

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

Jéssica Francielle Teixeira Chaves Petry

Síntese de hidrogéis constituídos de PLA-PEG-PLA e gelatina  
obtidos por polimerização fotoquímica

PORTO ALEGRE, JUNHO DE 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

Jéssica Francielle Teixeira Chaves Petry

Síntese de hidrogéis constituídos de PLA-PEG-PLA e gelatina  
obtidos por polimerização fotoquímica

Trabalho de conclusão apresentado junto à  
atividade de ensino “Trabalho de  
Conclusão de Curso - QUI” do Curso de  
Química, como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Bacharel em Química.

Prof.<sup>o</sup> Douglas Gamba  
Orientador

Prof.<sup>o</sup> Cesar Liberato Petzhold  
Co-Orientador

PORTO ALEGRE, JUNHO DE 2016.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha mãe, meus avós e Emerson, que me apoiam desde sempre em todas as minhas decisões e estão sempre ao meu lado, tornando meus dias mais felizes, mesmo os mais difíceis.

À todos do laboratório do K-215 por todos os aprendizados e risadas, em especial ao Douglas Gamba, por ser esse orientador maravilhoso.

Ao Cesar Petzhold por me acolher desde a minha primeira semana na UFRGS.

## RESUMO

Neste trabalho hidrogéis constituídos de copolímeros tribloco poli(lactídeo-b-etileno glicol-b-lactídeo) (PLA-PEG-PLA) foram preparados visando aplicação na área biomédica e farmacêutica. Para isto, copolímeros de PLA-PEG-PLA foram sintetizados com diferentes proporções mássicas entre D,L-lactídeo:PEG (2:1, 1:1, 0,8:1 e 0,5:1) através de polimerização por abertura de anel do monômero D,L-lactídeo empregando PEG com massas molares de  $4.600\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  e  $20.000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , como macroiniciador. As massas molares dos copolímeros foram determinadas por RMN de  $^1\text{H}$  e SEC e mostraram que os valores obtidos estão próximos aos valores teóricos calculados quando utilizou-se o PEG de  $4.600\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . As análises de TGA mostraram que as proporções entre PLA:PEG na composição dos copolímeros apresentaram valores próximos às utilizadas nas reações, enquanto que as análises de DSC mostraram que o aumento da cadeia de PLA na estrutura influenciou na cristalização dos copolímeros. Os copolímeros foram modificados com grupos reticulantes utilizando anidrido metacrílico, assim como o PEG. A modificação pôde ser observada por RMN de  $^1\text{H}$ , pelo aparecimento do sinal dos hidrogênios da dupla ligação em 5,5 ppm e 6,25 ppm. Para a preparação dos hidrogéis é necessário que o polímero seja solúvel em meio aquoso. Desta forma, o copolímero escolhido foi o de proporção 0,8:1 com PEG de  $4.600\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Os hidrogéis foram preparados por polimerização fotoquímica e caracterizados por compressão e grau de intumescimento. Além dos hidrogéis de PEG e de PLA-PEG-PLA, também foram preparados hidrogéis de copolímeros adicionando 1% de gelatina. Os hidrogéis preparados com o PEG modificado mostraram maior rigidez quando comparados aos demais e o hidrogel contendo gelatina apresentou maior capacidade de deformação. Os valores referentes ao grau de intumescimento dos hidrogéis se mostraram muito próximos, sendo que os hidrogéis de PLA-PEG-PLA apresentaram valores maiores que os hidrogéis de PEG e copolímero contendo gelatina.

Palavras-chave: polimerização por abertura de anel, PLA-PEG-PLA, fotopolimerização, hidrogel, gelatina.

## ABSTRACT

In this work, PLA-PEG-PLA triblock copolymers were synthesized in order to prepare hydrogels by photopolymerization for further applications in regenerative medicine and pharmaceuticals. The PLA-PEG-PLA copolymers were synthesized by ring opening polymerization of D,L-lactide using PEG (4,600 g.mol<sup>-1</sup> and 20,000 g.mol<sup>-1</sup>) as initiator with ratios of D,L-lactide:PEG of 2:1, 1:1, 0.8:1 and 0.5:1 (w/w). The molecular weight of copolymers were determined by <sup>1</sup>H NMR and SEC and showed values next to the theoretical values when PEG of 4,600 g.mol<sup>-1</sup> was used as initiator. The composition of copolymers were determined by TGA and the results obtained were identical from D,L-lactide:PEG feed ratio. Increasing the amount of PLA affected the crystallization of copolymers, as evidenced by DSC analysis. Methacrylic anhydride was used to modify the copolymers and PEG by introduction of reactive groups. The functionalization was confirmed by <sup>1</sup>H NMR by the presence of olefinic hydrogens from C=C bond of methacrylate group in 5.5 ppm and 6.2 ppm. The main requirement for preparation of hydrogels is its solubility in water. Thus, the hydrogels were prepared with copolymer containing the ratio PLA:PEG of 0.8:1, synthesized from PEG of 4,600 g.mol<sup>-1</sup>, and characterized by compression and swelling degree. Hydrogels were obtained by photopolymerization of modified PEG, PLA-PEG-PLA and PLA-PEG-PLA containing 1 % gelatin. PEG hydrogels showed higher stiffness compared to others and hydrogels containing gelatin showed greater deformation capacity. The values for swelling degree of hydrogels were very close, but PLA-PEG-PLA hydrogels showed greater capacity for water content.

Keywords: ring opening polymerization, PLA-PEG-PLA, photopolymerization, hydrogel, gelatin.

## LISTAS DE FIGURA

Figura 1: Esquema da biossíntese do ácido láctico a partir do amido de milho. ....	12
Figura 2: Estruturas dos estereoisômeros de ácido láctico e lactídeo. ....	13
Figura 3: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do copolímero PLA-PEG-PLA obtido através de polimerização por abertura de anel. ( $\text{CDCl}_3$ ).....	22
Figura 4: Termograma de DSC do segundo ciclo de aquecimento para os copolímeros sintetizados com PEG de $4.600 \text{ g.mol}^{-1}$ .( $20^\circ\text{C}/\text{min}$ ).....	24
Figura 5: Aproximação do termograma de DSC do segundo ciclo de aquecimento para os copolímeros sintetizados com PEG de $4.600 \text{ g.mol}^{-1}$ .....	25
Figura 6: Termogramas de DSC do primeiro ciclo de resfriamento para os copolímeros sintetizados com PEG de $4.600 \text{ g.mol}^{-1}$ .....	26
Figura 7: Termogramas de DSC do segundo ciclo de aquecimento para os copolímeros sintetizados com PEG de $20.000 \text{ g.mol}^{-1}$ .....	26
Figura 8: Termogramas de DSC do primeiro ciclo de resfriamento para os copolímeros sintetizados com PEG de $20.000 \text{ g.mol}^{-1}$ .....	27
FIGURA 9: Termograma de TGA dos copolímeros sintetizados com PEG $4.600 \text{ g.mol}^{-1}$ (a) e com PEG de $20.000 \text{ g.mol}^{-1}$ (b).....	28
FIGURA 10: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do copolímero PLA-PEG-PLA funcionalizado com anidrido metacrílico. ( $\text{CDCl}_3$ ).....	30
FIGURA 11: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do copolímero PLA-PEG-PLA obtido através de polimerização por abertura de anel. ....	31
FIGURA 12: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do PEG antes (a) e depois da funcionalização (b).....	32
FIGURA 13: Foto do hidrogel após a análise do grau de inchamento (a) e do hidrogel seco (b). ....	33
FIGURA 14: Gráfico relacionando o grau de intumescimento (%) com o tempo para os hidrogéis de PEG, PLA-PEG-PLA e PLA-PEG-PLA com 1% de gelatina. ....	34
FIGURA 15: Gráfico de tensão x deformação para os hidrogéis de PEG, PLA-PEG-PLA E PLA-PEG-PLA com gelatina (1%) (Cop-gel).....	35

**SUMÁRIO**

<b>1</b>	<b><u>INTRODUÇÃO</u></b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b><u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u></b>	<b>8</b>
2.1	HIDROGÉIS	8
2.2	POLÍMEROS UTILIZADOS PARA A PREPARAÇÃO DE HIDROGÉIS	11
2.3	TÉCNICAS DE POLIMERIZAÇÃO	15
<b>3</b>	<b><u>OBJETIVO</u></b>	<b>16</b>
3.1	OBJETIVOS GERAIS	16
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
<b>4</b>	<b><u>METODOLOGIA</u></b>	<b>17</b>
4.1	SÍNTESE DOS COPOLÍMEROS	17
4.2	FUNCIONALIZAÇÃO DOS COPOLÍMEROS DE PLA-PEG-PLA	17
4.3	PREPARAÇÃO DOS HIDROGÉIS	18
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS	18
4.4.1	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	18
4.4.2	CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO (SEC)	19
4.4.3	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	19
4.4.4	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)	19
4.5	CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS	20
4.5.1	GRAU DE INTUMESCIMENTO	20
4.5.2	PROPRIEDADES MECÂNICAS	20
<b>5</b>	<b><u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u></b>	<b>21</b>
5.1	CARACTERIZAÇÕES DOS COPOLÍMEROS DE PLA-PEG-PLA	21
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS	32
<b>6</b>	<b><u>CONCLUSÕES</u></b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b><u>REFERÊNCIAS</u></b>	<b>36</b>
	<b><u>APÊNDICE A</u></b>	<b>40</b>
	<b><u>APÊNDICE B</u></b>	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os hidrogéis têm atraído atenção como biomateriais, em virtude de suas propriedades mecânicas e biológicas. Hidrogéis são constituídos de uma rede tridimensional de polímeros hidrofílicos, capazes de reter até 95 % de água em sua estrutura, os quais podem ser ligados covalentemente através de reações de reticulação ou mantidos unidos através de forças coesivas, como ligações de hidrogênio ou iônicas. O primeiro hidrogel sintético foi reportado em 1960 por Wichterle e Lim e, desde então, vêm atraindo grande interesse, principalmente em aplicações biomédicas e farmacêuticas. Além de apresentar biocompatibilidade, esses materiais possuem outras propriedades físico-químicas importantes, como uma grande capacidade de intumescimento em água sem ocorrer solubilização do material, microestrutura porosa, taxa de degradação controlada e boas propriedades mecânicas quando submetidos a ensaios por compressão.

O poli(etileno glicol) (PEG) apresenta propriedades físico-químicas e biológicas únicas, como biocompatibilidade, ausência de imunogenicidade e citotoxicidade, solubilidade em água e em solventes orgânicos e é facilmente eliminado do organismo (para massas molares abaixo de  $30.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ). Portanto, essas características permitem uma ampla aplicação biomédica e farmacêutica para este polímero. Além destes usos, o PEG também é frequentemente utilizado como macroiniciador em polimerizações por abertura de anel para a preparação de copolímeros em bloco com poliésteres.

Nas décadas recentes, poliésteres alifáticos têm sido largamente estudados para aplicações biológicas, especialmente os derivados de poli(ácido láctico) (PLA). Em virtude de sua biodegradabilidade e biocompatibilidade são considerados de grande interesse em biomedicina, engenharia de tecidos e sistemas de liberação controlada de fármacos. Além disso, o PLA também pode ser usado na fabricação de bioplásticos com variadas aplicações de uso final, como por exemplo, em embalagens descartáveis. Entretanto, em razão da característica hidrofóbica do PLA, sua utilização como biomaterial torna-se restrita para algumas aplicações. Uma forma de contornar este problema é introduzir um bloco de um poliéter hidrofílico em sua estrutura. Copolímeros em bloco preparados por polimerização por abertura de anel do lactídeo na presença de PEG monohidroxilado ou dihidroxilado e catalisador,



têm sido muito estudados nos últimos tempos. Um exemplo disso são os copolímeros tribloco PLA-PEG-PLA, os quais são muito utilizados como matrizes para sistemas de distribuição controlada de fármacos e para engenharia de tecidos.

Neste projeto foi mostrada a síntese e caracterização do copolímero PLA-PEG-PLA e sua funcionalização com anidrido metacrílico e posteriormente sua aplicação na preparação de hidrogéis.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 HIDROGÉIS**

Hidrogéis são matrizes tridimensionais de polímeros hidrofílicos reticulados, sejam, através de ligações covalentes (reticulação química), ou por interações intermoleculares (reticulação física).<sup>1</sup> Por serem hidrofílicos, possuem a capacidade de absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos e, ao mesmo tempo não se dissolvem devido a sua estrutura reticulada, conferindo propriedades únicas de poucos materiais. Podem ser obtidos a partir de polímeros naturais ou polímeros sintéticos (homopolímeros ou copolímeros).

As pesquisas sobre hidrogéis começaram em 1960 com Wichterle e Lim com o poli(metacrilato de 2-hidroxietila).<sup>2</sup> O interesse nas décadas seguintes cresceu exponencialmente e continua crescendo linearmente nos últimos anos.<sup>3</sup> Os hidrogéis são muito atrativos para aplicações biomédicas, como liberação controlada de fármacos, em função da sua excelente biocompatibilidade, grande quantidade de água presente e por adquirirem formatos e tamanhos diversos. Essas propriedades variam com o polímero utilizado na formação do hidrogel. Moléculas bioativas podem ser inseridas nos hidrogéis de forma física ou química.<sup>1</sup>

Alguns hidrogéis apresentam ligações lábeis que podem ser clivadas hidroliticamente ou enzimaticamente, ou seja, são degradáveis. Algumas aplicações para hidrogéis degradáveis são veículos para liberação de fármacos, adesivos teciduais, implantes ortopédicos e barreiras de adesão. São interessantes como suportes, para engenharia de tecidos, por não permanecerem indefinidamente no organismo.<sup>4</sup>

A reticulação dos hidrogéis pode ser formada quimicamente ou fisicamente. As ligações formadas quimicamente são ligações covalentes e os hidrogéis formados por este tipo de ligação possuem melhores propriedades mecânicas. Por outro lado, as interações físicas podem acontecer por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas ou eletrostáticas. Ligações de hidrogênio e outras ligações não covalentes são muito mais fracas do que as covalentes. Os métodos de reação que proporcionam reticulação química incluem polimerização radicalar, reações químicas de grupos complementares e polimerização enzimática. A reticulação física pode ocorrer tanto por alterações no pH como na temperatura. Hidrogéis sensíveis ao pH são formados pela adição de grupos funcionais ácidos ou básicos na estrutura do polímero, desta forma, quando há variação no pH ou na força iônica, forma-se um hidrogel por interações físicas. Esse tipo de hidrogel é mais hidrofílico em virtude das cargas presentes, o que torna seu grau de intumescimento maior. No caso de hidrogéis termosensíveis, a temperatura pode aumentar ou diminuir o grau de intumescimento. Em hidrogéis com características predominantemente hidrofílicas, baixas temperaturas aumentam o grau de intumescimento, porém quando a temperatura é elevada há predominância de interações hidrofóbicas, causando separação de fase.<sup>5</sup>

Petka e colaboradores desenvolveram hidrogéis que apresentam transições sol-gel reversíveis, alterando a temperatura ou o pH do meio.<sup>6</sup> Quando um dos componentes do hidrogel é um ácido fraco e o outro é uma base, o hidrogel será fortemente dependente do pH. Esses hidrogéis que respondem a estímulos, como temperatura ou pH, são chamados de hidrogéis inteligentes pois podem ser formados nas condições de temperatura e pH de um organismo vivo.<sup>3</sup> Hidrogéis termosensíveis têm sido muito estudados para aplicações como carregadores de fármacos, eles se tornam semi-sólidos na temperatura do organismo. Esse tipo de hidrogel permite que a aplicação seja feita por injeção.<sup>7</sup>

Hidrogéis preparados a partir de polímeros sintéticos possuem vantagens quando comparados aos hidrogéis provenientes de polímeros naturais. Algumas dessas vantagens são: possibilidade de fotopolimerização, ajuste das propriedades mecânicas, controle da composição química e da arquitetura.<sup>8</sup> Em particular, as propriedades mecânicas dos hidrogéis são afetadas por diversos fatores, como a densidade de ligações cruzadas, características da composição do polímero e do

grupo de reticulação, grau de intumescimento e grau de degradação.<sup>9</sup> Hidrogéis obtidos através de fotopolimerização têm sido muito investigados para aplicações em engenharia de tecidos como suportes, por permitirem polimerização *in situ* utilizando estratégias minimamente invasivas. O suporte fotopolimerizado deve ter uma densidade de reticulação controlada, bem como interação celular, de forma que permita difusão de nutrientes desejáveis, propriedades mecânicas adequadas e liberação adequada de fármacos ou biomoléculas.<sup>10</sup>

Em virtude de sua excelente biocompatibilidade, são biomateriais muito estudados em aplicações biomédicas, uma vez que causam mínimas respostas inflamatórias, trombose e danos ao tecido.<sup>11</sup>

Para aplicações biomédicas, a inter-relação entre o processamento de um hidrogel, a estrutura e as propriedades é a base fundamental a ser considerada. Em hidrogéis compatíveis com células, essa inter-relação é complicada em virtude de uma multiplicidade de interações moleculares na interface entre a célula e o material. Desta forma, um projeto para este tipo de aplicação, deve focar nas propriedades adequadas, incluindo propriedades de transporte (liberação controlada), interações de tecido (bioatividade) e estabilidade química.<sup>12</sup>

A quantidade de água na matriz polimérica pode variar de 20 a 99%. Os hidrogéis que contêm mais de 95% são chamados de superabsorventes e por isso são altamente biocompatíveis, podendo ser comparados à matriz extracelular pela semelhança na composição e nas propriedades mecânicas.<sup>9</sup>

Hidrogéis podem ser classificados em quatro grupos:<sup>9</sup>

- Pela carga elétrica: iônicos ou neutros
- Estrutura física: amorfo, semicristalino, ligações de hidrogênio ou supramolecular
- Respostas a efeitos externos: sensíveis a estímulos ou insensíveis
- Origem: sintéticos ou naturais

O grau de degradação do hidrogel deve obedecer a taxa de formação do novo tecido ou a taxa de distribuição de moléculas bioativas. Normalmente, hidrogéis formados de polímeros sintéticos sofrem degradação através da hidrólise de ligações ésteres.<sup>9</sup>

## 2.2 POLÍMEROS UTILIZADOS PARA A PREPARAÇÃO DE HIDROGÉIS

Muitos polímeros têm sido investigados para utilização como biomateriais. Poliésteres alifáticos chamam atenção para tal aplicação por serem biocompatíveis e biodegradáveis, tais como poli( $\epsilon$ -caprolactona), poli(ácido lático), poli(ácido glicólico).<sup>1</sup>

Um dos macromônômeros mais utilizados na fabricação de hidrogéis sintéticos aplicados na medicina é o poli(etilenoglicol) (PEG), o qual é aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), órgão regulador de produtos alimentícios e medicamentos dos Estados Unidos, equivalente à ANVISA no Brasil. Trata-se de um polímero hidrofílico que forma redes tridimensionais reticuladas quando modificado com grupos acrilatos ou metacrilatos, em virtude dos dois grupos hidroxila terminais. Pode formar copolímeros com o poli(ácido lático), e os hidrogéis utilizando esse copolímero como macromônômero possuem a vantagem de ser termicamente reversíveis, dependendo da composição dos copolímeros. Esse copolímero também combina a degradabilidade do PLA com a biocompatibilidade do PEG.<sup>8;9</sup>

Hubbell e colaboradores<sup>13</sup> utilizaram macromônômeros de PEG, na fabricação de hidrogéis biocompatíveis. O PEG foi copolimerizado com oligopeptídeos que podem ser comparados a substratos encontrados na matriz extracelular (ECM).<sup>12</sup>

O copolímero formado com PLA/PEG é do tipo anfifílico, e tem sido estudado devido as suas excelentes propriedades de biocompatibilidade, degradabilidade e por ser bioreabsorvível. Para que possa ser utilizado na preparação de hidrogéis, este copolímero precisa ser solúvel em água, o que depende muito da razão entre o tamanho dos segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos.<sup>14</sup> Sawhney e colaboradores<sup>15</sup> reportaram a formação de hidrogéis biodegradáveis a partir da fotopolimerização deste tipo de polímero. Para preparar o hidrogel foi utilizado o copolímero em bloco poli(ácido lático)-poli(etilenoglicol)-poli(ácido lático) (PLA-*b*-PEG-*b*-PLA) funcionalizado com grupos terminais acrilato. A formação do hidrogel ocorreu pela reação dos grupos terminais acrilato a partir da iniciação de um fotoiniciador sob a ação da luz ultravioleta. A densidade de ligação cruzadas está ligada diretamente com a cinética de degradação, comportamento mecânico e o grau de intumescimento.<sup>16</sup>

Os hidrogéis preparados a partir do macromônômero de PLA-*b*-PEG-*b*-PLA foram desenvolvidos com o intuito de manter as vantagens dos hidrogéis à base de

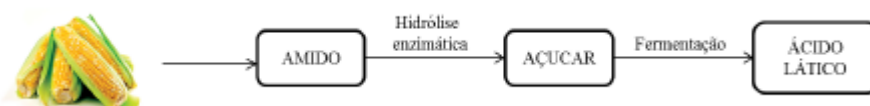
PEG, acrescidos da vantagem de serem degradáveis. Outro fator é a estrutura física do hidrogel. Com o aumento da massa molar do segmento de PEG, a densidade de ligações cruzadas diminui, aumentando o intumescimento e acelerando a degradação. A densidade de ligações cruzadas pode também controlar o tamanho da malha do hidrogel formando, sendo responsável pela difusividade de biomoléculas encapsuladas. A degradação do PLA-*b*-PEG-*b*-PLA gera compostos de caráter ácido, alterando o pH e a força iônica do meio e dessa forma, a taxa de degradação aumenta com a formação dessas espécies.<sup>17</sup>

Além de polímeros sintéticos, polímeros naturais também são largamente utilizados para a preparação de hidrogéis como, por exemplo, a gelatina. Esta biomolécula natural é obtida pela hidrólise parcial do colágeno, extraído de diversas fontes animais. Possui um baixo preço, e quando comparada ao colágeno é mais solúvel em água e possui menor imunogenicidade. Ela apresenta sequência de aminoácidos RGD (arginina, glicina e aspartato), sendo, portanto, específica para adesão à superfície celular, por isso pode ser utilizada para melhorar a fixação das células. A gelatina, assim como o colágeno, são exemplos de biomoléculas muito utilizadas em aplicações biomédicas. Da mesma forma que polímeros sintéticos, a gelatina pode ser modificada com grupos metacrilamida ou tiol para a formação de hidrogéis.<sup>18</sup>

O poli(ácido láctico) (PLA) é um poliéster alifático derivado do ácido láctico (ácido 2-hidróxiopropanóico). É de origem natural e é considerado biodegradável, biocompostável e biocompatível.<sup>19; 20; 21; 22</sup>

A produção do PLA inicia na biossíntese do ácido láctico através da extração do açúcar, como mostrado na Figura 1.<sup>23</sup>

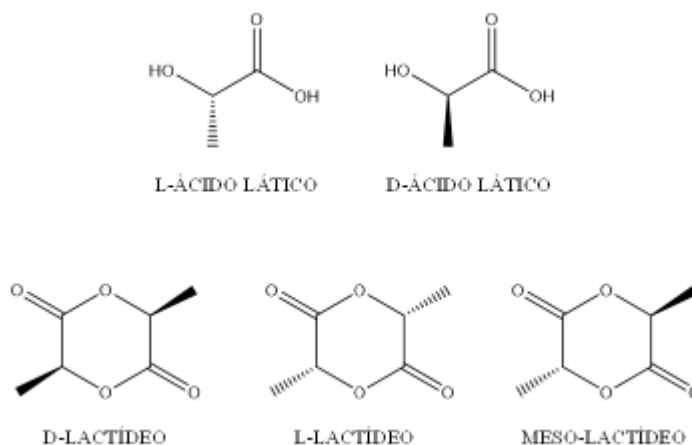
Figura 1: Esquema da biossíntese do ácido láctico a partir do amido de milho.



O ácido láctico possui um carbono assimétrico, podendo existir em duas configurações opticamente ativas (D e L) ou como mistura racêmica. O lactídeo é o dímero cíclico do ácido láctico, ou seja, é formado pela condensação de duas

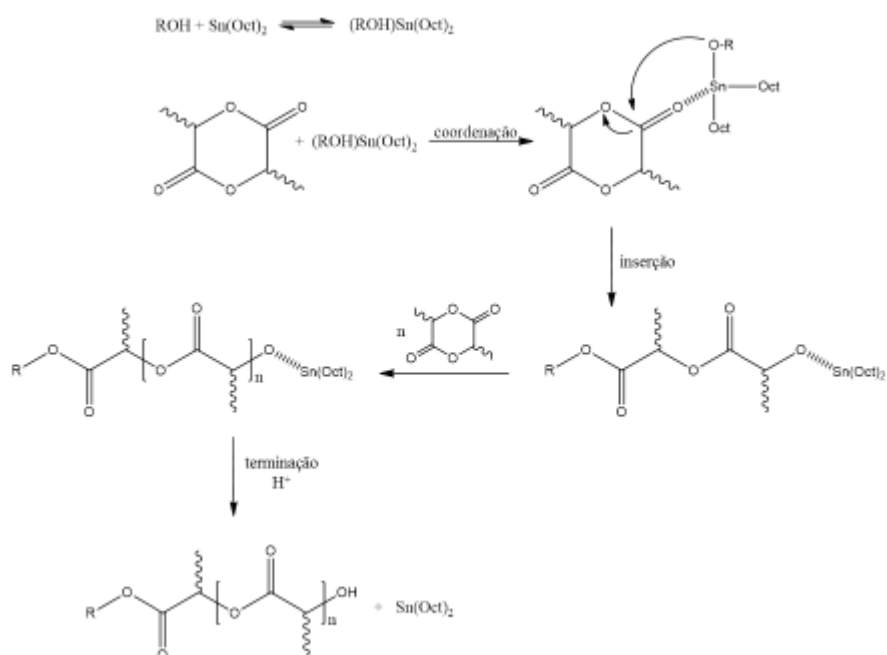
moléculas de ácido láctico. Da mesma forma que o ácido láctico, ele pode existir nas formas isoméricas: L-lactídeo, D-lactídeo e meso-lactídeo.<sup>20</sup>

Figura 2: Estruturas dos estereoisômeros de ácido láctico e lactídeo.



A polimerização por abertura de anel (ROP) é uma polimerização em cadeia em monômeros cíclicos, que normalmente contém heteroátomos.<sup>24</sup> O PLA pode ser sintetizado por esse método utilizando como monômero o lactídeo. O catalisador mais utilizado para a síntese de poliésteres alifáticos é o 2-etilhexanoato de estanho (II) ( $\text{Sn}(\text{oct})_2$ ) em virtude de ser mais disponível, de fácil manuseio, solúvel em solventes orgânicos e monômeros ésteres cíclicos e pode ser usado como aditivo em materiais em contato com alimentos.<sup>25</sup> A proposta de mecanismo desse tipo de polimerização utilizando  $\text{Sn}(\text{oct})_2$  ainda não é totalmente conhecida, mas tudo indica que ocorre por coordenação-inserção, como mostrado na Figura 4.<sup>26</sup> O  $\text{Sn}(\text{oct})_2$  apresenta algumas desvantagens tais como a necessidade de elevadas temperaturas e ocasionais reações paralelas.

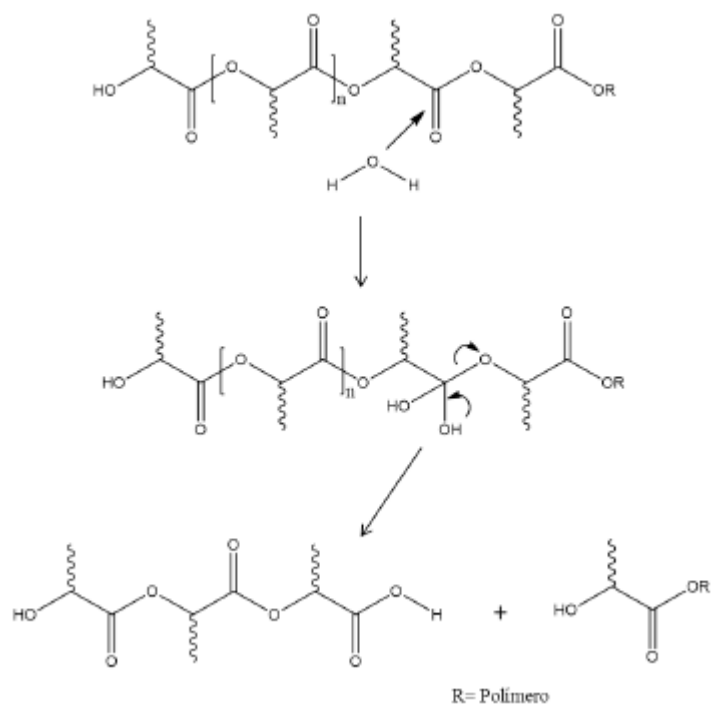
Esquema 1: Proposta do mecanismo ROP para a produção de PLA.



As propriedades do PLA dependem da proporção dos seus isômeros presentes no polímero. Os polímeros que possuem mais do que 93% do isômero L- na estrutura são considerados semicristalinos, enquanto os que possuem entre 50-93% do isômero L- na estrutura são estritamente amorfos.<sup>27</sup> As temperaturas de fusão podem variar entre 130-180°C e de transição vítrea entre 50-80°C. A cristalinidade influencia diretamente as propriedades mecânicas.<sup>28</sup>

A degradação do PLA passa por diversas etapas, incluindo absorção de água, hidrólise, perda da integridade mecânica, até consumo por microorganismos.<sup>29</sup> A principal via de degradação é a sensibilidade à umidade, em virtude da água absorvida provocar a clivagem da ligação éster. Essa clivagem causa a redução da massa molar do polímero.<sup>30</sup>

Esquema 2: Hidrólise do PLA.



### 2.3 FOTOPOLIMERIZAÇÃO

A fotopolimerização é usada em muitas aplicações, tais como materiais eletrônicos, óticos, membranas, revestimentos, modificação de superfícies, engenharia de tecidos, biosensores, sistemas de distribuição de fármacos e restaurações dentárias in situ. Porém sua eficiência depende da espessura do material, de forma que a luz não alcança grandes espessuras. Outro fator importante são os monômeros utilizados, o fotoiniciador e o comprimento de onda do feixe. O fotoiniciador é ponto mais importante a ser observado, de forma que ele controla a taxa da reação, o comprimento de onda de absorção da reação e a resistência do material sob condições de armazenamento. Utilizando essa técnica aliada a polímeros biodegradáveis, aumenta o interesse para aplicações biomédicas.<sup>31</sup>

Os fotoiniciadores são compostos sensíveis à luz, portanto interagem em contato com luz visível ou ultravioleta, formando radicais livres que iniciam a polimerização. Para a escolha adequada do fotoiniciador utilizado na preparação de hidrogéis é preciso levar em consideração a biocompatibilidade, solubilidade em água, estabilidade e citotoxicidade. Uma das maiores vantagens do uso da



fotopolimerização de hidrogéis, é que pode ser realizada *in situ*, em meio aquoso, e adquirir formatos complexos específicos, os quais seriam difíceis de serem reproduzidos de outra maneira. Porém, condições de polimerização *in vivo* são complicadas, pelo fato de que os sistemas biológicos exigem uma estreita faixa de temperatura e pH aceitáveis e, também, a ausência de materiais tóxicos, como são a maioria dos monômeros e solventes orgânicos. Portanto, uma forma de eliminar essa complicação é utilizando macromonômeros que podem ser solúveis em água e que possuem baixa toxicidade, utilizando baixa intensidade de luz, temperatura fisiológica e não utilizando solventes orgânicos.<sup>11</sup> A técnica de fotopolimerização traz vantagens quando comparada com a polimerização convencional, como por exemplo, altas taxas de polimerização, controle da forma final do polímero ou hidrogel, reação rápida a baixas temperaturas.<sup>16</sup>

Enquanto muitos sistemas de polimerização não podem ser aplicados para engenharia de tecidos em virtude da citotoxicidade dos monômeros, a fotopolimerização permite formar hidrogéis utilizando macromonômeros. Os macromonômeros utilizados para este fim precisam ser solúveis em água e possuírem dois ou mais grupos reativos.<sup>11</sup> Além disso, as condições de reação, a intensidade da luz, a temperatura da reação e o tipo de fotoiniciador, são parâmetros que influenciam na cinética de fotopolimerização de polímeros com grupos reticuláveis.<sup>18</sup>

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 OBJETIVOS GERAIS**

O objetivo geral do presente trabalho de conclusão de curso é a obtenção de hidrogéis a base de copolímero PLA-PEG-PLA com gelatina e sua caracterização, visando futuras aplicações em medicina regenerativa.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Sintetizar e caracterizar um copolímero tribloco de PLA-PEG-PLA solúvel em água;
- ✓ Funcionalizar o copolímero tribloco com anidrido metacrílico;
- ✓ Preparar hidrogéis à base do copolímero tribloco, com a adição de gelatina;
- ✓ Caracterização dos hidrogéis.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 SÍNTESE DOS COPOLÍMEROS

Os copolímeros foram sintetizados através de polimerização por abertura de anel do monômero D,L-lactídeo utilizando PEG como iniciador. No total, 8 copolímeros foram preparados: 4 utilizando PEG com massa molar de  $4.600 \text{ g.mol}^{-1}$  e 4 com massa molar de  $20.000 \text{ g.mol}^{-1}$ , onde a proporção em massa de D,L-lactídeo:PEG foi variada. A obtenção desses copolímeros foi realizada conforme procedimento padrão descrito abaixo.<sup>32</sup>

Em um balão monotubulado com rosca foram adicionados o D,L-lactídeo, o PEG e o octanoato de estanho, sob atmosfera inerte. O balão foi colocado em um banho de silicone a  $150 \text{ }^\circ\text{C}$  por 3 horas sob agitação magnética. Após o término da reação, o produto sólido obtido foi dissolvido em tetrahidrofurano (THF) e precipitado em hexano. Esse processo foi realizado duas vezes para garantir maior pureza do copolímero. Posteriormente, o produto foi solubilizado em diclorometano, o solvente foi retirado em evaporador rotatório e o sólido remanescente foi seco sob vácuo por 16 horas.

### 4.2 FUNCIONALIZAÇÃO DOS COPOLÍMEROS DE PLA-PEG-PLA

A funcionalização dos copolímeros é necessária para que haja a formação dos hidrogéis através de grupos reticuláveis, tais como grupos acrilato ou metacrilato.<sup>33</sup>

Assim, no procedimento padrão para esta funcionalização, o copolímero foi solubilizado em diclorometano seco, sob atmosfera inerte, seguido da adição de anidrido metacrílico (3 eq.) e trietilamina (3 eq.). A reação foi realizada por 4 dias à temperatura ambiente. Após este período, o diclorometano foi evaporado em evaporador rotatório e o produto remanescente foi solubilizado em THF e precipitado em hexano (2x). O material sólido obtido foi seco sob vácuo por 16 horas. Para fins de comparação, tanto o PEG de massa molar de  $4.600 \text{ g.mol}^{-1}$  quanto o PEG de massa molar de  $20.000 \text{ g.mol}^{-1}$  foram submetidos ao mesmo procedimento experimental para a funcionalização destes polímeros.

### 4.3 PREPARAÇÃO DOS HIDROGÉIS

O copolímero funcionalizado que se mostrou solúvel em meio aquoso foi utilizado na preparação dos hidrogéis. Uma solução de 15% do copolímero em tampão fosfato (pH 7,4, borbulhado com gás inerte para a remoção de oxigênio dissolvido) foi preparada. Após a solubilização, o iniciador foi adicionado e a reação de reticulação para a formação do hidrogel foi realizada via polimerização fotoquímica. Hidrogéis de copolímero contendo gelatina (1%) foram preparados via polimerização fotoquímica, utilizando ácido acético (3%) para auxiliar a solubilização deste polímero natural.<sup>34</sup> O procedimento também foi realizado com o PEG funcionalizado, para fins de comparação.

As soluções foram colocadas em seringas cortadas e a fotopolimerização foi realizada com o iniciador Irgacure 2959, utilizando uma lâmpada de luz ultravioleta ( $8,42 \text{ mW/cm}^2$ ) em comprimento de onda de 365nm, durante 1 hora, à temperatura ambiente.

### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS

#### 4.4.1 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram obtidos a 400 MHz e 100 MHz, respectivamente, em tubos de 5 mm de diâmetro interno, utilizando o espectrômetro

Bio Spin GmbH (*Bruker*). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) estão relacionados em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS), utilizado como padrão interno. As amostras foram preparadas solubilizando 20 mg ( $^1\text{H}$ ) ou 60 mg ( $^{13}\text{C}$ ) do polímero em 0,75 mL de  $\text{CDCl}_3$ .

#### 4.4.2 Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)

A análise de cromatografia por exclusão de tamanho foi utilizada para determinar a massa molar dos polímeros sintetizados. As massas molares médias ( $M_n$  e  $M_w$ ) bem como a distribuição de massas molares ( $M_w/M_n$ ) foram determinadas em relação à padrões de poliestireno. As amostras foram solubilizadas em THF, filtradas em filtros de PVDF (0,45  $\mu\text{m}$  de poro) e analisadas à 45 °C utilizando THF como eluente a uma vazão de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Todas as análises foram realizadas em um equipamento GPCmax VE2001 (*Viscotek*) equipado com detector de índice de refração.

#### 4.4.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises de DSC foram realizadas em equipamento de análise térmica DSC modelo Q20 da *TA Instruments*, sob atmosfera de nitrogênio. Para cada análise aproximadamente 10 mg de amostra foram pesadas em panelas herméticas de alumínio e submetidas a uma taxa de aquecimento de 20  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  de -60°C a 180°C, seguido do resfriamento na mesma taxa utilizada. Em seguida, a amostra foi submetida a um segundo ciclo de aquecimento e de resfriamento, utilizando as mesmas condições do primeiro ciclo.

#### 4.4.4 Análise termogravimétrica (TGA)

Os termogramas de TGA foram obtidos em um analisador térmico modelo Q50 da *TA Instruments*. Para cada análise, cerca de 5 mg de amostra foram colocados em um porta amostras de platina e submetidas a um aquecimento de 30 °C a 700 °C, empregando uma taxa de aquecimento de 20°C e sob atmosfera inerte.

## 4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS

### 4.5.1 Grau de intumescimento

O grau de intumescimento foi utilizado para avaliar a quantidade de água que os hidrogéis são capazes de absorver.<sup>35</sup> Para isso, os hidrogéis secos foram pesados e colocados em 5 mL de uma solução tampão fosfato (pH 7,4). O inchamento dos hidrogéis foi determinado através da pesagem das amostras inchadas em diferentes tempos, retirando-se o excesso de água utilizando um papel filtro. As análises foram realizadas em triplicata, à temperatura ambiente, onde foram determinados o percentual de água absorvida (W) e o grau de intumescimento (Q) dos hidrogéis segundo as equações abaixo:

$$W = (M_t/M_s) \times 100$$

$$Q = [(M_t - M_s)/M_t] \times 100$$

$M_t$ : Massa do hidrogel intumescido

$M_s$ : Massa do hidrogel seco

### 4.5.2 Propriedades mecânicas

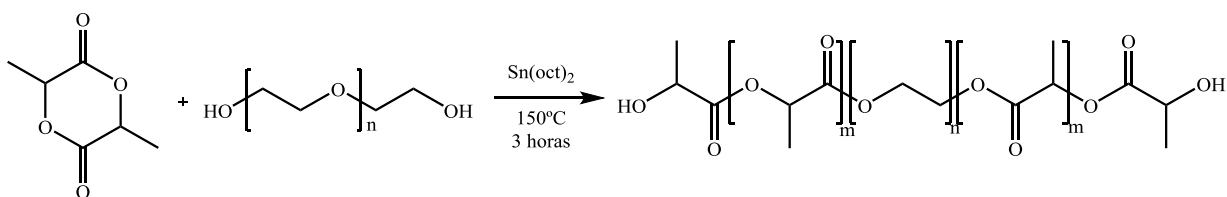
As propriedades mecânicas dos hidrogéis foram investigadas através de ensaios de tensão *versus* deformação em modo de compressão, utilizando um aparelho de análise dinâmico-mecânica modelo Q800 (*TA Instruments*). Para cada grupo de hidrogéis foram utilizadas 3 amostras em formato cilíndrico, as quais foram submersas em tampão fosfato (PBS, pH= 7,4) por cerca de 3 horas antes das análises. Após remover o excesso de água, as amostras medindo aproximadamente 9,1 mm x 9,6 mm (altura x diâmetro) foram submetidas a uma rampa de força de 1 N.min<sup>-1</sup> até 18 N, mantendo-se uma temperatura constante de 37 °C. O módulo de elasticidade foi calculado a partir da inclinação da tangente à curva de tensão x deformação e a tensão máxima foi obtida a partir do ponto de ruptura dos hidrogéis.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÕES DOS COPOLÍMEROS DE PLA-PEG-PLA

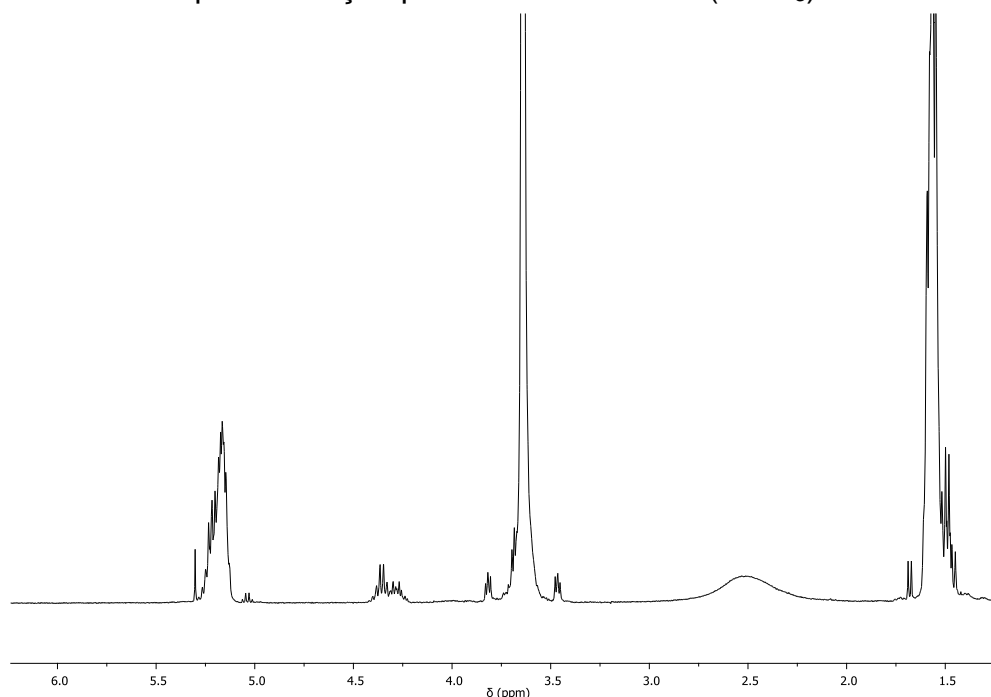
Os copolímeros de PLA-PEG-PLA foram sintetizados a partir da polimerização por abertura de anel do monômero cíclico D,L-lactídeo utilizando o polímero PEG como iniciador e octanoato de estanho (II) como catalisador (Esquema 1). Os copolímeros foram sintetizados em proporções de D,L-lactídeo:PEG de 2:1, 1:1, 0,8:1 e 0,5:1 (m/m). Além disso, dois polímeros de PEG com diferentes massas molares foram usados, obtendo-se um total de oito copolímeros distintos.

Esquema 3: Reação de formação do copolímero tribloco PLA-b-PEG-b-PLA



A Figura 3 apresenta o espectro de RMN de <sup>1</sup>H de um dos polímeros obtidos por abertura de anel. A interpretação deste gráfico mostra a presença de um intenso sinal em cerca de 1,6 ppm referente aos hidrogênios metílicos da unidade repetitiva do PLA, bem como um multiplete em 5,2 ppm atribuídos aos hidrogênios –CH desta mesma unidade repetitiva. Em cerca de 3,7 ppm observa-se um intenso sinal referente aos hidrogênios metilênicos da cadeia do PEG e entre 4,25-4,45 ppm ocorre a presença de dois conjuntos de multipletos, os quais são atribuídos aos hidrogênios -CH terminais das cadeias de PLA e aos hidrogênios –CH<sub>2</sub> terminais da cadeia do PEG. Um espectro mais detalhado, contendo a estrutura e as atribuições encontram-se em anexo.

Figura 3: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do copolímero PLA-PEG-PLA obtido através de polimerização por abertura de anel. ( $\text{CDCl}_3$ )



A partir dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foi possível calcular as massas molares médias dos polímeros sintetizados utilizando os valores das integrais referentes ao hidrogênio  $-\text{CH}$  da unidade repetitiva do PLA, em 5,25 ppm, e aos hidrogênios dos dois  $-\text{CH}_2$  da unidade repetitiva do PEG, em 3,65 ppm, através da equação:<sup>36</sup>

$$M_{nRMN} = M_{nPEG} + \left( \frac{M_{nPEG}}{44} \times 72 \times 4 \times \frac{I_{CHPLA}}{I_{CH_2PEG}} \right)$$

Os copolímeros obtidos foram analisados também por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) para a determinação da massas molares médias numéricas ( $M_n$ ) e ponderais ( $M_w$ ), assim como a polidispersidade das amostras ( $M_w/M_n$ ). Os dados das massas molares obtidas tanto por RMN quanto por SEC foram comparadas com as massas molares teóricas para cada copolímero e os resultados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Massas molares dos copolímeros PLA-PEG-PLA, em diferentes proporções, obtidos por SEC e RMN de  $^1\text{H}$ .

lactídeo:PEG	$M_n$ teórico <sup>a</sup>	$M_n$ RMN <sup>a</sup>	$M_n$ SEC <sup>a</sup>	$(M_w/M_n)^b$
PEG 4.600 g.mol <sup>-1</sup>				

<b>0,5:1</b>	6.900	6.000	9.500	1,03
<b>0,8:1</b>	8.300	7.800	10.400	1,07
<b>1:1</b>	9.200	8.400	10.100	1,08
<b>2:1</b>	13.800	13.400	12.100	1,11
<b>PEG 20.000 g.mol<sup>-1</sup></b>				
<b>0,5:1</b>	30.000	27.620	24.900	1,09
<b>0,8:1</b>	36.000	33.000	23.100	1,17
<b>1:1</b>	40.000	38.000	26.700	1,08
<b>2:1</b>	60.000	57.100	14.500	1,25

a. Valores em g.mol<sup>-1</sup>

b. Obtido por SEC.

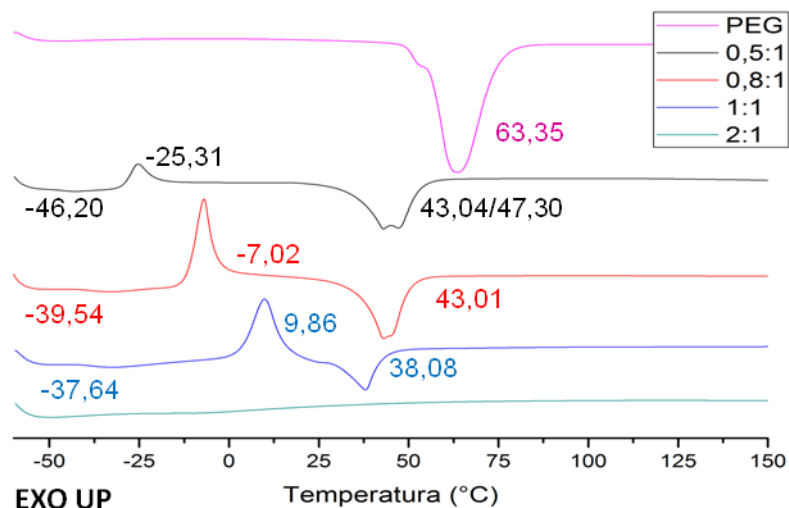
A partir dos resultados mostrados na Tabela 1 foi possível verificar que os valores de massas molares calculados através dos espectros de RMN dos produtos aproximam-se aos valores teóricos para todas as amostras. Ao analisar os valores obtidos através da análise de SEC, contudo, observa-se que há uma diferença expressiva em relação aos valores teóricos, principalmente para os copolímeros sintetizados a partir do PEG de 20.000 g.mol<sup>-1</sup>. Estes resultados podem estar relacionados à utilização de uma curva de calibração com padrões de poliestireno, o qual em solução irá apresentar um volume hidrodinâmico diferente do copolímero PLA-PEG-PLA e, conseqüentemente, uma massa molar diferente da esperada. Além disso, o THF pode não ser um bom solvente para estes copolímeros, reduzindo o volume hidrodinâmico do novelo polimérico em solução. Deste modo, a massa molar adotada para o cálculo das reações de funcionalização das cadeias com anidrido metacrílico foi aquela calculada através da análise de RMN.

A análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada para determinar a influência da quantidade de PLA nas propriedades térmicas do copolímero. A Figura 4 mostra os termogramas do segundo ciclo de aquecimento para os copolímeros sintetizados com o PEG de massa molar de 4.600 g.mol<sup>-1</sup>, em comparação ao termograma do PEG puro. A curva referente ao PEG apresenta somente um pico de fusão em 63,3 °C, em virtude da característica semi-cristalina deste polímero. Entretanto, não foi possível determinar a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) na faixa de temperatura analisada. Para os copolímeros contendo as proporções de 0,5:1, 0,8:1 e 1:1, observa-se um deslocamento do pico de fusão para temperaturas mais baixas quando comparados com o PEG. Esta diminuição relaciona-se ao rompimento da regularidade da cadeia do PEG pela presença das



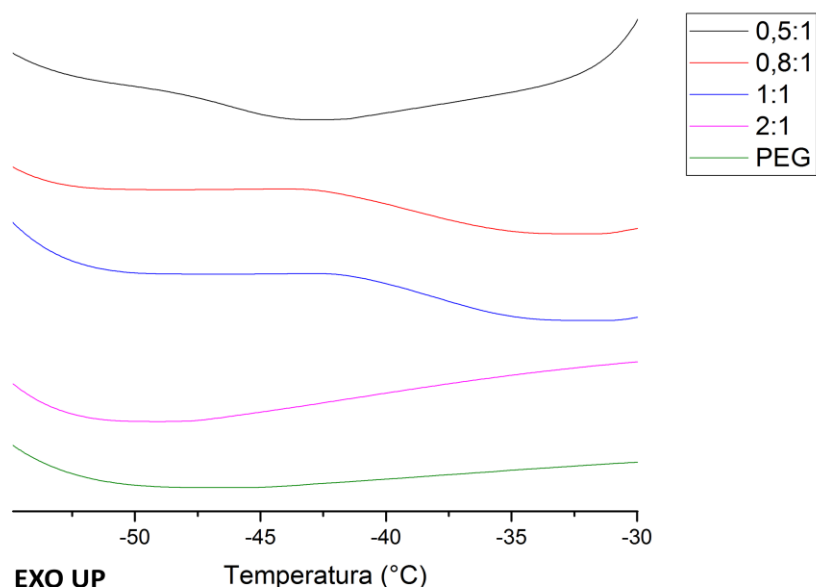
cadeias do PLA, o que leva à diminuição da formação de estruturas cristalinas no copolímero. Quando uma proporção de 2:1 de D,L-lactídeo:PEG foi utilizada, o polímero obtido apresentou-se completamente amorfo.

Figura 4: Termograma de DSC do segundo ciclo de aquecimento para os copolímeros sintetizados com PEG de  $4.600 \text{ g.mol}^{-1}$ . ( $20^\circ\text{C}/\text{min}$ )



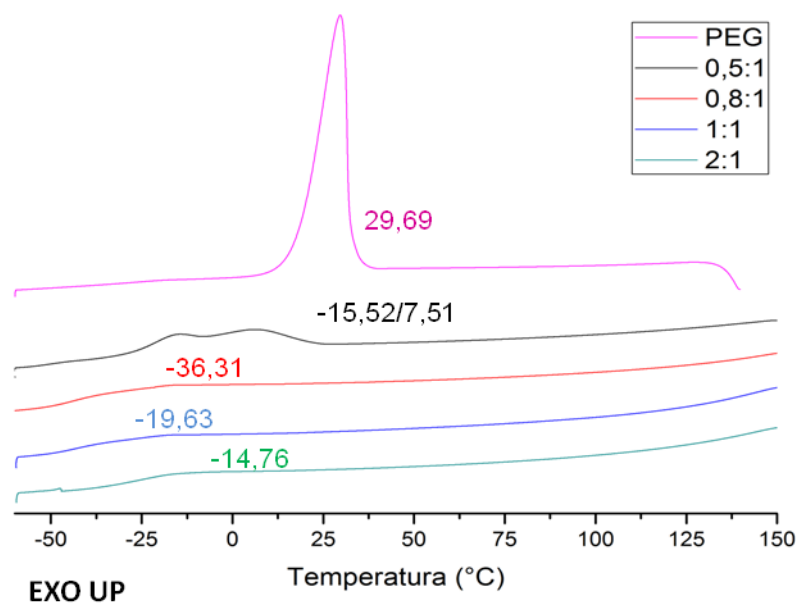
Nos copolímeros contendo as proporções de 0,5:1, 0,8:1 e 1:1 de PLA:PEG foi possível observar as temperaturas de transição vítrea próximas a  $-40^\circ\text{C}$ . Porém, para o PLA-PEG-PLA de proporção 2:1 não foi possível determinar com certeza a temperatura de transição deste copolímero, apenas uma evidência em cerca de  $-15^\circ\text{C}$  (Figura 6).

Figura 5: Aproximação do termograma de DSC do segundo ciclo de aquecimento para os copolímeros sintetizados com PEG de  $4.600 \text{ g.mol}^{-1}$ .



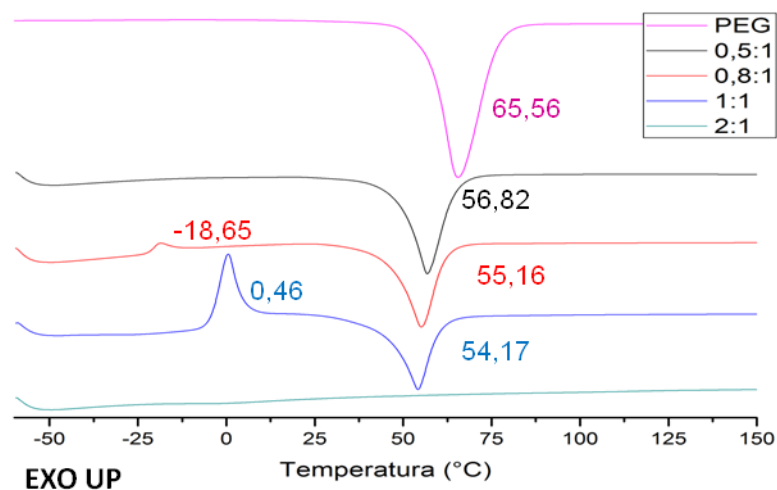
Além das temperaturas  $T_g$  e  $T_m$ , também pode ser observado um pico de cristalização nos copolímeros contendo as proporções de 0,5:1, 0,8:1 e 1:1 de lactídeo:PEG, o qual se desloca pra maiores temperaturas e aumenta de intensidade com o aumento de PLA na cadeia. Esse pico de cristalização pode estar relacionado com o pico observado no primeiro resfriamento (Figura 6). A cristalização dos copolímeros se inicia no primeiro resfriamento onde, em virtude da presença das cadeias do PLA, ocorre apenas uma organização parcial das cadeias do copolímero para a formação dos cristais. Entretanto, somente a partir do segundo aquecimento, quando o polímero volta a ter mobilidade, é que a cristalização do copolímero se completa. Isso explica a diminuição do pico de cristalização no primeiro resfriamento com o aumento da proporção de PLA e o deslocamento do mesmo para menores temperaturas. Para a curva de resfriamento do PEG, contudo, observa-se um intenso pico relacionado à cristalização do polímero, o qual não se observa no aquecimento, indicando que toda a amostra cristalizou durante o resfriamento. A curva do polímero de proporção 0,5:1 apresenta dois picos de fusão e dois de cristalização, no resfriamento. A presença destes picos pode estar relacionada à presença de polímeros com cadeias de PLA de diferentes tamanhos, os quais comportam-se de forma distinta.

Figura 6: Termogramas de DSC do primeiro ciclo de resfriamento para os copolímeros sintetizados com PEG de  $4.600 \text{ g.mol}^{-1}$



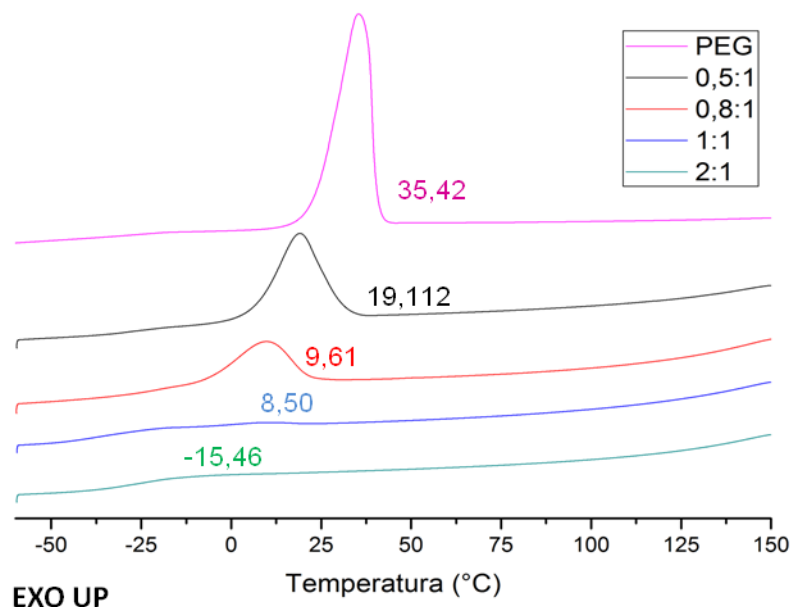
Na Figura 7 é mostrado o termograma de DSC do segundo ciclo de aquecimento dos copolímeros de PLA-PEG-PLA sintetizados a partir do PEG com massa molar de  $20.000 \text{ g.mol}^{-1}$ , em comparação ao PEG puro. O resultado destas análises foi semelhante aos copolímeros sintetizados a partir do PEG com massa molar de  $4.600 \text{ g.mol}^{-1}$ , ou seja, com o aumento do PLA no copolímero observa-se uma diminuição na temperatura de fusão.

Figura 7: Termogramas de DSC do segundo ciclo de aquecimento para os copolímeros sintetizados com PEG de  $20.000 \text{ g.mol}^{-1}$ .



Assim como observado para os copolímeros anteriores, nas curvas dos copolímeros de proporções de 0,8:1 e de 1:1 aparecem picos exotérmicos relacionados à cristalização, mostrando que ela não aconteceu completamente durante o primeiro resfriamento. No copolímero de proporção de 0,5:1, contudo, esse pico não é observado e isso pode ser explicado pelo fato de toda a cristalização ter ocorrido durante o primeiro resfriamento. Essa afirmação é corroborada ao se analisar as curvas referentes ao primeiro resfriamento destes copolímeros, as quais estão mostradas na Figura 8. A menor proporção de PLA no copolímero (0,5:1) não impede que os segmentos de PEG no copolímero se organizem para formar os cristais do polímero e o que se observa é a total cristalização do material durante o resfriamento. Quando essa proporção aumenta, observa-se uma diminuição da cristalização durante o resfriamento, a qual irá se completar apenas quando as cadeias ganharem mobilidade novamente durante o aquecimento.

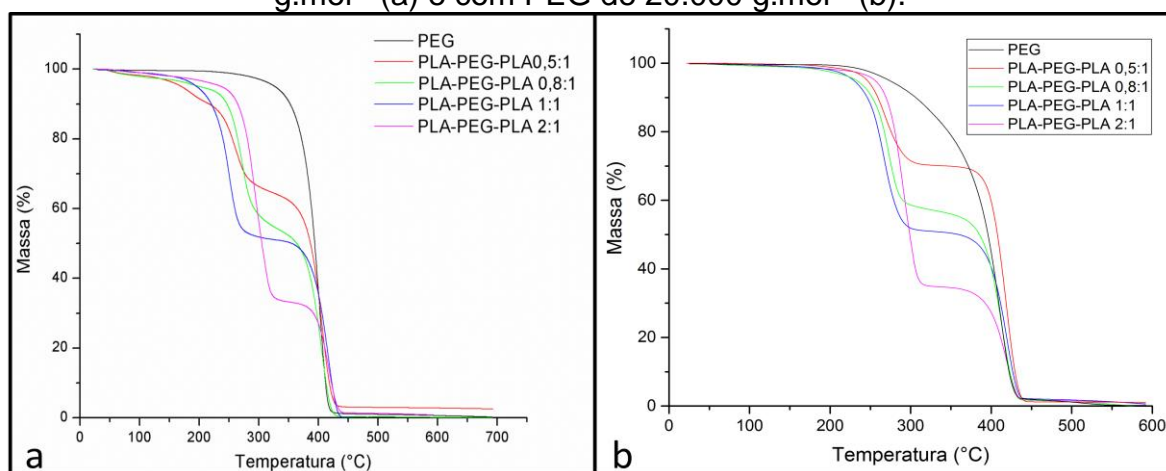
Figura 8: Termogramas de DSC do primeiro ciclo de resfriamento para os copolímeros sintetizados com PEG de  $20.000 \text{ g.mol}^{-1}$ .



As temperaturas de transição vítrea para os copolímeros sintetizados com PEG de  $20.000 \text{ g.mol}^{-1}$  não puderam ser determinadas na faixa de temperatura analisada. Para o copolímero de proporção 2:1, nenhuma transição é observada, o que pode ser justificado pela grande quantidade de PLA no copolímero.

Análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas nos copolímeros sintetizados a fim de se obter o perfil de degradação térmica dos mesmos. A Figura 9 mostra os termogramas de TGA dos copolímeros com PEG de massa molar de  $4.600 \text{ g.mol}^{-1}$ , bem como aqueles sintetizados com o PEG de  $20.000 \text{ g.mol}^{-1}$ , em comparação com o do PEG puro. Para todos os copolímeros são observadas duas perdas de massa, onde a primeira é referente à degradação térmica do segmento de PLA e a segunda corresponde ao bloco de PEG.

FIGURA 9: Termograma de TGA dos copolímeros sintetizados com PEG  $4.600 \text{ g.mol}^{-1}$  (a) e com PEG de  $20.000 \text{ g.mol}^{-1}$  (b).



A partir dos termogramas foi possível calcular o percentual de massa de PLA que foi incorporada ao copolímero na reação, cujos valores estão mostrados na Tabela 3. Os resultados mostraram que as proporções das perdas nos copolímeros foram próximas às proporções de D,L-lactídeo:PEG usadas nas reações. As temperaturas referentes às taxas máximas de degradação mostraram-se próximas às aquelas correspondentes ao homopolímero de PEG e também para o homopolímero de PLA de baixa massa molar.<sup>37; 38</sup>

Para a preparação dos hidrogéis é necessário que o copolímero seja solúvel em meio aquoso. Desta forma, foram realizados testes qualitativos de solubilidade para saber qual copolímero poderia ser utilizado para a preparação dos hidrogéis. Os testes foram realizados em concentração de 15% em solução tampão fosfato (pH = 7,4), e a melhor solubilidade foi determinada visualmente. De todos os copolímeros sintetizados, o copolímero escolhido foi o de proporção 0,8:1 utilizando

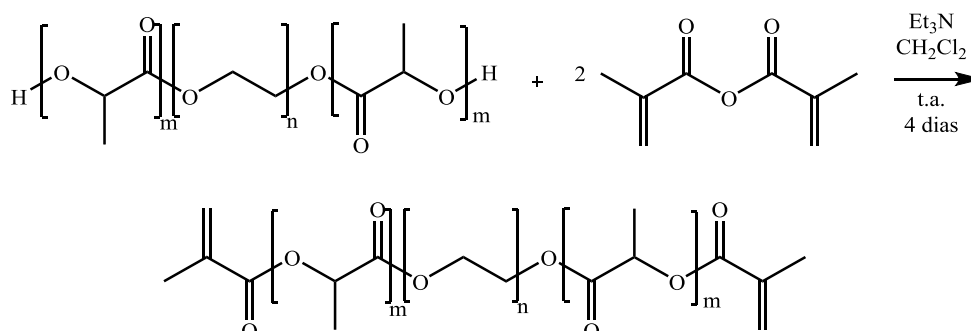
o PEG de massa molar  $4.600 \text{ g.mol}^{-1}$  que foi o copolímero solúvel em água com a maior proporção de PLA na cadeia. Os polímeros de maiores proporções (2:1 e 1:1) não foram solúveis em água em virtude de possuírem uma cadeia de PLA maior. A proporção de 0,5:1 mostrou-se solúvel em meio aquoso, porém quando comparada à 0,8:1 possui uma cadeia de PLA menor.

A partir dos testes de solubilidade, o copolímero de PLA-PEG-PLA de proporção 0,8:1 sintetizado com o PEG de massa molar de  $4.600 \text{ g.mol}^{-1}$  foi funcionalizado com anidrido metacrílico, obtendo-se assim grupos reticuláveis em suas extremidades (Esquema 4). Essa reação foi realizada utilizando um excesso de anidrido metacrílico para garantir que todas as extremidades do polímero estivessem funcionalizadas com o grupo metacrilato, a fim de garantir a completa reticulação das cadeias durante a preparação dos hidrogéis.

TABELA 2: Dados obtidos a partir do termograma de TGA dos copolímeros sintetizados com PEG  $4.600 \text{ g.mol}^{-1}$  e com PEG de  $20.000 \text{ g.mol}^{-1}$ .

Utilizando PEG $4.600 \text{ g.mol}^{-1}$					
Amostra	1ª perda		2ª perda		Proporção
	Temperatura (°C)	Peso (%)	Temperatura (°C)	Peso (%)	
PEG	403	99,55	-	-	
PLA-PEG-PLA 0,5:1	260	25,57	407	61,83	0,41:1
PLA-PEG-PLA 0,8:1	272	40,49	406	53,87	0,75:1
PLA-PEG-PLA 1:1	251	46,72	417	51,22	0,91:1
PLA-PEG-PLA 2:1	293	64,39	418	31,79	2,03:1
Utilizando PEG $20.000 \text{ g.mol}^{-1}$					
PEG	427	87,88	-	-	
PLA-PEG-PLA 0,5:1	268	28,52	419	68,86	0,41:1
PLA-PEG-PLA 0,8:1	273	41,74	413	55,23	0,76:1
PLA-PEG-PLA 1:1	267	47,92	419	48,85	0,98:1
PLA-PEG-PLA 2:1	290	62,96	419	33,05	1,90:1

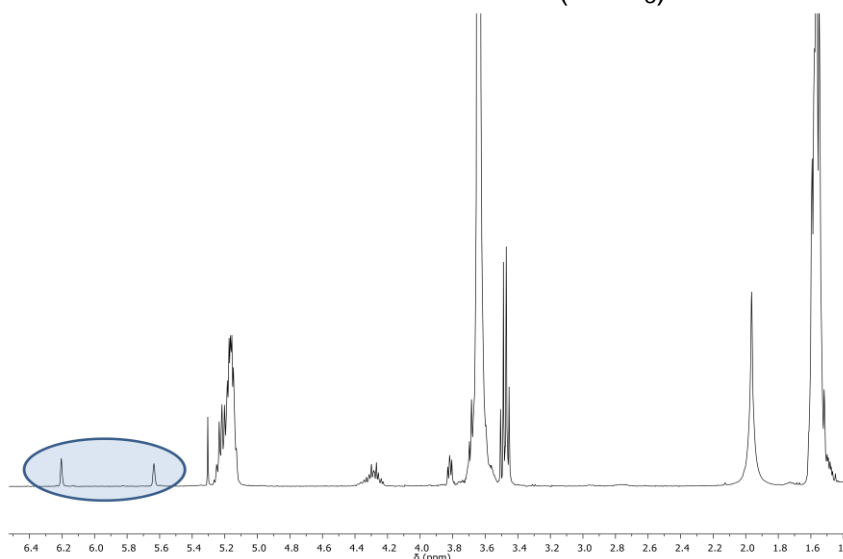
ESQUEMA 4: Reação de funcionalização do copolímero PLA-b-PEG-b-PLA com anidrido metacrílico.



A comprovação da funcionalização das cadeias do copolímero foi realizada através da análise de RMN de  $^1\text{H}$ , cujo espectro está mostrado na Figura 10. Os hidrogênios da ligação dupla do grupo metacrilato aparecem como singletos em 5,65 e 6,20 ppm. Para determinar a eficiência da funcionalização, as integrais dos hidrogênios da dupla ligação do metacrilato foram comparadas à integral do sinal em 4,3 ppm, referente aos hidrogênios dos dois  $-\text{CH}_2$  terminais do PEG e dos hidrogênios do  $-\text{CH}$  terminal do PLA, de forma que a razão entre as integrais ficou próxima a 0,20.

$$\frac{I_{\text{Hdupla}}}{I_{4,3\text{ppm}}} = \frac{2}{10} = 0,20$$

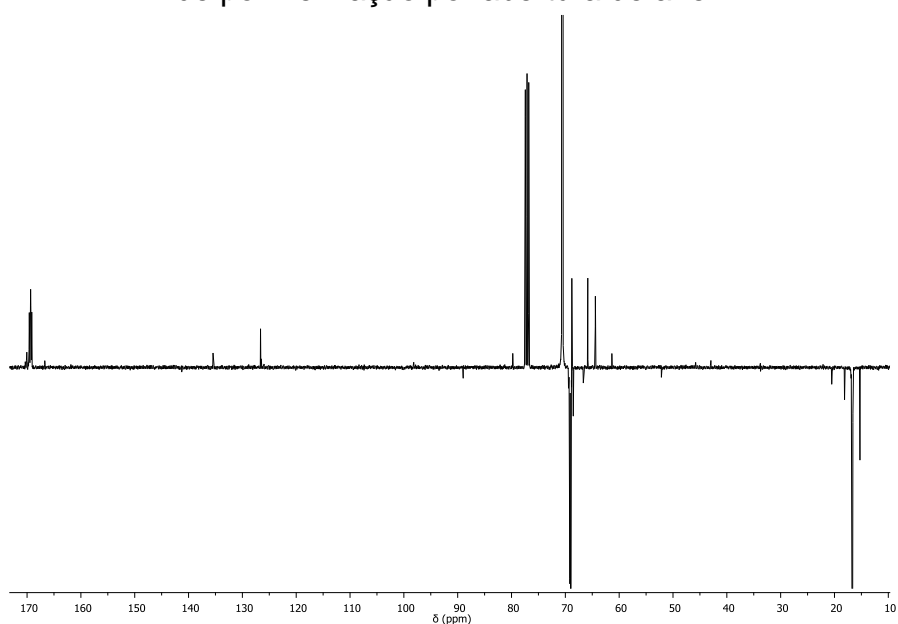
FIGURA 10: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do copolímero PLA-PEG-PLA funcionalizado com anidrido metacrílico. ( $\text{CDCl}_3$ )



O copolímero também foi caracterizado por RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT (*Attached Proton Test*) para confirmar as atribuições realizadas a partir do RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 10). No espectro da Figura 11 podem ser observados os sinais do carbono das

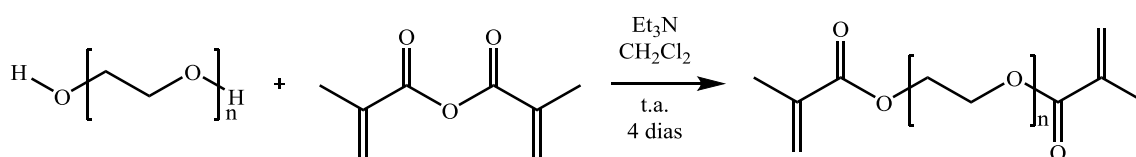
carbonilas em 170 ppm, os carbonos da ligação dupla aparecem em 135 ppm (CH) e 127 ppm (CH<sub>2</sub>). Os sinais dos carbonos da unidade terminal do PEG ligado ao PLA aparecem em 66 ppm e 64 ppm, enquanto que os carbonos da unidade repetitiva aparecem por volta de 70 ppm. Os sinais que aparecem para baixo em 69 ppm correspondem ao carbono do CH do PLA e os que aparecem em 17 ppm e 15 ppm são referentes às metilas (do PLA e do metacrilato, respectivamente).

FIGURA 11: Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do copolímero PLA-PEG-PLA obtido através de polimerização por abertura de anel.



Como forma de comparação com o copolímero de PLA-PEG-PLA, o PEG de massa molar de 4.600 g.mol<sup>-1</sup> também foi funcionalizado com anidrido metacrílico nas mesmas condições reacionais para a obtenção de grupos reticuláveis nas extremidades da cadeia (Esquema 5).

ESQUEMA 5: Reação de funcionalização do PEG com anidrido metacrílico.

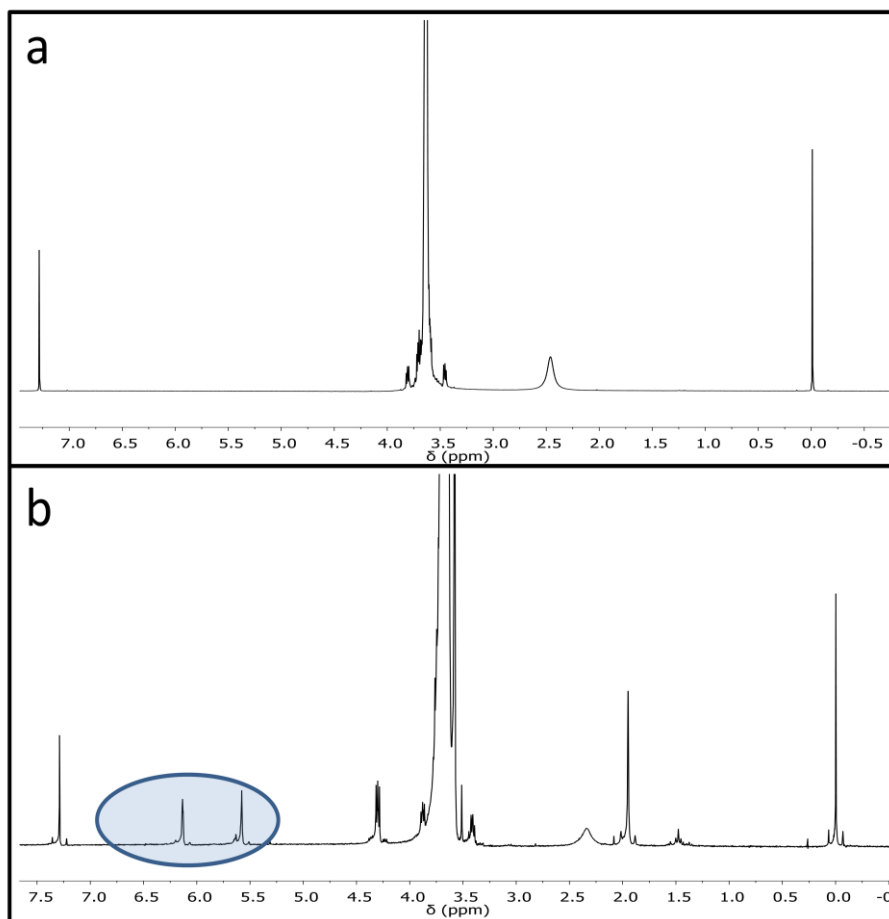


A Figura 12 apresenta um comparativo entre os espectros de RMN de <sup>1</sup>H para PEG antes e após a funcionalização com anidrido metacrílico. Observadm-se os



sinais referentes aos hidrogênios da ligação dupla do metacrilato em 5,5 ppm e 6,3 ppm, comprovando a sua funcionalização.

FIGURA 12: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do PEG antes (a) e depois da funcionalização (b).



Após a completa caracterização dos copolímeros funcionalizados, diferentes hidrogéis foram preparados através de fotopolimerização, utilizando PEG, PLA-PEG-PLA e PLA-PEG-PLA com gelatina (1%).

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS

Os hidrogéis preparados a partir da fotopolimerização dos polímeros funcionalizados com anidrido metacrílico foram caracterizados, primeiramente, pelo grau de intumescimento (Q), o qual determina a absorção máxima de água que o hidrogel pode comportar. Na Figura 13 é mostrado um hidrogel após o inchamento

(a) e um hidrogel seco (b). Os hidrogéis secos foram submetidos ao inchamento em uma solução salina de PBS e foram pesados em tempos determinados para verificar a quantidade de água absorvida. Na Figura 14 é mostrado o gráfico que relaciona o tempo com o grau de intumescimento até 540 minutos para os hidrogéis de PEG com massa molar de  $4.600 \text{ g.mol}^{-1}$ , de PLA-PEG-PLA com proporção 0,8:1 utilizando PEG de massa molar  $4600 \text{ g.mol}^{-1}$  e de PLA-PEG-PLA contendo 1% de gelatina, nele pode ser observado que o copolímero de PLA-PEG-PLA possui maior inchamento, porém as diferenças entre os valores são pequenas, de forma que a hidrofobicidade da cadeia do PLA não interferiu significativamente no grau de inchamento do PEG. Entretanto, destaca-se a grande capacidade de absorção da solução de PBS para todos os hidrogéis preparados, a qual alcançou quase 500 %. Este resultado está de acordo com o observado em outros trabalhos na literatura para o inchamento de hidrogéis.<sup>35</sup>

FIGURA 13: Foto do hidrogel após a análise do grau de inchamento (a) e do hidrogel seco (b).

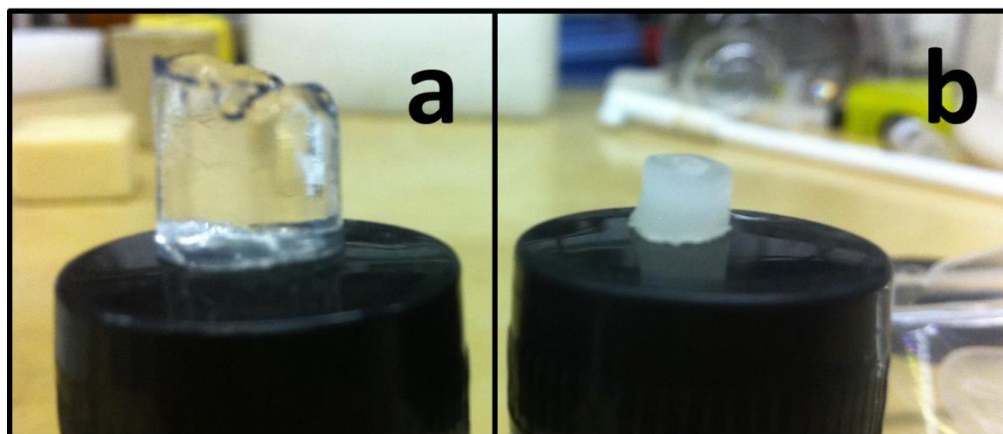
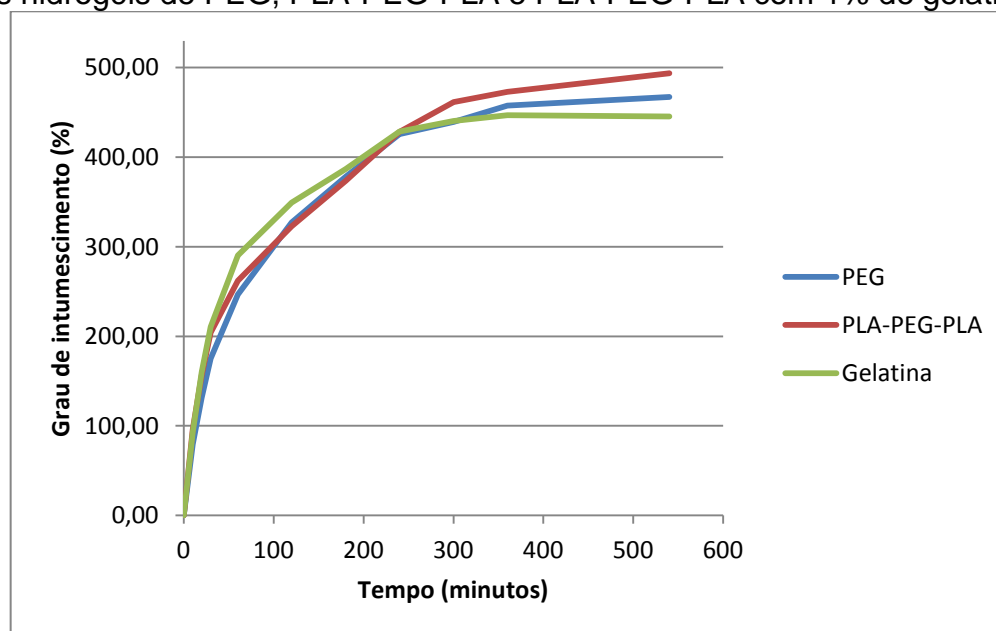


FIGURA 14: Gráfico relacionando o grau de intumescimento (%) com o tempo para os hidrogéis de PEG, PLA-PEG-PLA e PLA-PEG-PLA com 1% de gelatina.

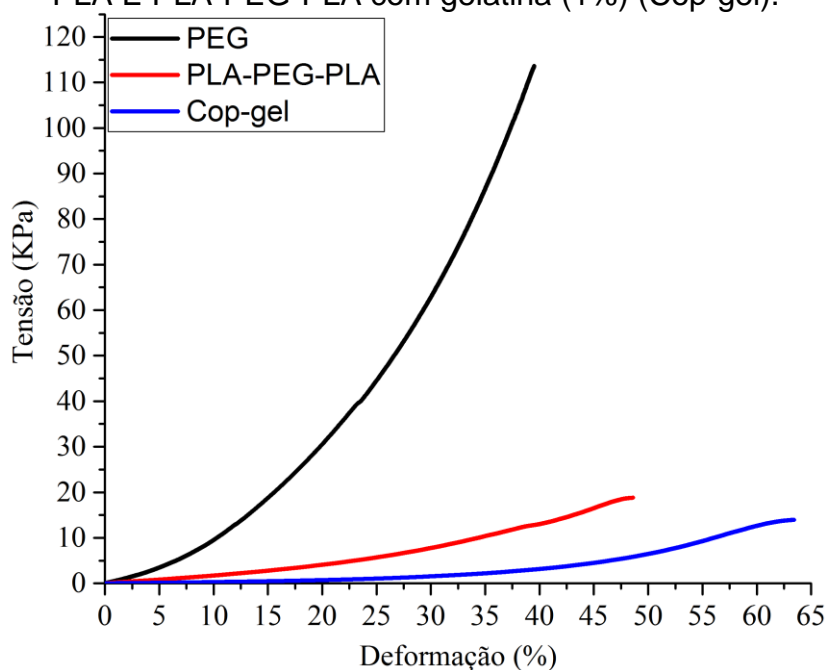


A Figura 15 mostra o comportamento mecânico dos diferentes hidrogéis preparados quando submetidos a um teste de tensão-deformação. O hidrogel contendo apenas o PEG apresentou a maior rigidez entre os três hidrogéis analisados e este comportamento diz respeito à concentração de cadeias de polímero presentes em solução, pois para todos os hidrogéis preparados a concentração utilizada foi de 15 % em massa de polímero em solução. Uma vez que o PEG possui uma cadeia menor do que seus correspondentes copolímeros, o número total de cadeias disponíveis para formar a estrutura reticulada do hidrogel é maior para este polímero e, como consequência, ocasiona um número maior de reticulações, estando de acordo com o menor valor de intumescimento. O copolímero PLA-PEG-PLA por sua vez, possui aproximadamente, uma massa molar correspondente ao dobro da massa molar do PEG, ou seja, a concentração de grupos metacrilato disponíveis para reagirem entre si é menor, levando a uma diminuição da densidade de reticulações do material, e a um aumento no intumescimento.

Quando gelatina foi adicionada na preparação do hidrogel proveniente do copolímero, observou-se uma significativa diminuição no módulo de elasticidade deste material. Esta redução pode estar associada a uma possível interferência da cadeia da gelatina durante o processo de reticulação do hidrogel, pois em virtude da

presença de grupos funcionais  $-NH_2$  e  $-COOH$  é possível que o radical formado durante a fotopolimerização abstraia um destes hidrogênios que estão disponíveis na cadeia da gelatina, encerrando a propagação da reação. Contudo, deve-se ainda levar em consideração o fato de que para a preparação deste hidrogel adicionou-se ácido acético para auxiliar na solubilização da gelatina. Este ácido presente no hidrogel pode atuar na degradação dos segmentos da cadeia de PLA, o que poderia levar a uma significativa redução no módulo de elasticidade do material.

FIGURA 15: Gráfico de tensão x deformação para os hidrogéis de PEG, PLA-PEG-PLA E PLA-PEG-PLA com gelatina (1%) (Cop-gel).



Na Tabela 5 são mostrados os valores para os módulos de elasticidade, tensão máxima na ruptura e deformação máxima dos hidrogéis. Os dados corroboram o comportamento observado nas curvas de tensão x deformação, ou seja, para as amostras de PEG o módulo de elasticidade é maior, indicando um material com maior resistência à deformação, enquanto que o copolímero PLA-PEG-PLA apresenta um módulo de elasticidade cerca de 60 % menor. Para o hidrogel do copolímero contendo gelatina, houve uma expressiva diminuição do módulo, o qual pode ter sido ocasionado tanto pela degradação das cadeias do PLA em função da presença de ácido acético, quanto pela incompleta reticulação das cadeias do copolímero pela presença da gelatina. Entretanto, o hidrogel contendo gelatina

apresentou uma maior capacidade de deformação quando comparado com os hidrogéis de PEG e do copolímero PLA-PEG-PLA.

TABELA 3: Dados de módulo de elasticidade, tensão máxima na ruptura e deformação máxima dos hidrogéis para o PEG, PLA-PEG-PLA e PLA-PEG-PLA com gelatina (Cop-gel).

Amostra	Módulo de elasticidade (kPa)	Tensão máxima (kPa)	Deformação (%)
PEG	54,5	114	40,3
PLA-PEG-PLA	36,5	20	47,6
Cop-gel	3	13	66,1

## 6 CONCLUSÕES

Neste trabalho mostrou-se que é possível preparar copolímeros PLA-PEG-PLA através da polimerização por abertura de anel do lactídeo usando PEG como macroiniciador, e sua proporção pôde ser observada através das análises termograviméticas. A funcionalização destes copolímeros com anidrido metacrílico, foi realizada com sucesso gerando copolímeros precursores para obtenção de hidrogéis do copolímero PLA-PEG-PLA via polimerização fotoquímica. Hidrogéis preparados com PLA-PEG-PLA mostraram grau de intumescimento muito semelhante, porém um pouco maior, do que os preparados com PEG, e apresentaram módulo de elasticidade inferior aos hidrogéis de PEG, porém a capacidade de deformação mostrou-se semelhante. Hidrogéis preparados na presença de gelatina apresentaram menor módulo de elasticidade, porém maior capacidade de deformação. Para que se possa entender melhor as propriedades deste material ainda são necessárias análises que avaliem o comportamento de degradação, a estrutura e porosidade do hidrogel e como a gelatina se comporta quando inserida no mesmo. Para isso, ainda serão realizadas análises de degradação e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

## 7 REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> LI, S. M.; EL GHZAOU, A.; DEWINCK, E. Rheology and drug release properties of bioresorbable hydrogels prepared from polylactide/poly(ethylene

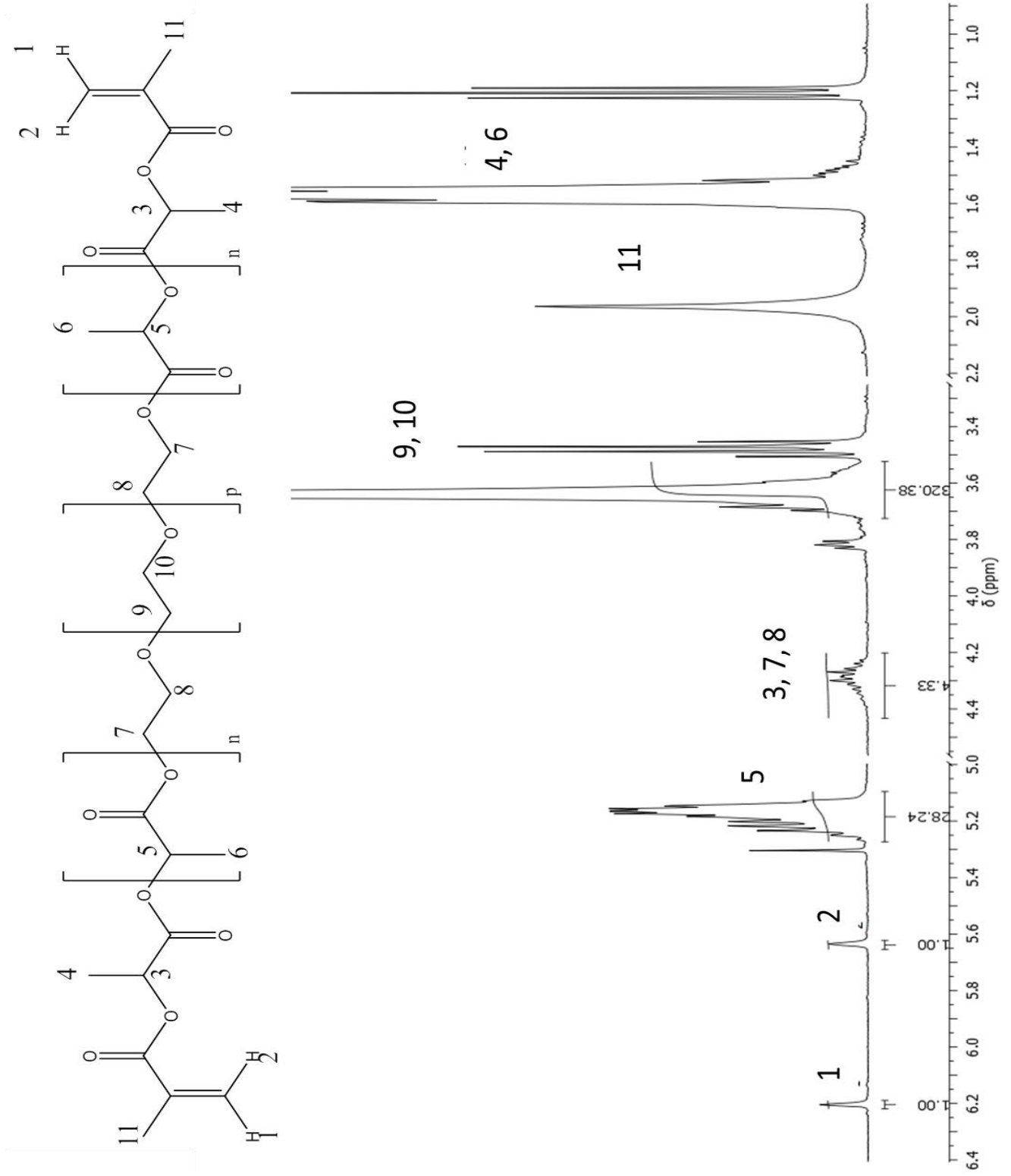
- glycol) block copolymers. **Macromolecular Symposia**, v. 222, p. 23-35, Mar 2005.
- 2 WICHTERLE, O.; LIM, D. HYDROPHILIC GELS FOR BIOLOGICAL USE. **Nature**, v. 185, n. 4706, p. 117-118, 1960 1960.
- 3 JAGUR-GRODZINSKI, J. Polymeric gels and hydrogels for biomedical and pharmaceutical applications. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 21, n. 1, p. 27-47, Jan 2010.
- 4 METTERS, A. T.; BOWMAN, C. N.; ANSETH, K. S. A statistical kinetic model for the bulk degradation of PLA-b-PEG-b-PLA hydrogel networks. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 30, p. 7043-7049, Aug 3 2000.
- 5 DELIGKARIS, K. et al. Hydrogel-based devices for biomedical applications. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 147, n. 2, p. 765-774, Jun 3 2010.
- 6 PETKA, W. A. et al. Reversible hydrogels from self-assembling artificial proteins. **Science**, v. 281, n. 5375, p. 389-392, Jul 17 1998.
- 7 OWEN, S. C. et al. Correlation of tissue drug concentrations with in vivo magnetic resonance images of polymer drug depot around arteriovenous graft. **Journal of Controlled Release**, v. 146, n. 1, p. 23-30, Aug 17 2010.
- 8 ZHU, J. Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 31, n. 17, p. 4639-4656, Jun 2010.
- 9 DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4337-4351, Nov 2003.
- 10 CLAPPER, J. D. et al. Biotinylated biodegradable nanotemplated hydrogel networks for cell interactive applications. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 4, p. 1188-1194, Apr 2008.
- 11 NGUYEN, K. T.; WEST, J. L. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 23, n. 22, p. 4307-4314, Nov 2002.
- 12 SELIKTAR, D. Designing Cell-Compatible Hydrogels for Biomedical Applications. **Science**, v. 336, n. 6085, p. 1124-1128, Jun 1 2012.
- 13 LUTOLF, M. P. et al. Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: Engineering cell-invasion characteristics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 9, p. 5413-5418, Apr 2003.
- 14 WU, X.; EL GHZAOUI, A.; LI, S. Aggregates and hydrogels prepared by self-assembly of amphiphilic copolymers with surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 374, p. 127-134, May 15 2012.

- 15 SAWHNEY, A. S.; PATHAK, C. P.; HUBBELL, J. A. BIOERODIBLE HYDROGELS BASED ON PHOTOPOLYMERIZED POLY(ETHYLENE GLYCOL)-CO-POLY(ALPHA-HYDROXY ACID) DIACRYLATE MACROMERS. **Macromolecules**, v. 26, n. 4, p. 581-587, Feb 15 1993.
- 16 REDDY, S. K.; ANSETH, K. S.; BOWMAN, C. N. Modeling of network degradation in mixed step-chain growth polymerizations. **Polymer**, v. 46, n. 12, p. 4212-4222, May 26 2005.
- 17 SHAH, N. M.; POOL, M. D.; METTERS, A. T. Influence of network structure on the degradation of photo-cross-linked PLA-b-PEG-b-PLA hydrogels. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 11, p. 3171-3177, Nov 13 2006.
- 18 MUNOZ, Z.; SHIH, H.; LIN, C.-C. Gelatin hydrogels formed by orthogonal thiol-norbornene photochemistry for cell encapsulation. **Biomaterials Science**, v. 2, n. 8, p. 1063-1072, 2014 2014.
- 19 TOKIWA, Y.; CALABIA, B. P. Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 2, p. 244-251, Sep 2006.
- 20 AURAS, R.; HARTE, B.; SELKE, S. An overview of polylactides as packaging materials. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, n. 9, p. 835-864, Sep 16 2004.
- 21 JING, F.; HILLMYER, M. A. A bifunctional monomer derived from lactide for toughening polylactide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 42, p. 13826-13827, Oct 2008.
- 22 GARLOTTA, D. A literature review of poly(lactic acid). **Journal of Polymers and the Environment**, v. 9, n. 2, p. 63-84, Apr 2001.
- 23 AVINC, O.; KHODDAMI, A. Overview of Poly(lactic acid) (PLA) Fibre. **Fibre Chemistry**, v. 41, n. 6, p. 391-401, Nov 2009.
- 24 KAMBER, N. E. et al. Organocatalytic ring-opening polymerization. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 12, p. 5813-5840, Dec 2007.
- 25 DONG, C. M. et al. Synthesis of star-shapee poly(epsilon-caprolactone)-b-poly(DL-lactic acid-alt-glycolic acid) with multifunctional initiator and stannous octoate catalyst. **Macromolecules**, v. 34, n. 14, p. 4691-4696, Jul 2001.
- 26 LIU, H. F. et al. A study on a chitosan-gelatin-hyaluronic acid scaffold as artificial skin in vitro and its tissue engineering applications. **Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition**, v. 15, n. 1, p. 25-40, 2004.
- 27 AURAS, R. A. et al. Mechanical, physical, and barrier properties of poly(lactide) films. **Journal of Plastic Film & Sheeting**, v. 19, n. 2, p. 123-135, Apr 2003.

- 28 ANDERSON, K. S.; SCHRECK, K. M.; HILLMYER, M. A. Toughening polylactide. **Polymer Reviews**, v. 48, n. 1, p. 85-108, 2008.
- 29 BIGG, D. M. Polylactide copolymers: Effect of copolymer ratio and end capping on their properties. **Advances in Polymer Technology**, v. 24, n. 2, p. 69-82, Sum 2005.
- 30 LUNT, J. Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1-3, p. 145-152, 1998.
- 31 GRINSTAFF, M. W. et al. Photocrosslinkable polymers for biomedical applications. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 222, p. U249-U249, Aug 2001.
- 32 WANG, Q. et al. Synthesis, Thermosensitive Gelation and Degradation Study of a Biodegradable Triblock Copolymer. **Journal of Macromolecular Science Part a-Pure and Applied Chemistry**, v. 50, n. 2, p. 200-207, Jan 2013.
- 33 LIN-GIBSON, S. et al. Synthesis and characterization of PEG dimethacrylates and their hydrogels. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 4, p. 1280-1287, Jul-Aug 2004.
- 34 BRYANT, S. J.; ANSETH, K. S. Controlling the spatial distribution of ECM components in degradable PEG hydrogels for tissue engineering cartilage. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 64A, n. 1, p. 70-79, Jan 1 2003.
- 35 HAO, J. Q.; LI, H.; WOO, H. G. Synthesis and Characterization of Cholic Acid-Containing Biodegradable Hydrogels by Photoinduced Copolymerization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 112, n. 5, p. 2976-2980, Jun 2009.
- 36 GUERROUANI, N.; MAS, A.; SCHUE, F. MgH<sub>2</sub>/PEG initiating system for ring opening polymerization of lactone and lactide. **E-Polymers**, Mar 2 2010.
- 37 KIM, B. S.; MATHER, P. T. Amphiphilic telechelics incorporating polyhedral oligosilsesquioxane: 1. Synthesis and characterization. **Macromolecules**, v. 35, n. 22, p. 8378-8384, Oct 2002.
- 38 SILVERAJAH, V. S. G. et al. A Comparative Study on the Mechanical, Thermal and Morphological Characterization of Poly(lactic acid)/Epoxidized Palm Oil Blend. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 5, p. 5878-5898, May 2012.



# APÊNDICE A



# APÊNCICE B

