém com o tamanho de partícula na faixa de 30nm e estável termicamente;
- ❖ As nanopartículas de hidroxiapatita se mostraram presentes em toda extensão da matriz polimérica;
- ❖ Tanto os hidrogéis quanto os biocompósitos, se mostraram promissores compostos para aplicação na engenharia de tecido, como hidrogéis injetáveis para a reconstrução e/ou reparação de defeitos ósseos. Em especial destacam-se os hidrogéis H2.1 e H4, por sua menor capacidade em intumescer, morfologia com uma estrutura organizada, com presença de cavidades e porosidade, somados a boa estabilidade térmica. Já para os biocompósitos destacam-se o HN3.1.3 e HN4.0.3, que também apresentaram baixa variação na capacidade de intumescer,

morfologias rugosas e com elevado número de cavidade, além de elevada dispersão de nanohidroxiapatita na matriz polimérica, somado a esses fatores, eles apresentam elevada estabilidade térmica e aproximadamente 24% de sua massa composta por nanohidroxiapatita.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como trabalhos futuros sugere-se realizar os seguintes testes tanto nos hidrogéis quanto nos biocompósitos:

- Teste *in vitro* de citotoxicidade e viabilidade celular, selecionar os melhores resultados para realizar o teste de diferenciação e proliferação celular;
- Análise reológica, para determinação da viscosidade aparente.

7. REFERÊNCIAS

- ABDAL-HAY, A., SHEIKH, F. A., & LIM, J. K.. **Air jet spinning of hydroxyapatite /poly (lactic acid) hybrid nanocomposite membrane mats for bone tissue engineering.** Colloids And Surfaces B: Biointerfaces, 2013, 102, 635-643.
- AHMED, E. M.. **Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review.** Journal Of Advanced Research, 2015, 6(2), 105-121.
- AKCELRUD, L., **Fundamentos da Ciência dos Polímeros**, Edição São Paulo: Manole, 2007.
- ALETAHA, M., SALOUR, H., YADEGARY, S., FEKRI, Y., TAVAKOLI, M.. **Orbital volume augmentation with calcium hydroxyapatite filler in anophthalmic enophthalmos.** Journal Of Ophthalmic & Vision Research, 2017, 12(4), 397.
- AQUADA, F. A.; MUNIZ, E. C.; VAZ, C. M.P.; MATTOSO, L. H.C.. **Correlação entre parâmetros da cinética de intumescimento com características estruturais e hidrofílicas de hidrogéis de poliacrilamida e metilcelulose.** Química Nova, 2009, 32(6), 1482-1490.
- ARACOS, D.; BOCCACCINI, A.R.; BOHNER, M.; DÍEZ-PÉREZ, A.; EPPLE, M.; GÓMEZ-BARRENA, E.; HERRERA A I J, A.; PLANELL, J. A.; RODRÍGUEZ-MAÑASAL, L.; VALLET-REGÍAB, M.. **The relevance of biomaterials to the prevention and treatment of osteoporosis.** Acta Biomaterialia, 2014, 10(5), 1793-1805.
- BALAKRISHNAN, B. **Chapter 4: Injectable hydrogels by chemical crosslinking.** In: Injectable Hydrogels for Regenerative Engineering, 2016 155-200.
- BIGI, A., BOANINI, E., GAZZANO, M., KOJDECKI, M. A., & RUBINI, K. **Microstructural investigation of hydroxyapatite–polyelectrolyte composites.** Journal Of Materials Chemistry, 2004, 14(2), 274-279.
- BRASKEM. **Glossários de termos aplicados a polímeros**, Julho de 2002. Disponível em: https://www.braskem.com.br/Portal/Principal/Arquivos/html/boletm_tecnico/Glossario_de_termos_aplicados_a_polimeros.pdf . Acessado em 2 Fevereiro de 2018.
- CALLISTER, W. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução.** Grupo Gen-LTC, 2000.

- CATROS, S., GUILLEMOT, F., LEBRAUD, E., CHANSEAU, C., PEREZ, S., BAREILLE, R., AMEDE, J., FRICAIN, J. C.. **Physico-chemical and biological properties of a nano-hydroxyapatite powder synthesized at room temperature.** *Irbm*, 2010, 31(4), 226-233.
- CAWTHON, P. M.. **Gender differences in osteoporosis and fractures.** *Clinical Orthopaedics And Related Research*, 2011, 469(7), 1900-1905.
- CHANDRASEKARAN, A.; SURESH S.; DAKSHANAMOORTHY A.. **Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite (n-HAP) using the wet chemical technique.** *International Journal Of Physical Sciences*, 2013, 8(30), 1639-1645.
- COOPERSTEIN, M. A., CANAVAN, H. E.. **Assessment of cytotoxicity of (N-isopropyl acrylamide) and poly (N-isopropyl acrylamide)-coated surfaces.** *Biointerphases*, 2013, 8(1), 19.
- COSTA, A. C. F. M., DE LIMA, M. G., DE ALMEIDA LIMA, L. H. M., CORDEIRO, V. V., DE SOUTO VIANA, K. M., DE SOUZA, C. V., LIRA, H. L.. **Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações.** *Revista Eletrônica De Materiais E Processos*, 2009, 4(3),29-38.
- COWIN, S. C. **Bone mechanics handbook.** CRC Press, 2001.
- DETSCH, R. , WILL, J., HUM, J., ROETHER, J. A. , BOCCACCINI, A. R.. **6.1 Biocompatibility, 6.2 Materials and Synthesis.** *Cell Culture Technology*, 91-93, 2018.
- DJONLAGIC, J.; PETROVIC, Z.S.. **Semi-interpenetrating polymer networks composed of poly(N-isopropyl acrylamide) and polyacrylamide hydrogels.** *Journal Of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 2004, 42 (21), 3987–3999.
- DUCHEYNE, P.. CUCKLER, J. M.. **Bioactive ceramic prosthetic coatings.** *Clinical Orthopaedics And Related Research*, 1992, (276), 102-114.
- FEI, R.; GEORGE, J. T.; PARK, J.; MEANS, A. K.; GRUNLAN, M. A.. **Ultra-strong thermoresponsive double network hydrogels.** *Soft Matter*, 2013, 9(10), 2912-2919.
- FRAZÃO, P.; NAVEIRA, M.. **Prevalência de osteoporose : uma revisão crítica.** *Revista Brasileira De Epidemiologia*, 2006, 9(2), 206-214.
- GALPERIN, A.; LONG, T. J.; RATNER, B. D. **Degradable, Thermo-Sensitive Poly(N-isopropyl acrylamide)- Based Scaffolds with Controlled Porosity for Tissue Engineering Applications.** *Biomacromolecules*, 2010, 11, 2583-2592.

- GRAIVIER, M. H., LORENC, Z. P., BASS, L. M., FITZGERALD, R., & GOLDBERG, D. J.. **Calcium Hydroxyapatite (CaHA) Indication for Hand Rejuvenation**. *Aesthetic Surgery Journal*, 2018, 38(suppl_1), S24-S28.
- GRULKE, E. A. **Polymer Process Engineering**. PTR PH, New Jersey, 1994.
- HAMIDI, M; AZADI, A; RAFIEI, P.. **Hidrogel nanoparticles in drug delivery**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60, 1638-1649.
- HAN, A., RUJIJANAGUL, G., RANDORN, C.. **Preparation of hydroxyapatite hydrogel for bone-like materials via novel self-initiated photocatalytic polymerization**. *Materials Letters*, 2017, 193, 142-145.
- HAQ, M. A.; SU, Y.; WANG, D.. **Mechanical properties of PNIPAM based hydrogels: A review**. *Materials Science And Engineering: C*, 2017, 70, 842–855.
- HARTGERINK, J. D.; BENIASH, E.; STUPP, S. I.. **Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers**. *Science*, 2001, 294(5547), 1684-1688.
- HELMUS, M. N.; TWENDEM; K., **Materials selection**. In *Encyclopedia Handbook of Biomaterials And Bioengineering*, 1995, 2, part A, 1429-1463.
- HIROKAWA, Y., TANAKA, T.. **Volume phase transition in a non-ionic gel**. In *AIP Conference Proceedings*, 1984, 107(1), 203-208.
- HOLLINGER, J. O. (Ed.).. **An introduction to biomaterials**. CRC Press, 2011.
- HONG, Z., QIU, X., SUN, J., DENG, M., CHEN, X., & JING, X.. **Grafting polymerization of L-lactide on the surface of hydroxyapatite nanocrystals**. *Polymer*, 2004, 45(19), 6699-6706.
- ICRIVERZI M.; RUSEN L.; SIMA, L. H.; MOLDOVAN, A.; BRAJNICOV, S.; BONCIU, A.; MIHAILESCU, N.; DINESCU, M.; CIMPEAN, A.; ROSEANU, A.; DINCA, V.. **In vitro behavior of human mesenchymal stem cells on poly(N-isopropylacrylamide) based biointerfaces obtained by matrix assisted pulsed laser evaporation**. *Applied Surface Science*, 2018, 440, 712–724.
- KASTEN, P., LUGINBÜHL, R., VAN GRIENSVEN, M., BARKHAUSEN, T., KRETTEK, C., BOHNER, M., BOSCH, U.. **Comparison of human bone marrow stromal cells seeded on calcium-deficient hydroxyapatite, β -tricalcium phosphate and demineralized bone matrix**. *Biomaterials*, 2004, 24(15), 2593-2603x.
- KATTI, K. S. **Biomaterials in total joint replacement**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2004, 39(3), 133-142.

- KHORASANI, A. M.; GOLDBERG, M.; DOEVEN, E. H.; LITTLEFAIR, G.. **Titanium in biomedical applications—properties and fabrication: a review.** Journal Of Biomaterials And Tissue Engineering, 2015, 5(8), 593-619.
- KLING, J. M.; CLARKE, B. L.; SANDHU, N. P.. **Osteoporosis prevention, screening, and treatment: a review.** Journal Of Women's Health, 2014, 23(7), 563-572.
- KOUTSOPOULOU, S., **Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods.** Journal Biomedical Material Research, 2002, 62, 600–612.
- LEE, H. J.; CHOI, H. W.; KIM, K. J.; LEE, S. C.. **Modification of hydroxyapatite nanosurfaces for enhanced colloidal stability and improved interfacial adhesion in nanocomposites.** Chemistry Of Materials, 2006, 18(21), 5111-5118.
- LEESON, M. C.; LIPPITT, S. B. **Thermal aspects of the use of polymethylmethacrylate in large metaphyseal defects in bone.** A clinical review and laboratory study. Clinical Orthopaedics And Related Research, 1993, 295, 239-245.
- LEWANDROWSKI, K.U., GRESSER, J.D., WISE, D.L., TRANTOLO, D.J.. **Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: a histologic evaluation of osteointegration of poly(propylene glycol-co-fumaric acid)-based cement implants in rats.** Biomaterials, 2000, 21(8), 757–760.
- LODE, A., HEISS, C., KNAPP, G., THOMAS, J., NIES, B., GELINSKY, M., SCHUMACHER, M.. **Strontium-modified premixed calcium phosphate cements for the therapy of osteoporotic bone defects.** Acta Biomaterialia, 2018, 65, 475-485.
- LUCAS, E. F., SOARES, B. G., & MONTEIRO, E. E.. **Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica.** Editora E-papers, 2001.
- MATYJASZEWSKI, K., TSAREVSKY, N. V. **Macromolecular engineering by atom transfer radical polymerization.** Journal of the American Chemical Society, 2014, 136(18), 6513-6533.
- MATZELLE, T.R.; GEUSKENS, G. ; KRUSE, N.. **Elastic properties of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(acrylamide) hydrogels studied by scanning force microscopy.** Macromolecules, 2003, 36(8), 2926–2931.

- MCAULIFFE, J.A.. **Bone graft substitutes**. Journal Hand Therapy, 2003, 16(2),180–187.
- MELO, C. S.; CUNHA J. A. S.; FIALHO, S. L. **Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos**. Revista De Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2012, 33(4), 469-477.
- MIHOC B. A., MITU, L.. **Characteristic of hydroxyapatite: A**. The 7th International Conference on Computation Mechanics and Virtual Engineering, 2017.
- NAÇÕES UNIDAS. **World Population Prospects 2017**. Disponível em: <https://esa.un.org/unpd/wpp/Download/Standard/Population/> . Acesso em 01 de março de 2018.
- NANDI, S. K., ROY, S., MUKHERJEE, P., KUNDU, B., DE, D. K., & BASU, D.. **Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review**. Indian Journal Medicinal Research, 2010, 132(1), 15-30.
- NAHA, P. C., BHATTACHARYA, K., TENUTA, T., DAWSON, K. A., LYNCH, I., GRACIA, A., BYRNE, H. J.. **Intracellular localisation, geno-and cytotoxic response of polyN-isopropylacrylamide (PNIPAM) nanoparticles to human keratinocyte (HaCaT) and colon cells (SW 480)**. Toxicology Letters, 2010, 198(2), 134-143.
- NEVITT, R. T., HEUER, G., STORM, P. B., TAYLOR, J. A., BARLLET, S. P., NGUYEN, P.. **Does Autologous vs. Alloplastic Cranioplasty Affect Cranial Growth Patterns?**. Plastic and Reconstructive Surgery–Global Open, 6(8S), 208-209, 2018.
- O'BRIEN, FJ. **Biomaterials & scaffolds for Tissue Engineering**. Mater Today, 2011, 14 (3), 88–95.
- ODIAN, G. **Principles of polymerization**. John Wile & Sons, 4th edition, 2004.
- OTTENBRITE, R.M., HUANG, S.J., PARK, K. **Hydrogels and Biodegradable Polymers for Bioapplications**. American Chemical Society Symposium Series, 1996, 627.
- PARIDA, P.; BEHERA, A.; MISHRA, S. C.. **Classification of Biomaterials used in Medicine**. International Journal Of Advances In Applied Sciences, 2012, 1(3), 125-129.
- PAVIA, D. L., LAMPAN, G. M., KRIZ, G. S., VYVYAN, J. R.. **Introdução à Espectroscopia**–Tradução da 4ª edição norte-americana. Cengage Learning, 2010.

- POINERN, E.; BRUNDAVANAM, R. K.; LE, X. T.; FAWCETT, D.. **Thermal and ultrasonic influence in the formation of nanometer scale hydroxyapatite bio-ceramic.** International Journal Of Nanomedicine, 2011, 6, 2083-2095.
- PULEO, G. L.; ZULLI, F.; PIOVANELLI, M.; GIORDANO, M.; MAZZOLAI, B.; BECCAI, L.; ANDREOZZI, L.. **Mechanical and rheological behavior of pNIPAAm crosslinked macrohydrogel.** Reactive And Functional Polymers, 2013, 73(9), 1306-1318.
- QUEIROZ, P. M.. **Síntese e caracterização de hidrogéis superabsorventes obtidos a partir da copolimerização de acrilamida, n-isopropilacrilamida e metacrilato de sódio.** Dissertação de mestrado, 2011.
- RATHJEN, C. M., PARK, CHANG-HO, GOODRICH, P. R.. **The effect of preparation temperature on some properties of a temperature-sensitive hydrogel.** Polymer Gels And Networks, 1995, 3, 101-115.
- RIBEIRO, C. A.; MARTINS, M. V.S.; BRESSIANI, A. H.; BRESSIANI, J. C.; LEYVA, M. E.; DE QUEIROZ, A. A. A.. **Electrochemical preparation and characterization of PNIPAM-HAp scaffolds for bone tissue engineering.** Materials Science And Engineering: C, 2017, 81, 156-166.
- SHADJOU N, HASANZADEH M. **Bone Tissue Engineering using silica-based mesoporous nanobiomaterials: recent progress.** Material Science Engineering, 2015, 55, 401–409.
- SCHLOSSBAUER, A.; SCHAFFERT, D.; KECHT, J.; WAGNER, E.; BEIN, T.. **Click chemistry for high-density biofunctionalization of mesoporous silica.** Journal Of The American Chemical Society, 2008, 130(38), 12558-12559.
- SHI, D.(ED.). **Biomaterials and tissue engineering.** Springer Science & Business Media, 2013.
- SHIT, S. C.; SHAH, P. M. **Edible polymers: challenges and opportunities.** Journal Of Polymers, 2014.
- STILE, R. A., BURGHARDT, W. R., HEALY, K. E.. **Synthesis and characterization of injectable poly (N-isopropylacrylamide)-based hydrogels that support tissue formation in vitro.** Macromolecules, 1999, 32(22), 7370-7379.
- STOCK, U. A.; VACANTI, J. P. **Tissue engineering: Current state and prospects.** Annual Review Of Medicine, 2001, 52, 443-451.
- SUDARSANAN, K. T., YOUNG, R. A.. **Significant precision in crystal structural details.** Holly Springs hydroxyapatite. Acta Crystallographica Section B, 1969, 25(8), 1534-1543.

- TAKIGAWA, T.; YAMAWAKI, T.; TAKAHASHI, K.; MASUDA, T.. **Change in Young's modulus of poly (N-isopropylacrylamide) gels by volume phase transition.** *Polymer Gels And Networks*, 1998, 5(6), 585-589.
- TANAKA, S., SUZUKI, K., NORISUY, T., SHIBAYAMA, M.. **Dependence of shrinking kinetics of poly(N-isopropylacrylamide) gels on Preparation Temperature.** *Polymer*, 2002, 43, 3101-3107.
- TEMPESTI, P., NICOTERA, G. S., BONINI, M., FRATINI, E., BAGLIONI, P.. **Poly (N-isopropylacrylamide)-hydroxyapatite nanocomposites as thermoresponsive filling materials on dentinal surface and tubules.** *Journal Of Colloid And Interface Science*, 2018, 509, 123-131.
- TEOH, S. H.. **Engineering materials for biomedical applications.** World scientific. 5a-chapter 1: Introduction to biomaterials engineering and processing, S.H. Teoh. 5b- chapter 2: durability of metallic implant materials. M. Sumita and S.H. Teoh, 2004.
- USKOKOVIĆ, V.. **When 1+1>2 : Nanostructured composites for hard Tissue Engineering applications.** *Material Science Engineering C*, 2015, 57, 434–451.
- VALLET-REGÍ M, COLILLA M, GONZÁLEZ B. **Medical applications of organic-inorganic hybrid materials within the field of silica-based bioceramics.** *Chemical Society Reviews*, 2011, 40(2), 596–607.
- VENKATESAN, J; KIM, S-K.. **Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering—a review.** *Journal Of Biomedical Nanotechnology*, 2014, 10(10), 3124-3140.
- WADE, S. W., STRADER, C., FITZPATRICK, L. A., ANTHONY , M. S., O'MALLEY, C. D. **Estimating prevalence of osteoporosis: examples from industrialized countries.** *Archives Of Osteoporosis*, 2014, 9(1), 182.
- WANG, X., JIANG, M., ZHOU, Z., GOU, J., HUI, D.. **3D printing of polymer matrix composites: A review and prospective.** *Composites Part B: Engineering*, 2017, 110, 442-458.
- WANG, H.; ZHANG, G.; MA, X.; LIU, Y.; FENG, J.; PARK, K.; WANG, W.. **Enhanced encapsulation and bioavailability of breviscapine in PLGA microparticles by nanocrystal and water-soluble polymer template techniques.** *European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics*, 2017, 115, 177-185.
- WILLIAMS, D.F. (Ed.), **Definitions in Biomaterials: Proceedings of a Consensus**

Conference of the European Society for Biomaterials. Chester, England, Elsevier Science Limited, 1987.

YAZDANI, J., AHMADIAN, E., SHARIFI, S., SHAHI, S., DIZAJ, S. M.. **A short view on nanohydroxyapatite as coating of dental implants.** Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 105, 553-557.

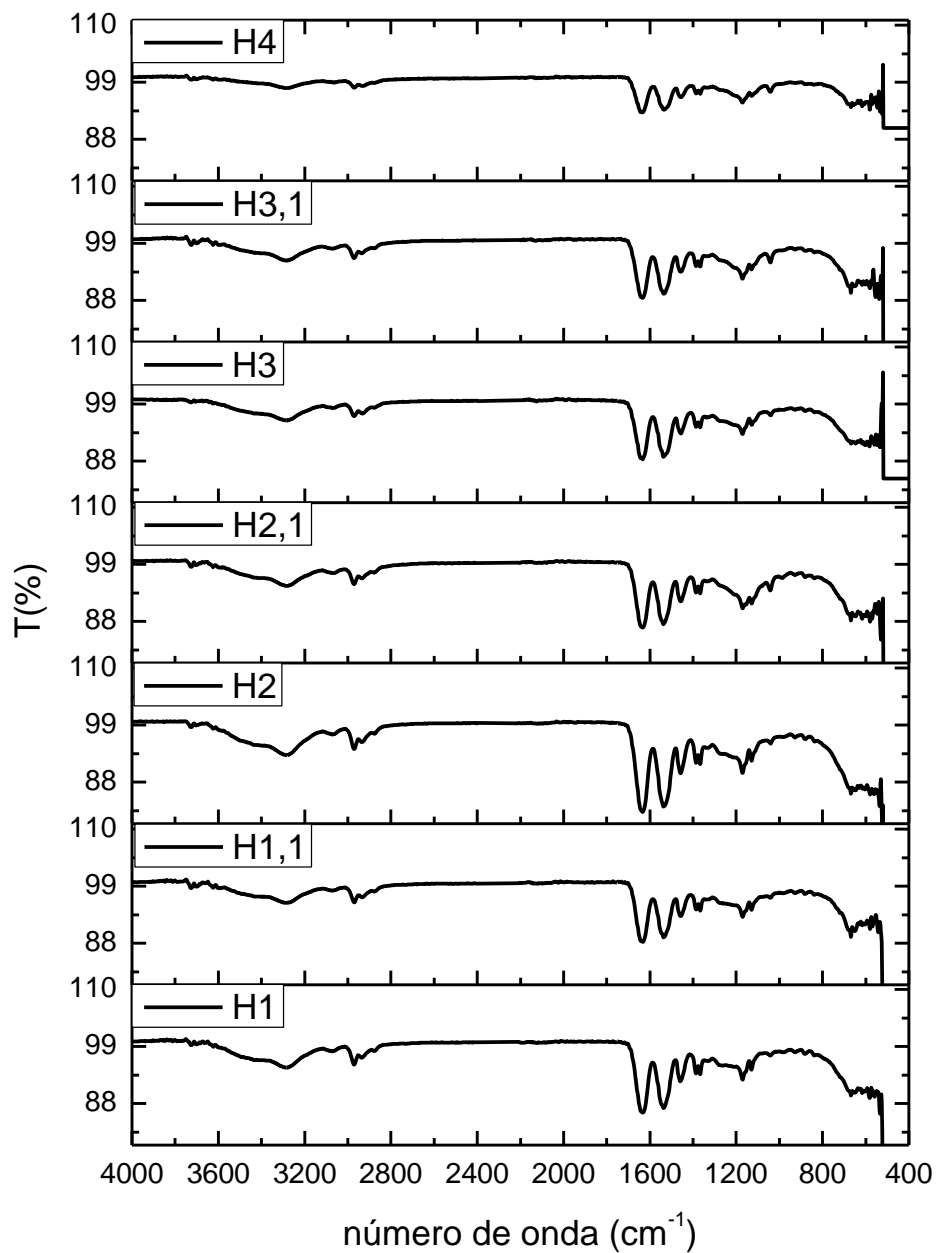
YOU, F., CHEN, X., COOPER, D. M. L., CHANG, T., EAMES, B. F.. **Homogeneous hydroxyapatite/alginate composite hydrogel promotes calcified cartilage matrix deposition with potential for three-dimensional bioprinting.** Biofabrication, 2018, 11(1), 015015.

ZHANG, J. T.; CHENG, S.X.; ZHUO, R.X.. **Poly (vinyl alcohol)/poly(N-isopropylacrylamide) semi-interpenetrating polymer network hydrogels with rapid response to temperature changes.** Colloid Polym Science, 2003, 281(6), 580-583.

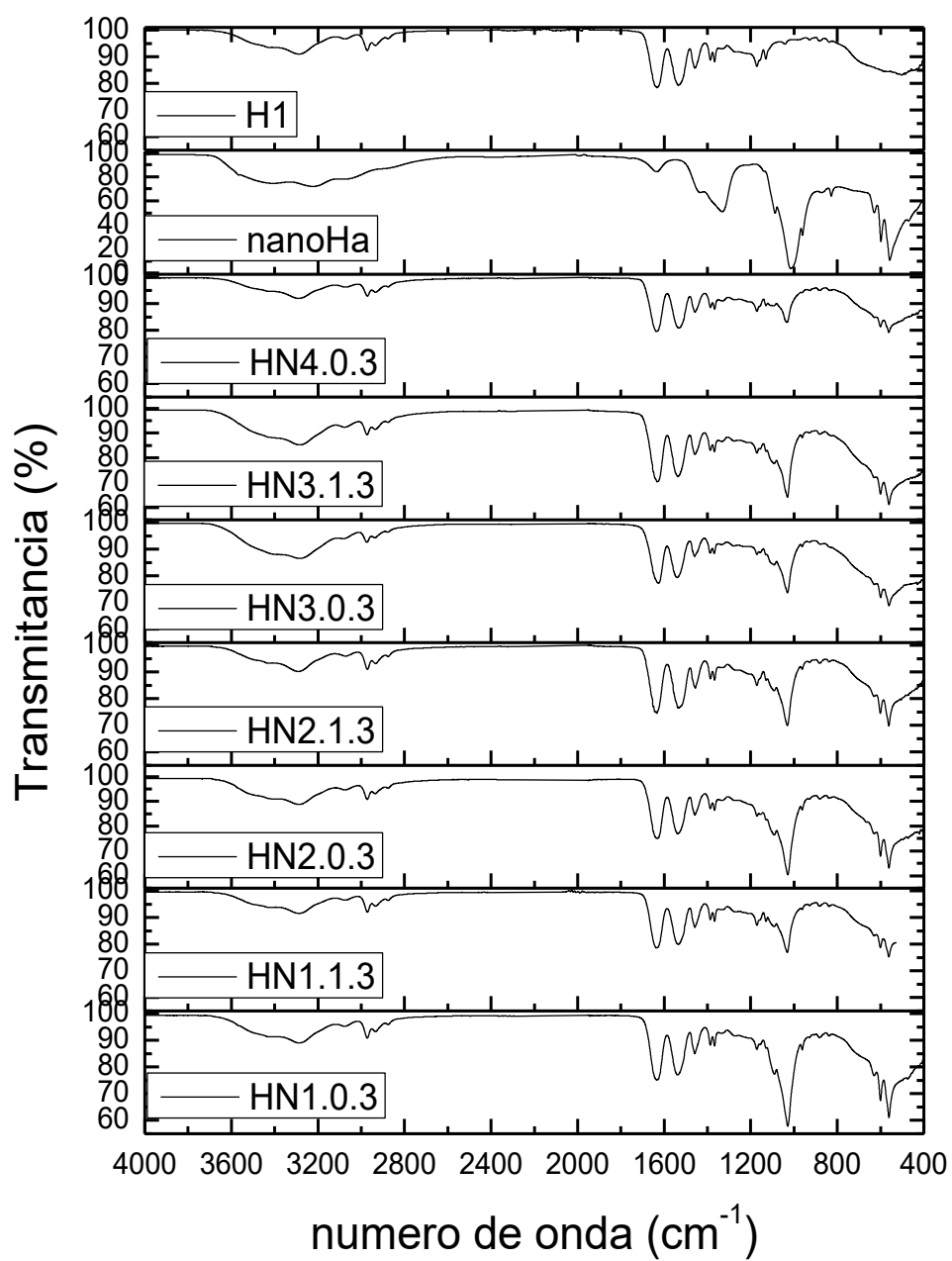
ZHANG, C. Y., LU, H., ZHUANG, Z., WANG, X. P. , FANG, Q. F.. **Nanohydroxyapatite/poly (L-lactic acid) composite synthesized by a modified in situ precipitation: preparation and properties.** Journal of Materials Science: Materials In Medicine, 2010, 21(12), 3077-3083.

8. APENDICE

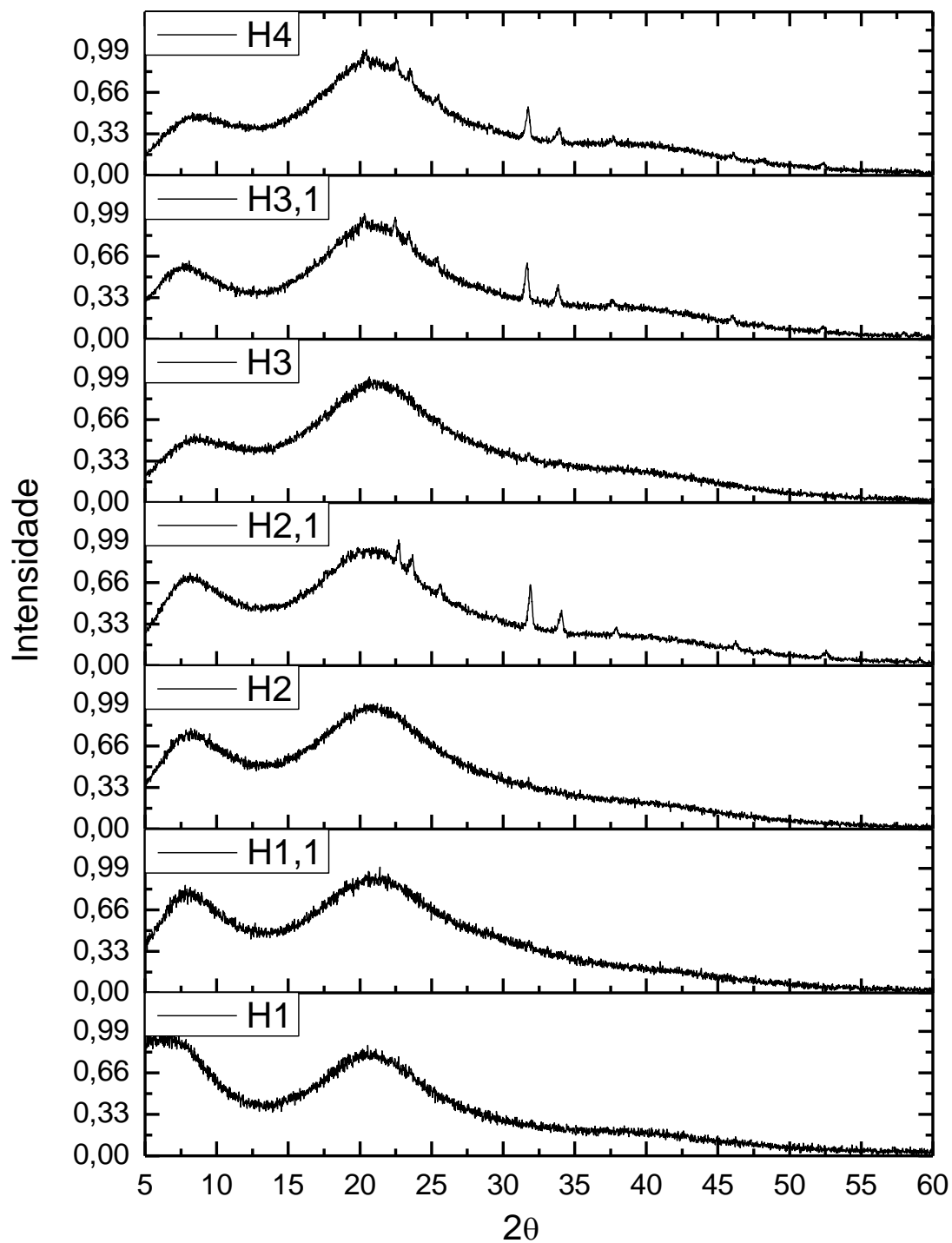
8.1 ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DOS HIDROGÉIS DE PNIPAAM



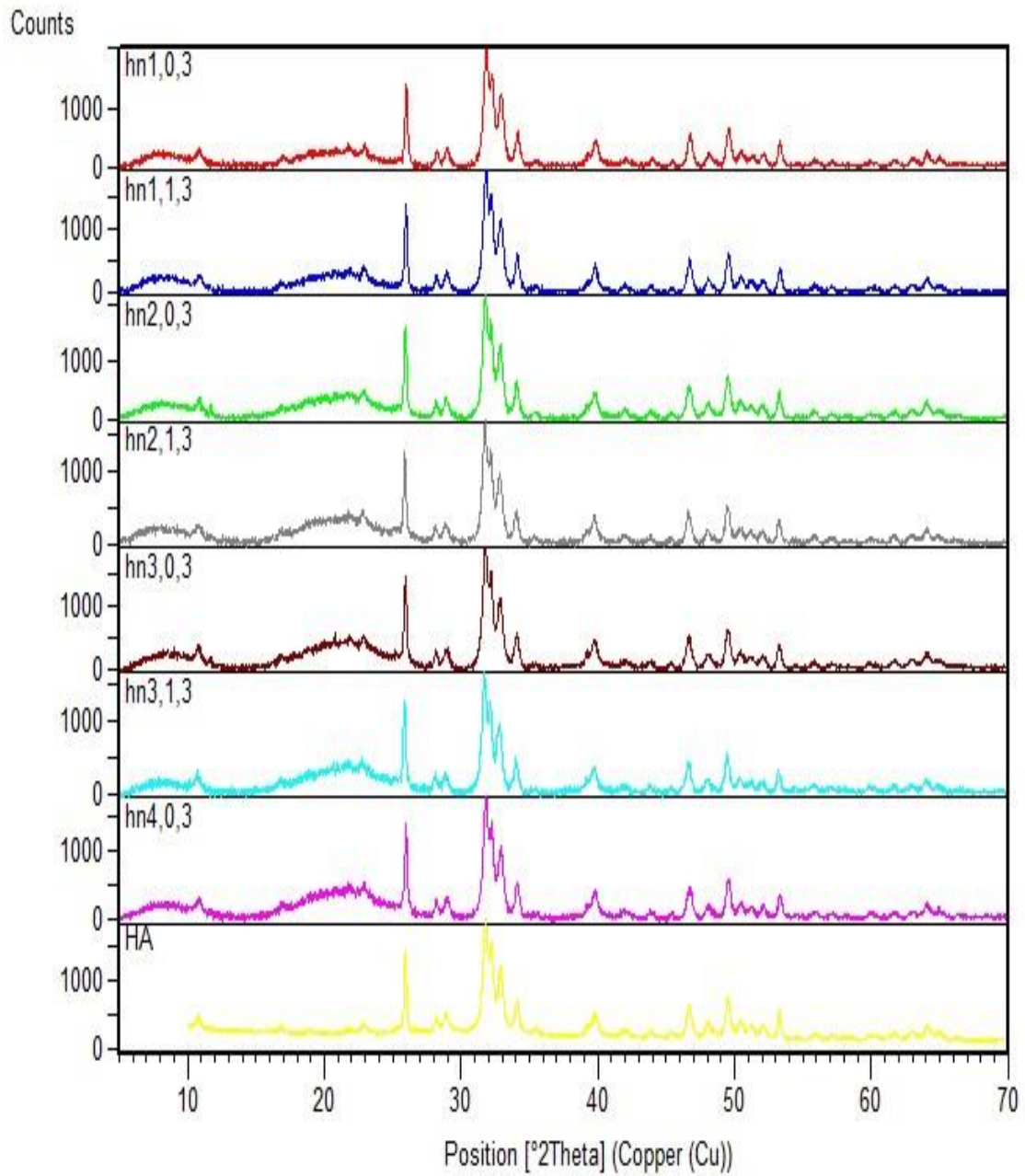
8.2. ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DOS BIOCOMPÓSITOS



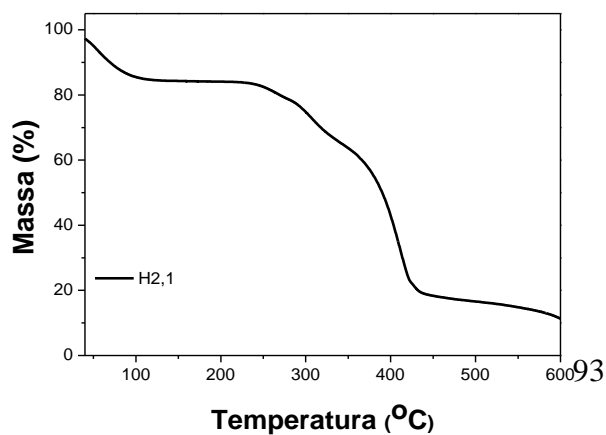
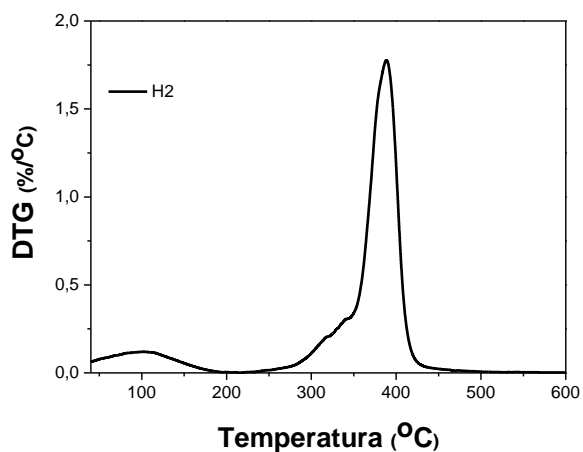
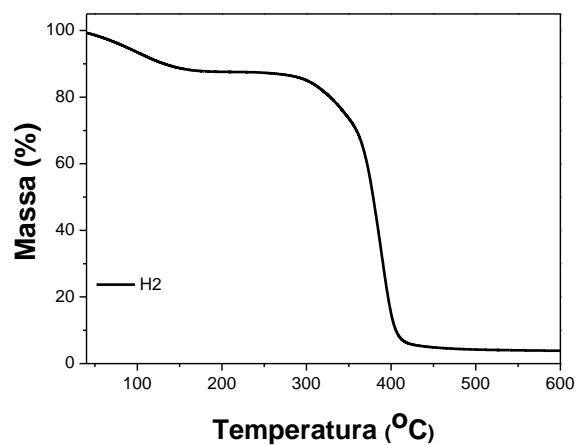
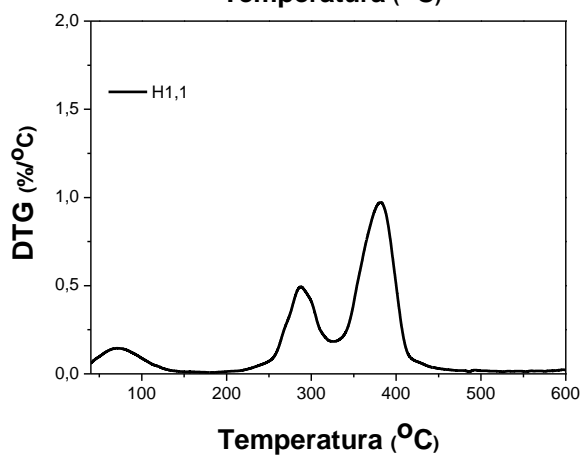
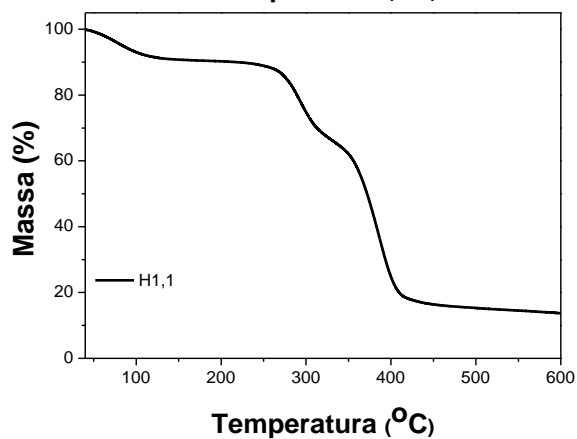
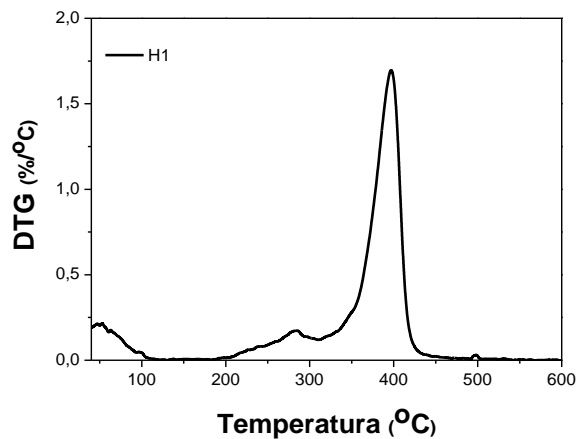
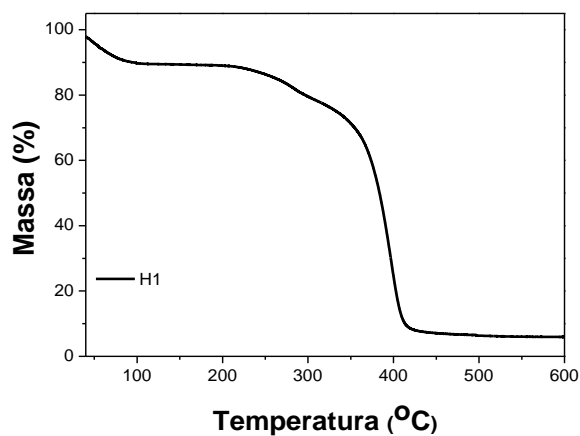
8.3 DIFRATOGRAMAS DE RAIOS-X DOS HIDROGÉIS DE PNIPAAM

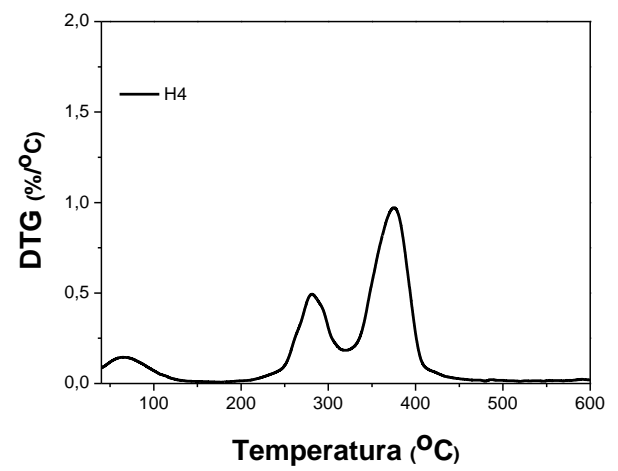
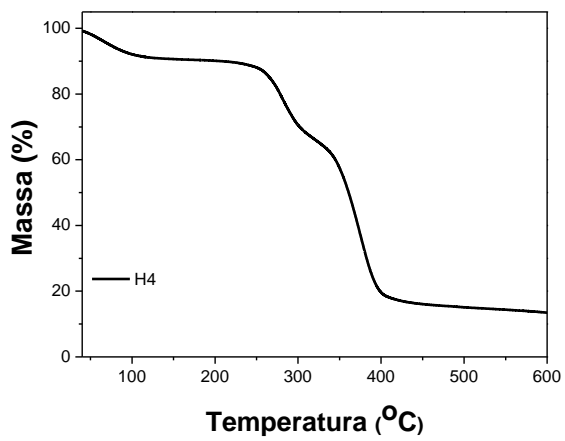
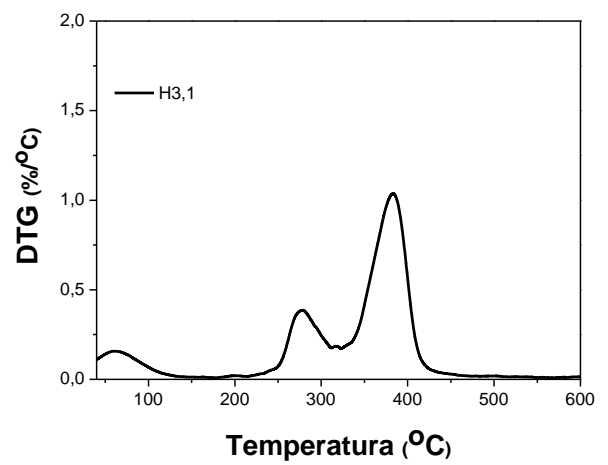
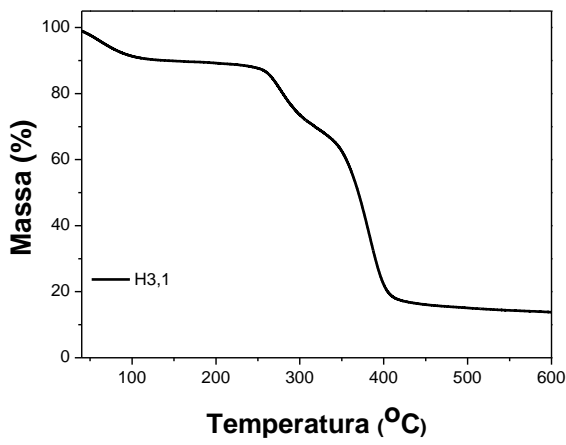
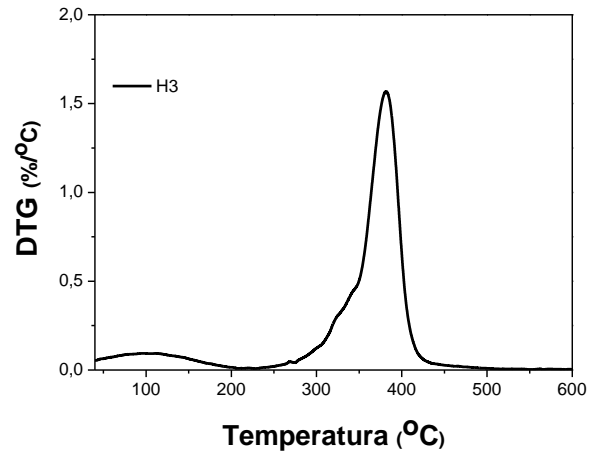
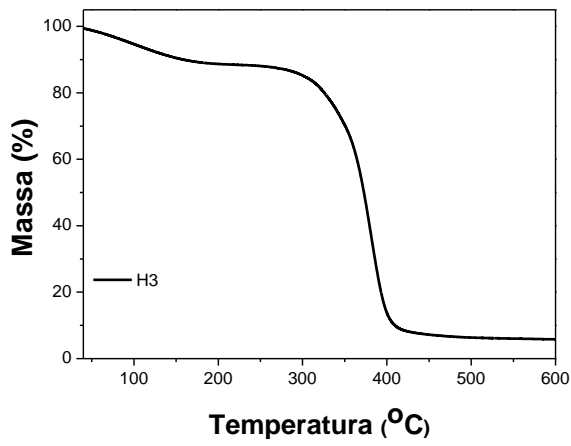


8.4 DIFRATOGRAMAS DE RAIOS-X DOS BIOCAMPÓSITOS



8.5 ANÁLISE TERMOGRAMÉTRICA (TGA) DOS HIDROGÉIS PNIPAAM E DERIVADA DA ANÁLISE TERMOGRAMÉTRICA (DTG)





8.6 ANÁLISE TERMOGRAMÉTRICA (TGA) DOS BIOCOMPÓSITOS E DERIVADA DA ANÁLISE TERMOGRAMÉTRICA (DTG)

