

SÍNTESE DE HIDROGÉIS A PARTIR DA COMBINAÇÃO DE GELATINA METACRILADA E POLIMETACRILATOS NÃO CONVENCIONAIS VIA FOTORRETICULAÇÃO

Palavras-Chave: HIDROGÉIS HÍBRIDOS, POLÍMEROS CATIÔNICOS, POLÍMEROS RESPONSIVOS

Autores:

ANA LUIZA ASSIS COUTINHO, FEQ – UNICAMP

GUILHERME FREY SCHÜTZ, FEQ – UNICAMP

Prof. Dr. RONIÉRIK PIOLI VIEIRA (orientador), FEQ - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais física ou quimicamente reticuladas que são caracterizados pela sua alta capacidade de absorção de água e manutenção de sua estrutura mesmo em seu estado intumescido (MITURA; SIONKOWSKA; JAISWAL, 2020). Possuem grande aplicabilidade como biomateriais e podem ser obtidos a partir de polímeros sintéticos ou naturais, como a gelatina. A gelatina se destaca como matéria-prima devido a sua alta biocompatibilidade, baixa imunogenicidade e proliferação celular e pode ter sua estrutura modificada com anidrido metacrílico (MA), formando gelatina metacrilada (GelMA), com propriedades mecânicas e taxa de degradação melhoradas (CATOIRA et al, 2019).

Hidrogéis à base de GelMA são formados por polimerização radicalar foto iniciada e seus efeitos biológicos podem ser aprimorados pela adição de monômeros sintéticos com características catiônicas como o cloreto de ([2-metacrilóiloxi) etil] trimetilamônio (METAC), de efeito antimicrobiano (SHIGA et al., 2018) e (2-(dimetilaminoetil)metacrilato) (DMAEMA), responsivo a variações de pH e temperatura (BLAŽIC; MARUŠIĆ; VIDOVIĆ, 2023), os quais contém grupamentos aminas quaternários e terciários, respectivamente. O presente estudo objetiva a elaboração de hidrogéis a base de GelMA combinados com os metacrilatos supracitados, visando futuras aplicações biomédicas. Para tal, o grau de intumescimento de hidrogéis, sob diferentes temperaturas e valores de pH, assim como a sua morfologia serão avaliados. Em última análise, pretende-se correlacionar estas características com as estruturas dos materiais sintetizados, servindo de base para futuras pesquisas e avanços na área de biomateriais.

METODOLOGIA:

A síntese da GelMA consistiu no aquecimento da solução tampão fosfato salina (PBS), pH 7,4 a 50°C seguido pela adição de 10% m/v de gelatina tipo B (Dinâmica Química), sob agitação constante. Após completa dissolução, foram adicionados 8 mL de anidrido metacrílico (Sigma-Aldrich) gota a gota e a reação procedeu por 3 horas à temperatura constante. Ao final deste período, a solução foi diluída com 2 vezes o volume de PBS à 40°C e posteriormente dialisada em membranas de diálise (Inlab), com corte de massa molar na faixa de 12-14 kDa, durante 7 dias em água destilada à 40°C. Por fim, a gelatina sintetizada foi congelada e liofilizada.

Para avaliar a eficiência da reação de metacrilção, foi determinado o grau de substituição (DS) da GelMA através de espectroscopia de ressonância magnética de prótons ¹H-RMN (Bunker Avance, 400 MHz), à temperatura ambiente e em triplicata - pela central analítica do Instituto de Química da Unicamp - de soluções de gelatina *in natura* e de GelMA em água

deuterada (D₂O) à concentração de 10 mg/mL. A integral referente aos picos dos prótons de metileno (d = 2,7 ppm e d = 2,9 ppm) foi utilizada para quantificação da lisina nas amostras e o DS foi determinado de acordo com a Equação 1.

$$DS (\%) = \left(1 - \frac{\text{Integração do sinal de lisina da GelMA}}{\text{Integração do sinal de lisina da gelatina}} \right) \times 100 \quad (1)$$

A avaliação quantitativa da presença de bandas relacionadas à inserção de grupos metacrilatos na gelatina foi feita através de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier FT-IR (Thermo Scientific, Nicolet 6700) pelo método de reflexão total atenuada (ATR) em uma faixa de 4000 a 600 cm⁻¹, para análise de grupamentos amida ou éster na GelMA.

A GelMA produzida foi utilizada para a obtenção de hidrogéis híbridos de poli(METAC) e PDMAEMA a partir de diferentes metodologias. Para os hidrogéis de poli(METAC), foram adicionados 10% m/v de GelMA, 1% m/v do fotoiniciador Irgacure 2959 (Sigma-Aldrich) e a respectiva quantidade de METAC (Sigma-Aldrich) - 5% m/v em PBS à 50°C, sob agitação constante e em béquer protegido da luz. Após completa homogeneização, a solução foi colocada em placa de Petri e submetida à luz UV (365 nm, com intensidade de 2 mWcm⁻²) durante 30 minutos, os hidrogéis foram lavados em água destilada por 24h.

Os hidrogéis de PDMAEMA foram produzidos a partir de 2 soluções: uma de GelMA contendo 10% m/v de GelMA e 1% m/v de Irgacure 2959, em PBS à 50°C; e outra, de DMAEMA, contendo 3,5% v/v de DMAEMA (Sigma-Aldrich), 1% m/m de bisacrilamida (Sigma-Aldrich) - agente de reticulação e 0,50% m/m de Irgacure 2959, em PBS à temperatura ambiente. Ambas foram feitas sob agitação constante e, após completa dissolução, unidas para formar as soluções de hidrogel de acordo com as proporções: 0% v/v, 50% v/v, e 100% v/v em relação à solução de DMAEMA. A solução formadora de hidrogel foi então colocada em placa de Petri e submetida à luz UV, de mesma especificação acima, por 20 minutos e o hidrogel cortado imediatamente em discos de 1 cm, os discos foram lavados por 24 h, em água destilada, para a remoção de componentes não reagidos.

Para avaliar o grau de intumescimento (SD), foi utilizada a Equação 2, sob diferentes condições de pH e temperatura. O ensaio consistiu na pesagem dos hidrogéis antes (m₀) e depois de ficarem imersos por 24 h em solução tampão (m₁) sob determinada temperatura. Para avaliar o efeito do pH, foram utilizadas soluções tampão de 1 e 10 à temperatura ambiente e, para avaliar o efeito da temperatura, foi utilizada solução tampão 7,4 às temperaturas de 25°C e 60°C.

$$SD(\%) = \frac{m_1 - m_0}{m_0} \times 100 \quad (2)$$

A morfologia dos hidrogéis foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), no intuito de correlacionar sua microestrutura com o grau de intumescimento e a quantidade de metacrilato adicionado nas formulações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os espectros ¹H-RMN da gelatina e da GelMA encontram-se na Figura 1. Observa-se que a intensidade do pico relacionado à lisina entre 2,8 ppm e 3,1 ppm é aproximadamente nula na GelMA, indicando a efetiva funcionalização da gelatina com grupos metacrilato, com DS próximo de 100%; houve também o aparecimento de picos entre 5,3 ppm e 5,5 ppm, relativos aos prótons acrílicos dos grupamentos metacrilato; e o aumento do pico em, aproximadamente, 1,9 ppm devido ao maior número de grupos metila na gelatina modificada (ZHU et al., 2019).

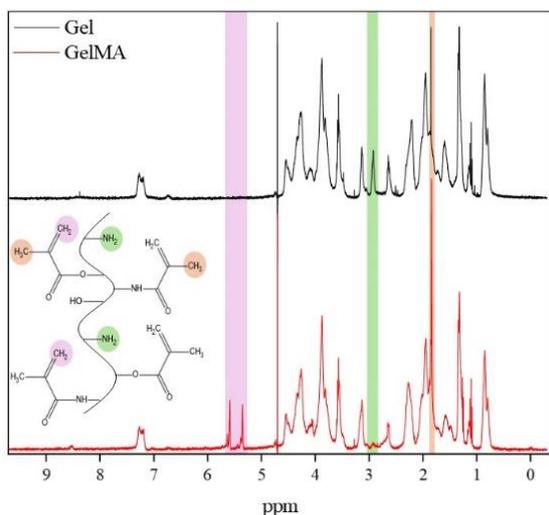


Figura 1: Espectros de ^1H -RMN referentes a gelatina *in natura* e GelMA.

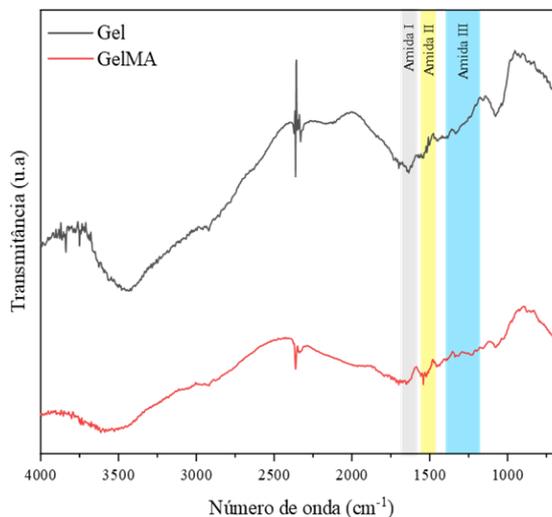


Figura 2: Análise FT-IR da gelatina *in natura* e GelMA.

A análise do FT-IR (Figura 2) da GelMA, em comparação com a gelatina *in natura*, apresentou picos relativos ao grupamento amida: aqueles entre $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ são referentes ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ da amida I; e os encontrados entre $1470 - 1570 \text{ cm}^{-1}$ e $1200 - 1400 \text{ cm}^{-1}$, referentes ao pico de vibração de deformação $\text{N}-\text{H}$ das amidas II e III, respectivamente (RAMESH; RAMALINGAM, 2021). Isto indica que houve modificação da gelatina.

A GelMA sintetizada foi utilizada para produção dos hidrogéis. As micrografias de superfície e seção transversal dos hidrogéis de poli(METAC) encontram-se na Figura 3 e graus de intumescimento obtidos em termos de temperatura e pH, na Tabela 1.

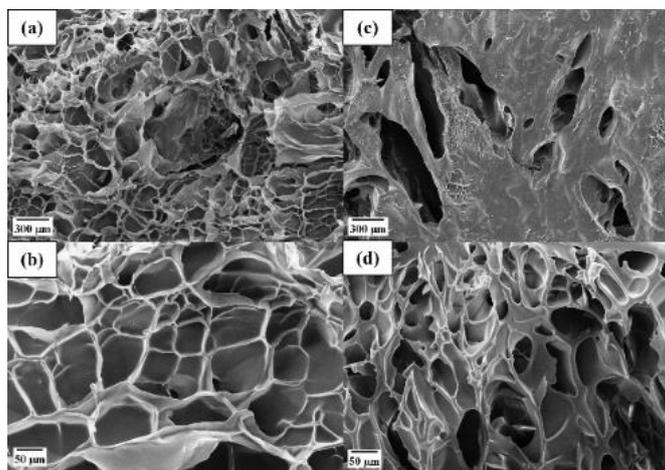


Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de superfície e seção transversal dos hidrogéis (a) e (b) GelMA, (c) e (d) METAC.

pH	Intumescimento (%)	
	GelMA	METAC5
1	$683,67 \pm 11,61$	$715,25 \pm 24,12$
10	$827,02 \pm 34,58$	$484,48 \pm 5,60$
Temperatura (°C)	Intumescimento (%)	
	GelMA	METAC5
	25	$815,53 \pm 52,68$
60	$1001,15 \pm 50,35$	$504,58 \pm 1,44$

Tabela 1: Grau de intumescimento dos hidrogéis de poli(METAC) em função da temperatura e pH.

A partir da Figura 3 (a) e (b), é possível observar que a superfície e a seção transversal dos hidrogéis de controle apresentaram estrutura porosa, com poros interconectados o que é esperado para esse tipo de material (YÜCE-ERARSLAN et

al., 2023). A incorporação do METAC no hidrogel faz com que seja formado um filme superficial que não obstrui os poros internos na formulação de METAC5.

Os testes de grau de intumescimento mostraram que os hidrogéis de controle apresentaram maior grau de intumescimento em relação a todas as formulações com METAC, com o aumento do SD conforme o aumento da temperatura e do pH. A menor capacidade de intumescimento relativa à incorporação do METAC sugere há uma maior densidade de reticulação na estrutura. Como não foi utilizado nenhum agente de reticulação, isto pode ter sido causado por associações entre os grupos metacrilato da GelMA e o METAC.

As micrografias de superfície e seção transversal dos hidrogéis de DMAEMA encontram-se na Figura 4 e graus de intumescimento obtidos em termos de pH e temperatura na Tabela 2.

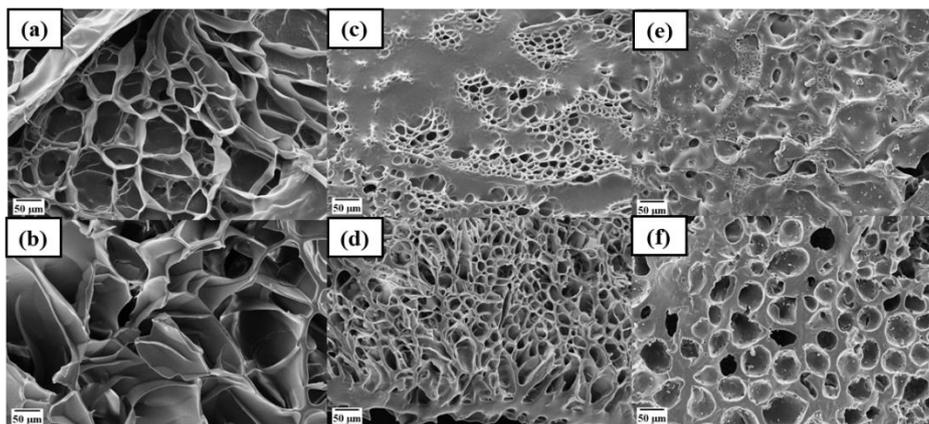


Figura 4: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de superfície e seção transversal dos hidrogéis (a) e (b) DMAEMA0, (c) e (d) DMAEMA50, (e) e (f) DMAEMA100.

pH	Intumescimento (%)		
	DMAEMA0	DMAEMA50	DMAEMA100
1	517,42 ± 23,86	1206,27 ± 98,13	1072,55 ± 42,80
10	864,79 ± 10,09	559,42 ± 11,72	341,75 ± 19,38
Temperatura (°C)	DMAEMA0	DMAEMA50	DMAEMA100
	25	738,95 ± 19,16	595,00 ± 20,85
60	809,54 ± 15,44	442,66 ± 43,33	231,79 ± 12,71

Tabela 2: Grau de intumescimento dos hidrogéis de DMAEMA em função da temperatura e pH.

Na Figura 4, é possível observar que os poros dos hidrogéis de PDMAEMA, quando comparados ao hidrogel de controle, apresentam poros reduzidos tanto na superfície quanto na seção transversal. Há uma diminuição no tamanho dos poros e de sua distribuição pela estrutura do hidrogel conforme o aumento da porcentagem de DMAEMA, isto pode ser causado por um maior número de ligações de hidrogênio entre porções hidrofílicas do hidrogel como interações GelMA-DMAEMA e DMAEMA-DMAEMA (WANG et al., 2008), diminuindo a quantidade de ligações de hidrogênio com as moléculas de água pode reduzir o tamanho dos cristais de gelo formados durante a liofilização.

Na Tabela 2, observa-se uma diminuição do grau de intumescimento em todas as formulações com DMAEMA, isto pode ser atribuído a uma maior densidade de reticulação. Em relação à responsividade à temperatura, considerando que a solubilidade do PDMAEMA diminui conforme o aumento da temperatura - e o ponto crítico está em torno de 40°C - acima desta temperatura, as interações entre a cadeia hidrofóbica do polímero se tornam superiores às interações entre o polímero e a água, fazendo com que a estrutura passe da forma helicoidal para globular, diminuindo a capacidade de intumescimento dos hidrogéis (JAIN et al., 2015). Nota-se o SD é maior, em todas as formulações com DMAEMA, quanto menor é o pH do meio. Isto pode ser atribuído à responsividade do DMAEMA, que possui pKa entre 7 e 7,8 e, em pH inferiores a esta faixa, apresenta os grupos amino terciários protonados que promovem a expansão de sua estrutura por repulsão eletrostática, aumento o grau de intumescimento dos hidrogéis (SHI et al., 2021).

CONCLUSÕES:

Diante dos resultados obtidos, conclui-se, de acordo com os testes de ¹H-RMN e FT-IR, que a metacilação da gelatina ocorreu com grau de substituição próximo a 100%. A GelMA foi efetiva como matéria-prima para a obtenção de hidrogéis de ambos os polímeros trabalhados, formando hidrogel em 20 e 30 minutos sob exposição de luz UV. As micrografias dos hidrogéis de poli(METAC) indicaram a formação de um filme superficial que reduziu sua porosidade, assim como sua capacidade de intumescimento. Por outro lado, os hidrogéis de PDMAEMA exibiram comportamento responsivo mesmo a baixas concentrações do monômero, e sua estrutura se manteve porosa mesmo a grandes concentrações de DMAEMA, o que possibilitaria uma boa performance em liberação de fármacos. Estudos futuros podem explorar a viabilidade destes hidrogéis para aplicações biomédicas, assim como a viabilidade de impressão 3D.

AGRADECIMENTOS:

Agradecemos ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) pelo financiamento do projeto.

BIBLIOGRAFIA

- BLAŽIĆ, R.; MARUŠIĆ, K.; VIDOVIĆ, E. Swelling and Viscoelastic Properties Cellulose-Based Hydrogels Prepared by Free Radical Polymerization of Dimethylaminoethyl Methacrylate in Cellulose Solution. **Gels**, v. 9, n. 2, 1 fev. 2023.
- CATOIRA, M. C. et al. Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 30, n. 10, p. 115, 10 out. 2019.
- JAIN, K. et al. Tunable LCST behavior of poly(N-isopropylacrylamide/ionic liquid) copolymers. **Polymer Chemistry**, v. 6, n. 38, p. 6819–6825, 14 out. 2015.
- MITURA, S.; SIONKOWSKA, A.; JAISWAL, A. Biopolymers for hydrogels in cosmetics: review. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 31, n. 6, p. 50, 25 jun. 2020.
- RAMESH, S.; RAMALINGAM, M. Aqueous-mediated synthesis and characterization of gelatin methacryloyl for biomedical applications. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 12, n. 5, p. 6269–6279, 15 out. 2022.
- SHI, K. et al. Preparation of polyvinyl alcohol formaldehyde-g-poly(2 (dimethylamino)ethyl methacrylate) macroporous hydrogels and their dual thermo/pH responsive behavior and antibacterial performance. **Reactive and Functional Polymers**, v. 164, p. 104916, 1 jul. 2021.
- SHIGA, T. et al. Evaluation of the Bactericidal and Fungicidal Activities of Poly([2 (methacryloyloxy)ethyl]trimethyl Ammonium Chloride)(Poly (METAC))-Based Materials. **Polymers**, v. 10, n. 9, p. 947, 26 ago. 2018.
- WANG, B. et al. Synthesis and properties of pH and temperature sensitive P(NIPAAm-co-DMAEMA) hydrogels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 64, n. 1, p. 34–41, 15 jun. 2008.
- YÜCE-ERARSLAN, E. et al. Eggshell integrated GelMA/CSMA/HyMA hybrid hydrogels for cell therapy/tissue engineering. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 140, n. 34, 10 set. 2023.
- ZHU, M. et al. Gelatin methacryloyl and its hydrogels with an exceptional degree of controllability and batch-to-batch consistency. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.