

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

Geórgia Schiller Barcellos

Síntese e caracterização de copolímeros para a preparação de hidrogéis
direcionados a tratamentos de regeneração raquimedular

PORTO ALEGRE, JUNHO DE 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

Geórgia Schiller Barcellos

Síntese e caracterização de copolímeros para a preparação de hidrogéis
direcionados a tratamentos de regeneração raquimedular

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.^o Douglas Gamba
Orientador

PORTO ALEGRE, JUNHO DE 2018.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo suporte e apoio sem os quais a trajetória que culmina com esse trabalho de conclusão de curso seria impossível.

Ao meu orientador, Douglas Gamba, pela paciência, disposição em ensinar e estar sempre aberto a novas ideias e a discussões pertinentes à pesquisa.

Aos colegas de laboratório Marco Antônio Justino, Juliana Isidoro, Marcelo Gryczak e especialmente à Jéssica Petry, por ter me acompanhado e ajudado incansavelmente tantas vezes.

Aos demais amigos do curso, por todas as palavras de incentivo e por terem dado sentido à minha passagem pelo Instituto de Química.

RESUMO

Neste trabalho, hidrogéis constituídos de copolímeros de poli(ϵ -caprolactona-*b*-etilenoglicol-*b*- ϵ -caprolactona) (PCL-*b*-PEG-*b*-PCL) e poli(*N*-isopropilacrilamida-co-metacrilato de 2-fosforilcolina) (PNIPAAm-co-MPC) foram preparados visando à utilização em estudos de engenharia de tecidos voltados para a regeneração raquimedular. Para isso, os copolímeros de PNIPAAm-co-MPC foram sintetizados por polimerização radicalar livre com diferentes quantidades de MPC (0 %, 0,25 %, 0,5 %, 1,0 %, 2,5 % e 5,0 %, em mol). A temperatura mínima crítica de solução (LCST) dos copolímeros foi determinada por DSC, verificando-se que o aumento da quantidade de MPC levou a um aumento da LCST. O copolímero contendo 0,5 % de MPC foi escolhido para a preparação dos hidrogéis, pois foi o com maior quantidade do comonômero a apresentar LCST na faixa de temperatura de interesse, isto é, abaixo da temperatura corporal, com uma transição de fase significativamente intensa. Os copolímeros de PCL-*b*-PEG-*b*-PCL foram sintetizados com diferentes proporções mássicas entre ϵ -caprolactona:PEG (1:1, 0,5:1 e 0,25:1) através de polimerização por abertura de anel do monômero ϵ -caprolactona (CL), empregando PEG com massa molar de 4600 g.mol⁻¹ como macroiniciador. Dos copolímeros sintetizados, o que se mostrou solúvel em água foi o de proporção 0,25:1 CL:PEG, o qual foi posteriormente submetido à reação de funcionalização com anidrido metacrílico para a inclusão de grupos reticuláveis em suas extremidades. Os hidrogéis foram obtidos por polimerização radicalar utilizando persulfato de amônio como iniciador e *N,N,N'',N''*-tetraetilenodiamina (TEMED) como agente redutor. Três hidrogéis diferentes foram preparados: um contendo apenas MA-PCL-*b*-PEG-*b*-PCL-MA, um com 2,5 % de P(NIPAAm-co-MPC) e um com 5 % de P(NIPAAm-co-MPC). A análise de grau de intumescimento mostrou que os hidrogéis contendo P(NIPAAm-co-MPC) apresentam maior capacidade de retenção de água.

Palavras-chave: lesão raquimedular, PNIPAAm, PCL-*b*-PEG-*b*-PCL, metacrilato de 2-fosforilcolina, hidrogel.

ABSTRACT

In this study, poly(ϵ -caprolactone-*b*-ethyleneglycol-*b*- ϵ -caprolactone) and poly(*N*-isopropylacrilamide-*co*-2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) copolymers were synthesized in order to prepare hydrogels for applications in tissue engineering studies focused on spinal cord regeneration. P(NIPAAm-*co*-MPC) copolymers were synthesized by free radical polymerization with different quantities of MPC (0 %, 0,25 %, 0,5 %, 1,0 %, 2,5 % e 5,0 %). The lower critical solution temperature (LCST) of the copolymers was determined by DSC, and it was verified that the increase in the MPC quantity has led to a LCST increase. The copolymer with 0,5 % of MPC was used in the hydrogels preparation, since it was the one with the higher concentration of MPC that still showed LCST in the desired temperature range, *i.e.*, bellow body temperature. The PCL-*b*-PEG-*b*-PCL copolymers were synthesized with different ϵ -caprolactone:PEG ratios (1:1, 0,5:1 and 0,25:1) by ring opening polymerization of the ϵ -caprolactone (CL) ring, utilizing PEG with molar weight of 4600 g.mol⁻¹ as initiator. The copolymer that was soluble in water was the one with the ratio CL:PEG of 0,25:1. Thus, it was functionalized with methacrylic anhydride for the insertion of reactive groups. The hydrogels were obtained by radicalar polymerization using ammonium persulfate as initiator and *N,N,N'',N''*-tetraethylenediamine (TEMED) as reductant. Three different hydrogels were prepared: one containing only MA-PCL-*b*-PEG-*b*-PCL-MA, one with 2,5 % of P(NIPAAm-*co*-MPC) and one with 5 % of P(NIPAAm-*co*-MPC). The swelling degree analysis showed that the hydrogels containing P(NIPAAm-*co*-MPC) have greater capacity for water content.

Key words: spinal cord injury, PNIPAAm, PCL-*b*-PEG-*b*-PCL, 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine, hydrogel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura tridimensional porosa de um hidrogel	17
Figura 2– Representação genérica da estrutura de um poliéster.....	18
Figura 3 – Representação da estrutura da policaprolactona.....	20
Figura 4 – Representação da estrutura do poli(etilenoglicol).	20
Figura 5 – Representação da estrutura da poli(<i>N</i> -isopropilacrilamida).....	21
Figura 6 – Representação da estrutura do monômero metacrilato de 2-fosforilcolina.	23
Figura 7 – Espectro de RMN de ¹ H do copolímero P(NIPAAm-co-MPC) contendo 5 % de MPC. (D ₂ O, 400 MHz).....	30
Figura 8 – Termogramas de DSC das soluções dos polímeros, os quais mostram as temperaturas mínimas críticas de solução.	31
Figura 9 – Espectro de RMN de ¹ H do copolímero PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL. (CDCl ₃ , 400 MHz).....	33
Figura 10 – Comparativo entre os espectros de RMN de ¹ H do copolímero PCL- <i>b</i> - PEG- <i>b</i> -PCL antes (em vermelho) e após a funcionalização com anidrido metacrílico (em preto). (CDCl ₃ , 400 MHz)	36
Figura 11 – Fotografia dos diferentes hidrogéis preparados: MA-PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL- MA (a), MA-PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL-MA com 2,5 % de P(NIPAAm-co-MPC) (b) e MA- PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL-MA com 5 % de P(NIPAAm-co-MPC) (c).	37
Figura 12 – Fotografia dos hidrogéis secos MA-PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL-MA (a), MA-PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL-MA com 2,5 % de P(NIPAAm-co-MPC) (b) e MA-PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL- MA com 5 % de P(NIPAAm-co-MPC) (c).	38
Figura 13 – Gráfico relacionando o grau de intumescimento (%) com o tempo para os hidrogéis de MA-PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL-MA, MA-PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL-MA com 2,5 %	

de P(NIPAAm-co-MPC) e MA-PCL-*b*-PEG-*b*-PCL-MA com 5 % de P(NIPAAm-co-MPC).....39

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Proposta do mecanismo ROP para a obtenção da policaprolactona.	19
Esquema 2 – Comportamento em solução do PNIPAAm.	22
Esquema 3 – Síntese do copolímero P(NIPAAm-co-MPC) por polimerização radicalar.....	28
Esquema 4 – Síntese do copolímero em bloco PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL.....	32
Esquema 5 – Reação de funcionalização do copolímero PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL com anidrido metacrílico.	35
Esquema 6 – Proposta de distribuição das cadeias dos copolímeros no interior do hidrogel.	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1	LESÕES RAQUIMEDULARES	12
2.2	BIOMATERIAIS	15
2.3	HIDROGÉIS	16
2.4	POLÍMEROS UTILIZADOS PARA A PREPARAÇÃO DE HIDROGÉIS 18	
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4	METODOLOGIA	24
4.1	MATERIAIS	24
4.2	SÍNTESE DO COPOLÍMERO P(NIPAAm-co-MPC).....	24
4.3	SÍNTESE DO COPOLÍMERO PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL	25
4.4	FUNCIONALIZAÇÃO DO COPOLÍMERO PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL COM ANIDRIDO METACRÍLICO (MA-PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL-MA)	25
4.5	CARACTERIZAÇÃO DOS COPOLÍMEROS	26
4.5.1	Ressonância Magnética Nuclear	26
4.5.2	Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)	26
4.5.3	Determinação da temperatura mínima crítica de solução (LCST) dos copolímeros P(NIPAAm-co-MPC)	26
4.6	PREPARAÇÃO DOS HIDROGÉIS.....	27
4.7	CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS.....	27
4.7.1	Grau de intumescimento	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COPOLÍMEROS DE P(NIPAAm-co-MPC).....	28
5.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COPOLÍMEROS DE PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL ₃₂	
5.3 FUNCIONALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COPOLÍMERO PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL.....	35
5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS.....	36
5.4.1 Grau de intumescimento	38
6 CONCLUSÕES.....	39
7 REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

Lesões na medula espinhal, também chamadas de traumatismos raquimedulares (TRM), são enfermidades que resultam em graves deficiências sensoriais e motoras em pessoas acometidas por esse tipo de trauma. Apesar das extensas pesquisas nessa área, ainda não há tratamentos clínicos disponíveis eficazes na restauração das funções motoras de pacientes com lesão medular crônica. Ao longo das últimas duas décadas, houve um aumento expressivo do número de pesquisas em engenharia de tecidos, também chamada de medicina regenerativa, uma promissora área para futuros tratamentos para traumas raquimedulares. Trata-se de um campo que busca a elaboração substitutos biológicos para a reconstrução terapêutica do corpo humano pela estimulação controlada e deliberada de células-alvo selecionadas, através da combinação de sinais mecânicos e moleculares.

O grande desafio no desenvolvimento de um substituto biológico funcional para a regeneração raquimedular está na capacidade de uma matriz de mimetizar a complexidade estrutural da medula espinhal. Dentro da vasta gama de materiais com possibilidade de aplicação na regeneração desse tipo de lesão, os hidrógeis apresentam um grande potencial pelo fato de serem adaptáveis ao formato da lesão devido à sua flexibilidade e elasticidade características. Hidrogéis são, por definição, materiais formados por uma rede polimérica tridimensional e hidrofílica, capazes de absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos.

Hidrogéis preparados a partir de polímeros naturais são tipicamente biocompatíveis e interessantes devido à presença de moléculas bifuncionais em sua estrutura. Por outro lado, hidrógeis preparados a partir de polímeros sintéticos possuem como vantagem um maior controle da taxa de degradação e de suas propriedades mecânicas e químicas. Nesse sentido, hidrógeis provenientes de poliésteres alifáticos têm sido estudados para diversas aplicações em engenharia de tecidos em razão de sua biocompatibilidade e degradabilidade, como é o caso da policaprolactona. Copolímeros em bloco preparados por polimerização por abertura de anel do ϵ -caprolactona na presença de PEG mono ou dihidroxilado e catalisador têm sido muito estudados. Um exemplo são os copolímeros tribloco PCL-*b*-PEG-*b*-

PCL, os quais são muito utilizados como matrizes para sistemas de distribuição controlada de fármacos e para engenharia de tecidos.

Poliacrilamidas, por serem biocompatíveis, também são frequentemente utilizadas para a obtenção de hidrogéis sintéticos em estudos em medicina regenerativa envolvendo o tratamento de lesões raquimedulares. Alguns desses polímeros, por serem termossensíveis, podem ser injetados para a formação do hidrogel in situ, evitando o risco de procedimentos cirúrgicos no local da lesão. A poli(*N*-isopropilacrilamida) é um exemplo dessa classe de polímeros, apresentando temperatura mínima crítica de solução (LCST) de 32 °C.

No que diz respeito à interação do material utilizado como substituto biológico e o meio celular, a presença de grupos funcionais capazes de promoverem uma interface adequada para que haja uma boa adesão das células sobre a matriz é essencial. O metacrilato de 2-fosforilcolina (MPC) é um monômero solúvel em água que possui em sua estrutura o grupo fosforilcolina, o qual é encontrado em compostos que compõem a membrana celular.

Neste trabalho, foi desenvolvido um material na forma de hidrogel para utilização em estudos de regeneração de traumatismos raquimedulares. O hidrogel foi preparado a partir da polimerização radicalar de um copolímero de PCL-*b*-PEG-*b*-PCL funcionalizado com grupos metacrilato, na presença de um copolímero de poli(*N*-isopropilacrilamida-co-metacrilato de 2-fosforilcolina).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LESÕES RAQUIMEDULARES

A medula espinhal é o principal caminho para a transmissão de informação entre o cérebro e o sistema nervoso periférico. Suas funções incluem a transmissão de sinais nervosos do córtex motor para o corpo e das fibras aferentes dos neurônios sensoriais para o córtex sensorial, além de estar envolvida na produção de reflexos espinhais. Ela se estende desde a base do cérebro até as primeiras vértebras lombares. Assim, o cérebro e a medula espinhal, juntos, compõem o sistema nervoso central.¹

Lesão na medula espinhal, também chamada de traumatismo raquimedular (TRM), é uma enfermidade altamente debilitante para a qual ainda não existe tratamento eficaz. Suas principais causas incluem lesões causadas por armas de fogo e outros atos de violência, acidentes automotivos, acidentes esportivos e outros eventos traumáticos.²

Imediatamente após um evento traumático na medula espinhal ocasionado por contusão, compressão ou laceração, o impacto mecânico leva ao dano do tecido, caracterizado por hemorragia, edema e necrose. Esses eventos compõem a lesão primária, que é o primeiro mecanismo patofisiológico do TRM. A maior parte da degeneração pós-traumática da medula espinhal se dá devido à lesão secundária, que ocorre ao longo do tempo, desde minutos até semanas após o trauma. A lesão secundária pode incluir um amplo espectro de eventos: hipotensão sistêmica, choque espinhal, disfunção da barreira hemato-encefálica devido a mudanças vasculares, edema e isquemia resultantes de trombose, formação de radicais livres e aumento da liberação de glutamato, levando à morte neuronal.¹

Como resultado dessa cascata de eventos, têm-se devastadores prejuízos neurológicos e perda parcial ou total das capacidades sensoriais e motoras, resultando em paraplegia ou tetraplegia. Outros problemas comuns associados ao TRM incluem infecção do trato urinário, problemas intestinais e disfunções cardíacas e respiratórias. Este cenário tem como consequência um grande impacto pessoal, social e econômico àqueles afetados pelo TRM, além de um grande fardo para a sociedade em termos de custos de saúde pública.³

A atual abordagem terapêutica para o tratamento de TRM envolve a eliminação/prevenção de mais danos à medula espinhal. Para isso, são realizados procedimentos de descompressão da medula, estabilização das lesões, tratamento de complicações secundárias e inclusão do paciente em um programa de reabilitação. Essas estratégias melhoram a qualidade de vida dos pacientes, mas, até agora, a abordagem terapêutica não engloba os déficits neurológicos decorrentes do trauma.² Os principais objetivos de pesquisas atuais voltadas para o tratamento de TRM são: redução da morte celular e redução da extensão da lesão, além de promoção do processo de neuroregeneração para reparação do tecido comprometido.^{4,5}

Terapias baseadas em células têm se mostrado eficientes na regeneração raquimedular em uma série de estudos sistematicamente revisados por Tetzlaff *et*

al.⁶ Uma grande variedade de células vem sendo estudada: células tronco embrionárias ou fetais, células tronco neuronais e células neuronais progenitoras, células tronco adultas, células Schwann, entre outras.⁷ As células transplantadas substituem as células perdidas e se integram ao circuito neuronal, promovem a mielinização e/ou liberação de fatores bioativos que promovem a regeneração endógena ou evitam maiores perdas neuronais e inflamação.⁸

No caso de lesões na medula espinhal, comumente há a formação de uma cavidade que dificulta o reestabelecimento dos axônios, de modo que é essencial que o tecido seja reconstruído através de um ambiente promotor do crescimento. Isso pode ser feito por meio do preenchimento da cavidade com uma matriz que atua como um suporte estrutural e/ou químico para o crescimento axonal e que concomitantemente serve como matriz para as células, drogas e outras substâncias bioativas empregadas no tratamento.⁸ Esta é a essência da engenharia de tecidos, também chamada de medicina regenerativa.

A engenharia de tecidos está fundamentada na construção ou formação de um novo tecido para a reconstrução terapêutica de tecidos e/ou órgãos do corpo humano através da estimulação controlada e deliberada de células-alvo selecionadas, por meio de uma combinação sistemática de sinais moleculares e mecânicos.⁹ Os materiais-modelo, comumente chamados de matrizes, ou do inglês *scaffolds*, são definidos como suportes temporários para o crescimento de células para formação de novos tecidos.¹⁰

Neste sentido, diferentes materiais tem sido estudados para utilização como *scaffolds* para regeneração raquimedular, levando em conta as características buscadas para o material voltado a essa aplicação. A matriz celular deve reproduzir a complexidade estrutural encontrada na medula espinhal, ou seja, ela deve ser capaz de promover os sinais bioquímicos e biomecânicos, cruciais para o desenvolvimento da forma e da estrutura do tecido, estimular a diferenciação celular e regular a função celular, permitindo a difusão de nutrientes, metabólitos e fatores de crescimento.¹¹ O material deve, ainda, permitir o adequado desenvolvimento do tecido nervoso, de modo a garantir que o circuito axonal seja reestabelecido e os sinais sinápticos regenerados.¹²

2.2 BIOMATERIAIS

Os materiais utilizados na elaboração das matrizes que auxiliam a regeneração de um tecido ou órgão são chamados de biomateriais. Eles podem ser definidos como substâncias manipuladas de modo a adquirirem características apropriadas para direcionar o curso de procedimentos terapêuticos ou de diagnóstico através do controle de interações com os componentes dos organismos vivos.¹³

O pré-requisito essencial para um material ser classificado como biomaterial é a sua biocompatibilidade, isto é, a capacidade do material de apresentar uma resposta apropriada a uma aplicação específica com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas quando em contato com os tecidos vivos e fluidos orgânicos. Algumas das propriedades inerentes aos biomateriais poliméricos que afetam sua biocompatibilidade são a massa molecular, solubilidade, forma e estrutura do implante, hidrofiliabilidade/hidrofobicidade, lubrificidade, energia superficial, absorção de água, degradação e mecanismo de erosão. No caso de biomateriais biodegradáveis, a sua biocompatibilidade deve ser demonstrada ao longo do tempo.¹⁴

Algumas das características necessárias a um biomaterial biodegradável são as seguintes:

- Não deve levar a uma resposta inflamatória ou tóxica quando implantado no corpo;
- Deve apresentar tempo de prateleira aceitável;
- O tempo de degradação deve estar de acordo com o tempo de regeneração ou cicatrização;
- Deve possuir propriedades mecânicas condizentes com a aplicação buscada e a variação dessas propriedades ao longo do processo de degradação deve ser compatível com o processo de regeneração ou cicatrização;
- Os produtos de degradação devem ser não tóxicos e o corpo deve ser capaz de metabolizá-los e eliminá-los;
- Permeabilidade e processabilidade apropriadas para a aplicação.¹⁴

Tanto polímeros naturais quanto sintéticos têm sido extensivamente estudados como biomateriais. Os polímeros naturais possuem algumas vantagens frente aos sintéticos como bioatividade, habilidade de apresentarem ligantes apropriados para interação com as células, susceptibilidade à degradação proteolítica e remodelação natural. A bioatividade inerente a esses polímeros tem, contudo, algumas inconveniências. Grande parte dos polímeros naturais apresenta uma resposta imunogênica, é difícil de ser purificada e há também a possibilidade de transmissão de doenças. Polímeros como gelatina¹⁵, colágeno¹⁶, fibrina¹⁷ e alginato¹⁸ são exemplos de biomateriais naturais, sendo tipicamente biocompatíveis, além de serem hidrolítica e enzimaticamente biodegradáveis. Entretanto, uma vez que são obtidos principalmente de fontes animais, estes polímeros podem induzir respostas imunogênicas em seres humanos.¹⁹ Além disso, a utilização de polímeros naturais no preparo de hidrogéis muitas vezes leva a uma baixa reprodutibilidade devido a variações na fonte do material e às técnicas de processamento.¹⁴

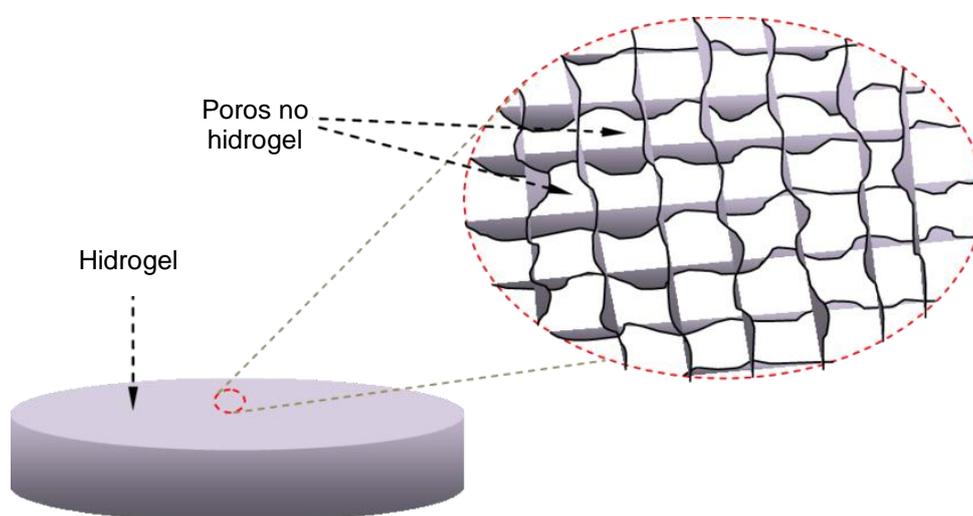
Polímeros sintéticos, por outro lado, são facilmente esterilizáveis e podem ser sintetizados de modo a ter-se o controle da taxa de degradação e outros parâmetros como porosidade, arquitetura, dureza e outras propriedades químicas. Exemplos dessa classe de materiais são o poli(etilenoglicol) (PEG)²⁰, poliacetato de vinila (PVA)²¹ e poliacrilamidas²². Estudos voltados para a síntese de biomateriais sintéticos com cinética de erosão previsível em sistemas de liberação controlada de drogas (*drug delivery*) e como *scaffolds* em engenharia de tecidos tem recebido significativa atenção. A típica baixa biocompatibilidade devido à falta de fatores de reconhecimento é contornada por meio da funcionalização com grupos específicos que aumentam a interação com o ambiente celular.²³

2.3 HIDROGÉIS

Dentro do vasto campo de biomateriais com possibilidade de aplicação na engenharia de tecidos, uma classe de material que tem recebido atenção devido a suas características proeminentes é a dos hidrogéis. Esses compostos são formados por redes poliméricas tridimensionais unidas através de ligações covalentes ou outras forças coesivas, como ligações de hidrogênio e iônicas. Eles apresentam-se quebradiços quando secos e, na presença de solvente, incham ao

mesmo tempo em que mantêm sua forma original, formando géis elásticos e flexíveis.²⁴ A quantidade de água que os hidrogéis são capazes de absorver varia de 20 a 95 % em relação à sua massa total. Pelo fato de reterem grandes quantidades de água e de apresentarem uma estrutura tipicamente porosa (Figura 1), os hidrogéis permitem a migração celular e difusão molecular para fora da matriz celular.²⁵ O grau de porosidade também afeta as propriedades mecânicas do hidrogel, sendo menor a dureza quanto maior a porosidade do material.²⁶

Figura 1 - Estrutura tridimensional porosa de um hidrogel.



Fonte: ROY, Niladri e SAHA, Nabanita, 2012.²⁷

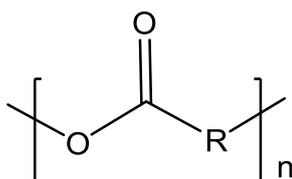
A origem das reticulações dos hidrogéis pode ser química ou física. As ligações formadas quimicamente são ligações covalentes e os hidrogéis formados por este tipo de ligação possuem melhores propriedades mecânicas. Já as interações físicas podem ocorrer por meio de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas ou eletrostáticas. Os métodos sintéticos que proporcionam reticulação química incluem polimerização radicalar, reações químicas de grupos complementares e polimerização enzimática. A reticulação física pode ocorrer por alteração de características do meio, como pH e temperatura. No caso dos hidrogéis termossensíveis, o aumento da temperatura pode levar ao aumento das interações hidrofóbicas das cadeias do polímero, acarretando uma mudança de fase caracterizada pela formação do hidrogel. A concentração do polímero, o tamanho da

porção hidrofóbica na cadeia polimérica e a estrutura do polímero afetam a temperatura em que ocorre a transição.²⁸

2.4 POLÍMEROS UTILIZADOS PARA A PREPARAÇÃO DE HIDROGÉIS

Conforme discutido anteriormente, a possibilidade de um maior controle das propriedades físicas, químicas e mecânicas dos materiais sintéticos tem levado a um interesse na preparação de hidrogéis a partir dessa classe de polímeros. Neste sentido, hidrogéis provenientes de poliésteres alifáticos têm sido utilizados em estudos para diversas aplicações em engenharia de tecidos em razão de sua biocompatibilidade e degradabilidade. Poliésteres (Figura 2) são polímeros termoplásticos com ligações éster hidroliticamente lábeis. Apesar de todos os ésteres serem teoricamente biodegradáveis, visto que a esterificação é um processo químico reversível, apenas poliésteres alifáticos com cadeias relativamente curtas apresentam tempo de degradação adequado para a maior parte das aplicações biomédicas.¹⁴

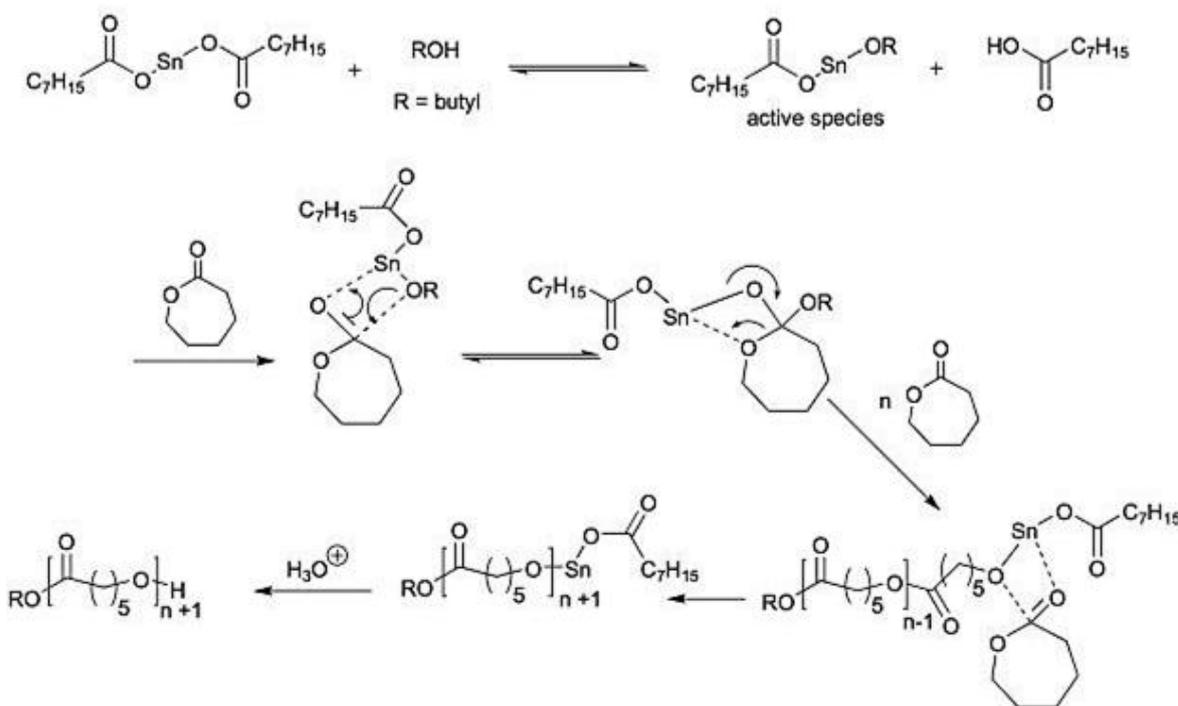
Figura 2– Representação genérica da estrutura de um poliéster.



Os poliésteres podem ser sintetizados a partir de uma vasta gama de monômeros via polimerização por abertura de anel (ROP) e policondensação, dependendo das unidades monoméricas. A polimerização por abertura de anel de lactonas cíclicas se estabeleceu como a técnica de polimerização *one pot* mais eficiente para a obtenção de homo e co-poliésteres de elevada massa molecular. As vantagens da ROP frente à policondensação como um processo comercialmente viável incluem: condições reacionais mais brandas, tempos reacionais mais curtos, ausência de coprodutos reacionais e a possibilidade de utilizarem-se lactonas cíclicas de seis ou sete membros.²⁹ A ROP da ϵ -caprolatona, com proposta

mecânica de “coordenação-inserção” apresentada no Esquema 1, é o método mais utilizado para a obtenção da policaprolactona (PCL).

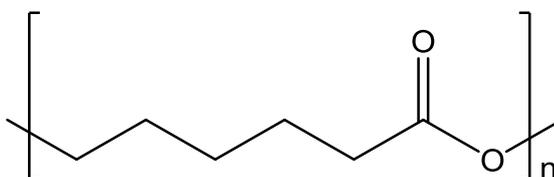
Esquema 1 – Proposta do mecanismo ROP para a obtenção da policaprolactona.



Fonte: SISSON, Adam *et al.*, 2013.³⁰

A PCL (Figura 3) é um poliéster alifático composto por unidades repetitivas de hexanoato. É um polímero semicristalino, com um grau de cristalinidade que pode atingir até 69 %. Ela é facilmente processável, visto que é solúvel em diversos solventes orgânicos, possui ponto de fusão entre 55 e 60 °C e temperatura de transição vítrea de -60 °C, além de formar blendas miscíveis com uma grande variedade de polímeros. A PCL sofre degradação hidrolítica com uma taxa de degradação que vai de meses até vários anos, dependendo da massa molecular, do grau de cristalinidade do polímero e das condições de degradação. A porção amorfa é degradada primeiro, resultando em um aumento do grau de cristalinidade ao longo do tempo, enquanto a massa molecular mantém-se constante. A degradação ocorre por cisão da cadeia final a elevadas temperaturas e por cisão aleatória da cadeia a baixas temperaturas.²⁹

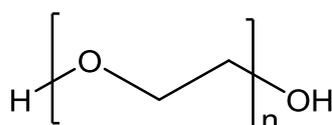
Figura 3 – Representação da estrutura da policaprolactona.



Devido à lenta degradação da PCL, diversos copolímeros têm sido estudados de modo a melhorar as propriedades deste polímero. Um exemplo é o copolímero formado com o poli(etilenoglicol) (PEG), um macromonômero aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para utilização em aplicações biomédicas.

O PEG (Figura 4) é um polímero hidrofílico cuja estrutura básica é um diol com dois grupos hidroxila terminais que podem ser convertidos em outros grupos funcionais, como acrilatos e metacrilatos. Os dois grupos funcionais terminais podem ser simétricos ou assimétricos, o que é conveniente para a formação de hidrogéis e para a conjugação com biomoléculas. Três principais métodos de reticulação são utilizados para a preparação de hidrogéis de PEG: fotopolimerização, polimerização radicalar livre de PEG funcionalizado com grupos acrilatos e reações químicas específicas, como condensação, adição de Michael e reação enzimática.²⁰

Figura 4 – Representação da estrutura do poli(etilenoglicol).



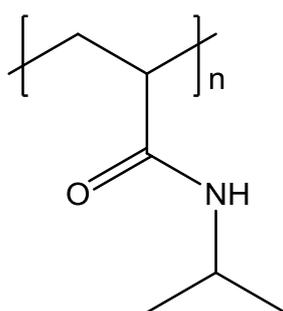
Algumas das características que tornam o PEG um polímero importante para aplicações biomédicas são a sua biocompatibilidade, não-imunogenicidade e resistência à adsorção de proteínas. Contudo, hidrogéis de PEG tipicamente exibem mínima ou não exibem atividade biológica intrínseca devido à natureza não-adesiva das cadeias poliméricas.³¹ Assim, diferentes estratégias têm sido estudadas para o desenvolvimento de hidrogéis de PEG capazes de mimetizar a matriz extracelular natural, desde a modificação dos hidrogéis com fatores bioativos e a

copolimerização com monômeros que apresentem características mais favoráveis à interação celular.

No intuito de modificar as propriedades da PCL, Ko e colaboradores³² sintetizaram o copolímero em bloco poli(ϵ -caprolactona-*b*-etilenoglicol-*b*- ϵ -caprolactona) (PCL-*b*-PEG-*b*-PCL) e o utilizaram em ensaios de regeneração de tecido cartilaginoso. Após estudos para avaliar a composição mais adequada do copolímero para que o mesmo fosse solúvel em meio aquoso, ele foi funcionalizado nas extremidades de suas cadeias com grupos acrilatos e a obtenção de hidrogéis reticulados foi feita por meio de fotopolimerização.

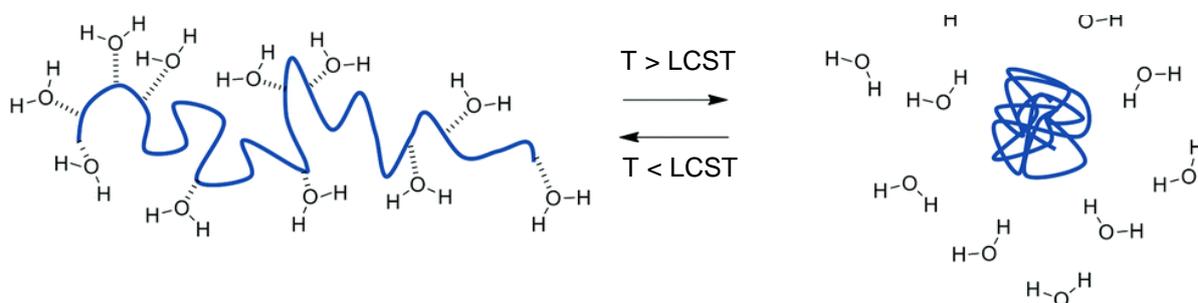
Poliacrilamidas, por serem biocompatíveis, também são frequentemente utilizadas para a obtenção de hidrogéis sintéticos em estudos em medicina regenerativa envolvendo o tratamento de lesões raquimedulares.^{33,22} Além disso, alguns destes polímeros possuem a vantagem de serem termossensíveis, ou seja, a formação do hidrogel ocorre diretamente no local da lesão após a sua injeção, o que pode minimizar os danos provenientes de procedimentos cirúrgicos.¹⁸ A poli(*N*-isopropilacrilamida) (PNIPAAm, Figura 5) é o polímero termoresponsivo mais conhecido, sofrendo uma transição de fase reversível em sistemas aquosos em aproximadamente 32 °C, que é a sua temperatura mínima crítica de solução (LCST).

Figura 5 – Representação da estrutura da poli(*N*-isopropilacrilamida).



Acima da LCST, o PNIPAAm exibe uma estrutura hidrofóbica e coloidal devido ao enfraquecimento das ligações de hidrogênio intermoleculares com a água e, simultaneamente, a um aumento das interações hidrofóbicas entre os grupos isopropila de suas cadeias (Esquema 2). Por outro lado, o PNIPAAm torna-se solúvel em água abaixo da LCST.³³

Esquema 2 – Comportamento em solução do PNIPAAm.



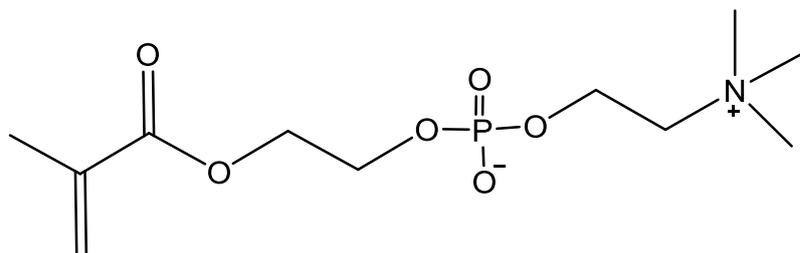
FONTE: PHILLIPS, Daniel e GIBSON, Matthew, 2015.³⁴

Um fator importante a ser levado em consideração a respeito dos biomateriais sintéticos que são utilizados como substitutos biológicos é a presença de grupos funcionais capazes de promoverem uma interface adequada para a interação com o meio celular. Essa interface irá proporcionar uma melhor adesão das células sobre a matriz, bem como auxiliar na expansão do novo tecido em formação através do biomaterial.³⁵ Com base nesta perspectiva, pesquisadores tem utilizado compostos zwitteriônicos em hidrogéis para proporcionar uma melhor interação entra a matriz e o meio celular.³⁶

Polímeros contendo fosforilcolina têm recebido atenção como biomateriais, uma vez que os grupos zwitteriônicos presentes nesses polímeros conferem hidrofiliidade e biocompatibilidade excepcionais. Os hidrogéis feitos a partir de polímeros contendo fosforilcolina foram apresentados pela primeira vez por Nakabayashi e colaboradores³⁷ na forma de um copolímero de metacrilato de 2-fosforilcolina (MPC) e n-butil metacrilato. Diversos exemplos demonstram a preparação de hidrogéis contendo MPC através de polimerização radicalar convencional com diferentes grupos reticulantes.³⁸

O MPC (Figura 6) é um monômero solúvel em água que possui em sua estrutura o grupo fosforilcolina, o qual é encontrado em compostos que compõem a membrana celular. Um polímero contendo unidades de MPC é interessante sob o ponto de vista sintético pelo fato de o grupo fosforilcolina na cadeia lateral possuir cargas tanto negativas quanto positivas, mas ser neutro devido à formação intramolecular de sais.

Figura 6 – Representação da estrutura do monômero metacrilato de 2-fosforilcolina.



Sabe-se que a biocompatibilidade e hemocompatibilidade de polímeros contendo MPC devem-se à supressão da adsorção de proteínas na superfície.³⁹ Essa propriedade deve-se à disposição das moléculas de água em torno do grupo fosforilcolina. A unidade MPC é hidrofílica mas interage fracamente com as moléculas de água e não atrapalha a formação da rede de moléculas de água por ligação de hidrogênio.⁴⁰

Resultados obtidos em estudos indicam que a utilização desse monômero na preparação de hidrogéis em diferentes aplicações auxilia a expansão das células no interior desses hidrogéis.³⁶ Em trabalho recente, Tu e colaboradores⁴¹ utilizaram o monômero MPC para modificação de óxido de grafeno com o intuito de estimular a criação e o crescimento de novos neuritos, prolongamentos dos neurônios, os quais são responsáveis pela transmissão dos sinais sinápticos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral do presente trabalho de conclusão de curso foi desenvolver um material na forma de hidrogel visando à utilização em estudos de regeneração raquimedular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese e caracterização de copolímeros de poli(*N*-isopropilacrilamida-co-metacrilato de 2-fosforilcolina) através de polimerização radicalar livre;
- Síntese e caracterização de um copolímero em bloco de poli(ϵ -caprolactona-*b*-etilenoglicol-*b*- ϵ -caprolactona) através de polimerização por abertura de anel;
- Funcionalização do copolímero tribloco com anidrido metacrílico;
- Preparação dos hidrogéis através de polimerização radicalar;
- Caracterização dos hidrogéis.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

Polietilenoglicol ($M_n = 4600 \text{ g.mol}^{-1}$), ϵ -caprolactona, octanoato de estanho (II), azobisisobutironitrila, *N*-isopropilacrilamida e metacrilato de 2-fosforilcolina foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich e utilizados como recebidos. Os solventes utilizados neste trabalho, como metanol, acetona, tetrahidrofurano, hexano e diclorometano foram adquiridos de fornecedores locais e utilizados sem purificações adicionais. Para as análises de RMN de ^1H foram utilizados clorofórmio deuterado (99,8 %) contendo 0,05 % de TMS como padrão interno e óxido de deutério (99,9 %), ambos adquiridos da empresa Cambridge Isotope Laboratories, Inc.

4.2 SÍNTESE DO COPOLÍMERO P(NIPAAm-co-MPC)

A síntese do copolímero P(NIPAAm-co-MPC) foi realizada através de polimerização radicalar livre. Os monômeros metacrilato de 2-fosforilcolina (MPC) e *N*-isopropilacrilamida (NIPAAm) foram adicionados em um balão de fundo redondo previamente ambientado com gás inerte (N_2). Em seguida, foram solubilizados em álcool metílico seguido da adição do iniciador azobisisobutironitrila (AIBN). O sistema foi submetido a uma temperatura de 60 °C, sob agitação magnética, por 24 horas. Ao final do processo, o solvente da reação foi evaporado em evaporador rotatório, o produto remanescente foi solubilizado em acetona e o polímero

precipitado em hexano. O procedimento de precipitação foi repetido para garantir maior pureza do copolímero. Por fim, o produto foi solubilizado em água e liofilizado. Para estudos comparativos, o homopolímero PNIPAAm foi sintetizado nas mesmas condições reacionais.

4.3 SÍNTESE DO COPOLÍMERO PCL-*b*-PEG-*b*-PCL

Os copolímeros foram sintetizados através de polimerização por abertura de anel do monômero ϵ -caprolactona (CL) utilizando polietilenoglicol (PEG) com massa molar numérica média de $4.600 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ como macroiniciador e octanoato de estanho (II) como catalisador. Foram preparados três copolímeros com diferentes proporções em massa de CL:PEG. A obtenção desses copolímeros foi realizada conforme procedimento padrão descrito abaixo.

Em um balão monotubulado com rosca, foram adicionados a CL, 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 solubilizado em tetrahidrofurano (THF) e precipitado em hexano. O processo de precipitação foi realizado duas vezes para garantir uma maior pureza do copolímero. Posteriormente, o produto foi solubilizado em diclorometano, o solvente foi removido em evaporador rotatório e o sólido remanescente foi seco sob vácuo.

4.4 FUNCIONALIZAÇÃO DO COPOLÍMERO PCL-*b*-PEG-*b*-PCL COM ANIDRIDO METACRÍLICO (MA-PCL-*b*-PEG-*b*-PCL-MA)

No procedimento padrão para esta funcionalização, o copolímero foi solubilizado em diclorometano anidro, sob atmosfera inerte, seguido da adição de anidrido metacrílico (3 equivalentes) e trietilamina (3 equivalentes). A reação foi realizada por quatro 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 éter etílico (2x). O material sólido obtido foi seco sob vácuo.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS COPOLÍMEROS

4.5.1 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos a 400 MHz, em tubos de 5 mm de diâmetro interno, utilizando o espectrômetro Bio Spin GmbH (Bruker). Os deslocamentos químicos (δ) estão relacionados em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS), utilizado como padrão interno. As amostras foram preparadas solubilizando-se 20 mg do polímero em 0,75 mL de CDCl_3 ou D_2O , dependendo do polímero analisado.

4.5.2 Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)

A análise de SEC foi utilizada para determinar-se a massa molar dos polímeros sintetizados. As amostras foram solubilizadas em THF, filtradas em filtros de poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) (0,45 μm de poro) e analisadas a 45 °C (amostras dos copolímeros de PCL-*b*-PEG-*b*-PCL) e a 30 °C (amostras dos copolímeros de PNIPAAm-*co*-MPC), utilizando-se THF como eluente a uma vazão de 1 mL.min⁻¹. Todas as análises foram realizadas em um equipamento GPCmax VE2001 (Viscotek) equipado com detector de índice de refração.

4.5.3 Determinação da temperatura mínima crítica de solução (LCST) dos copolímeros P(NIPAAm-*co*-MPC)

Uma vez que o polímero PNIPAAm possui uma temperatura de transição na qual deixa de estar em solução para formar um gel, foram determinadas as temperaturas mínimas críticas de solução dos copolímeros de P(NIPAAm-*co*-MPC) através de DSC. Soluções de 15 % (m/m) dos copolímeros em água grau Mili-Q foram preparadas e mantidas em repouso por no mínimo 24 horas, para atingirem um estado de equilíbrio. Em seguida, aproximadamente 30 mg das soluções foram colocadas em porta-amostras de alumínio hermeticamente fechados e aquecidos de 30 °C a 45 °C, sob uma taxa de aquecimento de 1 °C/min. As temperaturas mínimas críticas de solução foram determinadas a partir do ponto de máxima intensidade destas transições.

4.6 PREPARAÇÃO DOS HIDROGÉIS

O copolímero funcionalizado que se mostrou solúvel em meio aquoso foi utilizado na preparação dos hidrogéis. Três soluções com 15 % de conteúdo polimérico em água Mili-Q foram preparadas: uma composta apenas de MA-PCL-*b*-PEG-*b*-PCL-MA, uma contendo 12,5 % de MA-PCL-*b*-PEG-*b*-PCL-MA + 2,5 % de P(NIPAAm-*co*-MPC) e outra contendo 10 % de MA-PCL-*b*-PEG-*b*-PCL-MA + 5 % de P(NIPAAm-*co*-MPC) (sempre totalizando 15 % de polímero em solução). As soluções (triplicatas) foram transferidas para poços de uma placa para cultura e, em seguida, foi feita a adição do redutor *N,N,N',N'*-tetraetilenodiamina (TEMED) e do iniciador persulfato de amônio (APS), de modo que as concentrações destes reagentes nas soluções dos hidrogéis fosse de 10 µM. Após duas horas, os hidrogéis foram removidos da placa e dialisados em água Mili-Q por 24 horas.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS

4.7.1 Grau de intumescimento

O grau de intumescimento foi utilizado para avaliar a quantidade de água que os hidrogéis são capazes de absorver. A secagem dos hidrogéis foi realizada inicialmente em estufa convencional durante 24 horas e, por fim, em estufa à vácuo durante 8 horas. Os hidrogéis secos foram pesados e colocados em 20 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, sendo determinados o percentual de água absorvida (*W*) e o grau de intumescimento (*Q*) dos hidrogéis através das Equações 1 e 2 mostradas abaixo:

$$W = (M_t/M_s) \times 100 \quad (1)$$

$$Q = [(M_t - M_s)/M_t] \times 100 \quad (2)$$

M_t : Massa do hidrogel intumescido

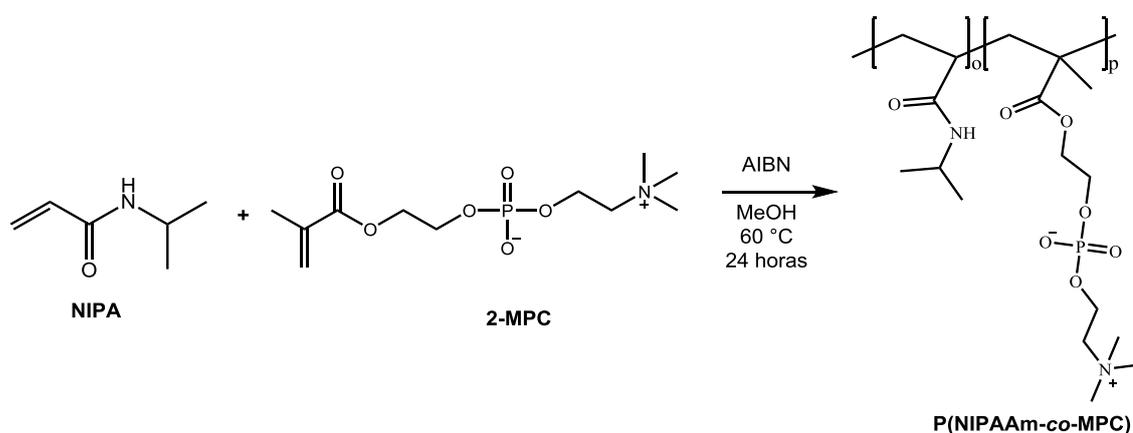
M_s : Massa do hidrogel seco

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COPOLÍMEROS DE P(NIPAAm-co-MPC)

A primeira etapa para a preparação dos hidrogéis visando uma possível aplicação em tratamentos de lesões raquimedulares consistiu na síntese do copolímero termossensível P(NIPAAm-co-MPC), a qual está representada no Esquema 3.

Esquema 3 – Síntese do copolímero P(NIPAAm-co-MPC) por polimerização radicalar.



Uma série de copolímeros foi sintetizada com diferentes proporções entre os monômeros. Os resultados de massa molar média (M_n), massa molar ponderal (M_w), dispersidade (D), rendimento gravimétrico e percentual molar de MPC no polímero estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados obtidos na síntese do P(NIPAAm-co-MPC) utilizando diferentes quantidades de MPC.

MPC adicionado (mol %)	M_n (g mol ⁻¹)	\bar{D}^a	Rendimento (%) ^b	MPC no polímero (%) ^c
0	65.700	1,6	96,3	0
0,25	30.900	2,6	97,2	0,3
0,5	27.500	3,1	99,0	0,6
1,0	25.900	2,1	99,0	1,4
2,5	15.850	1,8	95,6	2,9
5,0	15.000	1,9	92,7	4,5

a. Dispersidade.

b. Rendimento gravimétrico.

c. Calculado a partir dos espectros de RMN de ¹H.

Os resultados obtidos a partir das análises de SEC mostram uma tendência de diminuição da massa molar dos polímeros à medida que se aumentou a quantidade de MPC na reação, sem influenciar no rendimento da reação. Esta tendência de diminuição está possivelmente associada ao caráter iônico dos copolímeros cada vez maior à medida que a quantidade de MPC está presente. Uma vez que a análise de SEC é realizada em solvente orgânico, o caráter iônico pode estar influenciando no resultado obtido através de uma possível redução do volume hidrodinâmico das cadeias em solução em razão da interação eletrostática dos polímeros.

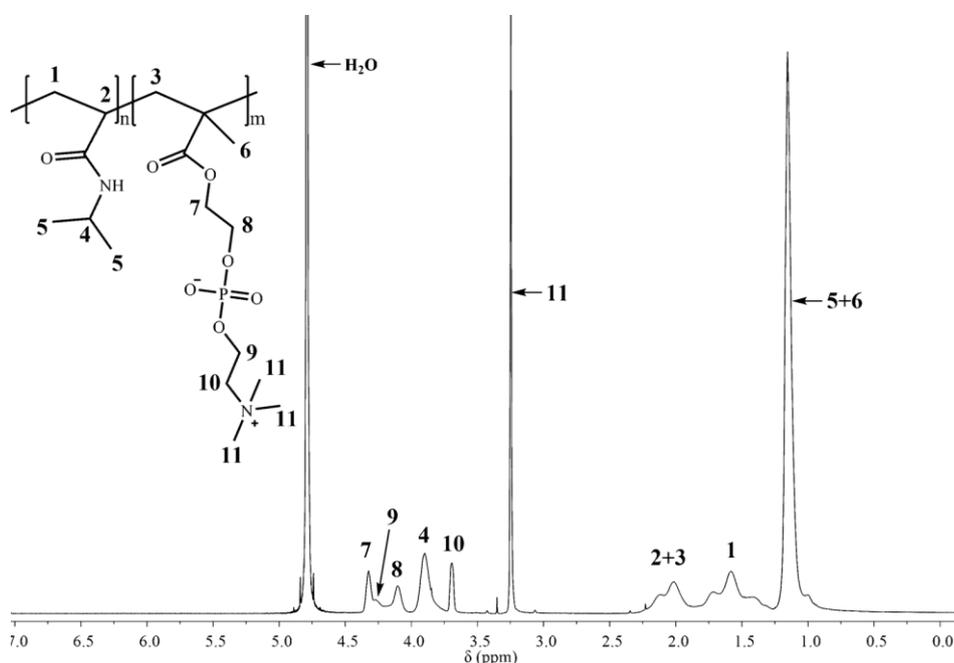
A partir dos espectros de RMN de ¹H (Figura 7) foi possível calcular a quantidade (percentual molar) de monômero MPC incorporada ao polímero. Para isso, utilizou-se a razão entre os sinais dos hidrogênios dos monômeros, conforme mostrado na Equação 3:

$$\% \text{ MPC} = \frac{A_{3,25/9}}{A_{3,25/9} + A_{3,9}} \quad (3)$$

Esta equação relaciona as áreas dos sinais em 3,25 e 3,9 ppm, os quais se referem aos hidrogênios das unidades repetitivas das metilas ligadas ao N⁺ do monômero MPC (indicados no espectro pelo número 11) e ao hidrogênio CH da isopropila do monômero NIPAAm (indicado como 4), respectivamente. Os dados

obtidos mostram que, em geral, a quantidade de MPC encontrada no polímero é ligeiramente superior ao adicionado na reação para quantidades inferiores a 5 %. Isto pode estar relacionado à dificuldade de delimitação das regiões das integrais no RMN em razão da proximidade dos sinais. O espectro de RMN de hidrogênio mostrado na Figura 7 refere-se ao copolímero contendo 5 % do monômero MPC em sua estrutura.

Figura 7 – Espectro de RMN de ^1H do copolímero P(NIPAAm-co-MPC) contendo 5 % de MPC. (D_2O , 400 MHz)



A influência da adição do monômero MPC à cadeia do PNIPAAm na sua temperatura mínima crítica de solução (LCST) foi avaliada através de calorimetria exploratória diferencial (DSC). Os resultados destas análises podem ser visualizados na Figura 8, onde a variação endotérmica da linha de base do termograma indica as transições de fase dos polímeros para a formação de hidrogéis. Os valores de LCST encontram-se na Tabela 2.

Figura 8 – Termogramas de DSC das soluções dos polímeros, os quais mostram as temperaturas mínimas críticas de solução.

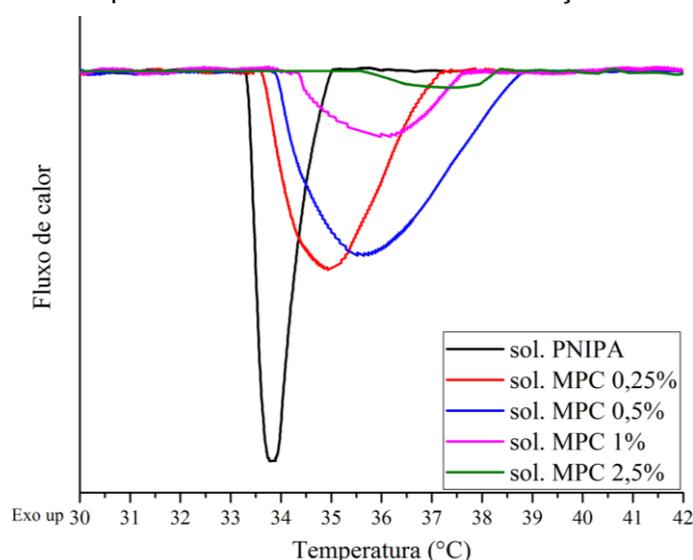


Tabela 2 – Temperaturas mínimas críticas de solução para os polímeros sintetizados.

Polímero	Temperatura média (°C)
PNIPAAm	33,9
MPC – 0,25 %	35,0
MPC – 0,5 %	35,7
MPC – 1,0 %	36,2
MPC – 2,5 %	37,4
MPC – 5,0 %	n.o.

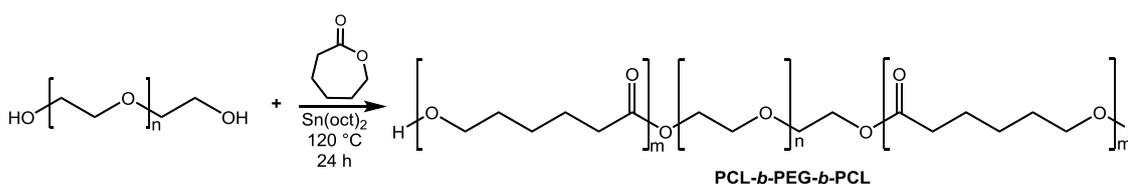
Os resultados indicam que quanto maior a concentração do comonômero iônico MPC, mais elevada a temperatura média de transição dos copolímeros. Essa observação pode ser explicada pelo fato de um maior número de grupos iônicos na cadeia polimérica resultar em mais forças eletrostáticas repulsivas. Isso aumenta a energia necessária para a quebra das ligações de hidrogênio, além de haver um enfraquecimento das interações hidrofóbicas das cadeias laterais. Essa diminuição de hidrofobicidade é evidenciada pela menor intensidade dos termogramas. Além disso, quanto maior o caráter iônico do polímero, maior a sua solubilidade em meio aquoso, o que resulta em uma menor possibilidade de interações hidrofóbicas das

cadeias para a formação do hidrogel. Isto ficou comprovado a partir da não observação de transições de fase para o copolímero contendo 5 % do monômero MPC e também pela baixa intensidade da transição observada para o copolímero MPC – 2,5 %. Com base nessas observações, o copolímero escolhido para ser empregado na preparação dos hidrogéis foi o MPC – 0,5 %, uma vez que ele foi o copolímero com a maior quantidade de MPC a apresentar LCST na faixa de temperatura de interesse (abaixo da temperatura corporal média) e a apresentar uma considerável intensidade de transição de fase.

5.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COPOLÍMEROS DE PCL-*b*-PEG-*b*-PCL

A segunda etapa do trabalho consistiu na síntese do copolímero em bloco PCL-*b*-PEG-*b*-PCL via mecanismo de polimerização por abertura de anel. (Esquema 2). Enquanto o copolímero P(NIPAAm-co-MPC) é responsável por realizar uma transição de fase no hidrogel, o copolímero PCL-*b*-PEG-*b*-PCL forma a rede reticulada do hidrogel. Assim, diferentes copolímeros foram sintetizados com a finalidade de determinar a composição entre CL e PEG que permitiria obter um copolímero solúvel em água.

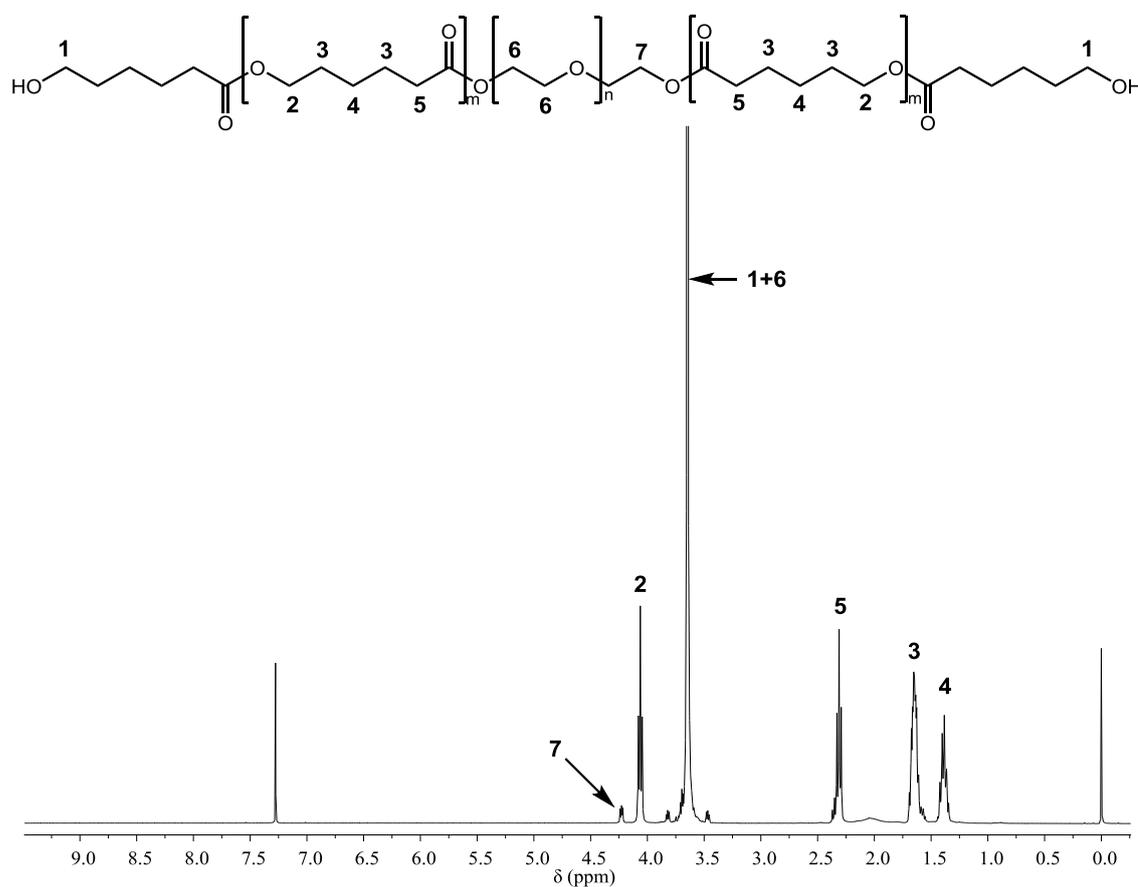
Esquema 4 – Síntese do copolímero em bloco PCL-*b*-PEG-*b*-PCL.



A Figura 9 apresenta, como exemplo, o espectro de RMN de ^1H do copolímero obtido por polimerização por abertura de anel contendo a proporção 0,5:1 de CL:PEG. São observados os sinais de ambas as unidades repetitivas do copolímero, sendo os sinais assinalados em 2, 3, 4 e 5 referentes aos hidrogênios metilênicos da unidade repetitiva da PCL, enquanto que o intenso sinal em cerca de 3,6 ppm refere-se aos hidrogênios da cadeia do PEG. Convém destacar que a polimerização entre o PEG e a CL leva ao surgimento do sinal em 4,2 ppm, que é

atribuído aos hidrogênios CH₂ terminais da cadeia do PEG ligados à cadeia da PCL, assinalados como 7.

Figura 9 – Espectro de RMN de ¹H do copolímero PCL-*b*-PEG-*b*-PCL. (CDCl₃, 400 MHz).



A partir dos espectros de RMN de ¹H foi possível calcular as massas molares numéricas médias (M_n) dos polímeros sintetizados, utilizando a Equação 4. Nesta equação, M_{nPEG} é a massa molar do PEG; I_{URPCL} é o valor da área da integral em 2,31 ppm referente aos hidrogênios CH₂ da unidade repetitiva da PCL; I_{UtPEG} é o valor da área da integral em 4,22 ppm referente aos hidrogênios CH₂ das unidades terminais do PEG e 114 refere-se à massa molar da unidade repetitiva da PCL.

$$M_{n(RMN)} = M_{nPEG} + \frac{I_{URPCL}}{I_{UtPEG}} \times 114 \quad (4)$$

As massas molares dos copolímeros também foram determinadas a partir de análises de SEC. Assim, foi possível realizar uma comparação entre os valores obtidos através das duas técnicas analíticas, cujos valores são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Massas molares dos copolímeros PCL-*b*-PEG-*b*-PCL, em diferentes proporções, obtidos por SEC e RMN de ¹H.

ε -CL:PEG	$M_{nteo}^{a,b}$	M_n RMN ^b	M_n SEC ^{b,c}	\mathcal{D}^c	Rendimento gravimétrico (%)
1:1	9.200	5.890	7.460	1,28	73
0,5:1	6.900	5.790	7.090	1,28	76
0,25:1	5.750	5.070	8.000	1,19	66

a. Massa molar teórica calculada pela equação $M_{nteo} = \frac{m \text{ CL}}{n \text{ PEG}} + 4600$

b. Valores em g.mol⁻¹.

c. Dispersidade do polímero. Obtido por SEC.

De acordo com os valores da Tabela 3, tanto as massas molares obtidas por RMN, quanto por SEC apresentaram uma expressiva diferença em relação à massa molar teórica calculada. Esta diferença está diretamente relacionada aos rendimentos das reações, uma vez que possivelmente houve perda de reagentes que não polimerizaram durante o procedimento, especialmente da caprolactona.

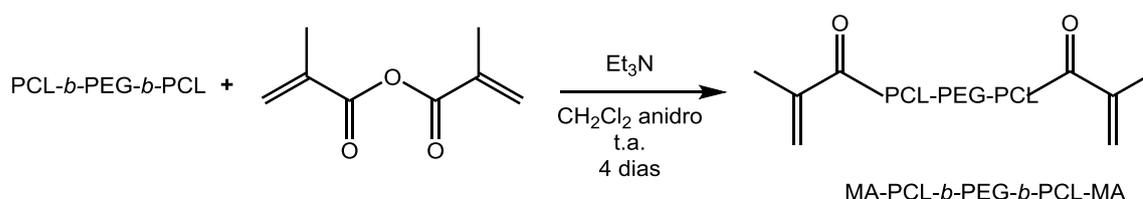
Quando as massas molares obtidas pelas duas técnicas são comparadas, observa-se que as massas molares dos copolímeros calculadas por RMN diferem expressivamente daquelas encontradas através da análise de SEC. Esta diferença pode estar associada à curva de calibração utilizada na análise de SEC, que é construída a partir de padrões de poliestireno. A curva de calibração se baseia no volume hidrodinâmico do polímero e, como o poliestireno e o copolímero PCL-*b*-PEG-*b*-PCL apresentam significativas diferenças estruturais, eles apresentam volumes hidrodinâmicos igualmente distintos. Portanto, a utilização da análise de RMN de ¹H para a determinação da massa molar dos copolímeros de PCL-*b*-PEG-*b*-PCL seria mais adequada, pois estabelece uma relação direta entre os hidrogênios terminais da cadeia do PEG e os hidrogênios das unidades repetitivas da PCL.

5.3 FUNCIONALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COPOLÍMERO PCL-*b*-PEG-*b*-PCL

Para a preparação dos hidrogéis é necessário que o copolímero seja completamente solúvel em meio aquoso. Deste modo, foram realizados testes qualitativos de solubilidade para determinar qual dos copolímeros sintetizados poderia ser empregado na preparação dos hidrogéis. Dos copolímeros sintetizados, o que se mostrou solúvel em água foi o de proporção 0,25:1 CL:PEG. A solubilidade deste polímero em água deve-se à baixa proporção de CL, uma vez que quanto maior a proporção deste monômero, maior o caráter hidrofóbico da cadeia.

Sendo assim, o copolímero de PCL-*b*-PEG-*b*-PCL de proporção 0,25:1 foi submetido à reação de funcionalização com anidrido metacrílico para a inclusão de grupos reticuláveis em suas extremidades (Esquema 5). A reação foi realizada utilizando um excesso de anidrido metacrílico, de modo a garantir que todas as extremidades do polímero estivessem funcionalizadas, para que a completa reticulação das cadeias fosse possível durante a preparação dos hidrogéis.

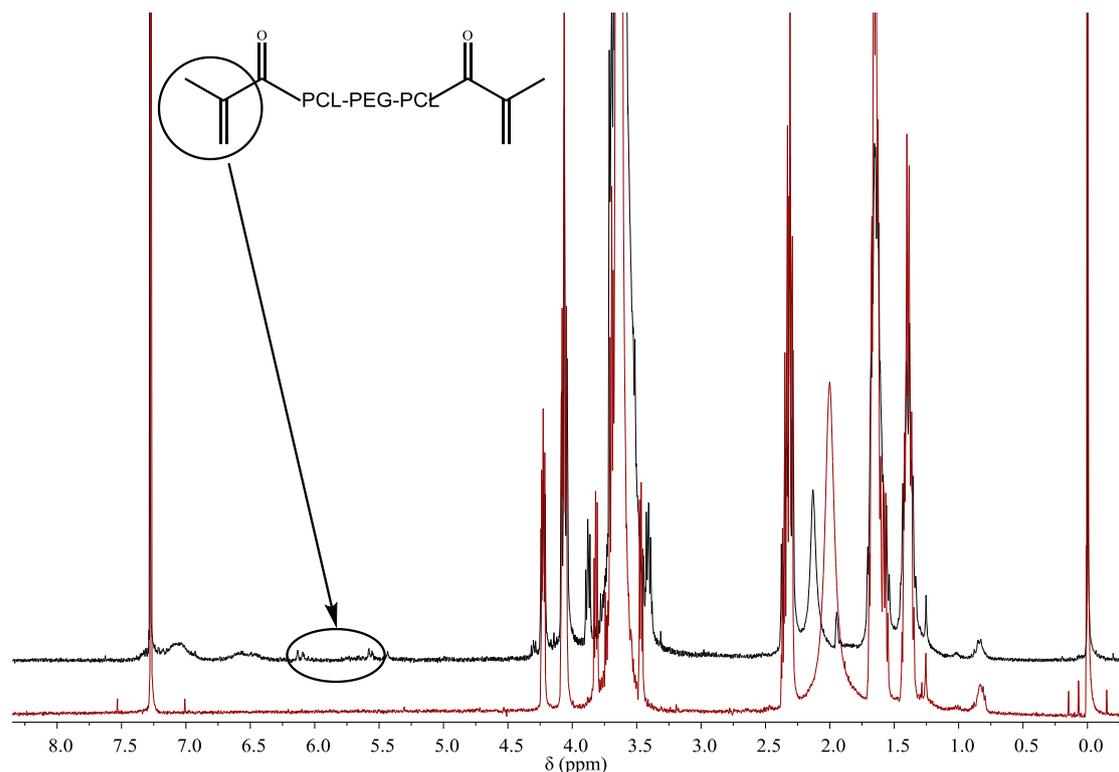
Esquema 5 – Reação de funcionalização do copolímero PCL-*b*-PEG-*b*-PCL com anidrido metacrílico.



A verificação da funcionalização das cadeias do copolímero com os grupos metacrilato foi realizada através da análise de RMN de ¹H, cujo espectro está mostrado na Figura 10. Nesta figura são mostrados dois espectros: o espectro do copolímero antes da funcionalização, que está em vermelho, e o do produto obtido após a funcionalização, que está em preto. A presença do grupo metacrilato é confirmada pelos dois dubletos em 5,6 e 6,1 ppm, os quais são referentes aos hidrogênios das ligações duplas das extremidades da cadeia. Comparando-se as integrais das áreas destes sinais com a integral do sinal em 4,2 ppm, referente aos hidrogênios metilênicos terminais da cadeia do PEG ligados ao bloco de PCL,

obtém-se uma razão de cerca de 1:1, sugerindo que o copolímero foi funcionalizado com êxito a partir da metodologia utilizada.

Figura 10 – Comparativo entre os espectros de RMN de ^1H do copolímero PCL-*b*-PEG-*b*-PCL antes (em vermelho) e após a funcionalização com anidrido Metacrílico (em preto).



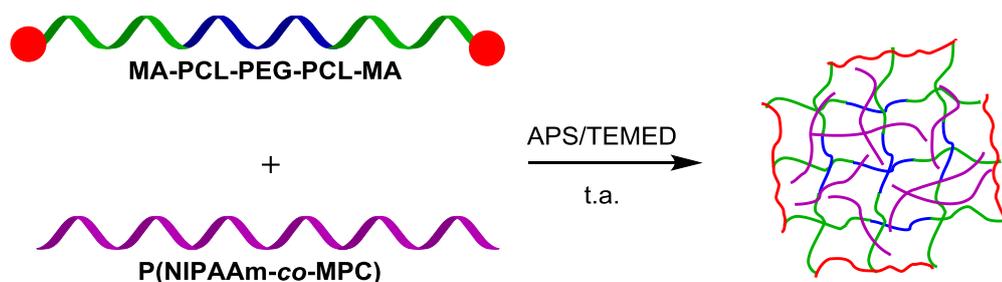
A fim de verificar-se se houve alguma possível clivagem de cadeia durante o processo de funcionalização, o copolímero MA-PCL-*b*-PEG-*b*-PCL-MA foi avaliado por SEC. O resultado desta análise mostrou que o copolímero funcionalizado apresentou uma massa molar numérica média de $8.331 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e uma polidispersidade de 1,15. Comparando-se com a massa obtida anteriormente pela análise de SEC (Tabela 3), verifica-se um pequeno aumento – o que é coerente, tendo em vista que foram adicionados grupos funcionais à cadeia do copolímero.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS

Depois de os dois copolímeros terem sido sintetizados e caracterizados, procedeu-se à preparação dos hidrogéis conforme procedimento descrito na

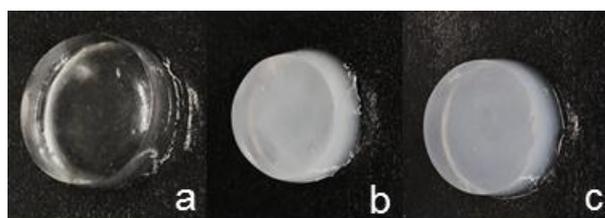
metodologia. Para fins ilustrativos, o Esquema 6 traz uma proposta de distribuição das cadeias dos copolímeros na estrutura do hidrogel.

Esquema 6 – Proposta de distribuição das cadeias dos copolímeros no interior do hidrogel.



A Figura 11 mostra o aspecto dos hidrogéis após sua preparação.

Figura 11 – Fotografia dos diferentes hidrogéis preparados: MA-PCL-*b*-PEG-*b*-PCL-MA (a), MA-PCL-*b*-PEG-*b*-PCL-MA com 2,5 % de P(NIPAAm-co-MPC) (b) e MA-PCL-*b*-PEG-*b*-PCL-MA com 5 % de P(NIPAAm-co-MPC) (c).



O hidrogel contendo apenas o copolímero MA-PCL-*b*-PEG-*b*-PCL-MA mostrou-se translúcido, enquanto que os dois hidrogéis contendo o copolímero P(NIPAAm-co-MPC) mostraram-se opacos. Os motivos pelos quais esses hidrogéis apresentaram essa característica ainda são desconhecidos e mais estudos seriam necessários para que as razões por trás desse comportamento fossem elucidadas.

Após a preparação, os hidrogéis foram secos (Figura 12) para a determinação do grau de intumescimento.

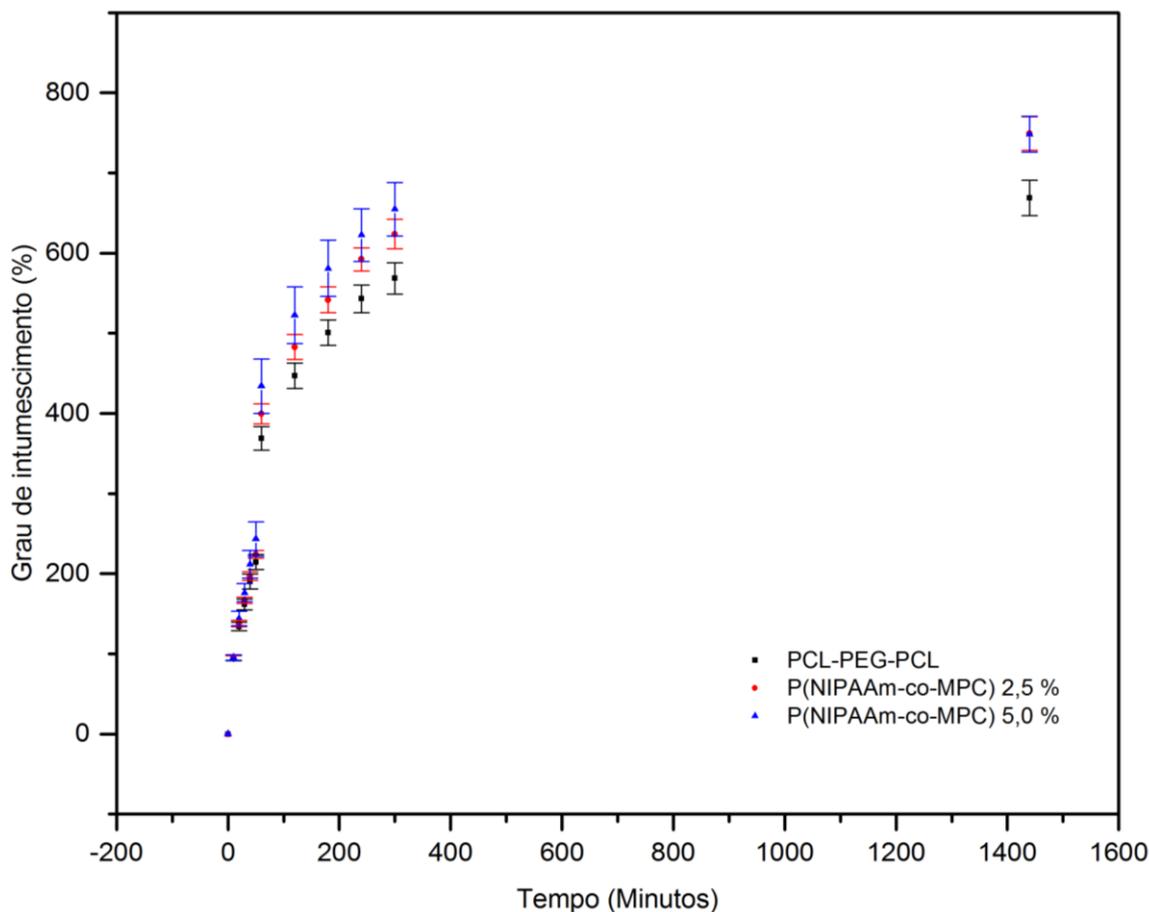
Figura 12 – Fotografia dos hidrogéis secos MA-PCL-*b*-PEG-*b*-PCL-MA (a), MA-PCL-*b*-PEG-*b*-PCL-MA com 2,5 % de P(NIPAAm-*co*-MPC) (b) e MA-PCL-*b*-PEG-*b*-PCL-MA com 5 % de P(NIPAAm-*co*-MPC) (c).



5.4.1 Grau de intumescimento

Os hidrogéis secos foram submetidos ao intumescimento em uma solução tampão de pH 7,6 e tiveram suas massas determinadas em intervalos de tempo pré-estabelecidos a fim de verificar-se a quantidade de solução por eles absorvida. Na Figura 13 é mostrado o gráfico que relaciona o tempo com o grau de intumescimento até 1440 minutos para os hidrogéis de MA-PCL-*b*-PEG-*b*-PCL-MA, MA-PCL-*b*-PEG-*b*-PCL-MA com 2,5 % de P(NIPAAm-*co*-MPC) e MA-PCL-*b*-PEG-*b*-PCL-MA com 5 % de P(NIPAAm-*co*-MPC).

Figura 13 – Gráfico relacionando o grau de intumescimento (%) com o tempo para os hidrogéis de MA-PCL-*b*-PEG-*b*-PCL-MA, MA-PCL-*b*-PEG-*b*-PCL-MA com 2,5 % de P(NIPAAm-*co*-MPC) e MA-PCL-*b*-PEG-*b*-PCL-MA com 5 % de P(NIPAAm-*co*-MPC).



Os dois últimos hidrogéis apresentaram o mesmo grau de intumescimento (749 %), que foi superior ao do hidrogel de MA-PCL-*b*-PEG-*b*-PCL-MA puro (669 %), Este resultado está de acordo com o esperado, uma vez que o copolímero P(NIPAAm-*co*-MPC) apresenta maior caráter hidrofílico do que o MA-PCL-*b*-PEG-*b*-PCL-MA, que possui a porção hidrofóbica da PCL. Devido ao caráter iônico do P(NIPAAm-*co*-MPC), sua incorporação também pode ter tido influência sobre a capacidade de retenção de água, visto que essa característica leva a uma maior solvatação das cadeias poliméricas.

6 CONCLUSÕES

Hidrogéis de PCL-*b*-PEG-*b*-PCL contendo P(NIPAAm-*co*-MPC) foram preparados com êxito. Para que esse objetivo fosse atingido, primeiramente foi

realizada a síntese de copolímeros de P(NIPAAm-co-MPC) através de polimerização radicalar livre. O estudo da temperatura mínima crítica de solução desses materiais sugeriu que o aumento da quantidade de MPC no polímero é acompanhado de um aumento da LCST e de uma diminuição das interações hidrofóbicas entre as cadeias. Copolímeros de PCL-*b*-PEG-*b*-PCL foram sintetizados através de polimerização por abertura de anel utilizando o PEG como macroiniciador. O produto foi funcionalizado com sucesso com anidrido metacrílico, gerando copolímeros precursores para a obtenção de hidrogéis contendo os dois copolímeros sintetizados. Esses hidrogéis foram preparados através de polimerização radicalar, e o grau de intumescimento dos materiais obtidos foi analisado. Os hidrogéis contendo o copolímero P(NIPAAm-co-MPC) apresentaram grau de intumescimento superior ao do hidrogel composto apenas de PCL-*b*-PEG-*b*-PCL. Para que se possa entender melhor as propriedades deste material e seu potencial de aplicação como suporte celular em tratamentos de traumatismos raquimedulares, ainda é necessário avaliar seu comportamento mecânico, degradação, estrutura e porosidade.

7 REFERÊNCIAS

1. Silva, N. A., Sousa, N. & Reis, R. L. Progress in Neurobiology From basics to clinical : A comprehensive review on spinal cord injury. *Prog. Neurobiol.* 114, 25–57, **2014**.
2. Tsintou, M., Dalamagkas, K., Seifalian, A. M. & Seifalian, A. M. Advances in regenerative therapies for spinal cord injury : a biomaterials approach. *Neural Regen. Res.* 10(5), 724-742, **2015**.
3. Selvarajah, S., Hammond, E. R., Haider, A. H., Abularrage, C. J. & Becker, D. The Burden of Acute Traumatic Spinal Cord Injury among Adults in the United States : An Update. *J. Neurotrauma.* 238, 228–238, **2014**.
4. Wilcox, J. T., Cadotte, D. & Fehlings, M. G. Neuroscience Letters Spinal cord clinical trials and the role for bioengineering. *Neurosci. Lett.* 519, 93–102, **2012**.
5. Pasale, S. K., Cerroni, B., Ghugare, S. V & Paradossi, G. Multiresponsive Hyaluronan-p (NiPAAm). *Macromol. Biosci.* 1025–1038, **2014**.

6. Tetzlaff, W. *et al.* A Systematic Review of Cellular Transplantation Therapies for Spinal Cord Injury. *J. Neurotrauma* 28, 1611–1682, **2011**.
7. Kubinová, Š. Biomaterials combined with cell therapy for treatment of spinal cord injury. *Regen. Med.* 7, 207–224, **2012**.
8. Xu, X. M. & Onifer, S. M. Transplantation-mediated strategies to promote axonal regeneration following spinal cord injury. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 169, 171–182, **2009**.
9. Williams, D. F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 30, 5897–5909, **2009**.
10. Murugan, R., Ph, D., Ramakrishna, S. & Ph, D. Design Strategies of Tissue Engineering Scaffolds with Controlled Fiber Orientation. *Tissue Eng.* 13, 1845–1866, **2007**.
11. Gu, X., Ding, F., Yang, Y. & Liu, J. Progress in Neurobiology Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration. *Prog. Neurobiol.* 93, 204–230, **2011**.
12. Hu, M. W. & Li, Y. K. Cellular Transplantation-Based Evolving Treatment Options in Spinal Cord Injury. *Cell Biochem. Biophys.* 71, 1-8, **2014**.
13. Williams, D. F. Regulatory biocompatibility requirements for biomaterials used in regenerative medicine. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 89, **2015**.
14. Nair, L. S. & Laurencin, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* 32, 762–798, **2007**.
15. Enrione, J. *et al.* A novel biomaterial based on salmon-gelatin and its in vivo evaluation as sterile wound-dressing. *Mater. Lett.* 212, 159–164, **2018**.
16. Ferrario, C. *et al.* Marine-derived collagen biomaterials from echinoderm connective tissues. *Mar. Environ. Res.* 128, 46–57, **2017**.
17. Brown, A. C. & Barker, T. H. Fibrin-based biomaterials: Modulation of macroscopic properties through rational design at the molecular level. *Acta Biomater.* 10, 1502–1514, **2014**.
18. Wiltsey, C. *et al.* Acta Biomaterialia Thermogelling bioadhesive scaffolds for intervertebral disk tissue engineering: Preliminary in vitro comparison of aldehyde-based versus alginate microparticle-mediated adhesion. *ACTA Biomater.*, **2015**.
19. Perale, G. *et al.* Hydrogels in Spinal Cord Injury Repair Strategies. *ACS Chem. Neurosc.* 7, 336–345, **2011**.

20. Zhu, J. Biomaterials Bioactive modification of poly (ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* 31, 4639–4656, **2010**.
21. He, H. *et al.* Preparation and characterization of silk sericin / PVA blend film with silver nanoparticles for potential antimicrobial application. *Int. J. Biol. Macromol* 104, 457-464, **2017**.
22. Yu, Y., Sun, X., Zhang, R., Yuan, S. & Lu, Q. Synthesis and properties of amphiphilic thermo-sensitive block copolymers. *J. Polym. Res.* 24, 55, **2017**.
23. Rezwani, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J. & Boccaccini, A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27, 3413–3431, **2006**.
24. Slaughter, B. V & Fisher, O. Z. Hydrogels in regenerative medicine. *Adv. Mater.* 21, 3307–3329, **2009**.
25. Führmann, T., Anandakumaran, P. N. & Shoichet, M. S. Combinatorial Therapies After Spinal Cord Injury : How Can Biomaterials Help? *Adv. Healthc. Mater.* 6, 1–21, **2017**.
26. Annabi, N., Nichol, J. W., Ph, D., Zhong, X. & Ji, C. Controlling the Porosity and Microarchitecture of Hydrogels for Tissue Engineering, *Tissue Eng. Part B Rev.* 16, 371-383, **2010**.
27. Roy, N. & Saha, N. PVP-based hydrogels: Synthesis, properties and applications, **2012**.
28. Deligkaris, K., Tadele, T. S., Olthuis, W. & van den Berg, A. Hydrogel-based devices for biomedical applications. *Sensors Actuators, B Chem.* 147, 765–774, **2010**.
29. Labet, M. & Thielemans, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chem. Soc. Rev.* 38, 3484, **2009**.
30. Sisson, A. L., Ekinici, D. & Lendlein, A. The contemporary role of ϵ -caprolactone chemistry to create advanced polymer architectures. *Polymer (Guildf)*. 54, 4333–4350, **2013**.
31. Alcantar, N. A., Aydil, E. S. & Israelachvili, J. N. Polyethylene glycol – coated biocompatible surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.* 51, 343-351, **2000**.
32. Ko C. Y., Yang C. Y., *et al.* Cartilage formation through alterations of amphiphilicity of poly(ethylene glycol)-poly(caprolactone) copolymer hydrogels. *RSC Advances*. 3:25769-79, **2013**.
33. Kuo, C. *et al.* Thermo- and pH-Induced Self-Assembly of P (AA- b -NIPAAm- b

- AA) Triblock Copolymers Synthesized via RAFT Polymerization. 1109–1118, **2016**.
34. Gibson, I. M., Phillips, D. Towards Being Genuinely Smart: 'Iso-Thermally Responsive' Polymers as Versatile, Programmable, Scaffolds for Biologically-Adaptable Materials. *Polym. Chem.* 1033–1043, **2015**.
 35. Peng, H. *et al.* Amphiphilic Triblock Copolymers of Methoxy-poly (ethylene glycol)-b-poly(L-lactide)-b-poly(L-lysine) for Enhancement of Osteoblast Attachment and Growth. 95–104, **2009**.
 36. McRae Page, S. *et al.* Promoting cell adhesion on slippery phosphorylcholine hydrogel surfaces. *J. Mater. Chem. B* 2, 620, **2014**.
 37. Ishihara, K., Ueda, T. & Nakabayashi, N. Preparation of Phospholipid Polymers and Their Properties as Polymer Hydrogel Membranes. *Polym. J.* 22, 355–360, **1990**.
 38. Kiritoshi, Y. & Ishihara, K. Preparation of cross-linked biocompatible poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) gel and its strange swelling behavior in water/ethanol mixture. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 13, 213–224, **2002**.
 39. Ishihara, K., Aragaki, R., Ueda, T., Watanabe, A. & Nakabayashi, N. Reduced thrombogenicity of polymers having phospholipid polar groups. *J. Biomed. Mater. Res.* 24, 1069–1077, **1990**.
 40. Kitano, H., Sudo, K., Ichikawa, K., Ide, M. & Ishihara, K. Raman Spectroscopic Study on the Structure of Water in Aqueous Polyelectrolyte Solutions. *J. Phys. Chem. B* 104, 11425–11429, **2000**.
 41. Tu, Q. *et al.* Biomimetic choline-like graphene oxide composites for neurite sprouting and outgrowth. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5, 13188–13197, **2013**.