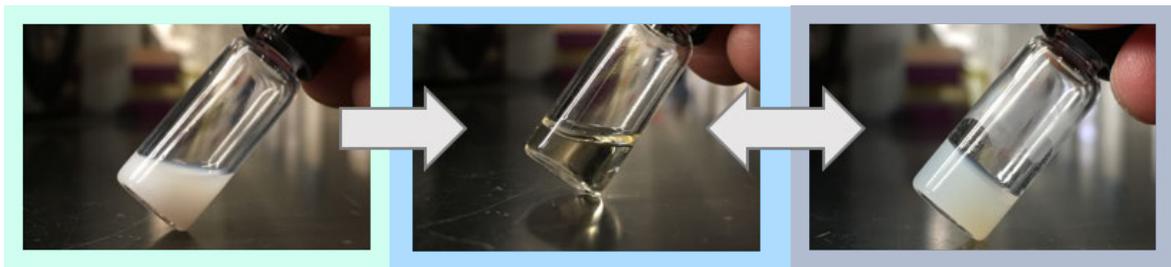


PHYSIKALISCHE HYDROGELE AUF POLYURETHAN-BASIS



Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium" (Dr. rer. nat.)

eingereicht
an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von Dipl.-Chem. Mai-Thi Leiendecker, geb. Nguyen-Kim
geb. 07.08.1987 in Heppenheim

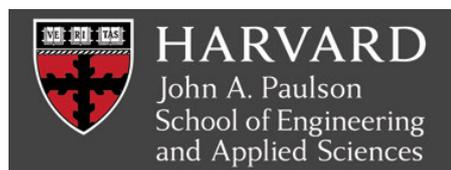
betreut durch Prof. Dr. Alexander Böker

Potsdam, den 27.02.2017

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-103917
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-103917>

Für meine Eltern, die ihr Leben liebevoll und unermüdlich ihren Kindern gewidmet haben, um mir all dies zu ermöglichen.

Diese Dissertationsarbeit wurde am DWI – Leibniz-Institut für Interaktive Materialien (RWTH Aachen University), an der John A. Paulson School of Engineering and Applied Sciences (Harvard University) und am Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung IAP (Universität Potsdam) unter der durchgehenden Betreuung von Prof. Dr. Alexander Böker und einer einjährigen Co-Betreuung von Prof. Dr. David Mooney durchgeführt. Diese Arbeit wurde von der Studienstiftung des deutschen Volkes gefördert.



DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank geht an erster Stelle an Prof. Dr. Alexander Böker und seine hervorragende Betreuung während der letzten vier Jahre. Als ein ausgesprochen kompetenter, unterstützender und positiver Doktorvater war seine fachliche und menschliche Betreuung die wichtigste Stütze für meine Doktorarbeit. Ich kann mir keinen anderen Doktorvater vorstellen, bei dem ich mehr gelernt oder mich besser entwickelt hätte – vielen Dank!

Einen ebenso herzlichen Dank möchte ich an Prof. Dr. David Mooney und seine Arbeitsgruppe in Harvard aussprechen, die mich für ein Jahr als Gastforscher empfangen haben. Es war unglaublich spannend aus einer andere Perspektive Einblicke in den biologischen Kontext meiner Forschung zu gewinnen. Nicht zuletzt werde ich die positive Atmosphäre der Mooney Gruppe und unsere gemeinsamen Unternehmungen in guter Erinnerung behalten.

An die ganze Böker-Gruppe, das „B-Team“, geht ein großes Dankeschön für die gute Zeit, die Hilfsbereitschaft und die Freundlichkeit; insbesondere an Christine, die beste Freundin und Kollegin gleichzeitig war. Vor allem möchte ich aber Christopher Licht, Jannik Borghs und Jan Wallenborn herausstellen, die ich als Studenten betreuen durfte. Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit ist in enger Zusammenarbeit mit euch und in langen Abenden im Labor entstanden. Danke für das gemeinsame Knobeln, für euren Input, euren Fleiß, eure guten Einfälle und vor allem für die gute Zeit, die wir im Labor hatten.

Beim gesamten „Großraumlabor B.2.51“ des DWI bedanke ich mich außerdem für all die fachlichen Diskussionen, technischen Hilfen und die gute Stimmung im Labor. Vielen

Dank an dieser Stelle an alle Mitglieder der Walther-, Wessling-, und Kühne-Gruppe, mit denen ich mich jederzeit austauschen konnte.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes bin ich sehr dankbar für die finanzielle Unterstützung meiner Promotion und meines Auslandsaufenthaltes, sowie für das fantastische Netzwerk und die vielen interessanten Veranstaltungen, über die ich meinen Horizont erweitern konnte.

Last but not least danke ich von ganzem Herzen meiner wunderbaren Familie und meiner großen Liebe Matthias, die mich während dieser Promotion – wie auch in jedem anderen Lebensabschnitt und -bereich – uneingeschränkt unterstützt und aufgebaut haben. Vor allem meinen Eltern, die so viel geopfert haben, um mir dies alles zu ermöglichen – con thuong Mama & Papa nhieu lam!

INHALTSVERZEICHNIS

I ÜBERSICHT	1
II EINLEITUNG	3
II.1 HYDROGELE IN BIOMEDIZINISCHEN ANWENDUNGEN	3
II.1.1 PHYSIKALISCHE HYDROGELE	7
II.2 MIKROGELE	13
II.2.1 MIKROGELE AN GRENZFLÄCHEN	13
II.3 POLYURETHANCHEMIE: EINLEITUNG	17
II.3.1 POLYURETHAN-BASIERTE HYDROGELE	20
III ERGEBNISSE & DISKUSSION	23
III.1 ALLGEMEINES KONZEPT	25
III.1.1 POLYMERDESIGN	25
III.1.2 GELIERUNGSMECHANISMUS	26
III.1.3 ZUSAMMENFASSUNG	31
III.2 SYNTHESE & CHARAKTERISIERUNG DER POLYURETHANE	33
III.2.1 ÜBERSICHT	33
III.2.2 ALLGEMEINE SYNTHESEROUTE	35
III.2.3 AUSWAHL DER MONOMERE	36
III.2.4 ENTSCHÜTZUNG DER CELLOBIOSE-EINHEIT	40
III.2.5 AUSWAHL DES KATALYSATORS	42
III.2.6 SYNTHESE & CHARAKTERISIERUNG VON PU_1 , PU_COOH-14 UND PU_DEG	47
III.2.7 SYNTHESE & CHARAKTERISIERUNG VON PU_SS	50
III.2.8 SYNTHESE & CHARAKTERISIERUNG VON PU_KAT	53
III.2.9 ZUSAMMENFASSUNG	56
III.3 BULK-HYDROGELE: HERSTELLUNG & CHARAKTERISIERUNG	57
III.3.1 SAURE HYDROGELE	60
III.3.2 PH-NEUTRALE HYDROGELE	67
III.3.3 ZUSAMMENFASSUNG	75

III.4 MIKROGELE: HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG	77
III.4.1 MIKROGELE VIA GLAS-DEVICES	79
III.4.2 MIKROGELE VIA PDMS-DEVICES	82
III.4.3 ZUSAMMENFASSUNG	85
IV ZUSAMMENFASSUNG & AUSBLICK	87
V EXPERIMENTALTEIL	89
V.1 SYNTHESE VON D(+)-CELLOBIOSE-HEXAACETAT (CELL-6OAc)	89
V.2 POLYURETHANSYNTHESE	90
V.3 HERSTELLUNG DER HYDROGELE	94
V.4 HERSTELLUNG VON MIKROGELEN	95
V.5 ANALYTISCHE METHODEN	99
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	101
ABBILDUNGEN & TABELLEN	103
REFERENZEN	109

I ÜBERSICHT

Der Kern dieser Dissertation besteht aus dem Design und der Herstellung einer neuen Klasse wasserlöslicher Polyurethane, welche sich über einen neuartigen Gelierungsmechanismus zu physikalischen Hydrogelen vernetzen lassen. In Wasser bilden die anionischen Polyurethane Nano-Aggregate, welche durch negative Ladungsabstoßung in Lösung gehalten werden. Ladungsabschirmung führt zu einer schnellen physikalischen Gelierung, welche durch Zugabe verschiedener Salze oder durch Senken des pH-Wertes induziert werden kann. Auf diese Weise erhält man entweder pH-neutrale oder saure (pH 4 - 5,5) Hydrogele, deren mechanische Eigenschaften durch eine Reihe von Parametern eingestellt werden können.

Konventionelle Hydrogele auf Polyurethan-Basis werden über reaktive und toxische isocyanat-terminierte Präpolymere hergestellt. Diese werden in Wasser über die Bildung von Harnstoffbindungen zu chemischen Hydrogelen vernetzt, was für einige biomedizinische Anwendungen problematisch ist. Der in dieser Arbeit vorgestellte physikalische Gelierungsmechanismus hingegen wäre für *in situ* Anwendungen in sensitiven biologischen Umgebungen geeignet. Darüber hinaus weisen die hier vorgestellten physikalischen Hydrogele eine äußerst schnelle Stress-Relaxation auf, welche im Kontext von *Tissue Engineering* und Mechanotransduktion gezielt eingesetzt werden könnte.

II EINLEITUNG

II.1 HYDROGELE IN BIOMEDIZINISCHEN ANWENDUNGEN

Von Kontaktlinsen und Kosmetikartikeln über Wundauflagen bis hin zu komplexen Materialien für *Drug Delivery* oder *Tissue Engineering* – Hydrogele finden wegen ihres hohen Wassergehalts und ihrer speziellen mechanischen Eigenschaften in unserem Alltag eine breite Anwendung.¹⁻⁶ Hydrogele sind **schwammartige Materialien** und können mit ihrer **Netzwerk-Struktur** das Tausendfache ihres Trockengewichts an Wasser absorbieren.¹ Die meisten Hydrogele basieren auf wasserlöslichen Polymeren, die durch leichte Vernetzung zu einer porösen, makromolekularen Struktur ihre schwammartigen Eigenschaften erhalten.² Hydrogele können aber auch aus aggregierten Partikeln oder kleinen Molekülen bestehen, die sich zu einer Netzwerkstruktur anordnen.⁷⁻⁹

Die Netzwerkstruktur und der hohe Wassergehalt bieten interessante Voraussetzungen für biomedizinische Anwendungen. **In den Poren der Hydrogele können beispielsweise Wirkstoffe eingeschlossen werden, die anschließend kontrolliert an die Umgebung wieder abgegeben werden können.**¹⁰⁻¹³ Dies kann durch langsame Diffusion aus den Poren geschehen, um ein schlagartiges Freisetzen zu vermeiden^{13,14}, oder gezielt durch externe Trigger wie Temperatur, pH oder Bestrahlung.¹⁵⁻¹⁸

Responsives Verhalten, d.h. die Reaktion auf externe Trigger, tritt bei Gelen durch die vernetzte Struktur besonders zum Vorschein, da Reaktionen auf Umgebungsänderungen oder andere Trigger durch das Gelnetzwerk hindurch geleitet und verstärkt werden.^{19,20} Hydrogele, die auf responsiven Polymeren basieren, können verschiedene Volumen- und Strukturveränderungen durchlaufen, meist reversibel einstellbar. Temperatursensitive Hydrogele können auf Temperaturänderungen durch Phasenübergänge reagieren, ionische Hydrogele können in Abhängigkeit von pH und Ionenstärke reversible Änderungen in Volumen und Porengröße durchlaufen.²¹⁻²³ Hydrogele sind somit Materialien, in welche man über die chemische Struktur der Polymere verschiedene responsive Eigenschaften integrieren kann, was vor allem bei einer Anwendung als Sensoren²⁴⁻²⁶ oder für gezielte Wirkstoffverabreichung^{1,5} zum Einsatz kommt.

In anderen Fällen ist ein gezielter Abbau der Hydrogele erwünscht. Der Einsatz von spaltbaren Vernetzern, wie beispielsweise hydrolisierbaren Esterbindungen, führt zu Hydrogelen, welche durch externe Trigger wie etwa eine pH-Veränderung desintegrieren, d.h. sich auflösen können, um beispielsweise Wirkstoffe gezielt freizusetzen.^{10,27-29}

Je nach Art der Vernetzung sind Hydrogele elastische oder viskoelastische Materialien, was im medizinischen Bereich besonders interessant ist. **Durch gezieltes Design können die mechanischen Eigenschaften biologischen Gewebes nachgeahmt werden, sodass Hydrogele unter anderem als Grundlage für die Herstellung künstlichen Gewebes eingesetzt werden.**^{30,31} Beispielsweise können Stammzellen aus Patienten gewonnen werden, welche *ex vivo* auf einer Hydrogel-Matrix kultiviert werden und anschließend wieder in den Patienten transplantiert werden können (siehe **Abbildung 1**).³²

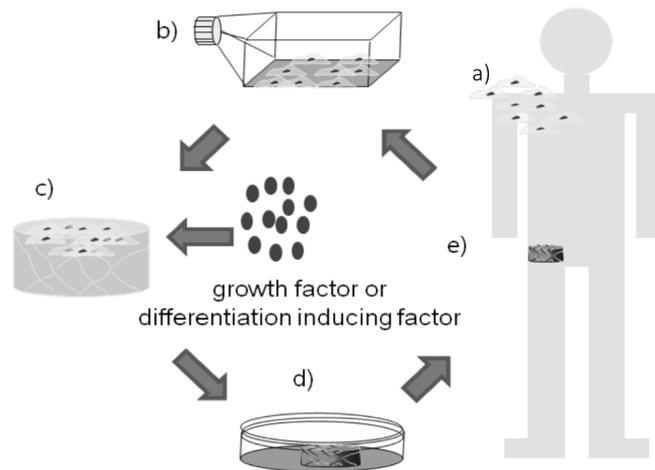


Abbildung 1.³² Prinzip des Tissue Engineering in der Stammzellentherapie. Gewebe wird vom Patienten entnommen (a), um Zellen zu gewinnen, welche zunächst *in vitro* kultiviert werden (b), bevor sie auf einem dreidimensionalen Template, wie etwa einem Hydrogel weiter gezüchtet werden (c) (d), sodass das künstliche Gewebe letztendlich wieder in den Patienten transplantiert werden kann (e).

Man unterscheidet zwischen **chemischen Hydrogelen**, welche über kovalente Bindungen vernetzt sind, und **physikalischen Hydrogelen**, deren Netzwerkstruktur durch physikalische Assoziationen wie beispielsweise ionische Wechselwirkungen^{33,34}, Wasserstoffbrückenbindungen³⁵⁻³⁷ oder makromolekulares *Self-Assembly*³⁸⁻⁴⁰ entsteht. Die meisten Hydrogele, welche uns im alltäglichen Gebrauch begegnen, sind chemische Hydrogele, meist auf Basis synthetischer Vinyl-, Acrylat- oder Acrylamid-Polymere, welche durch bifunktionale Linker vernetzt werden.² PolyHEMA (Polyhydroxyethylmethacrylat) oder PMMA (Polymethylmethacrylat) wurden als Basismaterialien für weiche Kontaktlinsen bekannt;³ sogenannte Superabsorber auf Polyacrylsäure-Basis werden in Hygieneartikeln und Babywindeln eingesetzt, wo sie ein großes Volumen an Flüssigkeit absorbieren.⁴¹

Im biomedizinischen Anwendungsbereich ist eine etwas komplexere Funktionalität und Responsivität der Hydrogele gefragt. Hydrogele auf Basis von Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAM) gehören zu den am besten studierten chemischen Hydrogelen. PNIPAM ist ein wasserlösliches, temperatur-responsives Polymer mit einer unteren kritischen Lösungstemperatur (Lower Critical Solution Temperatur, LCST) von

32°C.^{42,43} Während das Polymer bei Raumtemperatur wasserlöslich ist, kollabieren beim Erreichen der LCST die Wasserstoffbrücken-bindungen zwischen den Amidgruppen und den Wassermolekülen, sodass das Polymer ausfällt. Über leichte Vernetzung von PNIPAM durch den Einsatz von Bisacrylamiden wie beispielsweise N,N'-Methylenbisacrylamid entstehen PNIPAM-Hydrogele, welche bei Raumtemperatur gequollen vorliegen, sich jedoch oberhalb der LCST zusammenziehen und kollabieren (siehe **Abbildung 2**). Dieses Verhalten ist reversibel, sodass PNIPAM Hydrogele als stimuli-responsive Materialien in Drug Delivery, als Biosensoren oder als künstliche Aktuatoren eingesetzt werden.⁴⁴⁻⁵⁰

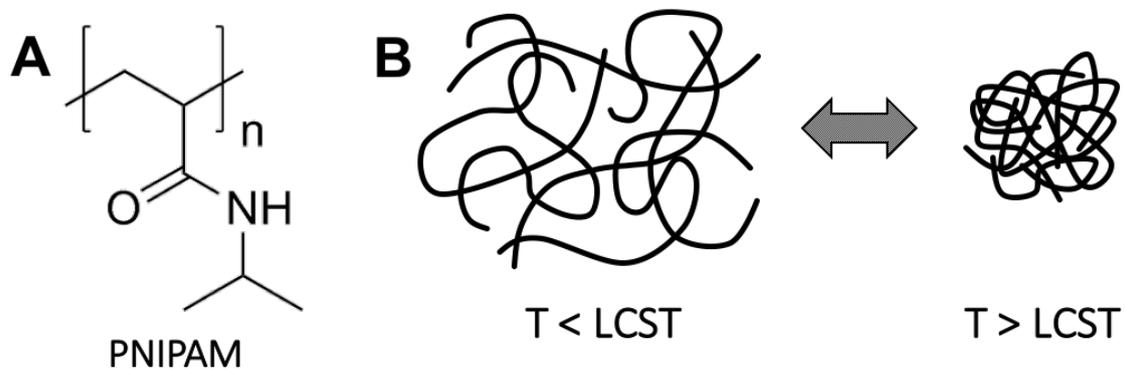


Abbildung 2. (A) Chemische Struktur von Poly(N-isopropylacrylamid) (PNIPAM). (B) Reversible Phasenübergänge durch Einstellung der Temperatur: Unterhalb der LCST liegt PNIPAM löslich bzw. gequollen vor, oberhalb der LCST liegt es unlöslich bzw. kollabiert vor.

Im Bereich des *Tissue Engineering* gewannen Hydrogele auf Basis natürlich vorkommender Polymere an Bedeutung. Zu den am häufigsten eingesetzten Materialien gehören in diesem Zusammenhang **Alginat-Hydrogele**.^{30,31,51,52} Alginsäure (bzw. seine Alginatsalze) ist ein natürlich vorkommendes Polysaccharid, das aus Algen gewonnen wird. Neben dem Einsatz in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie spielen Alginatgele eine wichtige Rolle als Basis für Zellkultivierung und künstliche Gewebe.^{30,31,51} Alginat können durch divalente Ionen wie z.B. Calcium-Ionen zu physikalischen Hydrogelen vernetzt werden.⁵¹ Um robustere Hydrogele mit stabileren mechanischen Eigenschaften zu erhalten, werden auch chemische Alginatgele

verwendet, welche durch bifunktionale Linker wie Polyethylenglykoldiamin kovalent vernetzt werden.⁵³⁻⁵⁵

Da eine kovalente Vernetzung zu stabileren Materialeigenschaften führt, dominieren chemische Hydrogele derzeit das Feld. Allerdings zeigt vor allem das Beispiel Alginat, dass physikalische Gele spezifische Vorteile haben, die gerade im Bereich des *Tissue Engineering* und der regenerativen Medizin besonders wertvoll sind. Deswegen werden Alginatgele am häufigsten ionisch vernetzt als physikalische Hydrogele angewendet.⁵³⁻⁵⁵ Über die Vorteile und spezifischen Eigenschaften physikalischer Hydrogele gibt der folgende Abschnitt einen Überblick.

II.1.1 PHYSIKALISCHE HYDROGELE

Physikalische Hydrogele werden in einigen biomedizinischen Anwendungen chemischen Hydrogelen vorgezogen, da ihre Vernetzung nicht auf chemischen – und damit in der Regel toxischen – Reaktionen basiert. Gerade für Anwendungen, wie die *in situ* Verkapselung von Zellen oder im Bereich der regenerativen Medizin als injizierbare Hydrogele, die erst im Körper gelieren, sind chemische Gele sehr beschränkt einsetzbar.⁵⁶ Der **milde Gelierungsmechanismus physikalischer Hydrogele** macht sie zu attraktiven Materialien für ***in situ* Anwendungen in sensibler biologischer Umgebung**.⁵⁷⁻⁶⁰

Zu den am häufigsten eingesetzten physikalischen Hydrogelen gehören die oben genannten **Alginatgele**.^{53,54} Alginsäure ist ein natürlich vorkommendes Polysaccharid, das blockweise aus α -L-Guluronsäure und β -D-Mannuronsäure besteht (siehe **Abbildung 3** oben). Physikalische Vernetzung wird durch Hinzugabe divalenter Ionen wie z.B. Ca^{2+} Ionen erreicht, welche durch die Guluronatblöcke nach dem sogenannten „eggbox“ Modell (Eierkarton-Modell) komplexiert werden (siehe **Abbildung 3** unten).⁶¹

In der Regel werden Alginategele durch einfaches Mischen von wässriger AlginateLösung mit einer CaCl_2 -Lösung hergestellt. Zum Beispiel können durch das Hinzutropfen von AlginateLösung in ein CaCl_2 -Bad Alginate-Kügelchen hergestellt werden.^{62,63} Für die Herstellung von Gelfilmen oder größeren Geometrien bedient man sich oft schlechter löslicher Salze wie Calciumsulfat oder Calciumcarbonat. CaSO_4 oder CaCO_3 verlangsamen durch ihre schlechtere Wasserlöslichkeit die Gelierung, sodass diese besser kontrollierbar wird.^{64,65} CaCO_3 wird oft in Kombination mit Glucono- δ -lacton (GDL) verwendet, welches in wässriger Lösung unter langsamer Freigabe von H^+ -Ionen hydrolysiert und den pH-Wert der Lösung graduell senkt. So wird das bei tiefem pH lösliche CaCO_3 langsam in lösliche Ca^{2+} Ionen überführt, was eine homogenen Alginate-Gelbildung ermöglicht.⁶⁵

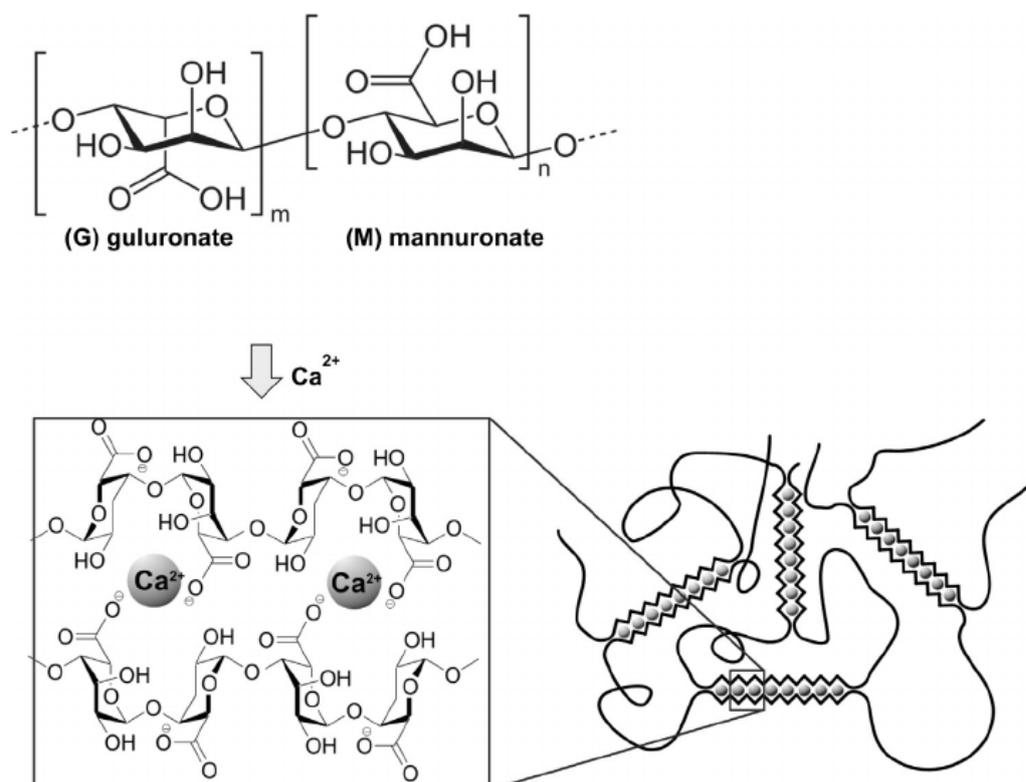


Abbildung 3.⁶¹ Alginsäure besteht aus Guluronat-Blöcken (G) und Mannuronat-Blöcken (M) (oben). Die G-Blöcke können Calcium-Ionen nach dem sogenannten Eggbox-Modell komplexieren, sodass durch die Vernetzung ein Hydrogel entsteht (unten).

Physikalische Hydrogele als Substrate für Zellkultivierung

Der biomedizinische Anwendungsbereich von Alginat-Hydrogelen ist groß, beispielsweise können organische Wirkstoffe oder Proteine in die Poren eingeschlossen und anschließend kontrolliert freigesetzt werden.^{66,67} Doch vor allem als 2- oder 3-dimensionale Template für Zellkultur eignen sich Alginatgele, da sie in ihren strukturellen und mechanischen Eigenschaften exzellente biologische Modelle darstellen.^{30,31} Oben wurde erwähnt, dass die mechanischen Eigenschaften von Hydrogelen so eingestellt werden können, dass sie natürlichem biologischen Gewebe ähneln. Hydrogele werden oft als **synthetische extrazelluläre Matrix** eingesetzt; interessant ist hierbei, dass die natürliche extrazelluläre Matrix von Zellen nicht rein elastisch, sondern – wie physikalische Hydrogele – **viskoelastisch** ist.^{31,68,69} Neben biologischen Faktoren, welche Zellwachstum und -entwicklung steuern, nehmen auch die mechanischen Eigenschaften der Zellumgebung einen deutlichen Einfluss darauf; dieses Phänomen nennt man **Mechanotransduktion**.^{31,70-72} So wachsen und entwickeln sich Zellen beispielsweise auf einem harten Substrat anders als auf einem weichen.⁷⁰⁻⁷² Bei der Arbeit mit Stammzellen wird auch die Differenzierung durch die Härte des Substrats beeinflusst; eine gesteuerte Differenzierung zu Knochenzellen etwa wird durch harte Substrate unterstützt.⁷²

Im direkten Vergleich zwischen chemisch und physikalisch vernetzten Alginatgelen, stellten sich die **physikalischen Hydrogele als besonders interessant in Hinblick auf Mechanotransduktion** heraus. Vergleicht man ein chemisch vernetztes, elastisches Alginatgel mit einem physikalisch vernetzten, viskoelastischen Alginatgel derselben Härte (d.h. desselben E-Moduls), so verhalten sich Zellen in Bezug auf Wachstum und Entwicklung im letzteren Fall als ob sie sich auf einem deutlich härteren Substrat befinden würden.^{73,74} Nähere Untersuchungen ergaben, dass die Eigenschaft der **Stress-Relaxation**, welche viskoelastischen Materialien besitzen, ein **signifikanter Faktor in der Mechanotransduktion** ist.^{73,74}

Stress-Relaxation ist somit eine Eigenschaft, deren Auswirkung auf Zellkultivierung erst kürzlich deutlich wurde, und die gezielt eingesetzt werden könnte, um Zellwachstum und -entwicklung zu steuern. Zusammen mit dem Vorteil, dass physikalische Hydrogele besser für *in situ* Anwendungen in sensibler biologischer Umgebung geeignet sind, stellen physikalische Hydrogele eine wirkungsvolle Alternative zu chemischen Hydrogelen dar, welche derzeit das Feld noch dominieren.

Alginatgele sind die am häufigsten eingesetzten physikalischen Hydrogele, insbesondere im Bereich *Tissue Engineering*. Als natürlich vorkommendes Polymer, das aus Algen gewonnen wird, ist Alginsäure ein attraktives Material für medizinische Anwendungen, dessen Biokompatibilität gut untersucht ist. Allerdings ist die **Heterogenität von Materialbeschaffenheit und -eigenschaften** bei natürlich gewonnenen Polymeren immer ein Nachteil. Die genaue chemische Zusammensetzung der Alginat, d.h. Anteil und Verteilung der Guluronat- bzw. Mannuronat-Blöcke sowie das Molekulargewicht kann hier nicht exakt eingestellt werden wie etwa bei synthetischen Polymeren. Außerdem können bei Alginaten **toxische Verunreinigungen** auftauchen, wie Schwermetalle oder Endotoxine.^{75,76} Auch die **chemische Modifizierung** ist bei natürlich gewonnenen Polymeren oft beschränkt, insbesondere bei Polysacchariden aufgrund ihrer hohen Hydrophilie, welche sie oft unlöslich in einer Vielzahl organischer Lösungsmittel für eine modifizierende Synthese macht.^{77,78} Damit ist man in der Möglichkeit strukturelle Variationen zu schaffen und gegebenenfalls Struktur-Wirkungsbeziehungen auszunutzen, auf die natürlich vorkommenden Zusammensetzungen beschränkt.

Kontext

In dieser Arbeit wird eine neue Klasse synthetischer Polymere vorgestellt, die sich physikalisch zu Hydrogelen vernetzen lassen und deren chemische Struktur einfach und breit variiert werden kann. Darüber hinaus weisen sie eine besonders schnelle Stress-Relaxation auf, was vor allem im Kontext von *Tissue Engineering* und Mechanotransduktion gezielt eingesetzt werden könnte.

II.2 MIKROGELE

Neben Bulk-Gelen sind sogenannte **Mikrogele** besonders spannende Systeme, da sie **polymere Materialeigenschaften mit kolloidalen Eigenschaften kombinieren**.⁷⁹⁻⁸² Je nach Größe werden Mikrogele manchmal auch als Nanogele eingestuft.^{83,84} Wie Bulk-Gele definieren sie sich durch ihre vernetzte Struktur, weisen zudem eine definierte Größe und Geometrie bei gleichzeitig unscharfer, weicher Oberfläche auf. Im Vergleich zu Bulk-Gelen kommen **Stimuli-Responsivitäten** aufgrund der erhöhten Oberfläche deutlicher zum Tragen. Oben wurde beschrieben, wie die vernetzte Struktur zur Responsivität beiträgt; kollabiert etwa ein Teil des Netzwerks, ist das im restlichen Netzwerk „zu spüren“.^{5,16} Übertragen wir dies nun auf kleine definierte Geometrien wie Mikrogele, dann kommen z.B. getriggerte Volumenänderungen durch die erhöhte Oberfläche besonders zum Tragen. Ionische oder pH-responsive Mikrogele können so deutlich größere Volumenänderungen unterlaufen als entsprechende Bulk-Gele.⁸⁵⁻⁸⁸

II.2.1 MIKROGELE AN GRENZFLÄCHEN

Dass sich Mikrogele als weiche Materialien anders verhalten als harte Partikel, wird auf interessante Weise deutlich, wenn man ihr **Verhalten an Grenzflächen** beobachtet. Wie harte Partikel sind sie **grenzflächenaktiv**, d.h. ordnen sich bevorzugt an Grenzflächen an, allerdings verformen sie sich dabei deutlich und bilden einen Film (siehe **Abbildung 4**⁸⁹).

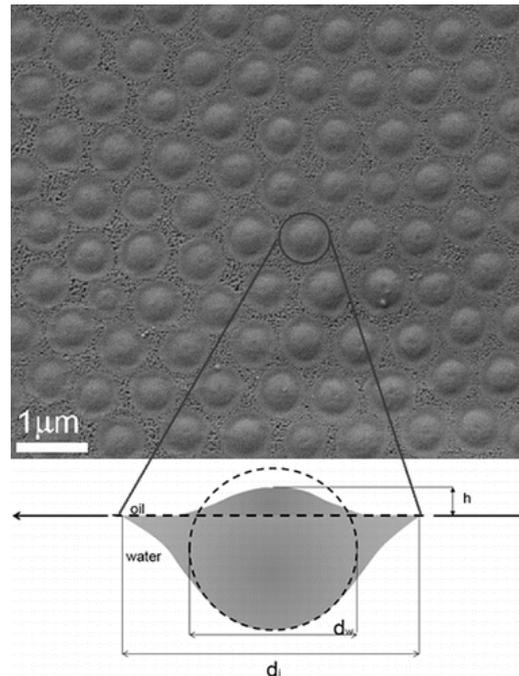


Abbildung 4.⁸⁹ Mikrogele verformen sich an Grenzflächen und bilden einen Film, wobei die sphärische Geometrie weiterhin deutlich sichtbar bleibt.

Eine gängige Methode Grenzflächenverhalten von Partikeln zu untersuchen ist die Herstellung von Langmuir-Blodgett-Filmen, wo Partikel an einer Grenzfläche zusammengeschoben werden und der dabei entstehende Druck aufgenommen wird. Bei der Untersuchung pH-responsiver, ionischer Mikrogele stellte man fest, dass sich Mikrogele in ihrem geladenen Zustand im Langmuir-Trog leichter zusammenschieben lassen als in ihrem ungeladenen Zustand (siehe **Abbildung 5**).⁹⁰ Die Coulomb-Abstoßung überwiegt hier somit nicht, womit sich Mikrogele gegenteilig zu geladenen harten Partikeln verhalten, welche sich stark abstoßen. Im Gegenteil, im geladenen Zustand scheint der höhere Quellgrad und die größere Porengröße dazu zu führen, dass sich die Mikrogele leichter komprimieren lassen.

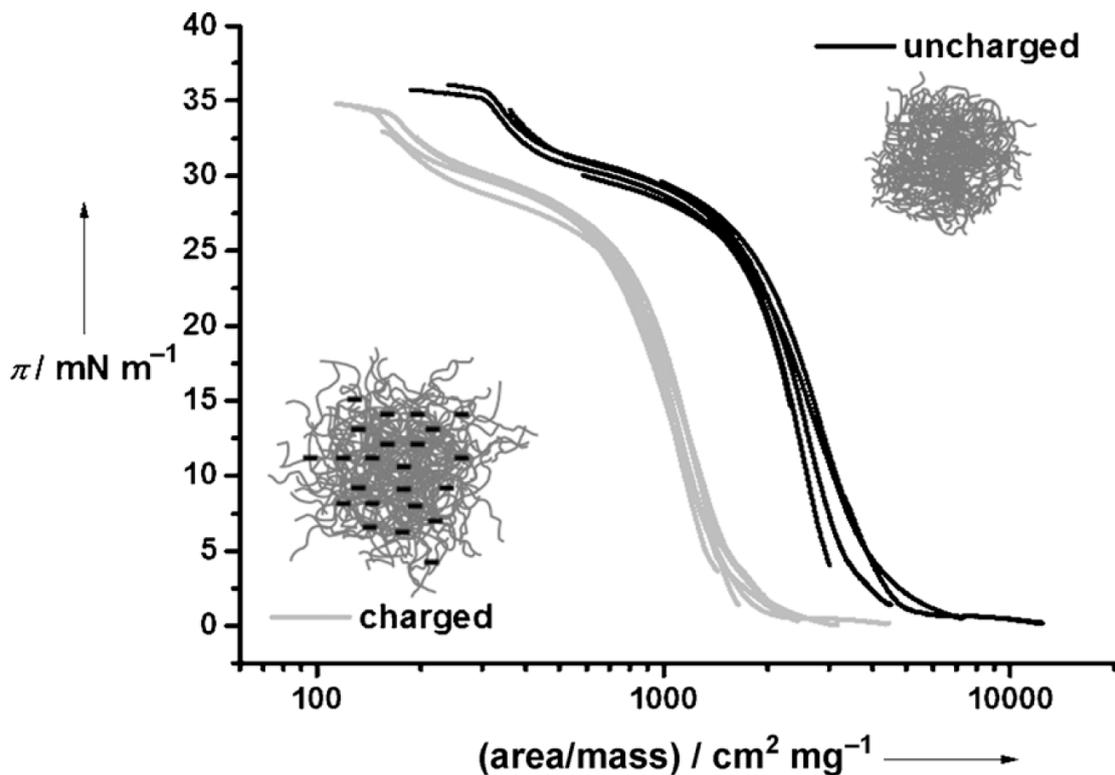


Abbildung 5.⁹⁰ Kompressions-Isotherme als Funktion des Drucks in Abhängigkeit der Mikrogel-Dichte für P(NIPAM-co-MMA) Mikrogele im geladenen (grau) und ungeladenen Zustand (schwarz). Im Gegensatz zu harten Partikeln lassen sich geladene Mikrogele leichter im Langmuir-Trog zusammenschieben als ungeladene.

Stimuli-responsive Pickering-Emulsionen mit Mikrogelen

Da Mikrogele grenzflächenaktiv sind, können sie genutzt werden, um **Pickering-Emulsionen** herzustellen, d.h. Emulsionen, welche nicht durch Tenside, sondern durch kolloidale Partikel stabilisiert werden. Die Responsivität der Mikrogele kann in diesem Zusammenhang intelligent eingesetzt werden, etwa um **Emulsionen gezielt zu brechen**, beispielsweise durch Änderung der Temperatur oder des pH-Wertes (siehe **Abbildung 6**).⁹¹

Mit stimuli-responsiven Mikrogelen kann man somit responsive Emulsionen herstellen, die durch äußere Trigger gezielt gebrochen oder geformt werden können.

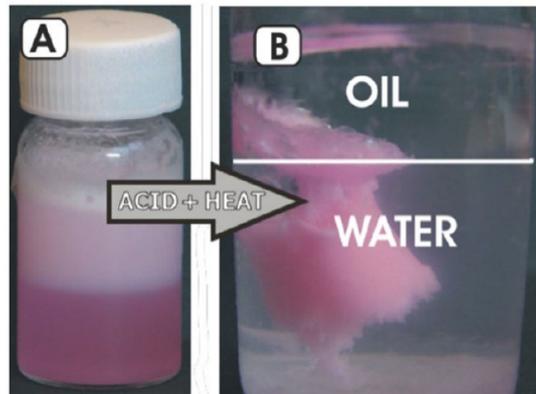


Abbildung 6.⁹¹ Pickering-Emulsion, die mit pH- und temperatur-sensitiven Mikrogelen hergestellt wurde. Eine Heptan-in-Wasser-Emulsion kann durch Senken des pH-Wertes und anschließender Erhitzung vollständig gebrochen werden.

Kontext

In dieser Arbeit werden neben Bulk-Gelen Mikrogele hergestellt, indem die Wassertröpfchen einer inversen Emulsion (Wasser-in-Öl-Emulsion) als Template für die Hydrogel-Partikel genutzt wurden. Diese Mikrogele könnten als weiche Bauteile oder als Stabilisatoren für intelligente Pickering-Emulsionen genutzt werden.

II.3 POLYURETHANCHEMIE: EINLEITUNG

Polyurethane stellen eine breite Polymerklasse dar und zeichnen sich durch exzellente mechanische Eigenschaften aus, welche sich durch Polymerzusammensetzung und Kettenlänge vielfältig variieren lassen.⁹²⁻⁹⁴ Dem Laien sind Polyurethane in der Regel als Basismaterialien für Schäume oder Schaumstoffe bekannt, die vor allem in der Bau-, Automobil- oder Verpackungsindustrie eingesetzt werden; doch die Anwendung von Polyurethanen ist deutlich vielfältiger. Vor allem die **Herstellung im industriellen Maßstab** ist bei Polyurethanen deutlich einfacher umsetzbar als z.B. bei radikalischen Polymerisationstechniken.⁹⁵ Im Vergleich zu anderen Polymerisationsverfahren ist eine **vollständige Eliminierung von toxischem Rest-Monomer** bei der Herstellung von Polyurethanen gut realisierbar, sodass **Polyurethane als biokompatible Materialien** in verschiedenen biomedizinischen Kontexten Anwendung finden.⁹⁶⁻⁹⁹ Dank ihrer guten mechanischen Eigenschaften werden Polyurethane als kardiovaskuläre Materialien eingesetzt, wie z.B. für Herzklappenprothesen, Gefäßprothesen oder intraaortale Ballonpumpen.¹⁰⁰⁻¹⁰³ Auch in der rekonstruktiven Chirurgie werden Polyurethane als Wundauflagen oder als Kiefer-Gesichtsprothesen verwendet.¹⁰⁴

Die Synthese von Polyurethanen basiert auf zwei Monomerarten, Diisocyanaten und Diolen, welche durch Polyaddition und unter Bildung der Urethanbindungen polymerisiert werden (siehe **Abbildung 7**).⁹⁵ Häufig verwendete Diisocyanate sind Toluoldiisocyanat (TDI) oder Diphenylmethandiisocyanat als aromatische Diisocyanate, oder Hexamethylendiisocyanat oder Isophorondiisocyanat (IPDI) als aliphatische bzw. cyclische Diisocyanate.⁹⁵ Als Diole werden häufig hydroxy-terminierte Oligomere oder Polymere eingesetzt, oft Polyether oder Polyester, wodurch im Produkt **segmentierte Polymere** entstehen.⁹⁵

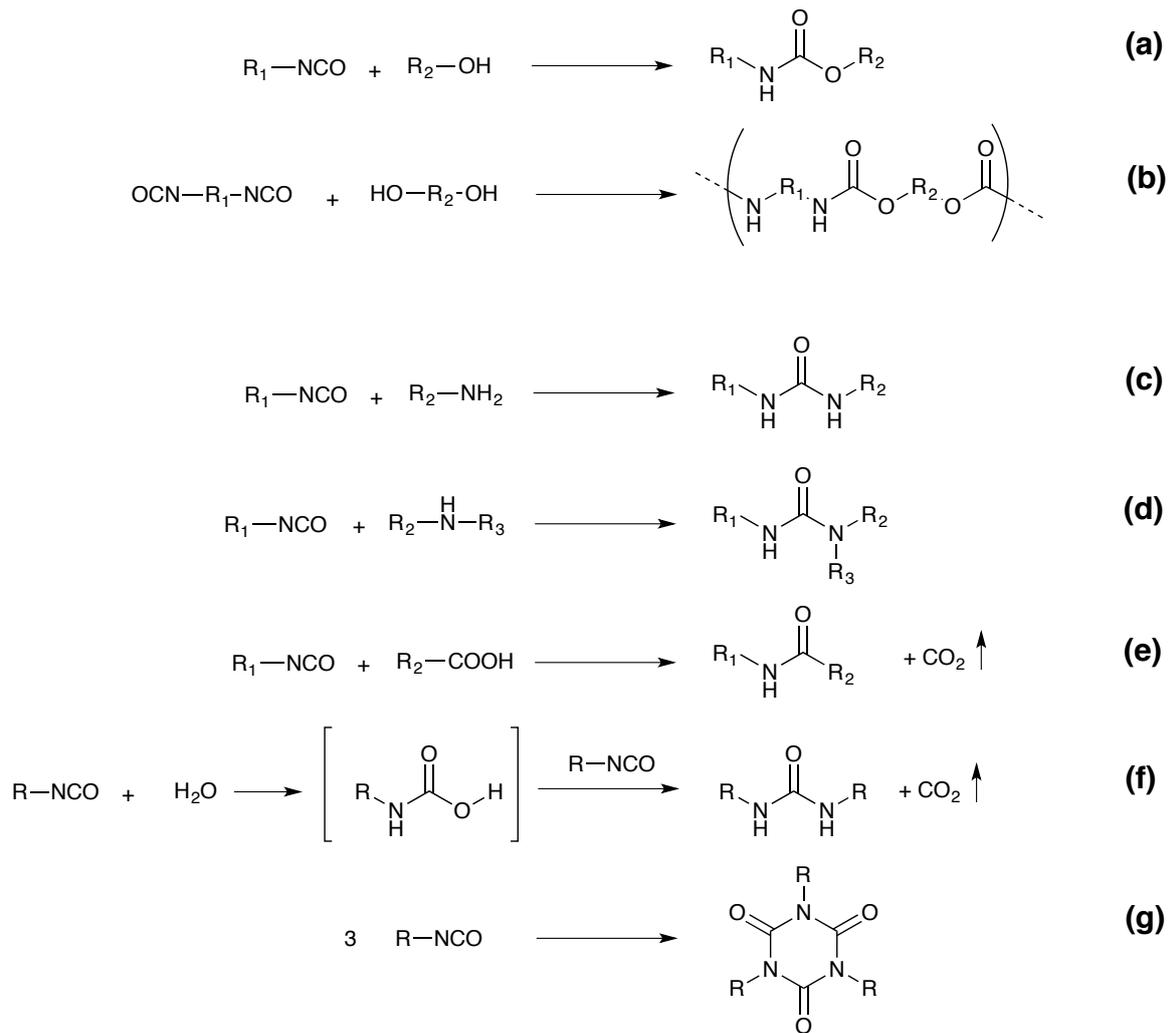


Abbildung 7. Grundreaktionen von Isocyanaten. (a) Urethanbildung mit Alkoholen, (b) Polyurethanbildung mit Diisocyanaten und Diolen, (c) (d) Harnstoff- und Ureabildung mit Aminen, (e) Amidbildung mit Carbonsäuren unter Abgabe von CO₂, (f) Reaktion mit Wasser zu Harnstoff unter Abgabe von CO₂, (g) Trimerisierung von Isocyanaten.

In der Polyurethansynthese können problemlos mehrere verschiedene Diole als Monomere eingesetzt werden; Oligomere oder Polymere können einfach eingebaut oder miteinander durch Urethanbindungen verknüpft werden. So kann eine große strukturelle Vielfalt geschaffen und verschiedene mechanische Eigenschaften kombiniert werden. Segmentierte Polymere, z.B. Polyurethane, die flexible und hydrophile Segmente wie etwa Polyethylenglykol beinhalten, kombinieren mechanische Eigenschaften von Hart- und Weichsegmenten (siehe **Abbildung 8**).¹⁰⁵ Hartsegmente entstehen durch kristalline Bereiche und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen

Urethangruppen und schaffen ein hartes, belastbares Material, während gleichzeitig die Spröde durch Weichsegmente gesenkt wird, welche gute Flexibilität und Elastizität gewähren.

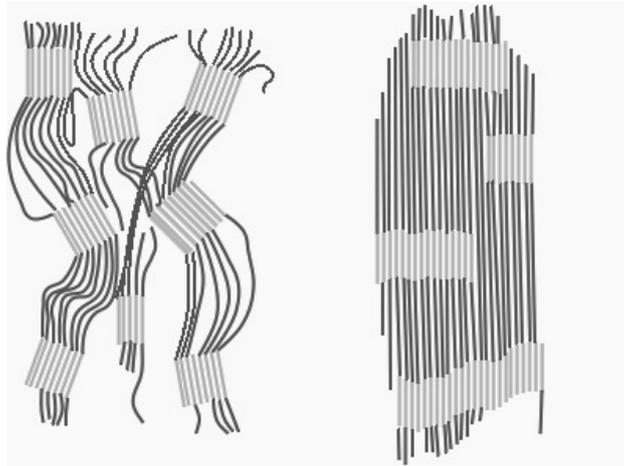


Abbildung 8.¹⁰⁵ Schematische Darstellung von Hartsegmenten (hell) und Weichsegmenten (dunkel) im ungedehnten (links) und gedehnten (rechts) Zustand. Urethaneinheiten stellen die Hartsegmente dar, welche durch ihre kristallinen Eigenschaften eine Härte ins Material einbringen, während eine Brüchigkeit durch flexible Weichsegmente wie etwa Polyethylenoxid-Einheiten verhindert wird.

Polyurethanchemie kann man somit als einfachen und vielseitigen Baukasten betrachten, mit welchem sich eine **Bandbreite an strukturellen und mechanischen Eigenschaften** erzielen lässt. Auf der anderen Seite ist Polyurethanchemie als Polyadditionsverfahren nicht so exakt wie andere Polymerisationstechniken wie etwa kontrollierte radikalische Polymerisationsarten und weisen eine breite Molekulargewichtsverteilung mit einem PDI im Bereich von 2 auf.⁹⁵ Dies ist jedoch kein Problem im Kontext von Hydrogelen, wo Polymere ohnehin heterogen vernetzt werden. Für die Herstellung von Basismaterialien von Hydrogelen bietet Polyurethanchemie somit vielfältige Möglichkeiten. In dieser Arbeit profitieren wir insbesondere in Hinblick auf die physikalische Gelierung von der Polyurethanchemie. Oben wurde beschrieben, dass die Viskoelastizität und Stress-Relaxation physikalischer Hydrogele in biologischen Anwendungen besonders interessant ist. **Durch das Verhältnis von Diisocyanat zu Diol kann außerdem das Molekulargewicht der Polymere über einen breiten Bereich**

eingestellt werden.⁹⁵ Dadurch ist die **Herstellung kürzerer Polymere oder Oligomere** bei Polyurethanchemie deutlich besser umsetzbar als bei anderen Polymerisationsverfahren. Durch kürzere Kettenlängen kann so eine **schnellere Stress-Relaxation** im Hydrogel realisiert werden.¹⁰⁶

II.3.1 POLYURETHAN-BASIERTE HYDROGELE

Bei allen Vorteilen bergen bisher bekannte Polyurethan-Hydrogele einen entscheidenden Nachteil in Bezug auf biomedizinische Anwendungen. In der Regel sind Polyurethan-Hydrogele nämlich chemische Gele, die auf isocyanat-terminierten Präpolymeren basieren, welche sich in Wasser unter Bildung von Harnstoffbindungen zu Hydrogelen vernetzen.¹⁰⁷⁻¹¹⁰ Da Isocyanate sehr reaktiv sind und mit vielen Nukleophilen selbst bei Raumtemperatur reagieren, sind Isocyanate hoch toxisch. Zwar können restliche Isocyanate nach der Gelierung vollständig entfernt werden, um ein nicht-toxisches und biokompatibles Material zu erhalten (siehe oben), allerdings schließt dies jede *in situ* Anwendung des Hydrogels in sensibler biologischer Umgebung aus. Alternative isocyanat-freie Syntheserouten von Polyurethanen sind ein wachsendes Forschungsgebiet mit dem Ziel *in situ* Toxizität von Polyurethansynthesen zu reduzieren.¹¹¹⁻¹¹³ Allerdings stehen isocyanat-freie Methoden der konventionellen Polyurethanchemie in Vielseitigkeit und Reaktivität deutlich nach.

In dieser Arbeit stellen wir daher ein Polyurethan vor, das sich durch einen physikalischen Gelierungsmechanismus vernetzen lässt, und somit für biologische *in situ* Anwendungen geeignet ist.

Kontext

In dieser Arbeit werden die synthetischen Vorteile von Polyurethanchemie mit den anwendungsbezogenen Vorteilen von physikalischen Hydrogelen verbunden. Hierzu wird ein neues Polyurethan vorgestellt, welches sich physikalisch vernetzen lässt. Im folgenden Abschnitt wird das Konzept und Polymerdesign mit den verschiedenen Funktionalitäten vorgestellt.

III ERGEBNISSE & DISKUSSION

Anmerkung zur Strukturierung des Ergebnisteils: In dieser Dissertationsarbeit wird eine neue Klasse wasserlöslicher Polyurethane vorgestellt, die durch einen neuartigen Gelierungsmechanismus physikalische Hydrogele formen können. Die experimentelle Arbeit dieser Dissertationsforschung lässt sich in drei Hauptteile einteilen:

1. Synthese und Charakterisierung der Polyurethane
2. Herstellung und Charakterisierung von Bulk-Hydrogelen
3. Herstellung und Charakterisierung von Mikrogelen

Bevor die Auswertung der experimentellen Daten in dieser Reihenfolge ausführlich diskutiert wird, soll zunächst – zum besseren Verständnis der gesamten Diskussion – das allgemeine Konzept dieser Arbeit erklärt werden, welches jedem hier vorgestellten Experiment zu Grunde liegt, nämlich das allgemeine Polymerdesign und damit eng zusammenhängend der **Mechanismus der physikalischen Gelierung**. Es handelt sich hierbei um einen neuartigen Gelierungsmechanismus, der in dieser oder ähnlicher Form bei noch keinem synthetischen Polymer zuvor beobachtet wurde. Insbesondere im zweiten Hauptteil, bei der Herstellung und Charakterisierung der Bulk-Gele, wird dieser Gelierungsmechanismus immer wieder experimentell bestätigt. Das Prinzip dieses Mechanismus soll aber nun schon vorweggenommen werden, um ein besseres Verständnis des gesamten Ergebnis-Teils zu gewährleisten, da bereits Polymerdesign und Synthese auf diesen Gelierungsmechanismus abzielen.

III.1 ALLGEMEINES KONZEPT

III.1.1 POLYMERDESIGN

Die Vorteile physikalischer Hydrogele für biomedizinische Anwendungen wurden in der Einleitung ausgiebig diskutiert. Mit dem Ziel einen vielseitig einsetzbaren, physikalischen Gelierungsmechanismus zu schaffen und eine Multifunktionalität in der chemischen Struktur zu erreichen, dienten als Grundlage wasserlösliche, ionische Polyurethane.

Den Kern dieser Arbeit bildet das Polyurethan PU_1, dessen Struktur in **Abbildung 9** dargestellt ist. Es wurden außerdem weitere Polyurethane hergestellt, deren Eigenschaften später im Detail diskutiert werden. Das allgemeine Konzept basiert auf der Kombination zweier Schlüssel-Funktionalitäten, nämlich zum einen dem **ionischen Charakter** des Polymers und zum zweiten seiner Fähigkeit **Wasserstoffbrückenbindungen** auszubilden. Auf dem Gegenspiel dieser beiden Eigenschaften basiert auch der physikalische Gelierungsmechanismus, der in **Kapitel III.1.2** beschrieben wird.

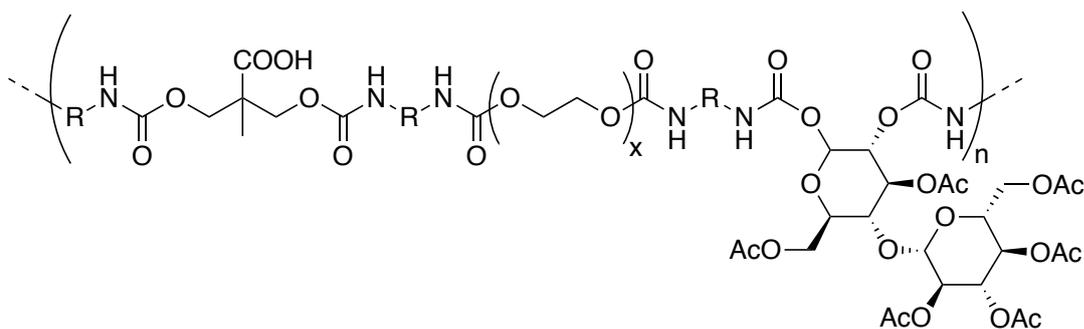


Abbildung 9. Chemische Struktur von Polyurethan PU_1.

Ionischer Charakter

Mit Ausnahme von PU_kat (siehe **Abbildung 12**) sind alle in dieser Arbeit vorgestellten Polyurethane anionische Polymere, die Carbonsäuregruppen tragen (vergleiche Struktur von PU_1, **Abbildung 9**). Neben der **Wasserlöslichkeit und pH-Responsivität**,

welche die ionischen Gruppen einbringen, verhindern sie durch **Ladungsabstoßung** eine spontane Vernetzung der Polyurethane. Durch Ladungsabschirmung, etwa durch Salze oder Änderung des pH-Wertes, wird die Gelierung induziert (siehe Details unter **Kapitel III.1.2**).

Wasserstoffbrückenbindungen

Urethangruppen sind gute Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren und bieten die Möglichkeit, starke bzw. kooperative Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen. Dadurch erhalten die Polyurethane eine **intrinsische Neigung, sich zu makromolekularen Strukturen zu organisieren**. Diese Assemblierung wird durch Ladungsabstoßung zwischen den ionischen Gruppen kontrolliert (siehe oben), sodass die Polyurethane in Lösung Nano-Aggregate bilden.

Weitere Struktur-Wirkungsbeziehungen werden in **Kapitel III.2.3** deutlich, wo auf die in dieser Arbeit verwendeten Monomere einzeln eingegangen wird. An dieser Stelle soll aber zunächst der neuartige Gelierungsmechanismus vorgestellt werden, der später mehrfach experimentell bestätigt wird. Wie oben erläutert, soll der Gelierungsmechanismus der detaillierten Diskussion der Experimentalarbeit vorangestellt werden, um ein umfassendes Verständnis zu gewährleisten, da bereits die Polymersynthese auf eben diesen Mechanismus abzielt.

III.1.2 GELIERUNGSMECHANISMUS

Physikalische Hydrogele sind interessante Materialien für biomedizinische Anwendungen, v.a. im Bereich der regenerativen Medizin oder des *Tissue Engineering*. Normalerweise sind Hydrogele auf Polyurethan-Basis jedoch chemische Gele, deren Herstellung toxische und reaktive Isocyanat-Gruppen beinhaltet (siehe **Kapitel II.3**). In dieser Arbeit wird ein physikalisches Hydrogel auf Polyurethan-Basis

vorgestellt, dessen neuartiger Gelierungsmechanismus unserem Wissen nach bisher bei noch keinem synthetischen Polymer in ähnlicher Form beobachtet wurde.

Er ähnelt mechanistisch der sogenannten kalten Gelierung von WPI (Whey Proteine Isolate; auf deutsch: Molkenprotein-Isolat) oder anderen Nahrungsmittelproteinen, welche durch Säuren oder Salze induziert wird.¹¹⁴⁻¹¹⁷

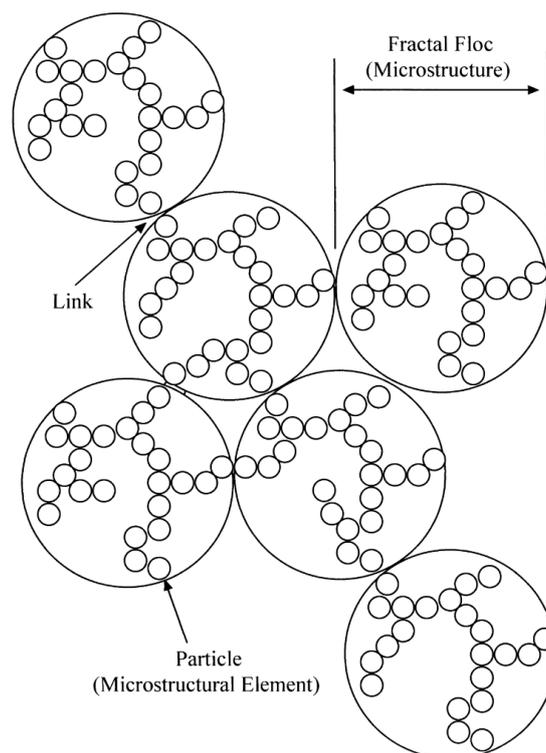


Abbildung 10.¹¹⁴ Mechanismus der Gelierung von WPI. Kolloidale Partikel bilden eine primäre Struktur, die sich durch weitere Aggregation der Partikel zu einem größeren Netzwerk aufbaut.

WPI-Gele sind Hydrogele, die im Lebens- und Nahrungsmittelbereich Anwendung finden. Durch Erhitzen wird WPI denaturiert, wodurch ein physikalisches Hydrogel entsteht. Als Alternative zur hitze-induzierten WPI-Gelierung wurde die Methode der sogenannten kalten WPI-Gelierung entwickelt, um Nahrungsmittel-Gele mit verbesserten Eigenschaften herzustellen.¹¹⁴ Hierbei wird zunächst eine entsalzte WPI-Lösung mit niedriger Ionenstärke hergestellt, welche anschließend zur Denaturierung erhitzt wird. Aufgrund der niedrigen Ionenstärke herrscht eine starke elektrostatische

Abstoßung zwischen den WPI-Molekülen, sodass eine Gelierung selbst im denaturierten Zustand verhindert wird. Nach Abkühlen der denaturierten WPI-Lösung wird die Gelierung durch langsame Zugabe von Salzen induziert, welche die Ladungen abschirmen, die elektrostatische Abstoßung aufheben und so eine Gelierung erlauben (siehe **Abbildung 10**).¹¹⁴

Der in dieser Arbeit vorgestellte Gelierungsmechanismus funktioniert nach einem verwandten Prinzip: **Die hier vorgestellten Polyurethane besitzen eine intrinsische Neigung, in wässriger Lösung über Wasserstoffbrückenbindungen Aggregate zu bilden** bzw. sich zu makromolekularen Strukturen zu assemblieren. Diese Neigung zur Aggregatbildung wird, ähnlich wie bei der kalten Gelierung von WPI, **durch Ladungsabstoßung und Ladungsabschirmung reguliert**. Im folgenden Abschnitt wird der Gelierungsmechanismus der Polyurethane im Detail erklärt.

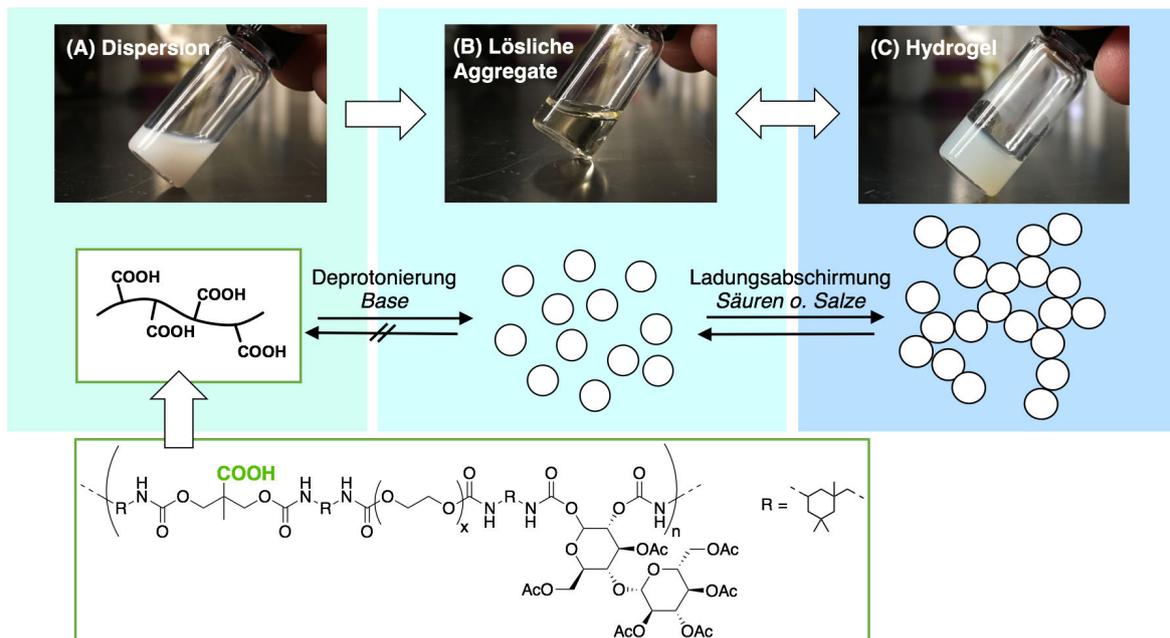


Abbildung 11. Allgemeines Prinzip des Gelierungsmechanismus am Beispiel von PU₁. Nach der Synthese in organischen Lösungsmitteln ist PU₁ zunächst nicht in Wasser löslich, sondern bildet stabile Dispersionen (A). Unter Hinzugabe von Base und Deprotonieren der COOH-Gruppen bildet sich eine klare Lösung (B). Durch Hinzugabe von Säure oder von Salzen bildet sich ein Bulk-Gel (C).

In **Abbildung 11** ist der hier vorliegende Gelierungsmechanismus schematisch dargestellt. Es handelt sich um eine neuartige physikalische Gelierung, die nun schrittweise diskutiert werden soll.

Zustand A (Dispersion). Das anionische Polyurethan weist eine **unkonventionelle pH-Responsivität** auf, welche ausschlaggebend für den Gelierungsmechanismus ist: Nach Synthese des Polyurethans im organischen Lösungsmittel (siehe **Kapitel III.2.2**) wird das Polymer in seiner protonierten (nicht-ionischen) Form erhalten. In diesem Zustand ist es unlöslich in Wasser, und bildet stattdessen stabile Dispersionen.

Übergang Zustand A – Zustand B (Dispersion – Lösung). Konventionelle pH-sensitive Moleküle oder Polymere, welche etwa Carbonsäuregruppen enthalten, können pH-abhängig und reversibel zwischen einem unlöslichen und einem löslichen Zustand hin- und herwechseln; im Falle von carbonsäurehaltigen Molekülen sind sie bei hohem pH deprotoniert und löslich, bei tiefem pH protoniert und unlöslich in Wasser.

Hier liegt allerdings ein anderer Fall vor, der unserem Wissen nach bisher noch nicht beobachtet wurde: Durch Zugabe von Base wie z.B. NaOH gehen die dispergierten Polyurethane augenscheinlich in Lösung. Senkt man anschließend den pH wieder, etwa durch Zugabe von HCl, so fällt das Polymer nicht wieder aus, sondern bildet ein Hydrogel (**Abbildung 11 C**). Der Übergang von der wässrigen Dispersion (Zustand A) zur Lösung (Zustand B) ist somit **ein Schlüsselschritt in diesem Gelierungsmechanismus, da er irreversibel ist.**

Zustand B (Lösung). Die augenscheinlich klare Polyurethan-Lösung besteht aus löslichen Aggregaten im Nanometerbereich. Das Polyurethan besitzt nämlich eine intrinsische Neigung, in wässriger Lösung vernetzte Strukturen zu bilden; die treibende Hauptkraft führen wir auf kooperative Wasserstoffbrückenbindungen zurück. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse der Hydrogel-Charakterisierung unterstützt (siehe **Kapitel III.3**).

Da das Polyurethan nach der Synthese zunächst wasserunlöslich ist (Zustand A), kann die Aggregatbildung erst mit dem Lösen in Wasser beginnen. Die **Deprotonierung der Carbonsäuregruppen** durch Hinzugabe von NaOH **initiiert somit die Aggregatbildung**, da erst durch das Lösen die freie Beweglichkeit der Polymerketten und ein Assemblieren zu größeren Strukturen ermöglicht wird.

Gleichzeitig entstehen durch die Deprotonierung negative Ladungen, welche sich abstoßen. Durch diese **Ladungsabstoßung** ist die Assemblierung der Polymerketten **auf die Bildung von Nano-Aggregaten beschränkt**. Die Bildung größerer Strukturen ist in diesem Zustand durch elektrostatische Abstoßung inhibiert. Es herrscht ein Gleichgewicht zwischen anziehenden Kräften, v.a. Wasserstoffbrückenbindung, und abstoßenden, elektrostatischen Kräften.

Übergang Zustand B – Zustand C (Lösung – Hydrogel). Durch Aufheben der Ladungsabstoßung, also durch **Ladungsabschirmung**, wird den Polymerketten erlaubt, **die Assemblierung zu größeren Netzwerkstrukturen fortzuführen, wodurch das Hydrogel entsteht** (Abbildung 11 C). Dies kann entweder durch Zugabe von Salzen, mono- wie divalent, oder durch Senken des pH-Wertes geschehen. Dieser Übergang ist reversibel.

III.1.3 ZUSAMMENFASSUNG

- Der physikalische Gelierungsmechanismus basiert auf dem Gegenspiel zweier Hauptkräfte: Wasserstoffbrückenbindungen als anziehende Kraft und Ladungsabstoßung als abstoßende Kraft.
- Das Polyurethan besitzt die intrinsische Neigung sich zu einem makromolekularen Gelnetzwerk zu assemblieren. In Wasser bildet das Polyurethan lösliche Nano-Aggregate; die Bildung eines Hydrogelnetzwerks wird durch Ladungsabstoßung der ionischen Polyurethane inhibiert. Durch Zugabe von Salzen oder Säure wird die Ladung abgeschirmt und die Gelierung induziert.
- Der Gelierungsmechanismus wird durch DLS-Messungen sowie durch im nächsten Kapitel folgende Ergebnisse aus der Hydrogelcharakterisierung unterstützt.

III.2 SYNTHESE & CHARAKTERISIERUNG DER POLYURETHANE

In dieser Arbeit werden neuartige, multifunktionelle Polyurethane vorgestellt, welche physikalisch – durch Zugabe von Salzen oder durch Regulierung des pH-Wertes – zu Hydrogelen vernetzt werden können. Der zu Grunde liegende Gelierungsmechanismus, auf welchen die Synthese abzielt, wurde in **Kapitel III.1.2** vorgestellt. Die Synthese wird in diesem Kapitel ausführlich vorgestellt und diskutiert; experimentelle Details sind in **Kapitel V.2** nachzulesen.

III.2.1 ÜBERSICHT

Im Rahmen dieser Dissertation wurden 5 verschiedene Polyurethane synthetisiert (PU_1, PU_COOH-14, PU_DEG, PU_SS und PU_kat), welche in **Abbildung 12** dargestellt sind.

Im Fokus dieser Arbeit liegt PU_1, welches als Grundlage für den Hauptteil dieser Arbeit dient. PU_COOH-14 und PU_DEG wurden im Laufe der Charakterisierung als Kontrollpolymere zu PU_1 synthetisiert, um den Einfluss verschiedener Funktionalitäten auf den Gelierungsmechanismus zu untersuchen (**Kapitel III.2.6**). Mit PU_SS wurde eine Redox-Reponsivität eingeführt (**Kapitel III.2.7**), mit PU_kat ein kationisches Analog zu PU_1 hergestellt (**Kapitel III.2.8**).

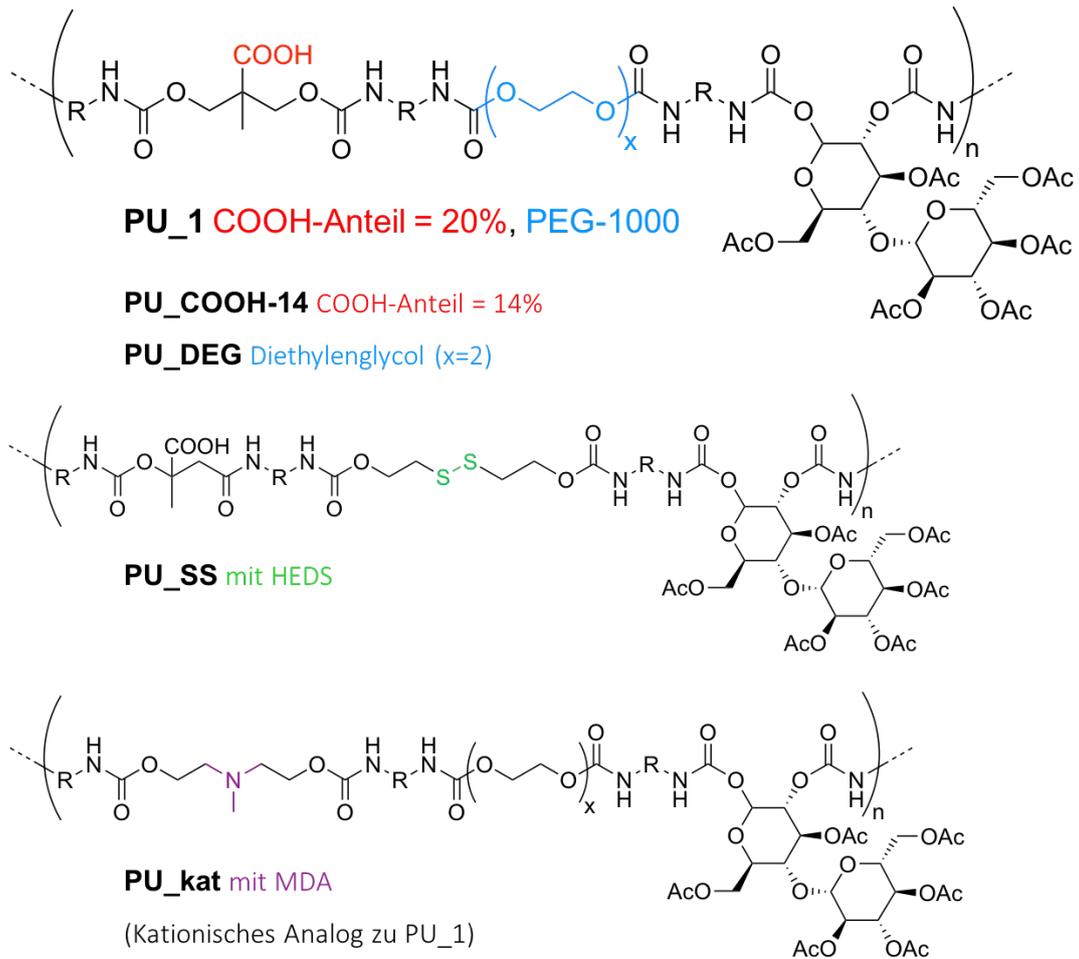


Abbildung 12. Übersicht der in dieser Dissertation hergestellten Polyurethane. PU_1 liegt im Fokus dieser Arbeit und stellt den Hauptteil der experimentellen Untersuchungen. PU_COOH-14 und PU_DEG wurden als Kontrollpolymere synthetisiert, um den Einfluss von COOH-Gehalt sowie Ethylenoxid-Kettenlänge zu untersuchen. PU_SS ist ein redox-aktives Polyurethan mit einem reaktiv spaltbaren Disulfid-Linker. PU_kat ist das kationische Analog zu PU_1, wo das Monomer DMPA durch MDA ersetzt wurde.

III.2.2 ALLGEMEINE SYNTHESEROUTE

Die allgemeine Syntheseroute, die allen hier vorgestellten Polyurethanen zugrunde liegt, ist in **Abbildung 13** dargestellt; die eingesetzten Monomerverhältnisse sind im **Experimentaltteil, Kapitel III.2.2**, beschrieben.

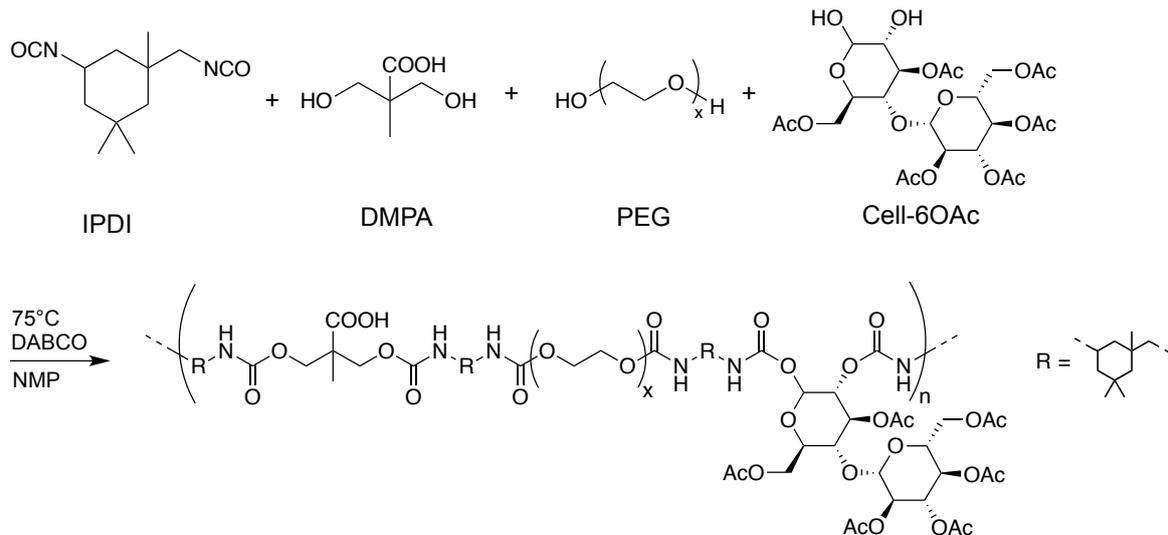


Abbildung 13. Allgemeines Syntheseschema am Beispiel von PU_1.

Dabei sollte erwähnt werden, dass die Anteilverhältnisse der Monomere während der Synthese einfach variiert werden können, sodass man eine beliebig breite Bibliothek an Polyurethanen nach diesem Konzept herstellen könnte. Da es sich hierbei aber um ein neuartiges Polyurethan mit einem neuartigen physikalischen Gelierungsmechanismus handelt, konzentrierten wir uns auf die gründliche Untersuchung einer gezielten Monomerzusammensetzung, in unserem Fall der von PU_1, um Eigenschaften und Mechanismus im Detail zu verstehen.

III.2.3 AUSWAHL DER MONOMERE

In diesem Kapitel sollen die Struktur-Wirkungsbeziehungen in Hinblick auf die in dieser Arbeit eingesetzten Monomere beleuchtet werden.

Isophorondiisocyanat (IPDI)

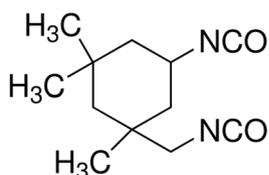


Abbildung 14. Struktur von IPDI.

Bei der Synthese von Polyurethanen gehören Toluoldiisocyanat und Diphenylmethandiisocyanat zu den am häufigsten verwendeten Diisocyanaten, da sie als aromatische Diisocyanate zu hervorragenden mechanischen Eigenschaften führen.¹¹⁸ Wegen des biomedizinischen Kontextes dieser Dissertationsarbeit wurde allerdings auf die Verwendung aromatischer Diisocyanate verzichtet, da Abbauprodukte, die durch Hydrolyse der Urethangruppen entstehen könnten, in biologischen Umgebungen toxisch sein können.¹¹⁹ Die am häufigsten verwendeten aliphatischen Diisocyanate sind Hexamethylendiisocyanat und **Isophorondiisocyanat (IPDI)**. Gegenüber Hexamethylendiisocyanat hat IPDI den Vorteil, dass es ein nicht-symmetrisches Molekül ist. Diisocyanate neigen zu Di- und Trimerisierungen (siehe **Abbildung 7**), was zu ungewünschten Nebenreaktionen und Verzweigungen führen kann.¹²⁰ IPDI hat aufgrund seiner Asymmetrie eine geringe Neigung zu diesen Nebenreaktionen.¹²⁰

Im Polyurethan ist die wichtigste Funktion der Urethangruppen die Ausbildung von **Wasserstoffbrückenbindungen**, welche die treibende Kraft bei der physikalischen Gelierung sind (siehe **Kapitel III.1.2**).

Dimethylpropionsäure (DMPA)

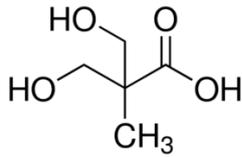


Abbildung 15. Struktur von DMPA

Der ionische Charakter der Polymere ist eine Schlüsseleigenschaft für den physikalischen Gelierungsmechanismus (siehe **Kapitel III.1.2**). Der Einbau funktionaler Gruppen in Polyurethane ist erschwert, da während der Synthese die reaktiven Isocyanate selbst mit schwachen Nukleophilen reagieren können. Die Carbonsäuregruppe bei Dimethylpropionsäure (DMPA) ist allerdings sterisch gehindert (siehe **Abbildung 15**), was DMPA zu einem beliebten Monomer für anionische und wasserlösliche Polyurethane macht. Neben der **Wasserlöslichkeit** wird eine **pH-Responsivität** eingeführt, die eine wesentliche Rolle beim Gelierungsmechanismus spielt (siehe **Kapitel III.1.2**).

Methyldiethynolamin (MDA) ist ein tertiäres Amin, welches als **kationisches Analog** zu DMPA getestet wurde. Die pH-Responsivität des kationischen Polyurethans ist hier umgekehrt; im Sauren liegt das Polymer in seiner kationischen, wasserlöslichen Form vor, im Basischen als nicht-ionisches Polymer.

Ethylenoxide: PEG, DEG, HEDS

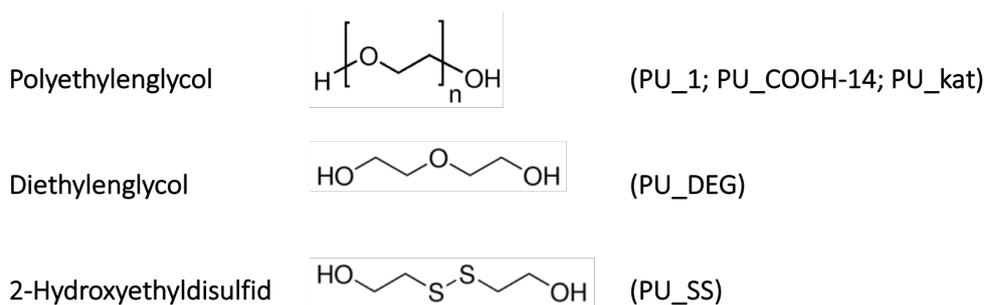


Abbildung 16. Chemische Strukturen von PEG, DEG und HEDS.

Als **Kettenverlängerer** wurden **verschiedene Ethylenoxid-Segmente** eingesetzt, PEG 1000 (PU_1, PU_COOH-14 und PU_kat), Diethylenglykol (DEG) (PU_DEG) sowie der Disulfid-Linker 2-Hydroxyethyl-disulfid (HEDS) (PU_SS) (siehe **Abbildung 16**). Durch Ethylenoxid-Einheiten wird die **Hydrophilie und Wasserlöslichkeit** der Polyurethane erhöht.

Zum einen bringen diese verschiedenen Kettenverlängerer verschiedene Funktionalitäten in das Polymer ein, zum anderen wechselwirken sie in verschiedener Weise durch **Wasserstoffbrückenbindungen** mit den Urethangruppen, welches die Eigenschaften der resultierenden Hydrogele beeinflusst (siehe Kapitel **III.2.6**). Die längeren PEG 1000-Segmente können zum Beispiel kooperative Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, was zu einer stärkeren Wechselwirkung führt.

HEDS bringt eine neue Funktion der Redoxaktivität ein. Die Disulfidbrücken können durch Reduktion gespalten werden. Auf diese Weise könnte, abhängig vom Anteil der Disulfid-Linker, eine redoxinduzierte Auflösung der Hydrogels oder eine Schaltung der Porengröße realisiert werden.

Cellobiose-Hexaacetat

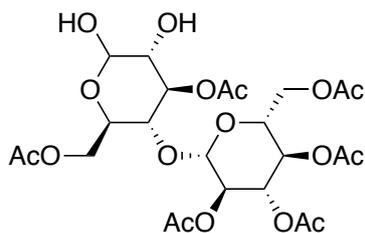


Abbildung 17. Struktur von Cellobiose-Hexaacetat.

Cellobiose ist ein Disaccharid bestehend aus zwei Glucose-Einheiten, die β -1,4-glykosidisch verknüpft sind. Cellobiose-Hexaacetat (Cell-6OAc) ist ein ungewöhnliches und spannendes Monomer, dessen Herstellung im **Experimententeil, Kapitel V.1**, beschrieben ist. Ausgehend von vollständig acetylierter Cellobiose wurde hierzu eine partielle Deacetylierung durchgeführt, woraus Cell-6OAc isoliert werden konnte – ein **Diol**. Die Monomersynthese orientiert sich an einer Vorschrift von Kahn et al.¹²¹, die wir an verschiedenen Stellen modifizierten, um die Ausbeute von Cell-6OAc zu maximieren. Nach unserem Wissen wurde Cellobiose bisher noch nie als Diol für eine Polyaddition eingesetzt.

Die Cellobiose-Einheit spielt keine tragende Rolle bei der Gelierung; zur Kontrolle wurden Polyurethane ohne Cellobiose-Monomer hergestellt, welche ebenfalls physikalisch vernetzt werden konnten. Allerdings erhielt man ohne Cellobiose-Monomer recht brüchige, instabile Materialien, die man z.B. nur schlecht mit einem Spatel transferieren konnte. **Die Anwesenheit der Cellobiose-Einheit verbessert die mechanischen Eigenschaften des resultierenden Hydrogels durch eine erhöhte Elastizität und Flexibilität.** Hydrogele, welche Cellobiose-Einheiten besaßen, konnten zu Hydrogelscheiben ausgestanzt und mit einem Spatel transferiert werden. Möglicherweise unterbricht die Cellobiose-Einheit die Kristallinität, welche durch die Urethangruppen geschaffen wird und ermöglicht dadurch ein elastischeres Hydrogel.

III.2.4 ENTSCHÜTZUNG DER CELLOBIOSE-EINHEIT

Die acetyl-geschützte Cellobiose-Einheit kann nachträglich **vollständig entschützt werden, sodass eine freie Glucosegruppe entsteht**. Diese könnte in biologisch besonders interessant sein, da Glucose mit der Glycocalyx einer Zelle wechselwirken und dadurch auch **Zelladhäsion** unterstützen könnte.¹²² Darüber hinaus könnte die Glucosegruppe als **Ankerpunkt für weitere glykosidische Modifizierung** dienen, um spezifische Interaktionen mit Peptiden oder Proteinen einzugehen.¹²³

Bei der basischen Entschützung muss mit besonderer Vorsicht vorgegangen werden. Urethangruppen sind gegen Hydrolyse zwar stabiler als Estergruppen, trotz allem ist es eine Herausforderung die richtigen Bedingungen zu finden, welche die Estergruppen spalten, ohne die Urethanbindungen zu beschädigen. Daher wurden verschiedene Methoden zur basischen Deacetylierung getestet, die in **Tabelle 1** zusammengefasst sind.

Unter den meisten basischen Bedingungen, die getestet wurden, wurde eine Zersetzung des Polyurethans beobachtet, allerdings stellte sich **eine Entschützung mit Guanidiniumnitrat und Natriummethoxid in Methanol** als geeignet für eine milde und selektive Entschützung heraus. Das ¹H-NMR-Spektrum des Polyurethans nach der Entschützung zeigt die erfolgreiche Entfernung der Acetylgruppen, wie aus den fehlenden Methylsignalen im Bereich 2,2 – 1,9 ppm abzuleiten ist (**Abbildung 18**). Darüber hinaus zeigt das ¹H-NMR-Spektrum keine Zeichen von Zersetzung des Polymers. Allerdings ist eine teilweise Zersetzung aufgrund der Gesamtausbeute von 60% nicht auszuschließen.

Tabelle 1. Übersicht der angewendeten Entschützungsverfahren und deren Reaktionsbedingungen.

	Base	Reaktionszeit [h]	Temperatur [°C]	Grad der Entschützung
1	Borax-Puffer pH 9,4	1	60	40%
2	0,1M NaOH	4	60	50%
3	NaHCO ₃ -Puffer pH 10,0	0,5	90	50%
4	NaOMe 10mol%	2	0	60%
5	Guanidiniumnitrat NaOMe	4	23	100%

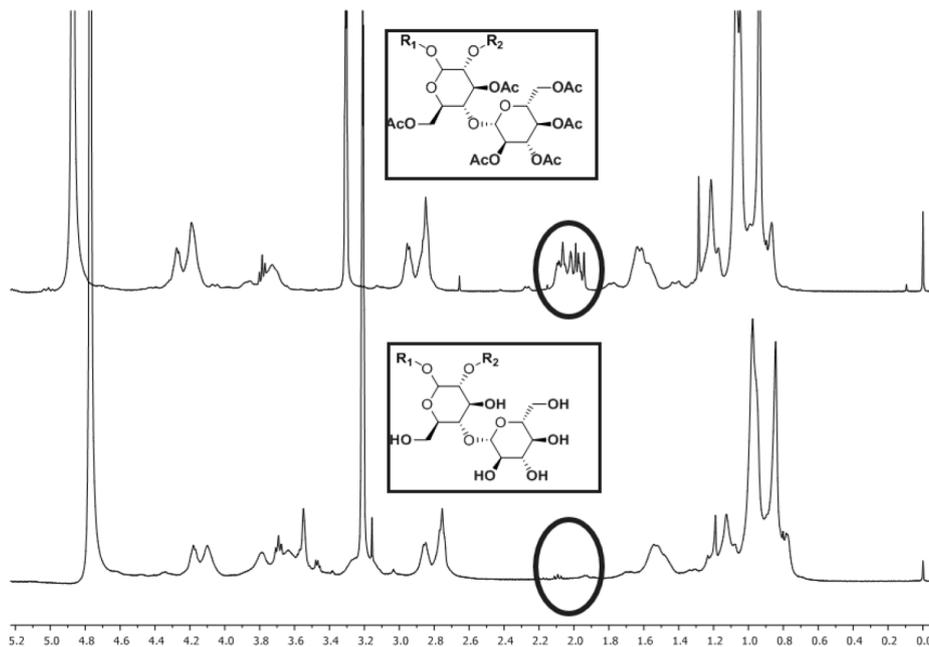


Abbildung 18. ¹H-NMR-Spektren von PU_1 vor (oben) und nach (unten) der Entschützung mit Guanidiniumnitrat und Natriummethanolat. Die Methylgruppen der Acetylschutzgruppen erscheinen bei einer chemischen Verschiebung von 2,1 – 1,9 ppm (eingekreist). Nach der Entschützung sind diese Peaks verschwunden, während der Rest des Polymers intakt bleibt.

III.2.5 AUSWAHL DES KATALYSATORS

Polyurethansynthesen werden oft durch cyclische Amine wie **DABCO** (1,4-Diazacyclo[2.2.2]octan), **DBN** (1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-en) oder **DBU** (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en) katalysiert.¹²⁰ Metallorganische Katalysatoren, z.B. zinnorganische Verbindungen, wie sie in der Polyurethan-Schaumherstellung verwendet werden, schlossen wir aufgrund ihrer Toxizität im Hinblick auf potentielle biomedizinische *in situ* Anwendungen der Polyurethane aus.

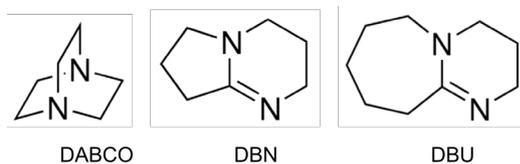


Abbildung 19. Chemische Strukturen von DABCO, DBN und DBU.

Der Mechanismus der Katalyse ist in **Abbildung 20** dargestellt. Nach Aktivierung des Alkohols durch das tertiäre, cyclische Amin erfolgt der nukleophile Angriff auf das Isocyanat und die Bildung der Urethangruppe.

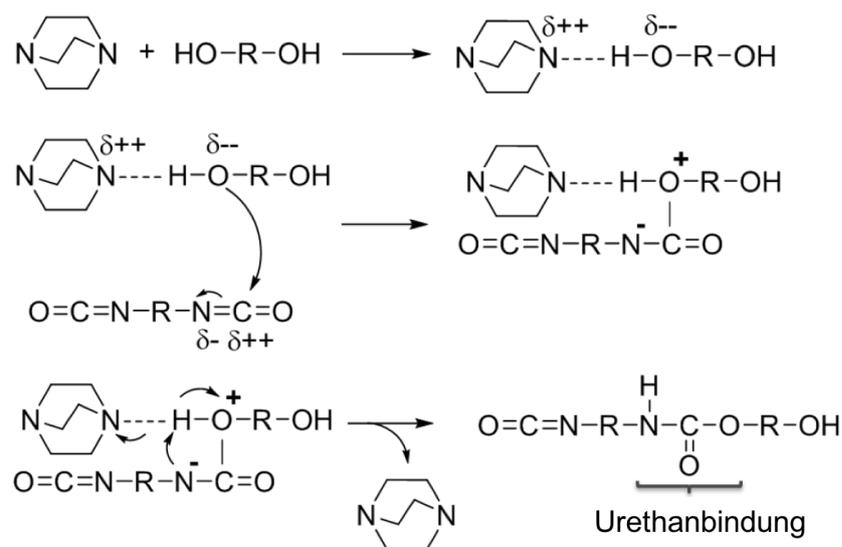


Abbildung 20. Mechanismus von Katalysator DABCO während der Polyurethan-Synthese.

Wir beobachteten beim Einsatz cyclischer Amine eine Nebenreaktion mit dem acetylierten Cellobiose-Monomer. Diese Nebenreaktion scheint den Katalysator teilweise zu deaktivieren und führt zu deutlich längeren Reaktionszeiten und einem verringerten Umsatz (siehe Kapitel V.2). Um den Einfluss des Katalysators auf die Polyurethansynthese zu untersuchen, verglichen wir die Katalysatoren DABCO, DBU und DBN. Dabei sollte erwähnt werden, dass die Reaktion mit DABCO in NMP, die Reaktionen mit DBU und DBN aus Löslichkeitsgründen in DMSO durchgeführt wurden.

Die Polyurethansynthesen wurden mit den verschiedenen Katalysatoren wie im **Experimententeil (Kapitel V.2)** beschrieben durchgeführt. Die basischeren Katalysatoren DBU und DBN zeigten dabei keine effektive Katalysatorfunktion bzw. führten zu geringen Umsätzen von 15% bzw. 59%, was unter anderem auch auf das Lösungsmittel DMSO zurückzuführen ist. In NMP wurde selbst ohne Katalysator ein Umsatz von 32% erzielt. Mit DABCO (in NMP) wurde ein Umsatz von 73% erreicht, wobei eine deutliche Braunfärbung der Reaktionslösung während der Synthese auftrat, die ebenfalls auf eine Nebenreaktion hinweist.

Um die Braunfärbung und die damit verbundene Nebenreaktion detaillierter zu untersuchen, führten wir Kontrollreaktionen mit verschiedenen Kombinationen aus DABCO und den eingesetzten Monomeren durch. Die Reaktionen wurden bei einer Konzentration von 0,5 mol/L in NMP durchgeführt und jeweils 5 Stunden lang unter Schutzgasatmosphäre auf 75 °C erhitzt. Die Beobachtungen sind in **Tabelle 2** zusammengefasst.

Nur die Kombination von Cell-6OAc und DABCO führte zu einer Braunfärbung des Reaktionsgemisches, welche nach ca. 15 Minuten Reaktionszeit auftrat. Je größer der DABCO Anteil im Reaktionsgemisch war, desto dunkler färbte sich die Reaktionslösung. Daher gehen wir von einer Nebenreaktion oder Intermediatbildung zwischen dem Katalysator DABCO und dem Cellobiose-Monomer Cell-6OAc aus. Mögliche

Intermediate sind in **Abbildung 21** dargestellt. Es könnte zu einer Adduktbildung oder einer übergangsweisen Deprotonierung einer Alkoholgruppe kommen.

Tabelle 2. Reaktionsübersicht der Kontrollreaktionen / Aufklärung der Nebenreaktion von DABCO.

	Substrat A	Substrat B	Verhältnis A:B	Beobachtung
1	Cell-6OAc	DABCO	1:1	Braune Reaktionslösung / viskos
2	Cell-6OAc	DABCO	1: 2,5	Schwarze Reaktionslösung / stark viskos
4	DMPA	DABCO	1:1	Leicht verschobenes DABCO Singlett
5	PEG 1000	DABCO	1:1	Keine Reaktion / Interaktion
6	IPDI	DMPA	1:1	Vollständiger Verbrauch von IPDI
7	Cell-6OAc	-	-	Keine Zersetzung
8	DABCO	-	-	Keine Zersetzung

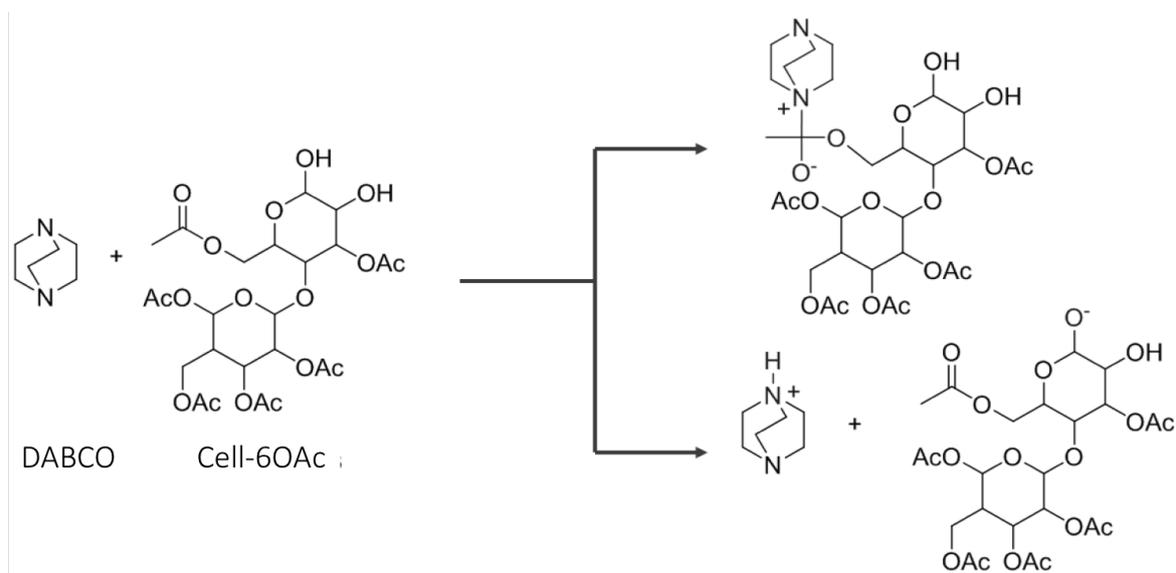


Abbildung 21. Mögliche Nebenreaktionen zwischen DABCO und Cell-6OAc.

Das ^1H -NMR-Spektrum des Reaktionsgemisches zeigt die Entstehung einer neuen Acetylgruppe bei einer Verschiebung von 2,70 ppm (siehe **Abbildung 22**). Dies könnte auf eine Adduktbildung zurückzuführen sein, allerdings verbleibt die Struktur des genauen Intermediates an dieser Stelle unklar.

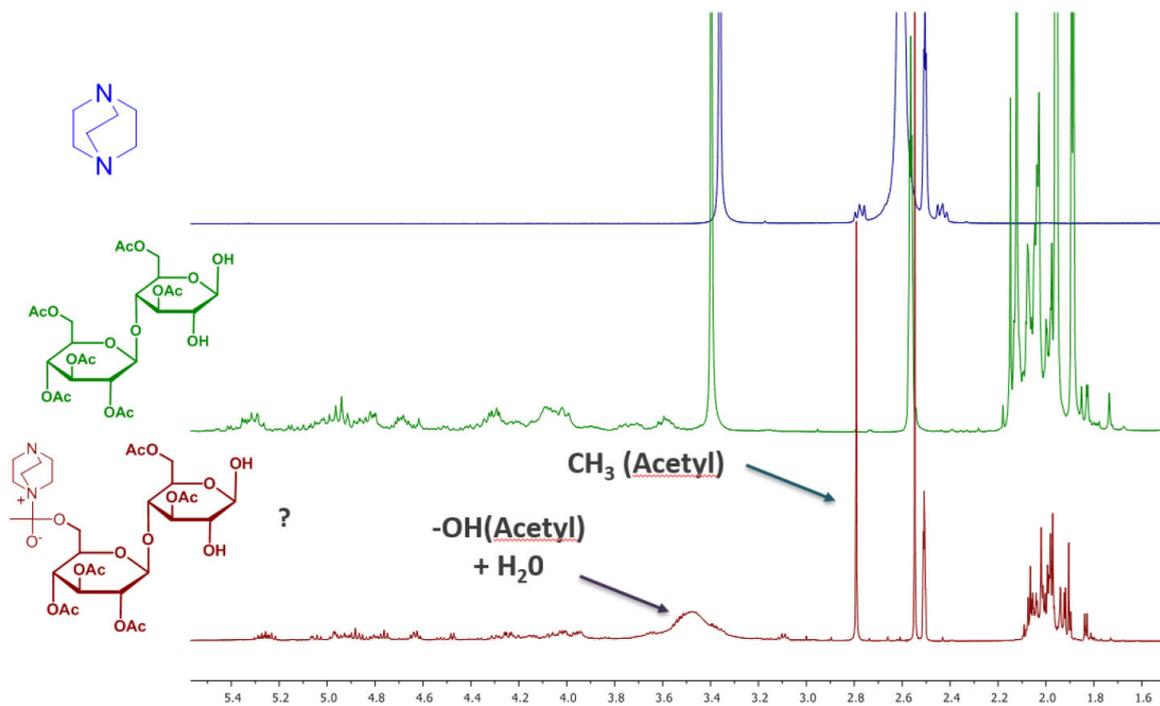


Abbildung 22. ^1H -NMR-Spektren von DABCO (blau), Cellobiose-Hexaacetat (grün) und dem Addukt (rot).

Zusammenfassung

- Es tritt eine spezifische Wechselwirkung zwischen dem Katalysator DABCO und dem Monomer Cell-6OAc auf, welche die Aktivität des Katalysators erniedrigt. Folgen sind ein erniedrigter Umsatz (73%), lange Reaktionszeiten und eine bräunliche Verfärbung der Reaktionslösung. Die exakte chemische Struktur des Intermediates, welches zwischen DABCO und Cell-6OAc gebildet wird, ist an dieser Stelle noch unklar.
- Alternative cyclische Amin-Katalysatoren (DBU, DBN) sind nicht effektiv. Ein Verzicht auf Katalysator führt zu einer Ausbeute von nur 32%.

III.2.6 SYNTHESE & CHARAKTERISIERUNG VON PU_1 , PU_COOH-14 UND PU_DEG

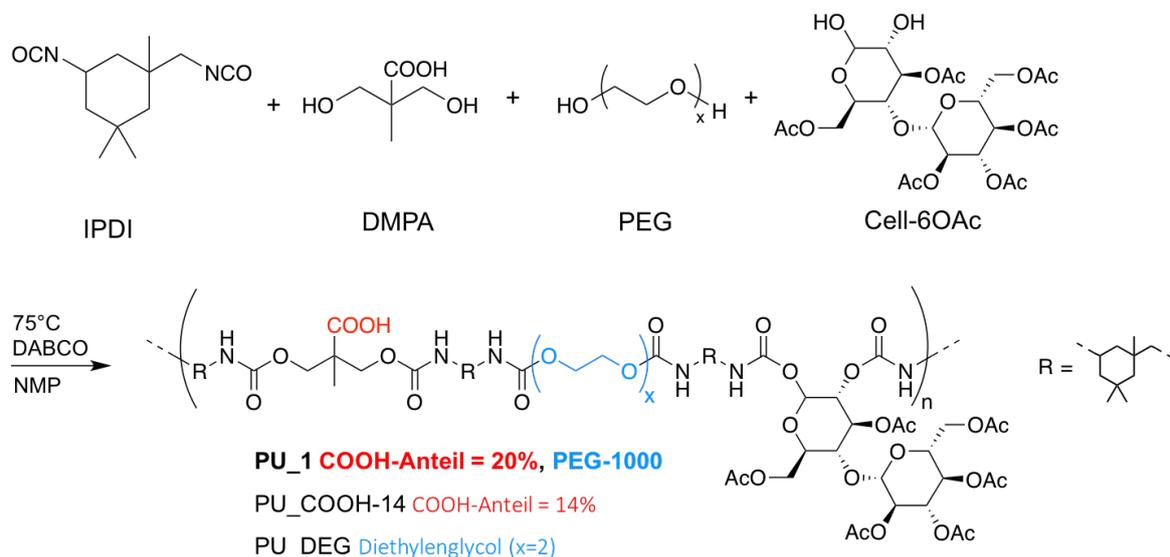


Abbildung 23. Übersicht über Synthese von PU_1, PU_COOH-14 und PU_DEG.

Im Fokus dieser Arbeit liegt das Polyurethan **PU_1**, dessen Synthese und Charakterisierung nun im Detail vorgestellt wird. PU_COOH-14 und PU_DEG wurden zur Aufklärung des Gelierungsmechanismus als Kontrollpolymere synthetisiert, wie unten näher beschrieben ist.

Mit Hinblick auf die Anwendung als Basismaterial für ein physikalisches Hydrogel und eine **schnelle Stress-Relaxation** war es das Ziel, **kürzere Polymere oder Oligomere** herzustellen, was durch Polyurethanchemie leicht realisierbar ist (vergleiche Kapitel II.3). Die Kettenlänge wird bei Polyaddition durch das Verhältnis von Diisocyanat zu Diol eingestellt; das größte Molekulargewicht wird bei einem exakten 1:1 Verhältnis erzielt, davon abweichend nehmen die Kettenlängen ab. In dem hier vorgestellten Fall muss der Einfluss des Katalysators allerdings mit einbezogen werden. Es wurde beobachtet, dass eine Wechselwirkung zwischen Katalysator DABCO und dem Cellobiose-Monomer auftritt, welche zu einer unvollständigen Umsetzung und kürzeren Kettenlängen führt

(siehe Kapitel III.2.5). Aus diesem Grund wurde ein 1:1 Diisocyanat zu Diol-Verhältnis angewendet, was zu einem Umsatz von 73% und Molekulargewichten in der Größenordnung von 5-10 kDa führte.

PU_1 wurde per **Gelpermeationschromatografie (GPC)** charakterisiert (siehe **Abbildung 24**), wobei beachtet werden muss, dass die Messungen in DMF und mit einem Standard von Polystyrol durchgeführt wurden. Messungen in wässrigen Eluenten waren wegen der Nanoaggregatbildung (siehe **Kapitel III.1.2** bzw. **Kapitel III.3**) nicht möglich. Die GPC-Messungen liefern somit keine absoluten Daten und sind mit Polystyrol anhand eines sehr unterschiedlichen Systems kalibriert. Allerdings implizieren die Daten stark, dass es sich bei den vorliegenden Polymeren um Oligomere oder Polymere in einer groben Größenordnung von 10 kDa und es sich daher um **verhältnismäßig kurze Kettenlängen** handelt. Diese sollten im Vergleich zu längeren Ketten eine größere Beweglichkeit in Lösung und damit eine schnellere Stress-Relaxation mit sich bringen. Diese schnelle Stress-Relaxation wurde im Zuge der Hydrogel-Charakterisierung bestätigt (siehe **Kapitel III.3**).

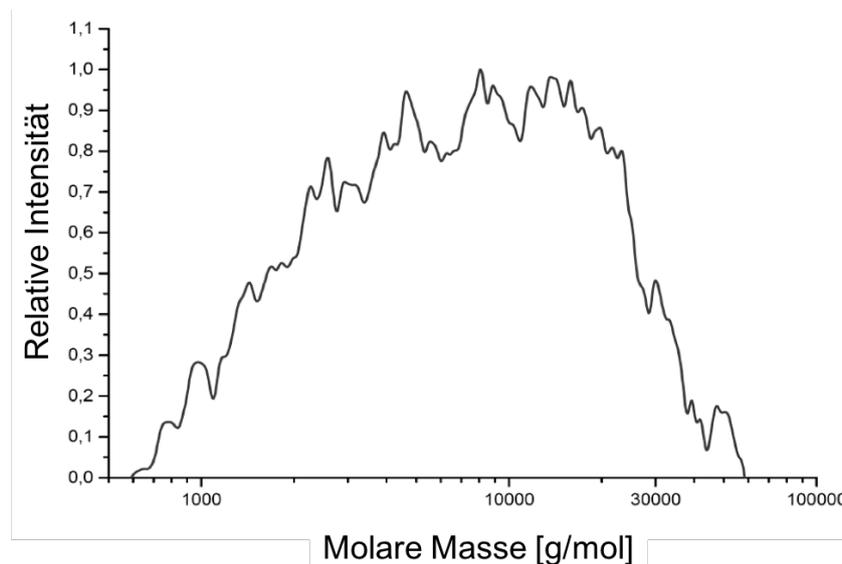


Abbildung 24. Molekulargewichtsverteilung von PU_1 nach GPC; Eluent DMF; Standard: Polystyrol.

Charakterisierung durch **FT-IR-Spektroskopie** lieferte **charakteristische Urethanbanden** (siehe **Abbildung 25**); darüber hinaus bestätigt die Abwesenheit einer Bande zwischen $2250\text{-}2270\text{ cm}^{-1}$ die **Abwesenheit von verbleibenden freien NCO**, sodass von einem vernachlässigbar kleinen Anteil an Restmonomer ausgegangen wird.

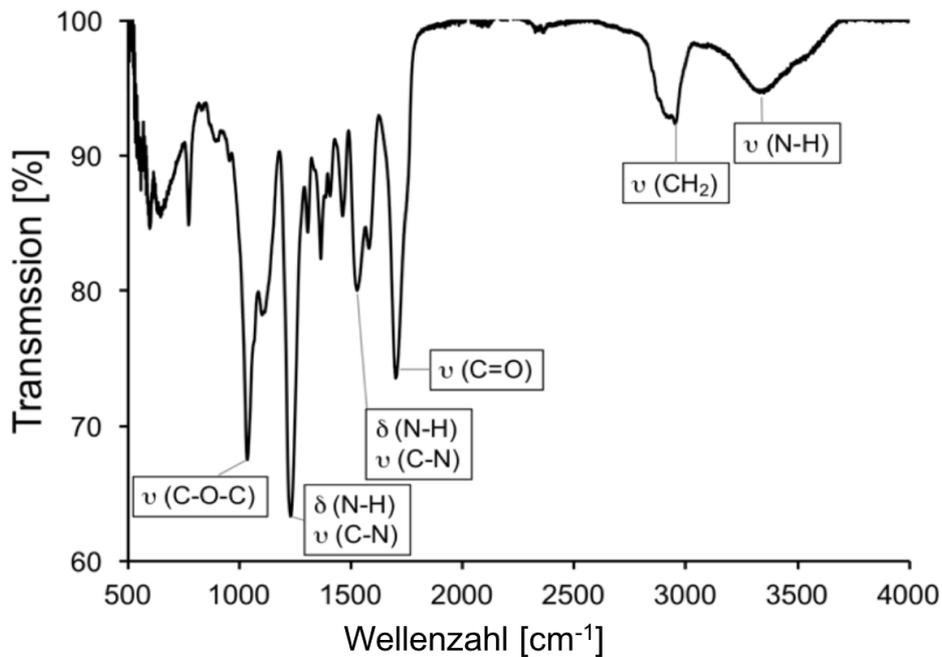


Abbildung 25. FTIR-Spektrum von PU_1.

Um die Rolle des COOH-Gehaltes sowie der PEG-Einheit und deren Einfluss auf die Eigenschaften der resultierenden Hydrogele zu untersuchen, wurden zwei Kontroll-Polymere hergestellt: **PU_COOH-14**, welches im Gegensatz zu PU_1 statt eines COOH-Anteils von 20% einen verminderten COOH-Anteil von 14% aufwies (siehe **Tabelle 5**), und **PU_DEG**, bei welchem die längeren PEG-Einheiten durch kürzeren Diethylenglykol-Einheiten (DEG) ersetzt wurden (siehe **Tabelle 6**). Insbesondere sollte der Einfluss des COOH-Anteils sowie der Länge der Ethylenoxid-Einheit (PEG vs. DEG) auf die Eigenschaften des Hydrogels untersucht werden. Daher verweisen wir an dieser Stelle auf **Kapitel III.3**, wo die Polyurethane PU_COOH-14 und PU_DEG bzw. ihre resultierenden Hydrogele näher untersucht werden.

III.2.7 SYNTHESE & CHARAKTERISIERUNG VON PU_SS

Ein großer Vorteil von Polyurethanchemie ist das Baukastenprinzip, nach dem man leicht verschiedene Monomere, in diesem Fall verschiedene Dirole, kombinieren kann. Durch die Verwendung von 2-Hydroxyethyl-disulfid (HEDS) konnte eine weitere Funktionalität eingeführt werden: eine Redoxresponsivität (siehe **Tabelle 7**).

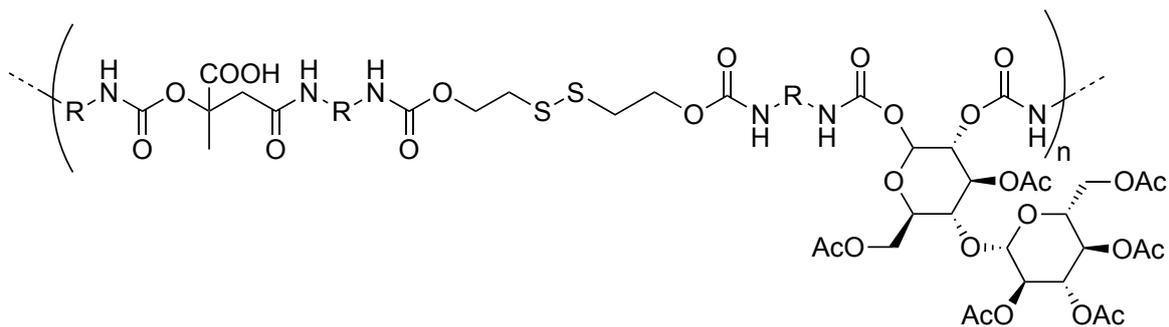


Abbildung 26. Chemische Struktur von Polyurethan PU_SS.

Disulfidbindungen können reduktiv gespalten werden, was unter anderem bei Drug Delivery Devices genutzt wird. Hier werden Disulfid-Linker eingesetzt, um im reduzierenden Milieu innerhalb der Zelle gespalten zu werden, um auf diese Weise Wirkstoffe gezielt freizulassen.¹²⁴⁻¹²⁶

PU_SS wurde mit ¹H-NMR-Spektroskopie analysiert (siehe **Abbildung 27**), wo die Spektren der Monomere mit dem Spektrum des Polyurethans verglichen wurden. Die Methylen-Triplets treten beim freien Monomer HEDS bei den Verschiebungen von 2,85 ppm bzw. 3,83 ppm auf. Durch die Bildung der Urethanbindung beobachten man bei letzterem Signal eine Tieffeld-Verschiebung zu etwa 4,18 ppm. Dies lässt auf einen erfolgreichen Einbau von HEDS in das Polyurethan schließen.

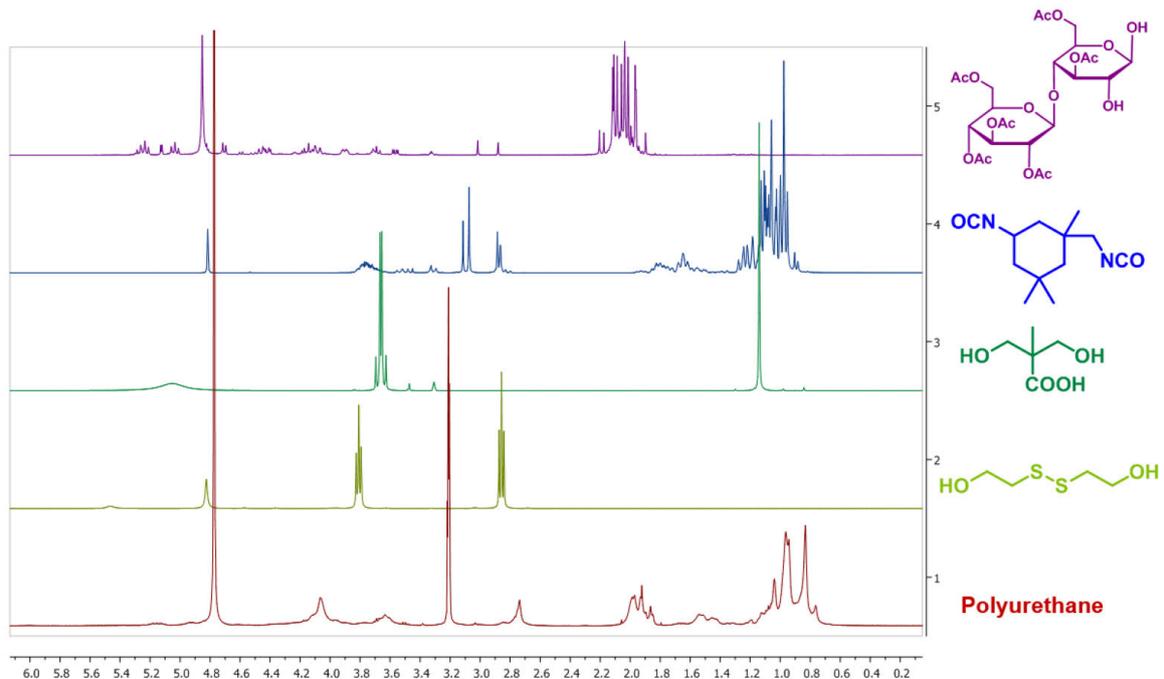


Abbildung 27. $^1\text{H-NMR}$ -Charakterisierung von PU_SS im Vergleich mit den Spektren der eingesetzten Monomere.

PU_SS wurde mit den Reduktionsmitteln 1,4-Dithiothreitol (DTT) und Glutathion behandelt und anschließend mittels GPC (Gelpermeationschromatografie) charakterisiert, um Bindungsspaltung der Disulfidlinker und den damit verbundenen Abbau zu kürzeren Einheiten nachzuweisen. Diese Daten sind hier nicht aufgeführt, da die GPC-Messungen entweder keinen Molekulargewichts-Abbau, sondern teilweise sogar eine Zunahme aufwiesen. Wahrscheinlich kam es im Anschluss an die Reduktionsreaktion, während der Aufreinigung und des Entferns des Reduktionsmittels, zu einer Re-Oxidation der Thiole zu Disulfiden und einer Neubildung der Polymerketten.

Hydrogele, welche mit PU_SS hergestellt wurden, zeigten keine Disintegration nach Zugabe von DTT- oder Glutathion-Lösung. Ein gezielter Abbau des Hydrogels kann somit auf diese Weise nicht erreicht werden. Allerdings kann durch Spalten der Disulfidbindungen wahrscheinlich die mechanischen Eigenschaften des Hydrogels sowie dessen Porengrößen gezielt verstellt werden. Die größte experimentelle Hürde für eine

genauere Charakterisierung ist die Vermeidung von Re-Oxidation, nachdem das Reduktionsmittel entfernt wurde. Diese könnte in Zukunft durch Zugabe von Antioxidantien vermieden werden.

Zusammenfassung

- Durch Verwendung von HEDS können redoxsensitive Disulfidlinker in die Polyurethane eingebaut werden, wie durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestätigt wurde.
- Durch Reduktionsmittel wie DTT oder Glutathion könnte die Porengröße verändert oder bei höherem HEDS-Anteil möglicherweise das Hydrogel aufgelöst werden.
- Die Charakterisierung der Spaltprodukte scheiterte bisher an Re-Oxidation der Thiole unter Neubildung von Disulfidbindungen. Dies könnte in Zukunft durch Zugabe von Antioxidantien wie beispielsweise Ascorbinsäure vermieden werden und sollte in Zukunft näher untersucht werden.

III.2.8 SYNTHESE & CHARAKTERISIERUNG VON PU_KAT

Die bisher genannten Polyurethane sind anionische Polymere, welche unter Protonierung bzw. Abschirmung der Ladung physikalische Hydrogele bilden. Dieser Prozess wird in Kapitel III.1.2 im Detail diskutiert.

Mit dem Ziel ein kationisches Analog herzustellen, ersetzen wir DMPA durch Methyldiethanolamin (MDA), einem tertiären Amin.

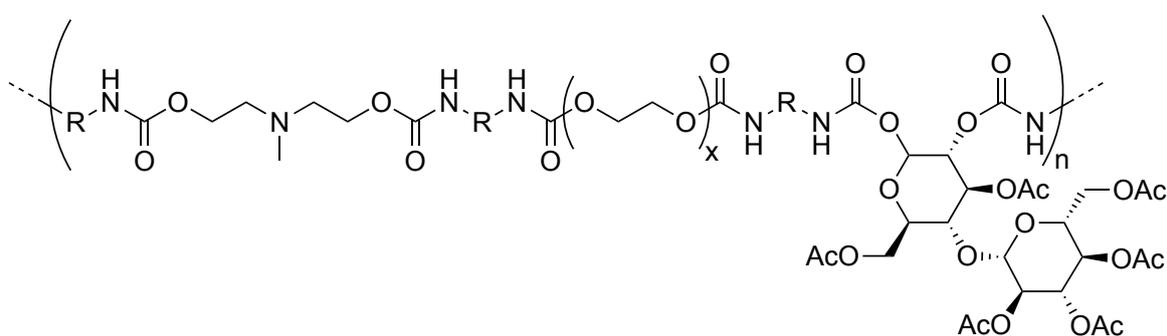


Abbildung 28. Chemische Struktur von Polyurethan PU_kat.

Die Synthese wurde nach derselben allgemeinen Vorschrift wie die anionischen Polyurethane durchgeführt (siehe Experimentalteil, **Tabelle 8**). Dabei wurde beobachtet, dass das Reaktionsgemisch eine intensive dunkle Verfärbung bekam und außerdem stark viskos wurde. Es schien sich eine vernetzte Struktur zu bilden, welche die Aufarbeitung, v.a. die Aufreinigung durch Dialyse erschwerte. Diese Beobachtungen sind wahrscheinlich auf eine Interaktion oder Nebenreaktion zwischen den tertiären Aminen des MDA und der Cellobiose-Einheit zurückzuführen. In Kapitel III.2.5, wurde ein ähnliches Phänomen beschrieben, wo die Wechselwirkung zwischen Cellobiose-Hexaacetat und dem Katalysator DABCO, ebenfalls ein tertiäres Amin, untersucht wurde.

Eine Charakterisierung von **PU_kat** durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie zeigte zwei Tripletts (8,2 ppm, 7,5 ppm) und ein Singulett (2,4 ppm), welche auf die Methylen- bzw. die Methylgruppen von MDA zurückzuführen sind (siehe **Abbildung 29**).

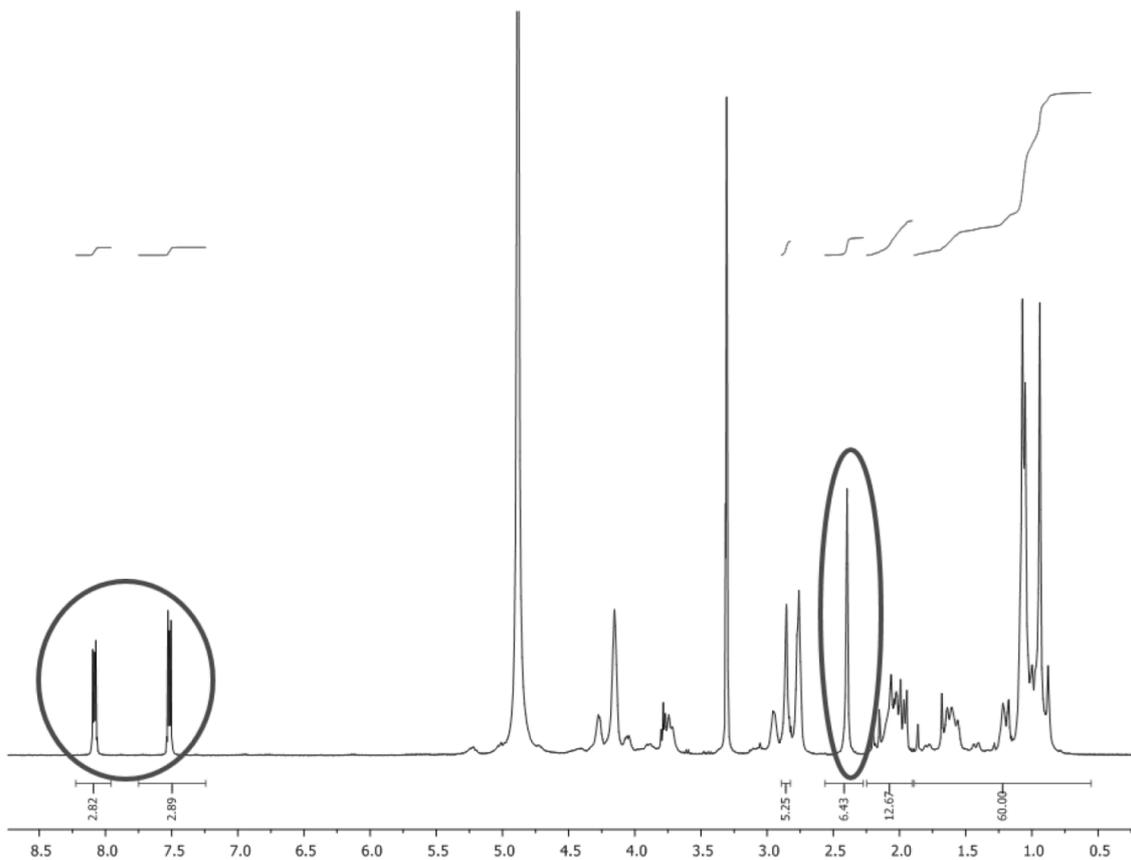


Abbildung 29. ^1H -NMR-Spektrum von PU_{kat}.

Ein kationisches Analog zum anionischen PU₁ ist aus verschiedenen Gründen interessant. Zunächst wird die pH-Abhängigkeit in einen anderen pH-Bereich verschoben; nun liegt das Polymer im Sauren in seiner ionischen, im Basischen in seiner nicht-ionischen Form vor. In Hinblick auf ein entsprechendes Hydrogel würde man ein Material erhalten, welches im Basischen stabil ist, sich jedoch im Sauren auflöst.

Darüber hinaus wäre die Bildung von Polymer-Polymer-Komplexen zwischen kationischen und anionischen Polyurethanen denkbar. Auf diese Weise könnten Mikro- oder Nanopartikel hergestellt werden.

Zusammenfassung

- Durch Verwendung von MDA anstelle von DMPA konnte ein kationisches Analog zu PU_1 hergestellt werden, wie durch ^1H -NMR-Spektroskopie bestätigt wurde.
- Es entsteht ein stark vernetztes, viskoses Material mit intensiver Braunfärbung, was auf ungewünschte Wechselwirkungen zwischen MDA und dem Katalysator DABCO zurückzuführen ist. Für eine vollständige Aufarbeitung müsste ein anderer Katalysator verwendet werden. In Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde das zunächst nicht umgesetzt, da metallbasierte Katalysatoren für eine Anwendung im biomedizinischen Bereich ungeeignet sind; doch als Proof-of-concept wäre die Herstellung eines sauberen, kationischen Polyurethans und eines entsprechenden Hydrogels in Hinblick auf viele weitere Anwendungen spannend.

III.2.9 ZUSAMMENFASSUNG

Durch Polyurethanchemie wurden multifunktionale Polymere hergestellt, welche die Fähigkeit besitzen physikalische Hydrogele zu bilden. Durch einen hohen Anteil an Urethan-Gruppen erhalten die Polymere ausgeprägte Fähigkeit zur Ausbildung starker Wasserstoffbrückenbindungen. Gleichzeitig handelt es sich um ionische und pH-responsive Polymere, welche durch Ladungsabstoßung und Ladungsabschirmung die Gelierung steuern, wie im nachfolgenden Kapitel experimentell bestätigt wird.

Nach unserem Wissen wurde in dieser Arbeit außerdem zu ersten Mal ein Dissaccharid als Monomer für eine Polyadditions-Synthese verwendet. Dadurch wurde eine interessante funktionelle Gruppe eingeführt, die Biokompatibilität und Biointeraktivität erhöhen könnte und als Ausgangspunkt für zukünftige glykosidische Modifizierungen dienen könnte.

Auch die Einführung redoxaktiver Gruppen ist über die Auswahl entsprechender Diole als Monomere möglich. Prinzipiell sind viele strukturelle Variationen durch Verwendung verschiedener Diole als Monomere denkbar.

Alle in dieser Arbeit hergestellten Polyurethane folgen demselben Syntheseprinzip. Während dieser Synthese können sowohl die Anteile der Monomere als auch die Art der Monomere einfach verändert werden, sodass sich diese Syntheseroute für die Herstellung einer breiteren Bibliothek eignet. Etwa durch Variierung von COOH-Gehalt und der Kettenlänge der Ethylenoxid-Einheit können die mechanischen Eigenschaften der resultierenden Hydrogele dramatisch beeinflusst werden, wie im folgenden Kapitel demonstriert wird.

III.3 BULK-HYDROGELE: HERSTELLUNG & CHARAKTERISIERUNG

Diese Dissertation behandelt einen **neuartigen physikalischen Gelierungsmechanismus**, der in ähnlicher Form bei noch keinem synthetischen Polymer beobachtet wurde. Die physikalische Gelierung beruht zunächst auf der intrinsischen Neigung des Polyurethans sich zu größeren Strukturen zu assemblieren. Die Gelierung verläuft gewissermaßen in zwei Stufen. Zunächst bilden die Polyurethane in Wasser lösliche Nanoaggregate, die durch **Ladungsabstoßung** davon abgehalten werden, größere Netzwerkstrukturen zu bilden. Im Anschluss an diese Vorassemblierung wird durch **Ladungsabschirmung**, d.h. durch Zugabe von Salzen oder Säure, das Fortschreiten der Assemblierung ermöglicht und damit eine sehr schnelle Gelierung induziert (siehe **Abbildung 30**).

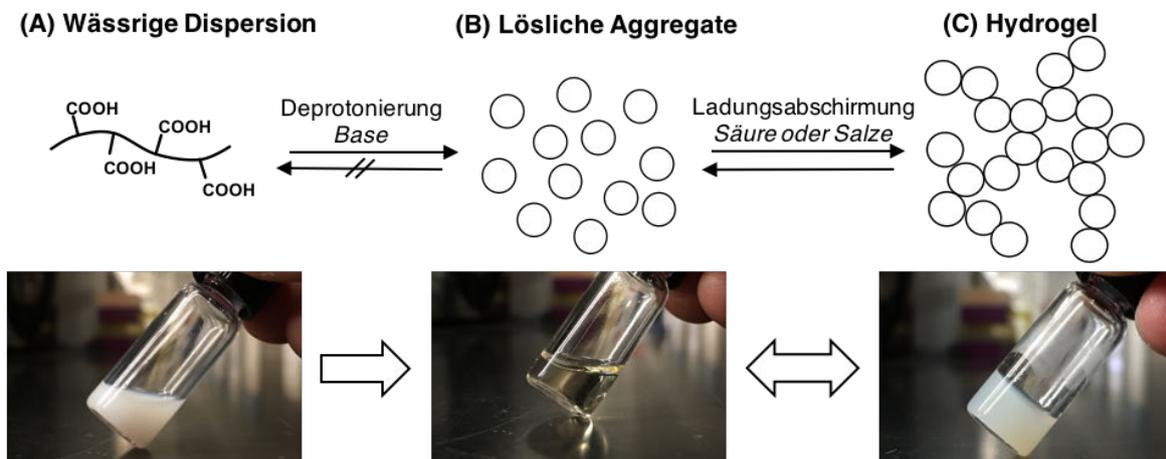


Abbildung 30. Gelierungsmechanismus / Allgemeiner Ablauf: Nach der Synthese erhält man das Polyurethan in seiner protonierten, wasserunlöslichen, aber dispergierbaren Form (A). Durch Deprotonierung unter Zugabe von Base bilden sich Nanoaggregate, die durch Ladungsabstoßung in Lösung gehalten werden (B). Durch Ladungsabschirmung schreitet die Aggregation fort und ein Hydrogel entsteht (C).

Die Anwesenheit löslicher Nano-Aggregate wurde durch **Dynamische Lichtstreuung (DLS)** nachgewiesen. DLS-Messungen von verdünnten Polyurethan-Lösungen (2 mg/mL) zeigten nicht nur die Bildung von Nano-Aggregaten, sondern auch eine pH-abhängige Veränderung des Aggregationsverhaltens (**Abbildung 31 A**). Da die Gelierung bei einem pH-Wert von 5,5 beginnt, wurden 4 DLS-Messungen zwischen pH 7,0 und pH 5,5 durchgeführt.

Bei neutralem pH 7,0 liegen Nanoaggregate im Größenbereich von 100 nm vor. **Mit sinkendem pH-Wert beobachtet man die Entstehung größerer Aggregate, sowie eine allgemeine Zunahme der Polydispersität und eine allgemeine Verschiebung hin zu größeren Partikeldurchmessern** (**Abbildung 31 A**). Hierbei sollte erwähnt werden, dass die DLS-Messungen mit 2 mg/mL bei deutlich geringeren Polymerkonzentrationen durchgeführt wurden als die Konzentrationen, die für die Herstellung der Hydrogele verwendet wurde (2-10 wt%), um einen sinnvollen Messbereich zu gewährleisten. Daher sind die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung keine exakte Repräsentation des Gelierungsvorgangs, zeigen jedoch einen deutlichen **pH-abhängigen Trend hin zu zunehmend größeren Aggregats-Strukturen**, selbst in verdünnten Lösungen.

Entsprechende DLS-Messungen wurden außerdem in Abhängigkeit von CaCl_2 Konzentration durchgeführt (siehe **Abbildung 31 B**). Hier ist der Effekt nicht so gut verfolgbar wie bei Zugabe von HCl. Dies ist nachvollziehbar, da eine Ladungsabschirmung durch Salze einen schwächeren Effekt hat als eine Protonierung der Carboxylate durch Säure. Darüber hinaus kann der Effekt der Salzbrückenbindung bei den tiefen Messkonzentrationen von 2 mg/mL nicht in Wirkung treten, welcher jedoch bei Hydrogel eine wesentliche Rolle spielt. Doch trotz dieser Bedingungen erkennt man eine deutliche Verbreiterung der Größenverteilung und eine zusätzliche Aggregatbildung an der oberen Grenze des Messbereichs, wenn auch weniger ausgeprägt als unter Zugabe von Säure. Wie oben im vorherigen Abschnitt erwähnt, wird der Gelierungsmechanismus darüber hinaus indirekt, aber deutlich von den

Ergebnissen der Hydrogel-Charakterisierung bestätigt, die im folgenden Kapitel aufgeführt werden.

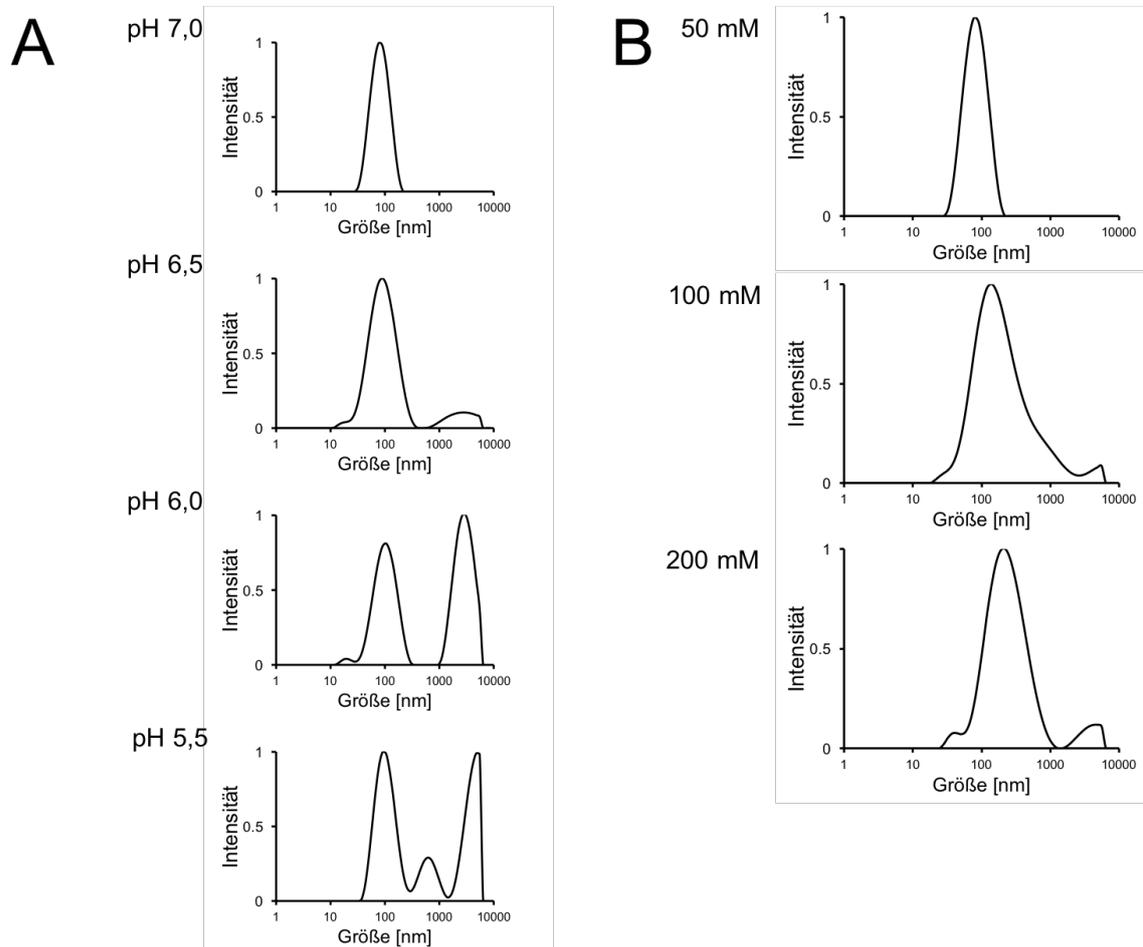


Abbildung 31. DLS-Messungen von 2mg/mL PU_1 in Abhängigkeit vom pH (A) und in Abhängigkeit von der CaCl₂ Konzentration (B).

III.3.1 SAURE HYDROGELE

Nicht nur bei physiologischem pH sind Hydrogele interessant für biomedizinische Anwendungen. Hydrogele, die in einem sauren pH-Bereich stabil sind oder im Sauren gebildet werden, können in dermatologischen Anwendungen als pH-hautneutrale (pH 5,5) Materialien eingesetzt werden. Auch in der oralen Wirkstoffverabreichung oder für Anwendungen im Magen-Darm-Trakt, wo saurer pH herrscht, sind saure Hydrogele interessant.

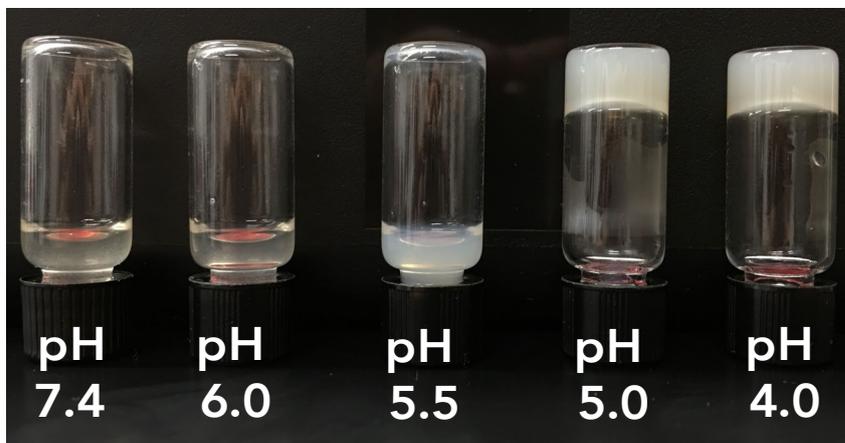


Abbildung 32. Fotos von 4 wt% PU_1 Lösungen in Abhängigkeit vom pH-Wert. Unterhalb von einem pH-Wert von 5,5 beginnt die Gelierung.

In dieser Arbeit stellen wir ein neuartiges Polyurethan vor, das sowohl pH-neutrale als auch saure Hydrogele bilden kann. Durch Zugabe von Säure zu einer wässrigen Polyurethanlösung erhält man Hydrogele im pH-Bereich von 4 - 5,5. Der genaue Prozess ist im Experimentalteil beschrieben.

Die Gelierung verläuft schlagartig, sobald ein pH von unter 5,5 erreicht wird (siehe **Abbildung 32**). Die sehr schnelle Gelierung ist darauf zurückzuführen, dass die Polyurethane in Lösung bereits vororganisiert in Aggregaten vorliegen (vergleiche **Kapitel III.1.2**). Um trotz der schnellen Gelierungskinetik eine homogene Gelstruktur zu gewährleisten, wurde als Säure **Glucono- δ -lacton (GDL)** verwendet (siehe **Abbildung 33**), ein natürlich vorkommendes Lacton, das als Lebensmittelzusatz bekannt

ist. **In Wasser hydrolysiert GDL teilweise unter Bildung von Gluconsäure, wodurch der pH der Lösung langsam sinkt**; die Hydrolysegeschwindigkeit ist dabei von Temperatur und Anfangs-pH der Lösung abhängig.

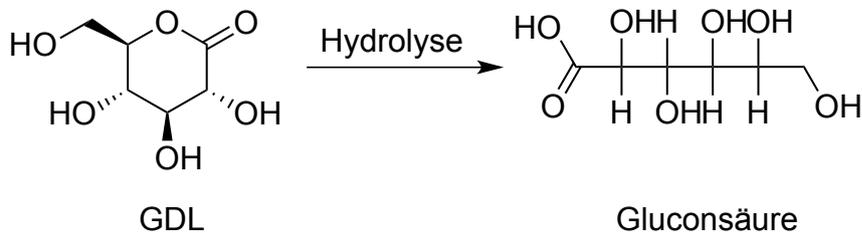


Abbildung 33. Chemische Struktur von GDL und Hydrolyse zu Gluconsäure.

In dieser Arbeit wurde GDL als „langsame Säure“ für die Herstellung aller Hydrogelproben verwendet, wobei an dieser Stelle erwähnt werden sollte, dass eine Gelierung mit einer Vielzahl von starken und schwachen Säuren beobachtet wurde. Wir gehen davon aus, auch in Hinblick auf unser Verständnis des Gelierungsmechanismus, dass eine Gelierung mit jeder Art von Säure möglich ist. Allerdings entstehen z.B. durch Hinzugabe von HCl leicht heterogene Gelklümpchen, da die Gelierung sehr schnell verläuft.

Um eine Bildung von Klümpchen gänzlich zu vermeiden, wie z.B. durch vorübergehend lokal erhöhte Säurekonzentration bei der Zugabe von GDL, wurde nicht mit reinem Wasser, sondern mit gepufferten Lösungen gearbeitet. Es wurde eine HEPES Puffer mit einem pH von 7.4 zur Herstellung der Polyurethanlösungen verwendet, die anschließend mit GDL-Lösung vermischt wurden (vergleiche **Experimententeil, Kapitel V.3.1**). Außerdem wurde eine Standardlösung von GDL in DMSO verwendet, um eine vorangehende Hydrolyse zu vermeiden.

Zur Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften der sauren Hydrogele wurden oszillationsrheologische Messungen und Kompressions-Messungen durchgeführt (siehe **Experimententeil, Kapitel V.5.5**). **Die Härte der Hydrogele kann durch den pH-Wert, die**

allgemeine Polymerkonzentration sowie den COOH-Gehalt eingestellt werden. Der pH-Wert ist hierbei die feinste Stellschraube, der COOH-Gehalt hat den dramatischsten Einfluss.

In **Abbildung 34** sind die Ergebnisse der Kompressionstests von Polyurethan-Hydrogelen in Abhängigkeit von pH (**Abbildung 34 A**) bzw. in Abhängigkeit der Polymerkonzentration dargestellt (**Abbildung 34 B**). Durch den pH-Wert ist eine feine Regulierung über einen Bereich von ca. 10 kPa möglich. **Je tiefer der pH-Wert, desto höher ist der Elastizitätsmodul (E-Modul) der Hydrogele.**

Die Hydrogele sind außerdem in einem Konzentrationsbereich von 2-10 wt% herstellbar. Hydrogele mit 2 wt% sind dabei jedoch zu weich, um etwa Scheiben daraus auszustanzen oder sie mit einem Spatel zu transferieren. Durch Einstellen der Polymerkonzentration kann man den E-Modul innerhalb eines Bereiches von 100 kPa variieren.

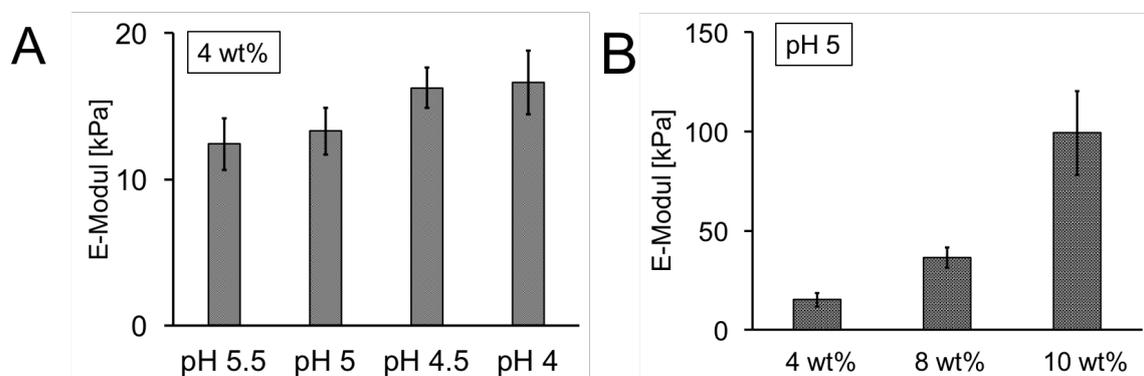


Abbildung 34. Elastizitätsmodul von PU_1 ermittelt durch Kompressionstests. (A) in Abhängigkeit vom pH, (B) in Abhängigkeit von der Polymerkonzentration in wt%.

Um den Einfluss des COOH-Gehaltes näher zu untersuchen, der ausgehend von dem oben beschriebenen Gelierungsmechanismus bedeutend sein sollte, **wurde als Kontroll-Polymer PU_COOH-14 mit 14% COOH-Anteil synthetisiert, um es mit PU_1 mit 20% COOH-Anteil zu vergleichen.** Der PEG-Gehalt sowie das allgemeine

Diisocyanat-Diol-Verhältnis wurde bei beiden Polymeren konstant gehalten. Sowohl die Ergebnisse der Kompressionstests als auch die der rheologischen Messungen zeigen einen signifikanten Einfluss des COOH-Gehaltes auf die mechanischen Eigenschaften des Hydrogels. **Abbildung 35** zeigt die Ergebnisse der Kompressionsmessungen, wo die Elastizitätsmodule von PU_1 und Kontroll-Polyurethan PU_COOH-14 bei verschiedenen pH-Werten verglichen wurden.

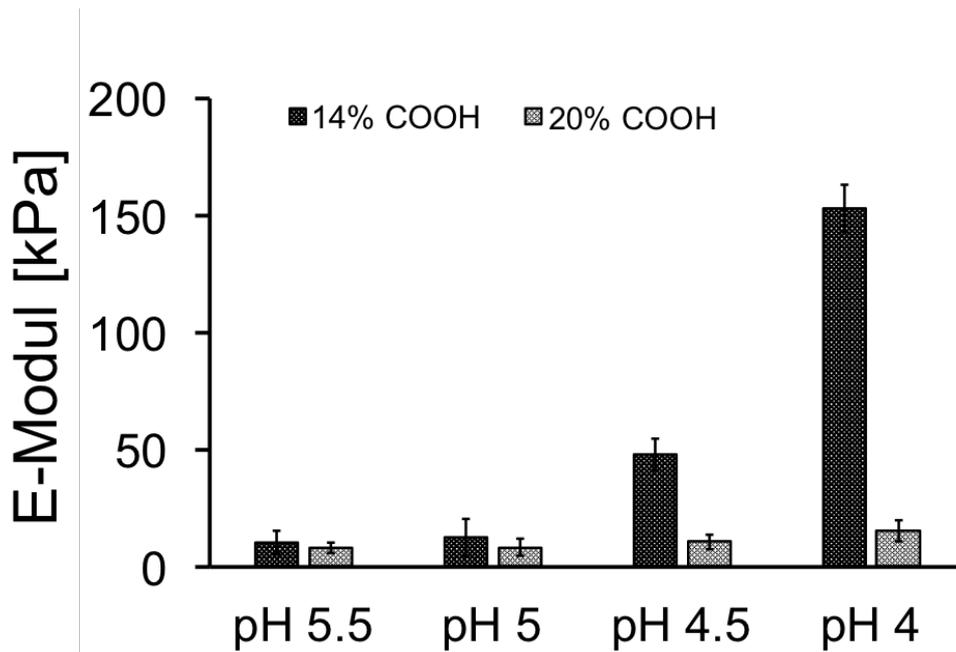


Abbildung 35. E-Module bestimmt durch Kompressionstests an 4 wt% Hydrogelen in Abhängigkeit verschiedener pH-Werte und Vergleich von Kontroll-Polymer PU_COOH-14 (14% COOH, dunkel) PU_1 (20% COOH, hell).

Zunächst fällt auf, dass **ein kleinerer COOH-Gehalt zu einem höheren Elastizitätsmodul führt, wobei der Unterschied mit abnehmendem pH immer signifikanter wird.** Während bei pH 5,5 ein Unterschied von wenigen kPa vorliegt, ist der Elastizitätsmodul bei 14% COOH-Gehalt um ein 18-Faches größer als bei 20% COOH-Gehalt. Ein kleinerer COOH-Gehalt erhöht somit nicht nur den Elastizitätsmodul des Hydrogels im Allgemeinen, sondern verstärkt vor allem die pH-Abhängigkeit der Hydrogel-Eigenschaften. Während bei 20% COOH-Gehalt durch den pH-Wert nur eine feine Variierung des Elastizitätsmoduls eingestellt werden konnte, lässt sich der Elastizitätsmodul bei 14% COOH-Gehalt über eine Spanne von 100 kPa variieren.

Rheologische Messungen bestätigten diesen signifikanten Unterschied (siehe **Abbildung 36**). Eine frequenzabhängige Messung von Speicher- und Verlustmodul (Speichermodul: G' ; Verlustmodul: G'') bei konstanter Amplitude (vergleiche auch **Experimententeil, Kapitel V.5.4**) zeigt zunächst, dass sowohl Speicher- als auch Verlustmodul bei einem COOH-Gehalt von 14% deutlich höher sind als bei 20% COOH-Anteil. Auffällig ist der Schnittpunkt zwischen Speicher- und Verlustmodul, welcher bei PU_COOH-14 bei 0,04 - 0,05 Hz auftritt, während er bei PU_1 außerhalb des gemessenen Frequenzbereiches liegt. Die Frequenz des Schnittpunktes von Speicher- und Verlustmodul entspricht bei viskoelastischen Materialien der inversen Stress-Relaxationszeit. **Daher führt ein niedrigerer COOH-Gehalt auch zu einer schnelleren Stress-Relaxation.**

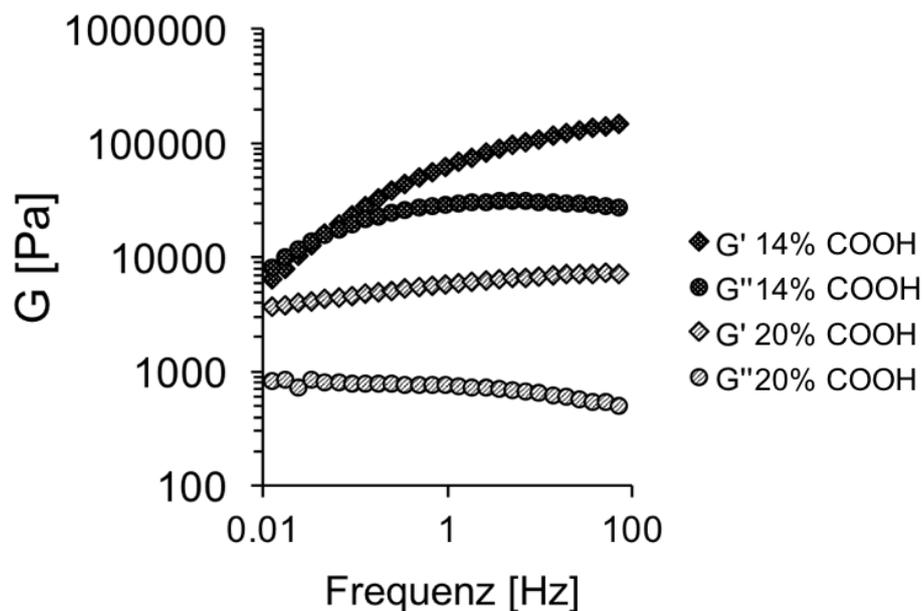


Abbildung 36. Oszillationsrheologische Messungen an 4 wt% Hydrogelen von PU_COOH-14 (14% COOH) und PU_1 (20% COOH); Frequency Sweeps (siehe Experimententeil, **V.5.4 Oszillationsrheologie**).

Der Einfluss des COOH-Gehaltes ist besonders interessant, da er auf den ersten Blick widersprüchlich wirken mag. Betrachtet man die Carbonsäuregruppen als Vernetzungspunkte des Hydrogels, so müsste es der Vernetzungsgrad und damit auch die Härte des Gels mit steigendem COOH-Gehalt zunehmen. Dass hier genau das

Gegenteil der Fall ist, **unterstützt den oben diskutierten Gelierungsmechanismus**. Sobald das Polyurethan in Wasser gelöst ist, d.h. in seiner anionischen, deprotonierten Form vorliegt, entspricht der COOH-Gehalt der negativen Ladungsdichte des Polymers. **Je höher der COOH-Gehalt, desto höher ist die Ladungsdichte und desto höher ist damit die elektrostatische Abstoßung**. Durch Reduzierung des COOH-Gehaltes von 20% auf 14% wurde die abstoßende Kraft verringert, sodass die anziehende Kraft der Wasserstoffbrückenbindungen dominiert (vergleiche **Kapitel III.1.2**). Dadurch entsteht es dichteres Netzwerk und ein höherer Elastizitätsmodul. Entsprechend ist auch die schnellere Stress-Relaxation bei tieferem COOH-Gehalt nachvollziehbar, da die Polymerketten durch geringere Ladungsabstoßung in geringerem Abstand zueinander organisiert sind.

Das Polyurethan-Hydrogel ist thixotrop und weist ein hervorragendes Regenerationsverhalten auf (Abbildung 37 A). Nach wiederholtem Scheren bis 100% Deformation zeigte das Hydrogel wiederholt eine vollständige Regeneration ohne feststellbare Materialermüdung. Die Regeneration verlief dabei auffällig schnell; innerhalb von gerade 7 s konnte eine vollständige Regeneration gemessen werden, während nach nur 1 s eine Regeneration von bereits 88% beobachtet wurde (Abbildung 37 B).

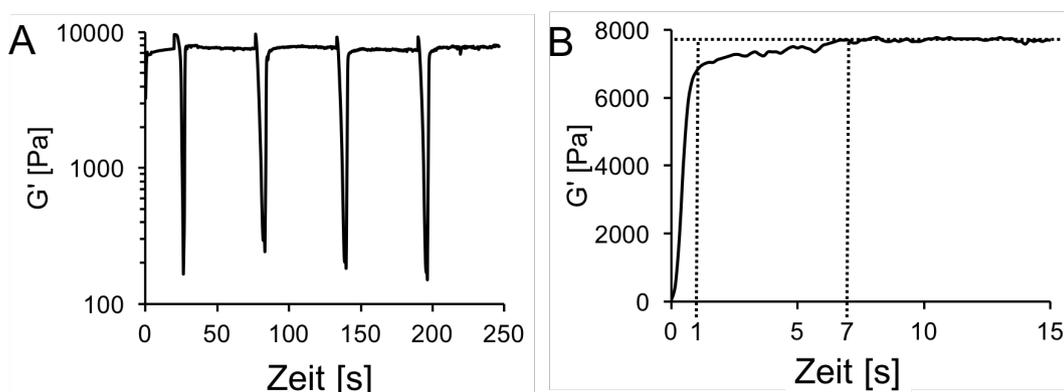


Abbildung 37. Oszillationsrheologische Messungen zu Thixotropie und Regenerationsverhalten von 4 wt% PU₁ Hydrogel bei pH 4,5.

Zusammenfassung

- Saure Polyurethan-Hydrogele können im pH-Bereich von 4 - 5,5 durch Zugabe verschiedener starker und schwacher Säuren hergestellt werden. Für eine homogene Gelierung ist die Verwendung von Glucono- δ -lacton als Säure zu empfehlen.
- Materialeigenschaften der Hydrogele können durch pH-Wert, allgemeine Polymerkonzentration und COOH-Gehalt des Polymers eingestellt werden.
- Der Einfluss des COOH-Gehaltes auf die mechanischen Eigenschaften des Hydrogels ist signifikant und unterstützt den oben diskutierten Gelierungsmechanismus: Je niedriger der COOH-Gehalt, desto niedriger sind Ladungsdichte und Ladungsabstoßung. Dadurch erhöhen sich Elastizitäts-, Speicher- und Verlustmodul, während die Stressrelaxationszeit sinkt.
- Die Hydrogele weisen thixotropes Verhalten und ein hervorragendes Regenerationsvermögen auf.

III.3.2 pH-NEUTRALE HYDROGELE

Für ein Anwendungspotential im Bereich der regenerativen Medizin oder *Tissue Engineering* sollten Hydrogele dem **physiologischen pH 7,4** entsprechen. pH-neutrale Hydrogele können mit dem hier vorgestellten Polyurethan durch ionische Vernetzung, d.h. durch Zugabe von Salzen, hergestellt werden. Die Gelierung geschieht dabei ähnlich rapide wie bei der Zugabe von Säure; sobald eine gewisse Ionenstärke der Lösung erreicht ist, entsteht ein Hydrogel. Da der primäre Trigger der Gelierung die **Ladungsabschirmung** ist (vergleiche **Gelierungsmechanismus, Kapitel III.1.2**), ist jede Art von Salz hierzu geeignet.

Monovalente Salze wie NaCl führen zu weichen Gelen, deren Materialeigenschaften denen kosmetischer Haargele ähneln (siehe **Abbildung 38**). Da diese Hydrogele für die hier vorgenommenen Experimente und Messungen aufgrund ihrer Weichheit nicht handhabbar waren und sie außerdem wegen ihrer Materialeigenschaften nicht als Basis für Zellkultivierung geeignet wären, wurde ihre mechanische Charakterisierung in dieser Arbeit ausgelassen. **Allerdings unterstützt die Tatsache, dass sich mit monovalenten Salzen Hydrogele herstellen lassen, deutlich den oben diskutierten Gelierungsmechanismus.** Es handelt sich nämlich offenbar nicht um einen Gelierungsmechanismus, der etwa der ionischen Vergelung von Alginat ähnelt, wo eine lokale Komplexierung zwischen Carbonsäuregruppen und divalenten Salzen vorliegt (vergleiche **Kapitel II.1.1**). Bei monovalenten Salzen wäre ein solcher oder ähnlicher Mechanismus ausgeschlossen. Stattdessen entsteht das Hydrogel durch Ladungsabschirmung, die eben auch durch monovalente Salze induziert werden kann und welche den Polyurethan-Ketten erlaubt, ein makromolekulares Netzwerk aufzubauen.

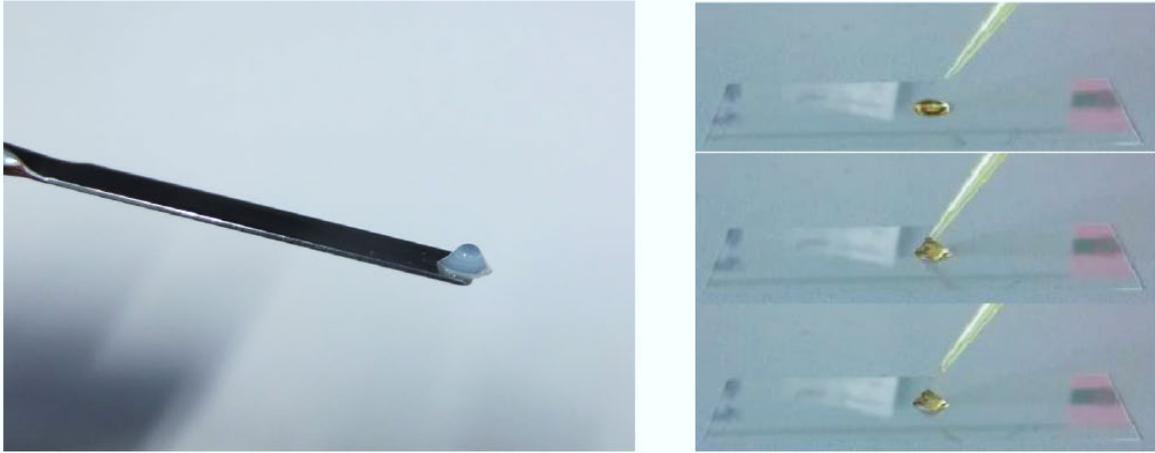


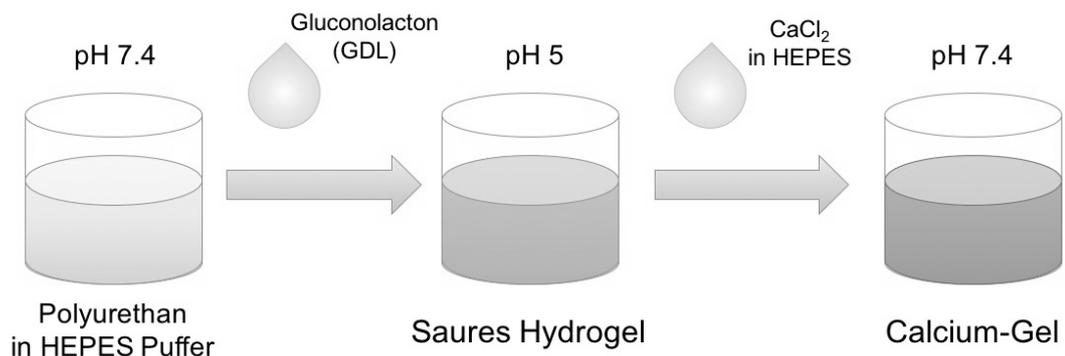
Abbildung 38. pH-neutrale Hydrogele durch Hinzugabe divalenter Salze wie CaCl_2 (links) oder monovalenter Salze wie NaCl (rechts).

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf Hydrogelen, welche durch Zugabe von CaCl_2 vernetzt wurden. Neben der Ladungsabschirmung durch das Salz kommt bei divalenten Salzen noch die **Bildung von Salzbrücken zwischen Carboxylat-Gruppen** hinzu, was das Hydrogelnetzwerk zu stärken scheint. Dies zeigt sich darin, dass ionisch vernetzte Hydrogele bei gleicher Polymerkonzentration härter sind als sauer vernetzte Hydrogele (siehe **Abbildung 40**).

Ähnlich wie bei den sauren Hydrogelen, verläuft die Gelierung so rapide, dass dabei leicht Klümpchen oder heterogene Gele entstehen. Wir gehen davon aus, dass die schnelle Gelierungskinetik darauf zurückzuführen ist, dass die Polyurethane in Lösung in den oben beschriebenen Nanoaggregaten bereits vororganisiert sind, sodass eine weitere Organisation oder Assemblierung hin zur Netzwerkstruktur besonders schnell verläuft.

Zur Herstellung von homogenen Hydrogelen wurden zwei verschiedene Methoden entwickelt, wobei jeweils auf Glucono- δ -lacton (GDL) als Hilfsmittel zurückgegriffen wurde (siehe **Abbildung 39**).

Methode A



Methode B

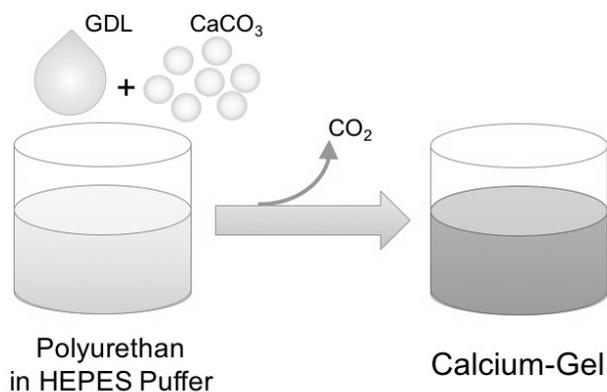


Abbildung 39. Zwei verschiedene Methoden zur Herstellung pH-neutraler Calcium-Gele durch Polyurethane. Methode A ist eine zweistufige Methode, die über die Herstellung eines sauren Gels verläuft, Methode B ist eine einstufige Methode, welche sich der Kombination von GDL und Calciumcarbonat bedient.

Methode A ist eine zweistufige Methode, die über ein saures Übergangs-Gel verläuft. Zunächst wird – nach dem Protokoll für die Herstellung saurer Hydrogele (vergleiche Experimentalteil) – mit Hilfe von GDL ein saures Hydrogel hergestellt. Anschließend wird das saure Hydrogel in einer gepufferten CaCl₂-HEPES-Lösung (pH 7,4) equilibriert, wobei die Lösung drei Mal ausgetauscht wird, bis das Hydrogel den neutralen pH-Wert von 7,4 eingenommen hat.

Methode B ist eine einstufige Methode, bei welcher **GDL und Calciumcarbonat** verwendet wird. CaCO₃ ist bei neutralem pH unlöslich, löst sich aber im Sauren unter Bildung von CO₂. Während der Hydrolyse von GDL löst sich das Calciumcarbonat mit

Hilfe der freiwerdenden Protonen. Die Anwesenheit von gelösten CO_2 steigert dabei wiederum die Löslichkeit von CaCO_3 erheblich unter der Bildung von Calciumhydrogencarbonat. Calciumhydrogencarbonat puffert wiederum die Lösung, sodass bei einem 2:1 Verhältnis von Calciumcarbonat zu GDL am Ende eine pH-neutrale Lösung erhalten wird. So kann in nur einem Schritt ein pH-neutrales Hydrogel hergestellt werden.

Anmerkung zur Charakterisierungsmethode: Zur Charakterisierung der Calcium-Hydrogele wurden im Gegensatz zu den sauren Hydrogelen nur Kompressionsmessungen und keine Oszillationsrheologie hinzugezogen. Dies ist auf den Herstellungsprozess der ionisch vernetzten Hydrogele zurückzuführen. Da die oben beschriebene Methode A zur Herstellung pH-neutraler Gele ein zweistufiger Prozess ist, eignet sich diese Methode nicht dazu eine *in situ* Gelierung zwischen den Rheometer-Platten durchzuführen. Dies ist allerdings bei rheologischen Messungen Voraussetzung, da sonst kein ausreichender Kontakt zwischen Material und Rheometerplatte hergestellt wird.

Im Gegensatz dazu eignet sich Methode B an sich für eine *in situ* Gelierung auf der Rheometer-Geometrie. Allerdings tritt hier ein anderes Problem auf, nämlich die Entstehung von CO_2 , welches während der Gelierung nicht vollständig aus dem Gel entweichen kann, solange es zwischen den Rheometerplatten fixiert ist. Im Labor wurden die Hydrogele nach Methode B in Petrischalen gegossen, sodass das entstehende CO_2 während der Gelierung nach oben entweichen konnte. Auf dem Rheometer jedoch bleiben in der Mitte des Hydrogels (Rheometergeometrie-Durchmesser: 25mm) Bläschen zurück, die jegliche rheologische Messungen ungültig machen würden.

Aus diesen Gründen beschränkten wir uns bei der Charakterisierung der pH-neutralen Hydrogele auf Kompressionsmessungen (vergleiche **Experimentalteil**). Hierzu wurden die Hydrogele entweder in Petrischalen oder zwischen zwei Glasplatten geliert und anschließend zu Scheiben ausgestanzt und vermessen.

Um die sauren und pH-neutralen Hydrogele angemessen miteinander zu vergleichen, wurden Kompressionstests an beiden durchgeführt und gegenübergestellt. **Bei gleicher Polyurethan-Konzentration (4 wt%) wiesen Calcium-Gele insgesamt deutlich höhere Elastizitätsmodule auf** (Abbildung 40 A). Ein saures Hydrogel bei pH 4 besitzt etwa denselben Elastizitätsmodul wie ein Calcium-Gel bei einer Calciumkonzentration von 10 mM, nämlich 23-25 kPa. Allerdings steigt der E-Modul bei den Calcium-Gelen mit zunehmender Calciumkonzentration signifikant bis zu 134 kPa bei 100 mM CaCl_2 . Wir gehen davon aus, dass **neben den Wasserstoffbrückenbindungen vor allem Salzbrücken zwischen Calciumionen und COOH-Gruppen** eine bedeutende Rolle in der Netzbildung spielen, weswegen Calcium-Gele im Allgemeinen deutlich härter sind als saure Gele.

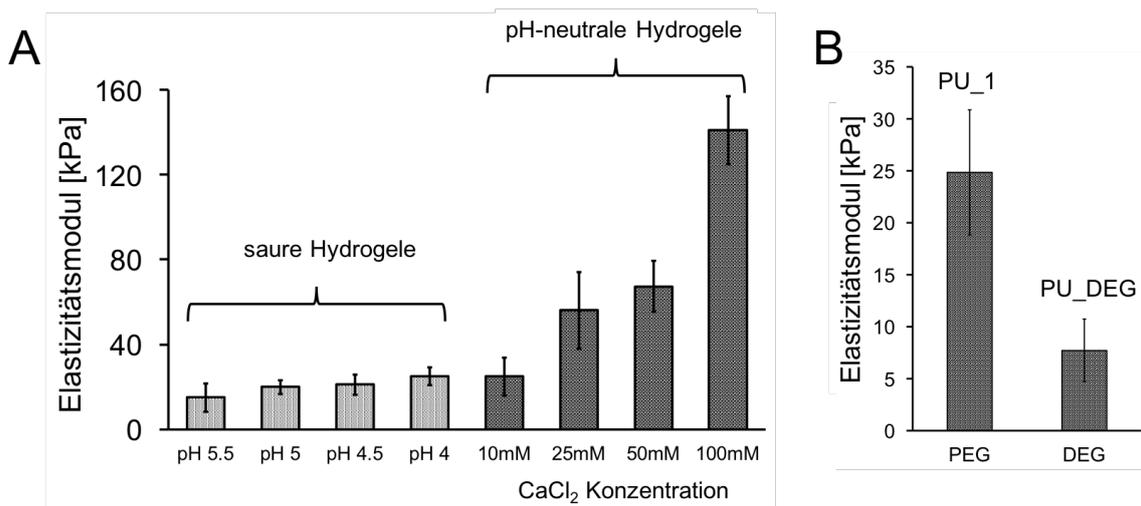


Abbildung 40. E-Module bestimmt durch Kompressionstests von verschiedenen Calcium-Gelen aus 4 wt% PU_1 im Vergleich mit entsprechenden sauren Hydrogelen bei derselben Polymerkonzentration (A), sowie im Vergleich mit einem entsprechenden Hydrogel aus 4 wt% PU_DEG und jeweiliger Calciumkonzentration von 10 mM (B).

Die Rolle der Wasserstoffbrückenbindungen wird allerdings besonders deutlich, wenn man die Rolle der PEG-Einheit näher untersucht. Hierzu wurde das Kontroll-Polyurethan **PU_DEG** synthetisiert, wobei die längere PEG-Einheit durch Diethylenglykol (DEG) ersetzt wurde (**Tabelle 6**). Dabei wurden Anteil und Anzahl der COOH-Gruppen sowie

das allgemeine Diisocyanat-zu-Diol-Verhältnis konstant gehalten. Anschließend wurden zwei Hydrogele mit jeweils 4 wt% Polyurethan-Konzentration und einer CaCl_2 -Konzentration von 10 mM nach Methode A hergestellt und durch Kompressionstests miteinander verglichen (**Abbildung 40 B**).

Während das Hydrogel aus PU_1 einen E-Modul von rund 25 kPa aufweist, besitzt das Hydrogel aus PU_DEG einen E-Modul von nur etwa 8 kPa (jeweils 4 wt%). Dieser Unterschied ist signifikant – und auf den ersten Blick ungewöhnlich. Ausgehend von den chemischen Strukturen beider Polyurethane, würde man erwarten, dass längere PEG-Einheiten im Gegensatz zu kürzeren DEG-Einheiten zu einer erhöhten Flexibilität der Polymerketten führen und damit auch zu einem weicheren oder flexibleren Hydrogel. Doch genau das Gegenteil ist der Fall, was wiederum **den oben diskutierten Gelierungsmechanismus unterstützt** (siehe Kapitel III.1.2).

Während längere PEG-Einheiten durchaus die Flexibilität des Polymers erhöhen, so sind sie als gute Wasserstoffbrücken-Akzeptoren gleichzeitig in der Lage mit den Urethan-Gruppen **koordinative Wasserstoffbrückenbindungen** einzugehen. Koordinative Effekte sind dafür bekannt, dass sie die Stärke einer Wechselwirkung signifikant erhöhen.

Diethylenglykol kann zwar auch Wasserstoffbrücken ausbilden, doch gerade die koordinative Natur der Bindungen, welche nur bei längeren Ketten auftritt, führt zu einer besonderen Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen. Dass ein PEG-haltige Polyurethane einen signifikant höheren E-Modul aufweist als ein entsprechendes DEG-haltiges Polyurethan ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass **Wasserstoffbrückenbindungen die dominierende attraktive Kraft** bei dem hier vorliegenden physikalischen Gelierungsmechanismus spielen.

In Kapitel III.3.1 wurde gezeigt, dass unter den verschiedenen Parametern, welche man variieren kann, der COOH-Gehalt den größten Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der sauren Hydrogele hat. Der COOH-Gehalt korreliert direkt mit der Ladungsdichte und damit mit der abstoßenden Kraft im Gelierungsmechanismus.

Als Gegenspieler dazu tritt die anziehende Kraft der Wasserstoffbrückenbindungen auf, auf welche vor allem die PEG-Einheit einen deutlichen Einfluss hat. Auf diese Weise kann man **durch die chemische Struktur der Polyurethane**, v.a. durch Anteil von COOH und PEG, welchen man während der Synthese leicht variieren kann, **die mechanischen Eigenschaften der resultierenden Hydrogele stark beeinflussen**.

Um die **Stressrelaxation** bei den pH-neutralen Hydrogelen zu untersuchen, wurden die Kompressionstests folgendermaßen durchgeführt (siehe auch Experimentalteil, **Kapitel V.5.5 Kompressionstests**): Zunächst wurden die Hydrogelscheiben bis zu einer Deformation von 15% komprimiert. Anschließend wurde die Deformation konstant gehalten, während der Stressabfall als Funktion der Zeit aufgenommen wurde. Zum Vergleich verschiedener Hydrogele mit verschiedenen Calcium-Konzentrationen wurde der Ausgangsstress bei 15% auf 1 normiert (**Abbildung 41**). Bei 10 mM, 25 mM und 50 mM Calcium-Konzentration verläuft die Stressrelaxation ähnlich mit einer initialen Halbwertszeit von 0,4 - 0,5 s. Bei einer Konzentration von 100 mM CaCl_2 fällt die Kurve flacher ab und die Halbwertszeit verdreifacht sich auf 1,5 s.

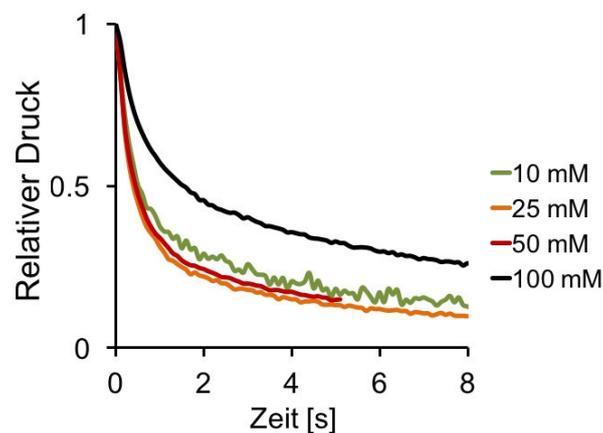


Abbildung 41. Stressrelaxationszeiten von 4 wt% PU_1 Calcium-Gelen bei verschiedenen Calcium-Konzentrationen. Initial-Druck ist auf 1 normiert und entspricht dem Druck bei 15% Deformierung unter Kompression.

Zusammenfassung

- pH-neutrale Hydrogele können mit Hilfe von CaCl_2 (oder anderen divalenten Salzen) hergestellt werden, wobei der E-Modul mit der Salzkonzentration korreliert. Es wurden Hydrogele im Bereich von 25 – 150 kPa (E-Modul) mit Calcium-Konzentrationen von 10 – 100 mM hergestellt.
- pH-neutrale Hydrogele besitzen im Allgemeinen höhere E-Module als saure Hydrogele, was auf die Ausbildung von Salzbrücken zwischen Calciumionen und COOH -Gruppen des Polyurethans zurückgeführt werden kann.
- Die mechanischen Eigenschaften können durch Polyurethan-Konzentration, Salzkonzentration sowie PEG-Gehalt eingestellt werden.
- Die mechanischen Charakterisierungen der Hydrogele unterstützen den oben diskutierten Gelierungsmechanismus; Wasserstoffbrückenbindungen scheinen die Schlüsselkraft bei der Gelierung darzustellen.

III.3.3 ZUSAMMENFASSUNG

Mit den hergestellten Polyurethanen konnten durch Zugabe von Salzen oder durch Zugabe von Säure pH-neutrale bzw. saure (pH 4 - 5,5) Hydrogele hergestellt werden. Die mechanischen Eigenschaften lassen sich durch eine Vielzahl von Parametern steuern: Polymerkonzentration, Salzkonzentration bzw. pH, sowie chemische Struktur des Polymers. Dadurch ließen sich Hydrogele mit E-Modulen zwischen 20 und 150 kPa herstellen, die eine schnelle Stressrelaxation und ein exzellentes Regenerationsverhalten aufwiesen.

Diese Hydrogele könnten verschiedene potentielle Anwendungen im biomedizinischen Bereich haben. Die pH-neutralen Hydrogele sind als Basis-Materialien für *Tissue Engineering* oder als Substrate für Zellverkapselung oder Kultivierung denkbar. Vor allem ihr viskoelastisches Verhalten und ihre Stressrelaxation machen sie zu sehr interessanten Materialien in Hinblick auf Mechanotransduktion (vergleiche Einleitung, **Kapitel II.1.1**).

Saure Hydrogele im pH-Bereich von 5,5 könnten für dermatologische Anwendungen im pH-hautneutralen Bereich nützlich sein. Auch eine Anwendung in der oralen Wirkstoffverabreichung oder als Materialien im Magen-Darm-Trakt wären denkbar.

III.4 MIKROGELE:

HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG

In der Einleitung wurden Mikrogele als interessante Systeme an der Grenze zwischen makromolekularen Materialien und Kolloiden beschrieben (vergl. **Kapitel II.2**). Konventionell werden Mikrogele *in situ* während der Polymerisation hergestellt. Hier stellen wir eine nachträgliche Vernetzung zu physikalischen Mikrogele vor, indem wir **inverse Emulsionen**, d.h. Wasser-in-Öl-Emulsionen, nutzen. Dabei dienen die **Wassertröpfchen als Template für die Mikrogel-Partikel**. Das in diesem Kapitel vorgestellte Projekt wurde von Jan Wallenborn im Rahmen seiner Diplomarbeit untersucht, welche von Mai-Thi Nguyen-Kim und Prof. Alexander Böker direkt betreut und 2014 veröffentlicht wurde.¹²⁷

In Zusammenarbeit mit Jan Wallenborn sowie der Wessling-Gruppe am DWI – Leibniz-Institut für Interaktive Materialien wurden **mikrofluidische Setups** verwendet, um Emulsionen mit **homogenen Tröpfchengrößen** über die sogenannte „droplet-based“ Mikrofluidik zu erhalten. Hier werden nicht-mischbare Phasen über Mikrokanäle zusammengeführt, sodass an Kanalkreuzungen durch Scherkräfte homogene Tröpfchen abreißen. Die Tröpfchengröße kann hierbei durch die Kanalgröße sowie das Einstellen der Fließraten kontrolliert werden. In der Einleitung wurde das interessante Verhalten von Mikrogele in Pickering-Emulsionen beschrieben, d.h. die Stabilisierung von Emulsionen durch weiche Mikrogele anstatt harter Partikel. Insbesondere in diesem Kontext ist die Herstellung uniformer Tröpfchengrößen und damit die Herstellung uniformer Mikrogele sehr interessant.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Mikrofluidik-Devices genutzt, nämlich selbst gebaute Glas-Devices, die von Jan Wallenborn hergestellt wurden (siehe **Kapitel V.4.1**) und PDMS-Devices (Polydimethylsiloxan-Devices), die mit Photomasken

(von der Arbeitsgruppe Wessling) hergestellt wurden. Bei beiden Setups wurde das in **Abbildung 42** dargestellte Prinzip verfolgt.

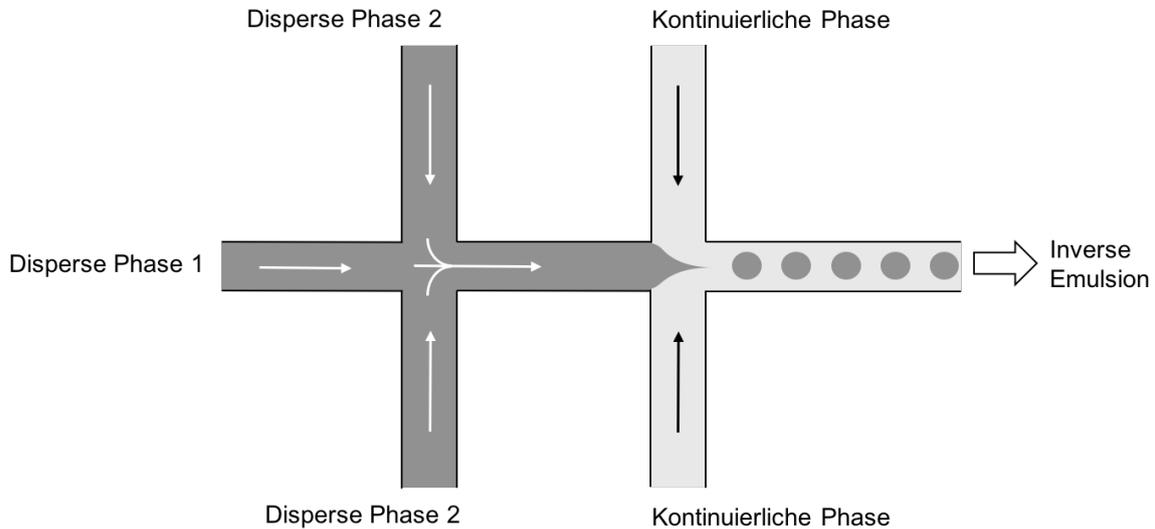


Abbildung 42. Schematische Darstellung des Prinzips des hier verwendeten Mikrofluidik-Setups. Zwei wässrige, disperse Phasen, zum einen die Polyurethan-Lösung, zum anderen die GDL-Lösung, werden zunächst kombiniert und treffen dann auf die kontinuierliche Ölphase, wodurch inverse Emulsionen entstehen.

Zunächst wurden in einem ersten Schritt PU_1-Lösung und GDL-Lösung innerhalb des Mikrofluidik-Systems kombiniert. Diese gemischte wässrige Phase stellt die disperse Phase dar, die an einer zweiten Kreuzung auf die organische Öl-Phase trifft, sodass eine inverse Wasser-in-Öl-Emulsion entsteht.

Der genaue Aufbau der beiden Devices ist in **Abbildung 43** bzw. **Abbildung 46** dargestellt.

Die beiden genutzten Devices haben verschiedene Vor- und Nachteile. PDMS Devices besitzen Kanäle in einer deutlich kleineren Größenordnung (20-40 μm im Gegensatz zu 0,7 – 1,22 mm bei Glas-Devices), sodass damit auch kleinere Mikrogele hergestellt werden können. Darüber hinaus können durch die lithografische Technik eine Vielzahl verschiedener Kanalmuster erhalten werden, wodurch PDMS Devices deutlich breiter eingesetzt werden können. Bei der sogenannten „droplet-based“ Mikrofluidik, die hier

angewendet wird, handelt es sich allerdings um einen simplen Aufbau, der auch leicht mit selbst gebauten Glas-Devices erstellt werden kann (siehe **Kapitel V.4.1**). Der Vorteil der Glas-Devices ist die höhere Stabilität gegenüber äußeren Einflüssen wie etwa Erschütterungen im Raum. Darüber hinaus vereinfacht die Größenordnung der Tröpfchen (20 – 80 μm) eine lichtmikroskopische Analyse. Für spätere Anwendungen sind kleinere Mikrogele interessanter; da wir hier aber noch am Anfang der Untersuchungen stehen und zunächst das Prinzip verifizieren möchten, ist eine vereinfachte Analytik ein großer Vorteil. Daher begannen unsere Experimente mit den selbst gebauten Glas-Devices und wurden anschließend mit PDMS-Devices wiederholt.

III.4.1 MIKROGELE VIA GLAS-DEVICES

Die in dieser Arbeit verwendeten Glas-Devices wurden von Jan Wallenborn in Eigenherstellung zur Verfügung gestellt. Der genaue Aufbau ist in **Abbildung 43** dargestellt und im Experimententeil (**Kapitel V.4.1**) detailliert beschrieben.

In der Mikrofluidik kann die Tröpfchengröße durch Größe und Verhältnis der Fließraten eingestellt werden. Hier konnten wir beim Variieren der Fließraten zwei verschiedene Verhältnisse finden, bei denen eine stabile Tröpfchenformation zu beobachten war (siehe **Tabelle 3**). Bei unstablen Konditionen kam es zu unterschiedlichen Tröpfchengrößen über die Zeit. Die Emulsionen wurden in einem Auffangbehälter gesammelt und die Größen der Mikrogelpartikel wurden anschließend lichtmikroskopisch ausgewertet (siehe **Abbildung 44** und **Abbildung 45**).

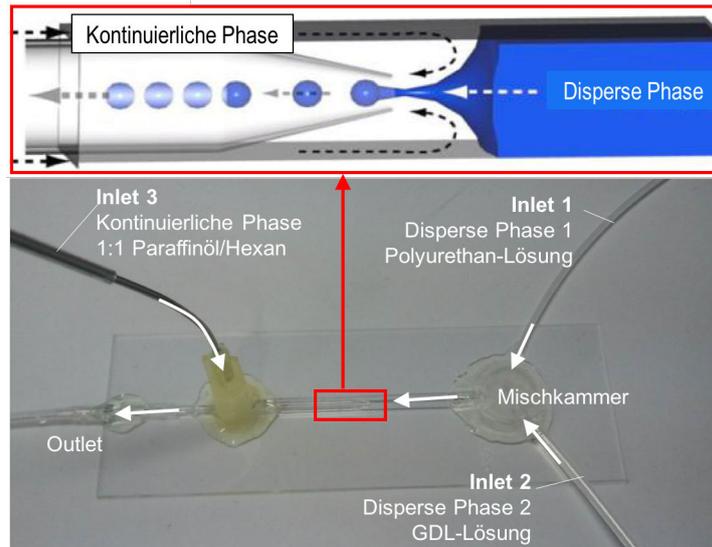


Abbildung 3.¹²⁷ Aufbau und Fließprinzip des Glas-Devices. Nachdem die beiden dispersen Phasen in eine runde Mischkammer eingeführt werden, treffen sie zusammen auf die kontinuierliche Ölphase, die über Inlet 3 zugeführt wird. Die Entstehung der inversen Emulsion ist in der Vergrößerung (roter Kasten) schematisch dargestellt. Im Outlet wird die Emulsion aufgefangen.

Tabelle 3.¹²⁷ Fließraten und Tröpfchengrößen innerhalb der Glas-Devices.

Disperse Phase 1	Disperse Phase 2	Kontinuierliche Phase	Tröpfchengröße
4 wt% PU_1 in HEPES Puffer (pH 7,4)	Glucono- δ -lacton in Wasser, 0,5 g/mL	1:1 Hexan/Paraffinöl	
0,254 mL/h	0,026 mL/h	1,00 mL/h	52,5 \pm 1,8
0,136 mL/h	0,014 mL/h	1,50 mL/h	17,5 \pm 1,0

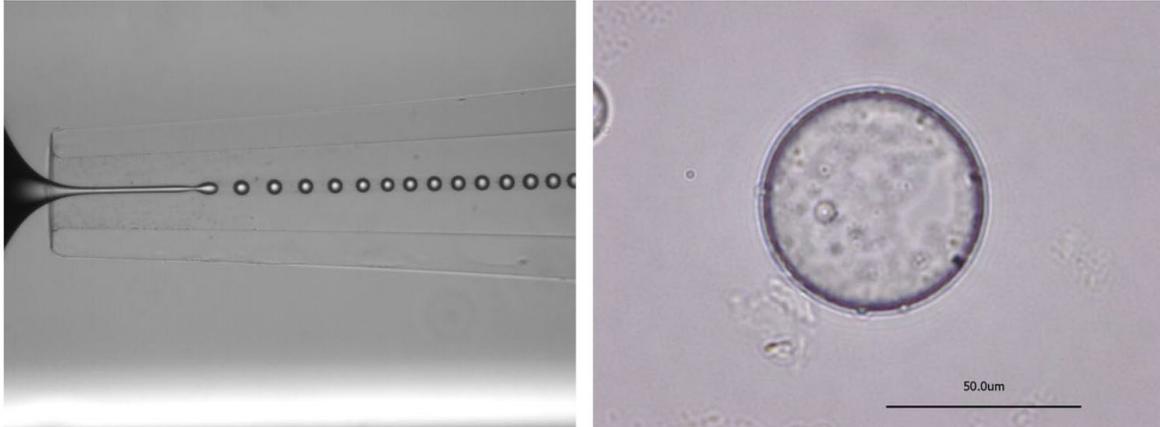


Abbildung 44.¹²⁷ Tröpfchenerzeugung in Glas-Devices bei einer Fließrate von 1 mL/h der kontinuierlichen Phase und einer Fließrate von 0,28 mL/h der dispersen Phase.

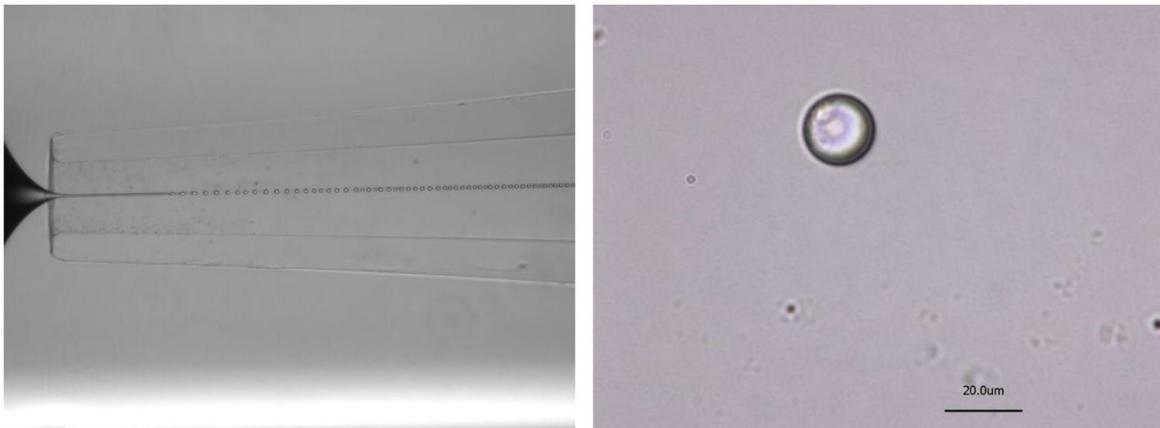


Abbildung 45.¹²⁷ Tröpfchenerzeugung in Glas-Devices bei einer Fließrate von 1,5 mL/h der kontinuierlichen Phase und einer Fließrate von 0,15 mL/h der dispersen Phase.

Eine Isolierung der Partikel stellt sich als schwierig heraus, da die Mikrogele mit der Zeit auf den Boden absanken und zusammenklebten. Da es sich um physikalische Hydrogele handelt, können auch interpartikuläre Vernetzungen auftreten. Eine kleinere Tröpfchengröße und damit kleinere Mikrogelegröße könnte zu einer besseren Dispergierung der Partikel führen.

III.4.2 MIKROGELE VIA PDMS-DEVICES

Polydimethylsiloxan (PDMS) ist ein nicht-toxisches, chemisch inertes, viskoelastisches Polymermaterial, welches im Alltag häufig und vielseitig verwendet wird. Hier nutzen wir das PDMS als Host-Material für die mikrofluidischen Kanäle. Als Kanaldesign nutzen wir bei den PDMS-Devices eine Vorlage für sogenannte Double-Droplet-Maker, welche normalerweise für dreiphasige Systeme genutzt werden, wo Doppelemulsionen nach dem Tröpfchen-in-Tröpfchen-Prinzip hergestellt werden können (siehe **Abbildung 46**). Die Gitter, welche jeweils direkt nach den Inlet-Löchern folgen, haben die Aufgabe Verschmutzungen oder Staub abzufangen.

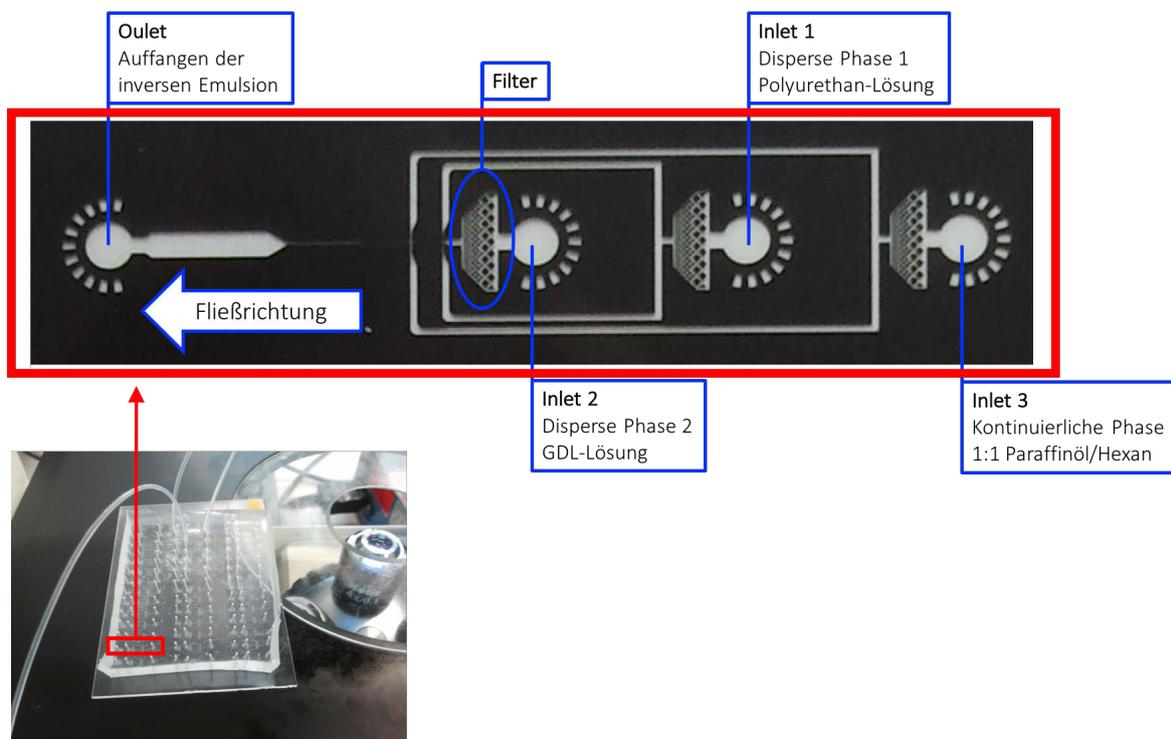


Abbildung 46.¹²⁷ Aufbau der PDMS-Devices. Dieses Kanal-Setup wurde als Master-Form zur Herstellung der PDMS-Devices (Foto unten) genutzt, vergleiche auch **Kapitel V.4.2, Abbildung 49**.

Während beim Glas-Device Polymerlösung und GDL-Lösung zunächst in einer Mischkammer vermischt und dann zusammen als disperse Phase in die Kanäle eingeführt wurden (vergleiche **Abbildung 43**), werden die beiden wässrigen Phasen nacheinander dem System zugeführt (siehe **Abbildung 46**). Durch Inlet 1 wird die

Polyurethan-Lösung eingeführt, die an der ersten Kreuzung auf die GDL-Lösung trifft, welche durch Inlet 2 eingeführt wird. Zusammen bilden sie die disperse wässrige Phase, welche an der zweiten Kreuzung auf die kontinuierliche Öl-Phase trifft, die durch Inlet 3 eingeführt wird. Dort reißen durch die auftretenden Scherkräfte homogene Wassertröpfchen ab, sodass die inverse Emulsion entsteht.

Leider beobachteten wir bei der Nutzung der PDMS Devices eine Verstopfung der Kanäle durch Gelierung innerhalb des Systems (siehe **Abbildung 47**).

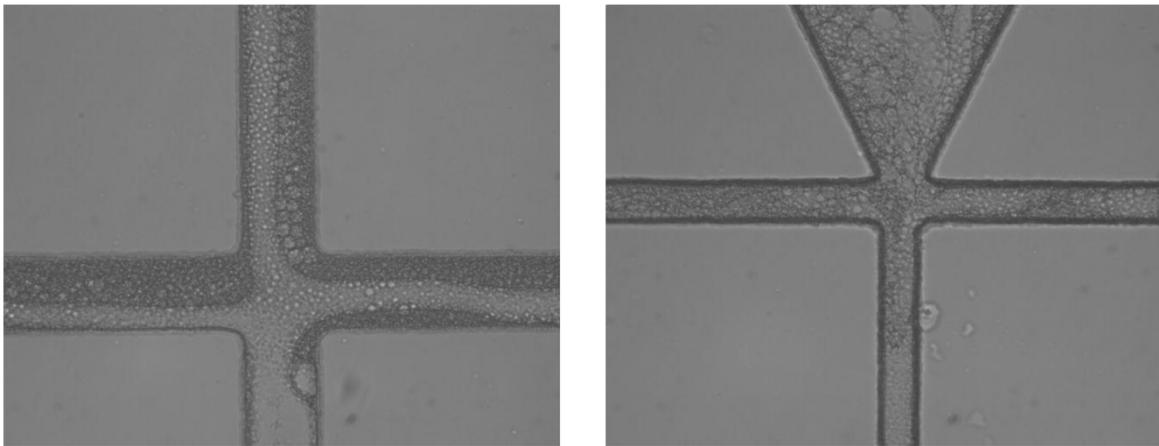


Abbildung 47.¹²⁷ Vorzeitige Gelierung innerhalb der Kanäle des PDMS-Devices.

Dies kann verschiedene Gründe haben. Zunächst könnte die Mischung der beiden wässrigen Lösungen, also der Polymerlösung und der GDL-Lösung, unvollständig verlaufen. Im Vergleich zum Glas-Device, wo die beiden Lösungen in einer größeren Mischkammer zusammenkommen, treffen sie hier nach sehr kurzem Abstand auf die kontinuierliche Phase, wo das Gemisch in Tröpfchen abgerissen wird (siehe **Abbildung 46**). Dadurch kommt es nicht nur zu einer schlechteren Vermischung, sondern auch zu lokal erhöhten GDL-Konzentrationen. Hinzu kommt, dass wir – im Gegensatz zu den Bulk-Gelen – keine GDL-DMSO-Lösung, sondern eine GDL-Wasserlösung verwenden. Die Verwendung des organischen Lösungsmittels DMSO, bzw. zu großer Mengen an DMSO, würde die Emulsion destabilisieren. In Wasser unterliegt GDL hingegen der Hydrolyse, sodass der pH-Wert schon zu sinken beginnt, bevor die Lösung ins System

eingeführt wird. Wie wir bei den Bulk-Gelen beobachtet haben, läuft die Gelierung sehr rapide ab, sobald ein pH-Wert von 5,5 erreicht wird. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Gelierung innerhalb der Kanäle durch einzelne lokal erhöhte Säurekonzentrationen ausgelöst wird.

Dies könnte auch teilweise innerhalb der Glas-Devices auftreten, allerdings könnte das bei den Kanaldurchmessern von 0,7 – 1,22 mm zu keiner Verstopfung führen. Die Kanäle der PDMS Devices haben einen Durchmesser von 40 μm , bzw. teilweisen Verengungen von 20 μm vor den Kreuzungen, sodass vorzeitige Gelierungen hier deutlich schneller zu Verstopfungen führen können.

Darüber hinaus sind die Fließraten entsprechend der Kanaldurchmesser geringer, und auch die Filtergitter führen dazu, dass die Experimente länger dauern als bei den Glas-Devices. Auch das bedeutet in Hinblick auf die GDL-Hydrolyse einen tieferen pH, der die Gelierung auslösen könnte.

III.4.3 ZUSAMMENFASSUNG

Über die Herstellung inverser Emulsionen konnten wir Wassertröpfchen als Template für Mikrogele nutzen. Die Herstellung ist derzeit zunächst auf Mikrogele im Bereich von 17 – 53 μm beschränkt; eine Realisierung kleinerer Partikel wäre wünschenswert. Die Verwendung von PDMS-Devices, welche mit kleineren Kanälen die Herstellung von Partikeln im Bereich von 10-50 μm versprechen, konnte bisher nicht genutzt werden, da durch frühzeitige Gelierung innerhalb des Systems die Kanäle verstopft wurden.

Für zukünftige Experimente wäre ein Ansatz über konventionelle Emulsions-Methoden interessant, z.B. durch die konventionelle Verwendung eines Ultraschall-Stabs oder auch durch Verwendung eines *Microfluidizers*, welcher durch Hochdrücke Tröpfchen unterhalb von 10 μm herstellen könnte. So könnte man schneller arbeiten, um der Hydrolyse von GDL vor der Herstellung der Emulsion entgegenzuwirken. Der Nachteil wäre die Entstehung heterogener Tröpfen- und Partikelgrößen; diese könnte man allerdings z.B. zentrifugisch auftrennen.

Konventionell werden Mikrogele *in situ* synthetisiert und sind entsprechend auch chemische Gele. Die Möglichkeit, physikalische Mikrogele durch nachträgliche Vernetzung herzustellen (die Vorteile physikalischer Hydrogele für biologische Anwendungen wurden oben mehrfach genannt), ist sehr spannend, etwa im Hinblick auf *in situ* Verkapselung von Zellen oder anderen biologischen Anwendungen und sollte in Zukunft näher untersucht werden.

Wie oben erwähnt ist dieses Projekt Teil der Diplomarbeit von Jan Wallenborn, die von Mai-Thi Nguyen-Kim und Prof. Alexander Böker direkt betreut wurde. Nähere Details finden sich in der Ausfertigung „Responsive Microgel Particles via Microfluidics“.¹²⁷

IV ZUSAMMENFASSUNG & AUSBLICK

Physikalische Hydrogele sind vielversprechende Materialien für regenerative Medizin oder *Tissue Engineering*, da sie im Gegensatz zu chemischen Hydrogelen für *in situ* Anwendungen in sensitiver biologischer Umgebung geeignet sind. Darüber hinaus sind sie viskoelastische Materialien, was sie zu interessanten Substraten für Zellkultivierung macht. Durch ihre stressrelaxierenden Eigenschaften könnten Zellwachstum und -entwicklung gezielt über Mechanotransduktion kontrolliert und gesteuert werden.

In dieser Dissertationsarbeit wurde das Design und die Herstellung einer neuen Klasse von Polyurethanen vorgestellt, die sich durch Zugabe von Salzen oder durch Regulierung des pH-Wertes zu physikalischen Hydrogelen vernetzen lassen. Der zu Grunde liegende Gelierungsmechanismus wurde in ähnlicher Form bisher noch bei keinem synthetischen Polymer beobachtet.

Die hier vorgestellten Polyurethane besitzen die intrinsische Neigung durch starke Wasserstoffbrückenbindungen makromolekulare Netzwerkstrukturen auszubilden; in Wasser wird dies auf die Ausbildung löslicher Nanoaggregate beschränkt, die durch Ladungsabstoßung zwischen den ionischen Polymeren in Lösung gehalten werden. Durch Ladungsabschirmung, sei es durch Zugabe von Salzen oder von Säure, wird eine schnelle Gelierung induziert. Auf diese Weise wurden in dieser Arbeit pH-neutrale und saure (pH 4 – 5,5) Bulk-Gele sowie Mikrogele hergestellt. Letztere wurden anhand inverser Emulsionen dargestellt, indem die Wassertröpfchen der Emulsion als Template für die Mikrogelepartikel genutzt wurden.

Die mechanischen Eigenschaften lassen sich durch eine Vielzahl verschiedener Parameter einstellen: Polymerkonzentration, Salzkonzentration, pH sowie die chemische Zusammensetzung der Polyurethane. Letzteres ist besonders interessant aus Sicht eines Polymerchemikers, da sich die mechanischen Eigenschaften der resultierenden Hydrogele durch den Anteil der COOH-Gruppen sowie die Kettenlänge der PEG-Einheit dramatisch variieren lassen. Durch Veränderung der Monomeranteile könnte man so auf einfachem Wege unter Anwendung derselben Syntheseroute eine Bibliothek verschiedener Polyurethane herstellen, die zu Hydrogelen mit sehr unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften vernetzt werden könnte.

Da es sich bei der hier vorgestellten Forschung sowohl um eine neue Polymerklasse als auch um einen neuartigen Gelierungsmechanismus handelt, stellt diese Abhandlung eine erste Analyse dar, die in Zukunft in verschiedene Richtungen weiter vertieft werden kann. Einige potentielle Anwendungsbereiche sind für diese Hydrogele denkbar: Die bisherigen Ergebnisse lassen auf eine Anwendung der pH-neutralen Bulk-Gele im Bereich *Tissue Engineering* hoffen, auf welchen das gesamte Konzept dieser Arbeit vorrangig abzielte. Die sauren Hydrogele könnten im Bereich der oralen Wirkstoffverabreichung oder bei pH 5,5 in dermatologischen Anwendungen genutzt werden. Die Mikrogele wiederum könnten interessante weiche Bauteile darstellen oder als Stabilisatoren für Pickering-Emulsionen untersucht werden.

V EXPERIMENTALTEIL

Anmerkung: Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden bei Sigma-Aldrich erworben und – falls nicht anders beschrieben – ohne weitere Aufreinigung verwendet.

V.1 SYNTHESE VON D(+)-CELLOBIOSE-HEXAACETAT (CELL-6OAC)

Das Cellobiose Monomer erhielten wir durch eine modifizierte Synthese nach Kahn et al.¹²¹ 15 g Cell-(8OAc) wurden unter Ultraschallbehandlung in 150 mL Acetonitril gelöst. Nachdem die Lösung mit einem Eisbad auf 0 °C gekühlt wurde, wurden 12 mL 24-26% Hydrazinhydrat-Lösung unter Rühren hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend weitere 20 Stunden bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines Überschusses an Ionentauscherharz Amberlite IR-120 beendet. Nach 10 Minuten Rühren wurde das Ionentauscherharz durch Filtration abgetrennt.

Acetonitril und Wasser wurden am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produktgemisch von D(+)-Cellobiose-heptaacetat (Cell-7OAc), D(+)-Cellobiose-hexaacetat (Cell-6OAc) und D(+)-Cellobiose-pentaacetat (Cell-5OAc) wurde anschließend über Nacht am Hochvakuum getrocknet.

Das Diol D(+)-Cellobiose-hexaacetat (Cell-6OAc) wurde durch Säulenchromatografie isoliert. Auf Silicagel und mit einem Eluenten-Gradienten von 2:3 bis 3:2 Aceton/Hexan-Gemisch wurden die drei Produkte aufgetrennt. Cell-7OAc wurde für weitere Synthesen von Cell-6OAc wiederverwendet. Cell-5OAc wurde verworfen.

V.2 POLYURETHANSYNTHESE

In dieser Dissertationsarbeit wurden fünf verschiedene Polyurethane hergestellt (siehe **Abbildung 48**). Die Substrate für die Synthesen aller Polyurethane (PU_1, PU_COOH-14, PU_DEG, PU_SS, PU_kat) sind in den **Tabellen 4-8** aufgelistet. Alle Synthesen wurden nach der folgenden allgemeinen Synthesevorschrift hergestellt.

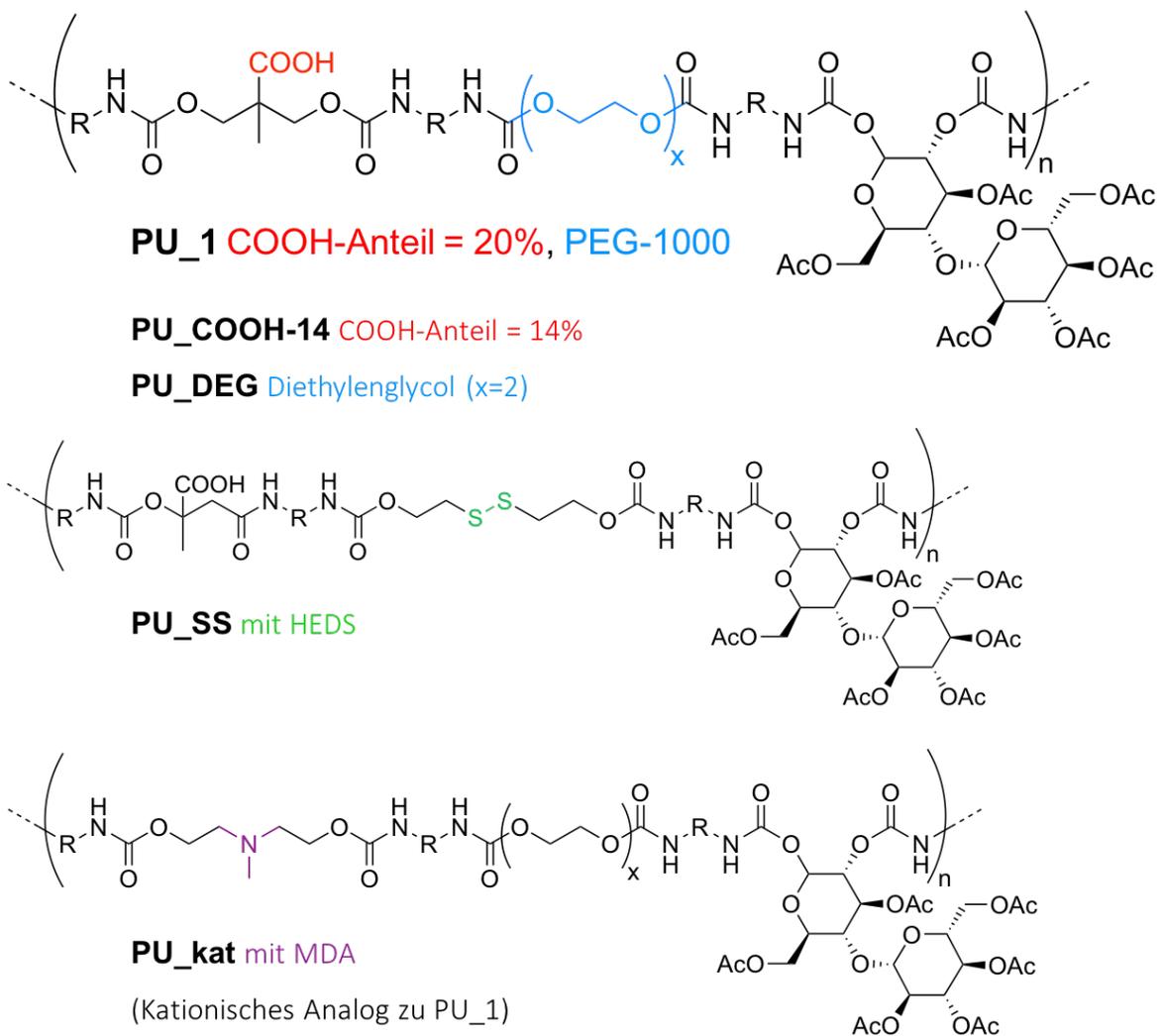


Abbildung 48. Übersicht der Polyurethane.

Alle Feststoffe wurden vor der Synthese über Nacht unter Hochvakuum getrocknet. Die Synthese wurde anschließend vollständig unter Schutzgasatmosphäre und unter Ausschluss von Feuchtigkeit durchgeführt.

Cell-6OAc **(1)** wurden in 1 mL wasserfreiem NMP unter Ultraschallbehandlung gelöst und unter Rühren auf 75 °C erhitzt. IPDI **(2)** wurde hinzutropft, wobei die Geschwindigkeit des Zutropfens so eingestellt wurde, dass eine Reaktionstemperatur von 80 °C nicht überschritten wurde. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktionslösung für 5 Stunden bei 75 °C gerührt.

DMPA (MDA bei PU_kat) **(3)** wurden in 0,5 mL in wasserfreiem NMP unter Ultraschallbehandlung gelöst und anschließend der Reaktionslösung zugetropft. 4 mg trockenes DABCO wurden als Katalysator hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde daraufhin 12 Stunden bei 75 °C gerührt.

Anschließend wurden PEG 1000 (DEG bei PU_DEG bzw. HEDS bei PU_SS) **(4)** (zuvor auf 60°C erhitzt) und weitere 4 mg DABCO der Reaktionslösung hinzugefügt. Nach weiteren 5 Stunden unter Rühren und bei 75 °C wurde die Reaktion durch Hinzugabe von einem Überschuss an Ethanol gequencht und für weitere 30 Minuten bei 75 °C gerührt.

Nachdem die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde sie mit Ethanol verdünnt und tropfenweise in Wasser ausgefällt. Das Polymer wurde durch Zentrifugieren (12000 U/min) abgetrennt und in destilliertem Wasser redispergiert. Unter Rühren wurde verdünnte NaOH Lösung (HCl bei PU_kat) tropfenweise hinzugefügt, bis eine klare Lösung bei neutralem bis leicht basischen pH (pH 7-8) (bei PU_kat pH 6-7) entstand. Die Lösung wurde 3 Tage lang dialysiert (MWCO = 3500 Da) und anschließend gefriergetrocknet.

Die Polyurethane wurde durch FTIR-Transmissionsspektroskopie und GPC (Gelpermeationschromatografie) charakterisiert (siehe **Kapitel III.2.6**).

Tabelle 4. Substratübersicht der Synthese von PU_1.

	Eintrag	M (g/mol)	ρ (g/mL)	eq	n (mmol)	m (mg)	V (μ L)
Cell-6OAc	1	594,6	-	1	0,992	590	-
IPDI	2	222,3	1.049	5,27	5,229	1162	1108
DMPA	3	134,1	-	4	3,969	532	-
PEG	4	1000	1,093 (60 °C)	0,27	0,268	268	245

Tabelle 5. Substratübersicht der Synthese von PU_COOH-14.

	Eintrag	M (g/mol)	ρ (g/mL)	eq	n (mmol)	m (mg)	V (μ L)
Cell-6OAc	1	594,6	-	1	1	595	-
IPDI	2	222,3	1.049	3,2	3,2	734	699
DMPA	3	134,1	-	2	2	268	-
PEG	4	1000	1,093 (60 °C)	0,2	0,2	200	183

Tabelle 6. Substratübersicht der Synthese von PU_DEG.

	Eintrag	M (g/mol)	ρ (g/mL)	eq	n (mmol)	m (mg)	V (μ L)
Cell-6OAc	1	594,6	-	1	1	595	-
IPDI	2	222,3	1.049	6	6	1331	1271
DMPA	3	134,1	-	4	4	536	-
DEG	4	106,1	1,118	1	1	106	95

Tabelle 7. Substratübersicht der Synthese von PU_SS.

	Eintrag	M (g/mol)	ρ (g/mL)	eq	n (mmol)	m (mg)	V (μ L)
Cell-6OAc	1	594,6	-	1	1	595	-
IPDI	2	222,3	1,049	4	4	934	890
DMPA	3	134,1	-	2	2	282	-
HEDS	4	154,3	1,261	1	1	154	122

Tabelle 8. Substratübersicht der Synthese von PU_kat.

	Eintrag	M (g/mol)	ρ (g/mL)	eq	n (mmol)	m (mg)	V (μ L)
Cell-6OAc	1	594,6	-	1	0,992	590	-
IPDI	2	222,3	1,049	5,27	5,229	1162	1108
MDA	3	119,2	1,04	4	3,969	473	455
PEG	4	1000	1,093 (60 °C)	0,27	0,268	268	245

V.3 HERSTELLUNG DER HYDROGELE

V.3.1 Herstellung saurer Bulk-Gele

Herstellung der Pufferlösung: 2,38 g 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) wurden in 80 mL Wasser gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert durch Zugabe von konzentrierter NaOH Lösung auf pH 7,4 eingestellt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 mL aufgefüllt.

10 mg Polyurethan wurden in 0,5 mL HEPES Puffer gelöst. 50 μ L Glucono- δ -lacton-Lösung (0,5 mg/mL in DMSO) wurden vorsichtig hinzugemischt; die Bildung von Bläschen wurde möglichst vermieden. Die Vernetzung zum Hydrogel fand anschließend innerhalb von 5 Stunden statt.

V.3.2 Herstellung pH-neutraler Bulk-gele

Methode A: Saure Hydrogele wurden nach der oben beschriebenen Methode hergestellt. Anschließend wurden die Gele in einer 0,1 M CaCl₂ Lösung (HEPES Puffer, pH 7,4) equilibriert, wobei die Pufferlösung mehrmals ausgewechselt wurde, bis ein neutraler pH im Gleichgewicht erreicht wurde.

Methode B: 20 mg Polyurethan wurden in 0,5 mL HEPES Puffer (pH 7,4) gelöst. 25 μ L einer 10 wt% CaCO₃ Dispersion (in Wasser) und 43 μ L GDL Lösung (0,5 g/mL in DMSO) wurden hinzugefügt und vorsichtig gemischt, ohne dass Blasen entstanden. Die Vernetzung zum Hydrogel fand innerhalb 30 Minuten statt.

V.4 HERSTELLUNG VON MIKROGELEN

Mikrogele wurden anhand von Wasser-in-Öl-Emulsionen (inverse Emulsionen) mit Hilfe von zwei verschiedenen mikrofluidischen Setups hergestellt.

V.4.1 Herstellung der Glas-Devices

Vorbereitung der Kapillaren. Zur Herstellung der Glas-Devices wurden runde Glaskapillaren (Innendurchmesser: 0,70 mm; Außendurchmesser: 1,20 mm) und quadratische Glaskapillaren (Innendurchmesser: 1,22 mm; Außendurchmesser: 1,50 mm) verwendet.

Das Ende der runden Glaskapillare wurde zunächst unter Erhitzen zu einer Spitze gezogen und an Schmirgelpapier wieder abgetragen, sodass eine Spitzenöffnung von 200 μm entstand.

Die runden und quadratischen Glaskapillaren wurden anschließend zur Reinigung eine Stunde lang in Piranha-Lösung (7:3 Gemisch von 98% H_2SO_4 und 30% H_2O_2) eingelegt. Nach sorgfältigem Abspülen mit Wasser und Aceton wurde die Glaskapillaren beschichtet, indem sie in einem 1:1 Gemisch von (Heptadecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrodecyl)trimethoxysilan und Aceton eingelegt wurden. Nachdem überschüssige Silan-Lösung wurde mit Aceton abgespült wurde, wurden die Kapillaren über Nacht im Exsikkator getrocknet.

Montage. Die Rundkapillare wurde mit der Spitze zuerst in die quadratischen Kapillare eingeführt und mit Hilfe von Epoxykleber auf einem Glasobjektträger fixiert (siehe **Abbildung 43**). Als Inlet für die kontinuierliche Phase wurde eine konventionelle Spritzenkanüle verwendet. Als Doppel-Inletkammer und gleichzeitig Mischkammer für beide Disperse Phasen (Polymerlösung und GDL-Lösung) wurde eine runde Plastikplatte (Durchmesser 1 cm) zugeschnitten, um die Kapillare und 2 Polyethylenschläuche zu

umfassen und ebenfalls mit Epoxykleber auf dem Objektträger fixiert (siehe **Abbildung 43**). Weitere Details sind in der Diplomarbeit „Responsive Particles via Microfluidics“ nachzulesen.¹²⁷

V.4.2 Herstellung der PDMS Devices

PDMS wurde auf eine lithografisch geprägte Maske gegossen, welche von der Arbeitsgruppe Wessling am DWI – Leibniz-Institut für Interaktive Materialien zu Verfügung gestellt wurde, und anschließend vernetzt. Die allgemeine Herstellungsweise ist in **Abbildung 49** dargestellt, das in dieser Arbeit genutzte Flow-Setup ist in **Abbildung 50** gezeigt. Es wurde das Setup für einen Double-Droplet-Maker verwendet, um zunächst die Polymerlösung ins System einzuspeisen und erst in den Channels mit der GDL-Lösung zu vermischen.

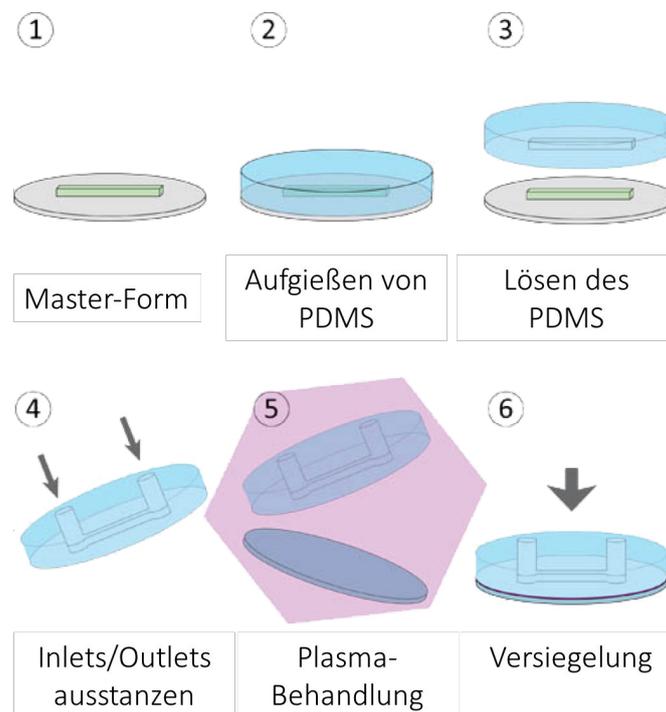


Abbildung 50.¹²⁸ Schematische Darstellung der Herstellung von PDMS Mikrofluidik-Devices.

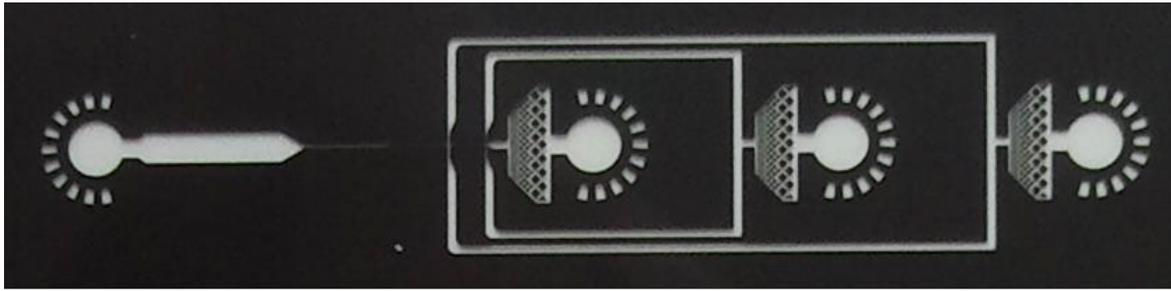


Abbildung 51.¹²⁷ Muster der PDMS-Kanäle, vergleiche hierzu auch **Abbildung 46**.

Die Kanaldurchmesser der hier verwendeten Devices betragen $40\ \mu\text{m}$, bzw. $20\ \mu\text{m}$ an Verengungen, die vor den Kreuzungen eingeführt wurden. Die Photomaske wurde in einer Petrischale fixiert, welche mit PDMS bis zu einer Höhe von 1-1,5 cm begossen wurde. Nach vollständiger Polymerisation wurde der Kanal-Bereich großzügig ausgeschnitten und vorsichtig mit einer Pinzette entfernt. Inlets und Outlets wurden anschließend manuell ausgestanzt (Durchmesser: 0,75 mm). Um die PDMS-Schicht auf einem Glas-Objektträger zu fixieren, wurden beide für 30 Sekunden bei 20 Watt im Sauerstoffplasma behandelt und in unmittelbarem Anschluss zügig aufeinander geklebt. Um die Verträglichkeit mit organischen Lösungsmitteln zu erhöhen, wurden die PDMS-Devices von Heicks Parylene Coating GmbH mit Parylen-C beschichtet.

Weitere Details zur Herstellung der PDMS Devices sind in der Diplomarbeit „Responsive Particles via Microfluidics“ nachzulesen.¹²⁷

V.4.3 Herstellung der Emulsionen

Für die Herstellung der inversen Emulsionen wurden für beide Devices folgende Bedingungen gewählt:

Wässrige Phase 1 (Disperse Phase): 4 wt% PU_1 in HEPES Puffer (pH 7,4)

Wässriger Phase 2 (Disperse Phase): 0,5 g/mL Glucono- δ -lacton in Wasser

Öl-Phase (Kontinuierliche Phase): 1:1 Paraffinöl/Hexan Gemisch

Emulgator: Abil[®] EM 90 (1 wt%)

Flowrates der kontinuierlichen und dispersen Phase wurden zur Herstellung verschiedener Tröpfchengrößen variiert (siehe **Tabelle 3**). Wässriger Phase 1 und 2 wurden in beiden Fällen erst im Device kombiniert und eine vorzeitige Gelierung außerhalb des Devices zu vermeiden.

Weitere Details zur Herstellung der Emulsionen sind in der Diplomarbeit „Responsive Particles via Microfluidics“ nachzulesen.¹²⁷

V.5 ANALYTISCHE METHODEN

V.5.1 FTIR-Spektroskopie

FTIR-Spektroskopie wurde mit einem Thermo Nicolet FT-IT Spektrometer im ATR Modus (Smart Endurance ATR Unit) durchgeführt. Spektren wurden von $4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$ aufgenommen mit einer Auflösung von $0,48 \text{ cm}^{-1}$ und 32 Scan-Wiederholungen.

V.5.2 Gelpermeationschromatografie GPC

GPC-Messungen wurden mit PSS GRAM 1000 A Guard Säulen ($8 \times 50 \text{ mm} + 300 \times 7,5 \text{ mm} + 300 \times 7,5 \text{ mm}$) und einer PSS GRAM 30 A ($300 \times 7,5 \text{ mm}$) durchgeführt. Als Eluent wurde DMF mit 0,1% LiBr gewählt mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min bei einer Messtemperatur von $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

V.5.3 Dynamische Lichtstreuung DLS

Dynamische Lichtstreuung wurde mit Hilfe eines Malvern Zetasizer Nano ZS im Winkel von 90° und bei einer Temperatur von $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. pH-abhängige Messungen wurden manuell und einzeln durchgeführt.

V.5.4 Oszillations-Rheologie

Rheologische Messungen wurden an dem Scherrheometer Anton Paar Physica MCR 301 im oszillierenden Modus und einer Platte-Platte-Geometrie (Gap: 1 mm , Plattendurchmesser 25 mm) gemessen. Rheologische Messungen wurden bei sauren Hydrogelen durchgeführt, deren Probenvorbereitung wie oben beschrieben vorbereitet wurden. Polyurethanlösungen in HEPES Puffer wurden mit verschiedenen Konzentrationen vorbereitet ($2 - 10 \text{ wt\%}$) und mit $30-70 \text{ } \mu\text{L}$ GDL Lösung ($0,5 \text{ mg/mL}$ in DMSO) gemischt. Anschließend wurde die Lösung auf die Rheometerplatte aufgetragen (Probenvolumen = $0,5 \text{ mL}$ bei 25 mm Platten) und zwischen den Platten geliert. (Zur Beschleunigung der Gelierung wurden die Platten auf $35 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt, und anschließend

wieder auf 25 °C abgekühlt und equilibriert, bevor die Messungen aufgenommen wurden.)

Die Gelierung wurde über konstante Scheramplitude und -frequenz ($\gamma = 0,1$; $\omega = 0,1$ Hz) beobachtet bis G' und G'' konstant blieben.

Frequency Sweeps wurden bei einer konstanten Scheramplitude von 0,1 und in dem Frequenzbereich von 0,01 – 16 Hz bei 25 °C aufgenommen.

Thixotropie-Messungen wurden durchgeführt, indem das Hydrogelnetzwerk bei 100% Deformation zerstört wurde. Anschließend wurde die Regeneration beobachtet. Dies wurde mehrmals wiederholt.

V.5.5 Kompressionstests

Kompressionstests wurden mit einem Instron 3342 Single-Column Mechanical Tester durchgeführt. Proben wurden vorbereitet, indem 0,5 mL Polyurethan-Lösung (2-10 wt% in HEPES Puffer, pH 7,4) mit 30-70 μ L GDL Lösung (0,5 mg/mL in DMSO) gemischt und zwischen zwei Glasplatten (1-2 mm Abstand) gegossen wurden. Nach Gelierung wurden Hydrogelscheiben von 10 mm Durchmesser ausgestanzt und nachgemessen. Für pH-neutrale Hydrogele wurden die Gelscheiben in 0,1 M CaCl_2 HEPES Lösung (pH 7,4) equilibriert.

Die Hydrogelscheiben wurden bis 15% Deformation komprimiert mit einer Deformationsrate von 1 mm/min. Zur Messung der Stressrelaxation wurde die Deformation konstant bei 15% gehalten, während der abnehmende Druck als Funktion der Zeit aufgenommen wurde.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Cell-6OAcc	D(+)-Cellobiose-hexaacetat
Cell-8OAc	D(+)-Cellobiose-octaacetat
DABCO	1,4-Diazacyclo[2.2.2]octan
DBN	1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-en
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DEG	Diethylenglycol
DMPA	Dimethylpropionsäure (Dimethyl propionic acid)
DMSO	Dimethylsulfoxid
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarot(-Spektroskopie)
GDL	Glucono- δ -lacton
HEDS	2-Hydroxyethyldisulfid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPDI	Isophorondiisocyanat
LCST	Lower Critical Solution Temperature (Untere kritische Lösungstemperatur)
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
MDA	Methyldiethanolamin
PDI	Polydispersitätsindex
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylenglycol
PNIPAM	Poly(N-Isopropylacrylamid)
PU / PUs	Polyurethan / Polyurethane
PolyHEMA	Polyhydroxyethylmethacrylat
WPI	Whey Proteine Isolate (Milchprotein-Isolat)

ABBILDUNGEN & TABELLEN

- Abbildung 1.**³² Prinzip des Tissue Engineering in der Stammzellentherapie. Gewebe wird vom Patienten entnommen (a), um Zellen zu gewinnen, welche zunächst in vitro kultiviert werden (b), bevor sie auf einem dreidimensionalen Templat, wie etwa einem Hydrogel weiter gezüchtet werden (c) (d), sodass das künstliche Gewebe letztendlich wieder in den Patienten transplantiert werden kann (e). 5
- Abbildung 2.** (A) Chemische Struktur von Poly(N-isopropylacrylamid) (PNIPAM). (B) Reversible Phasenübergänge durch Einstellung der Temperatur: Unterhalb der LCST liegt PNIPAM löslich bzw. gequollen vor, oberhalb der LCST liegt es unlöslich bzw. kollabiert vor. 6
- Abbildung 3.**⁶¹ Alginsäure besteht aus Guluronat-Blöcken (G) und Mannuronat-Blöcken (M) (oben). Die G-Blöcke können Calcium nach dem sogenannten Eggbox-Modell komplexieren, sodass durch die Vernetzung ein Hydrogel entsteht (unten). 8
- Abbildung 4.**⁸⁹ Mikrogele verformen sich an Grenzflächen und bilden einen Film, wobei die sphärische Geometrie weiterhin deutlich sichtbar bleibt. 14
- Abbildung 5.**⁹⁰ Kompressions-Isotherme als Funktion des Drucks in Abhängigkeit der Mikrogele-Dichte für P(NIPAM-co-MMA) Mikrogele im geladenen (grau) und ungeladenen Zustand (schwarz). Im Gegensatz zu harten Partikeln lassen sich geladene Mikrogele leichter im Langmuir-Trog zusammenschieben als ungeladene. 15
- Abbildung 6.**⁹¹ Pickering-Emulsion, die mit pH- und temperatur-sensitiven Mikrogele hergestellt wurde. Eine Heptan-in-Wasser-Emulsion kann durch Senken des pH-Wertes und anschließender Erhitzung vollständig gebrochen werden. 16
- Abbildung 7.** Grundreaktionen von Isocyanaten. (a) Urethanbildung mit Alkoholen, (b) Polyurethanbildung mit Diisocyanaten und Diolen, (c) (d) Harnstoff- und Ureabildung mit Aminen, (e) Amidbildung mit Carbonsäuren unter Abgabe von CO₂, (f) Reaktion mit Wasser zu Harnstoff unter Abgabe von CO₂, (g) Trimerisierung von Isocyanaten. 18

Abbildung 8. ¹⁰⁵ Schematische Darstellung von Hartsegmenten (hell) und Weichsegmenten (dunkel) im ungedehnten (links) und gedehnten (rechts) Zustand. Urethaneinheiten stellen die Hartsegmente dar, welche durch ihre kristallinen Eigenschaften eine Härte ins Material einbringen, während eine Brüchigkeit durch flexible Weichsegmente wie etwa Polyethylenoxid-Einheiten verhindert wird.....	19
Abbildung 9. Chemische Struktur von Polyurethan PU_1.....	25
Abbildung 10. ¹¹⁴ Mechanismus der Gelierung von WPI. Kolloidale Partikel bilden eine primäre Struktur, die sich durch weitere Aggregation der Partikel zu einem größeren Netzwerk aufbaut.....	27
Abbildung 11. Prinzip des Gelierungsmechanismus am Beispiel von PU_1. Nach der Synthese in organischen Lösungsmitteln ist PU_1 zunächst nicht in Wasser löslich, sondern bildet stabile Dispersionen (A). Unter Hinzugabe von Base und Deprotonieren der COOH-Gruppen bildet sich eine klare Lösung (B). Durch Hinzugabe von Säure oder von Salzen bildet sich ein Bulk-Gel (C).....	28
Abbildung 12. Übersicht der in dieser Dissertation hergestellten Polyurethane. PU_1 liegt im Fokus dieser Arbeit und stellt den Hauptteil der experimentellen Untersuchungen. PU_COOH-14 und PU_DEG wurden als Kontroll-Polymere synthetisiert, um den Einfluss von COOH-Gehalt sowie Ethylenoxid-Kettenlänge zu untersuchen. PU_SS ist ein redox-aktives Polyurethan mit einem reduktiv spaltbaren Disulfid-Linker. PU_kat ist das kationische Analog zu PU_1, wo das Monomer DMPA durch MDA ersetzt wurde.	34
Abbildung 13. Allgemeines Syntheschema anhand von PU_1.....	35
Abbildung 14. Struktur IPDI.....	36
Abbildung 15. Struktur DMPA.....	37
Abbildung 16. Chemische Strukturen von PEG, DEG und HEDS.....	38
Abbildung 17. Struktur von Cellobiose-Hexaacetat.....	39
Abbildung 18. ¹ H-NMR-Spektren von PU_1 vor (oben) und nach (unten) der Entschützung mit Guanidiniumnitrat und Natriummethanolat. Die Methylgruppen	

der Acetylschutzgruppen erscheinen bei einer chemischen Verschiebung von 2,1 – 1,9 ppm (oben, eingekreist). Nach der Entschützung sind diese Peaks verschwunden, während der Rest des Polymers intakt bleibt.	41
Abbildung 19. Chemische Strukturen, DABCO, DBN und DBU.	42
Abbildung 20. Mechanismus von Katalysator DABCO während der Polyurethan-Synthese.	42
Abbildung 21. Mögliche Nebenreaktionen zwischen DABCO und Cell-6OAc.	44
Abbildung 22. ¹ H-NMR-Spektren von DABCO (blau), Cellobiose-Hexaacetat (grün) und dem Addukt (rot).	45
Abbildung 23. Übersicht über Synthese von PU_1, PU_COOH-14 und PU_DEG.	47
Abbildung 24. Molekulargewichtsverteilung von PU_1 nach GPC.	48
Abbildung 25. FTIR-Spektrum von PU_1.	49
Abbildung 26. Chemische Struktur von Polyurethan PU_SS.	50
Abbildung 27. ¹ H-NMR-Charakterisierung von PU_SS im Vergleich mit den Spektren der eingesetzten Monomere.	51
Abbildung 28. Chemische Struktur von Polyurethan PU_kat.	53
Abbildung 29. ¹ H-NMR-Spektrum von PU_kat.	54
Abbildung 30. Gelierungsmechanismus. Nach der Synthese erhält man das Polyurethan in seiner protonierten, wasserunlöslichen, aber dispergierbaren Form (A). Durch Deprotonierung unter Zugabe von Base bilden sich Nano-Aggregate, die durch Ladungsabstoßung in Lösung gehalten werden (B). Durch Ladungsabschirmung schreitet die Aggregation fort und ein Hydrogel entsteht (C).	57
Abbildung 31. DLS-Messungen von 2mg/mL PU_1 in Abhängigkeit vom pH (A) und in Abhängigkeit von der CaCl ₂ Konzentration (B).	59
Abbildung 32. Fotos von 4 wt% PU_1 Lösungen in Abhängigkeit vom pH-Wert. Unterhalb von einem pH-Wert von 5,5 beginnt die Gelierung.	60
Abbildung 33. Chemische Struktur von GDL und Hydrolyse zu Gluconsäure.	61

Abbildung 34. Elastizitätsmodulus von PU_1 ermittelt durch Kompressionstests. (A) in Abhängigkeit vom pH, (B) in Abhängigkeit von der Polymerkonzentration in wt%.	62
Abbildung 35. E-Module bestimmt durch Kompressionstests an 4 wt% Hydrogelen in Abhängigkeit verschiedener pH-Werte und Vergleich von Kontroll-Polymer PU_COOH-14 (14% COOH, dunkel) PU_1 (20% COOH, hell)......	63
Abbildung 36. Oszillationsrheologische Messungen an 4 wt% Hydrogelen von PU_COOH-14 (14% COOH) und PU_1 (20% COOH); Frequency Sweeps (siehe Experimentalteil).	64
Abbildung 37. Oszillationsrheologische Messungen zu Thixotropie und Regenerationsverhalten von 4 wt% PU_1 Hydrogel bei pH 4,5.....	65
Abbildung 38. pH-neutrale Hydrogele durch Hinzugabe divalenter Salze wie CaCl ₂ (links) oder monovalenter Salze wie NaCl (rechts).	68
Abbildung 39. Zwei verschiedene Methoden zur Herstellung pH-neutraler Calcium-Gele durch Polyurethane. Methode A ist eine 2-stufige Methode, die über die Herstellung eines sauren Gels verläuft, Methode B ist eine 1-stufige Methode, welche sich der Kombination von GDL und Calciumcarbonat bedient.	69
Abbildung 40. E-Module bestimmt durch Kompressionstests von verschiedenen Calcium-Gelen aus 4 wt% PU_1 im Vergleich mit entsprechenden sauren Hydrogelen bei derselben Polymerkonzentration (A), sowie im Vergleich mit einem entsprechenden Hydrogel aus 4 wt% PU_DEG und jeweiliger Calciumkonzentration von 10 mM (B).	71
Abbildung 41. Stressrelaxationszeiten von 4 wt% PU_1 Calcium-Gelen bei verschiedenen Calcium-Konzentrationen. Initial-Druck ist auf 1 normiert und entspricht dem Druck bei 15% Deformierung unter Kompression.	73
Abbildung 42. Schematische Darstellung des Prinzips des hier verwendeten Mikrofluidik-Setups. Zwei wässrige, diperse Phase, zum einen die Polyurethan-Lösung, zum anderen die GDL-Lösung, werden zunächst kombiniert und treffen dann auf die kontinuierliche Ölphase, wodurch inverse Emulsionen entstehen.....	78

Abbildung 43. ¹²⁷ Aufbau und Fließprinzip des Glas-Devices. Nachdem die beiden dispersen Phasen in eine runde Mischkammer eingeführt werden, treffen sie zusammen auf die kontinuierliche Ölphase, die über Inlet 3 zugeführt wird. Die Entstehung der inversen Emulsion ist in der Vergrößerung (roter Kasten) schematisch dargestellt. Im Outlet wird die Emulsion aufgefangen.....	80
Abbildung 44. ¹²⁷ Aufbau der PDMS-Devices. Dieses Kanal-Setup wurde als Master-Form zur Herstellung der PDMS-Devices genutzt, vergleiche Abbildung 49	82
Abbildung 45. ¹²⁷ Tröpfchen-Generierung in Glas-Devices bei einer Fließrate von 1mL/h der kontinuierlichen Phase und einer Fließrate von 0,28 mL/h der dispersen Phase.	81
Abbildung 46. ¹²⁷ Tröpfchen-Generierung in Glas-Devices bei einer Fließrate von 1,5 mL/h der kontinuierlichen Phase und einer Fließrate von 0,15 mL/h der dispersen Phase.....	81
Abbildung 47. ¹²⁷ Vorzeitige Gelierung innerhalb der Kanäle des PDMS-Devices.....	83
Abbildung 48. Übersicht der Polyurethane.....	90
Abbildung 49. ¹²⁸ Schematische Darstellung der Herstellung von PDMS Mikrofluidik-Devices.....	96
Abbildung 50. ¹²⁷ Muster der PDMS-Kanäle, vergleich hierzu auch Abbildung 44	97
Tabelle 1. Übersicht über angewendete Entschützungsverfahren und deren Reaktionsbedingungen.....	41
Tabelle 2. Reaktionsübersicht der Kontrollreaktionen / Aufklärung der Nebenreaktion von DABCO.....	44
Tabelle 3. ¹²⁷ Fließraten und Tröpfchengrößen innerhalb der Glas-Devices.....	80
Tabelle 4. Substrat-Übersicht der Synthese von PU_1.....	92
Tabelle 5. Substrat-Übersicht der Synthese von PU_COOH-14.....	92
Tabelle 6. Substrat-Übersicht der Synthese von PU_DEG.....	92
Tabelle 7. Substrat-Übersicht der Synthese von PU_SS.....	93
Tabelle 8. Substrat-Übersicht der Synthese von PU_kat.....	93

REFERENZEN

1. Hoffman, A.S., 2012. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews*, 64, pp.18-23.
2. Caló, E. and Khutoryanskiy, V.V., 2015. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, 65, pp.252-267.
3. Nicolson, P.C. and Vogt, J., 2001. Soft contact lens polymers: an evolution. *Biomaterials*, 22(24), pp.3273-3283.
4. Peppas, N.A., Hilt, J.Z., Khademhosseini, A. and Langer, R., 2006. Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology. *Advanced Materials*, 18(11), pp.1345-1360.
5. Hoare, T.R. and Kohane, D.S., 2008. Hydrogels in drug delivery: progress and challenges. *Polymer*, 49(8), pp.1993-2007.
6. Lee, K.Y. and Mooney, D.J., 2001. Hydrogels for tissue engineering. *Chemical reviews*, 101(7), pp.1869-1880.
7. Yang, Z., Liang, G. and Xu, B., 2008. Enzymatic hydrogelation of small molecules. *Accounts of chemical research*, 41(2), pp.315-326.
8. Kleinsmann, A.J. and Nachtsheim, B.J., 2013. Phenylalanine-containing cyclic dipeptides—the lowest molecular weight hydrogelators based on unmodified proteinogenic amino acids. *Chemical Communications*, 49(71), pp.7818-7820.
9. Kleinsmann, A.J., Weckenmann, N.M. and Nachtsheim, B.J., 2014. Phosphate-Triggered Self-Assembly of N-[(Uracil-5-yl) methyl] urea: A Minimalistic Urea-Derived Hydrogelator. *Chemistry—A European Journal*, 20(31), pp.9753-9761.

10. Jeong, B., Bae, Y.H. and Kim, S.W., 2000. Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG–PLGA–PEG triblock copolymers. *Journal of controlled release*, 63(1), pp.155-163.
11. Zhang, X.Z., Wu, D.Q. and Chu, C.C., 2004. Synthesis, characterization and controlled drug release of thermosensitive IPN–PNIPAAm hydrogels. *Biomaterials*, 25(17), pp.3793-3805.
12. Gupta, P., Vermani, K. and Garg, S., 2002. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug discovery today*, 7(10), pp.569-579.
13. Nagai, Y., Unsworth, L.D., Koutsopoulos, S. and Zhang, S., 2006. Slow release of molecules in self-assembling peptide nanofiber scaffold. *Journal of controlled release*, 115(1), pp.18-25.
14. Siepmann, J., Kranz, H., Bodmeier, R. and Peppas, N.A., 1999. HPMC-matrices for controlled drug delivery: a new model combining diffusion, swelling, and dissolution mechanisms and predicting the release kinetics. *Pharmaceutical Research*, 16(11), pp.1748-1756.
15. Okano, T., Bae, Y.H., Jacobs, H. and Kim, S.W., 1990. Thermally on-off switching polymers for drug permeation and release. *Journal of Controlled Release*, 11(1), pp.255-265.
16. Schmaljohann, D., 2006. Thermo-and pH-responsive polymers in drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 58(15), pp.1655-1670.
17. Kim, J.H., Lee, S.B., Kim, S.J. and Lee, Y.M., 2002. Rapid temperature/pH response of porous alginate-g-poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels. *Polymer*, 43(26), pp.7549-7558.
18. Sershen, S.R., Westcott, S.L., Halas, N.J. and West, J.L., 2000. Temperature-sensitive polymer–nanoshell composites for photothermally modulated drug delivery. *Journal of biomedical materials research*, 51(3), pp.293-298.
19. Ahmed, E.M., 2015. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of advanced research*, 6(2), pp.105-121.

20. Xia, L.W., Xie, R., Ju, X.J., Wang, W., Chen, Q. and Chu, L.Y., 2013. Nano-structured smart hydrogels with rapid response and high elasticity. *Nature communications*, 4.
21. Tsitsilianis, C., 2010. Responsive reversible hydrogels from associative “smart” macromolecules. *Soft Matter*, 6(11), pp.2372-2388.
22. Pochan, D.J., Schneider, J.P., Kretsinger, J., Ozbas, B., Rajagopal, K. and Haines, L., 2003. Thermally reversible hydrogels via intramolecular folding and consequent self-assembly of a de novo designed peptide. *Journal of the American Chemical Society*, 125(39), pp.11802-11803.
23. Sidorenko, A., Krupenkin, T., Taylor, A., Fratzl, P. and Aizenberg, J., 2007. Reversible switching of hydrogel-actuated nanostructures into complex micropatterns. *Science*, 315(5811), pp.487-490.
24. Richter, A., Paschew, G., Klatt, S., Lienig, J., Arndt, K.F. and Adler, H.J.P., 2008. Review on hydrogel-based pH sensors and microsensors. *Sensors*, 8(1), pp.561-581.
25. Gerlach, G. and Arndt, K.F. eds., 2009. *Hydrogel sensors and actuators: engineering and technology* (Vol. 6). Springer Science & Business Media.
26. Lee, Y.J. and Braun, P.V., 2003. Tunable inverse opal hydrogel pH sensors. *Advanced Materials*, 15(7-8), pp.563-566.
27. Ulbrich, K., Subr, V., Podpěřová, P. and Burešová, M., 1995. Synthesis of novel hydrolytically degradable hydrogels for controlled drug release. *Journal of controlled release*, 34(2), pp.155-165.
28. Jeong, B., Bae, Y.H., Lee, D.S. and Kim, S.W., 1997. Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems. *Nature*, 388(6645), pp.860-862.
29. Langer, R., 1998. Drug delivery and targeting. *Nature*, 392(6679), pp.5-10.
30. Lee, K.Y. and Mooney, D.J., 2001. Hydrogels for tissue engineering. *Chemical reviews*, 101(7), pp.1869-1880.
31. Drury, J.L. and Mooney, D.J., 2003. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 24(24), pp.4337-4351.

32. Hong, J.K. and Kwon, S.M., 2014. Application of tissue engineering in stem cell therapy. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 7(2), p.67.
33. Sun, T.L., Kurokawa, T., Kuroda, S., Ihsan, A.B., Akasaki, T., Sato, K., Haque, M.A., Nakajima, T. and Gong, J.P., 2013. Physical hydrogels composed of polyampholytes demonstrate high toughness and viscoelasticity. *Nature materials*, 12(10), pp.932-937.
34. De Boisseson, M.R., Leonard, M., Hubert, P., Marchal, P., Stequert, A., Castel, C., Favre, E. and Dellacherie, E., 2004. Physical alginate hydrogels based on hydrophobic or dual hydrophobic/ionic interactions: Bead formation, structure, and stability. *Journal of colloid and interface science*, 273(1), pp.131-139.
35. Xing, B., Yu, C.W., Chow, K.H., Ho, P.L., Fu, D. and Xu, B., 2002. Hydrophobic interaction and hydrogen bonding cooperatively confer a vancomycin hydrogel: a potential candidate for biomaterials. *Journal of the American Chemical Society*, 124(50), pp.14846-14847.
36. Guo, M., Pitet, L.M., Wyss, H.M., Vos, M., Dankers, P.Y. and Meijer, E.W., 2014. Tough stimuli-responsive supramolecular hydrogels with hydrogen-bonding network junctions. *Journal of the American Chemical Society*, 136(19), pp.6969-6977.
37. Fisher, O.Z., Larson, B.L., Hill, P.S., Graupner, D., Nguyen-Kim, M.T., Kehr, N.S., De Cola, L., Langer, R. and Anderson, D.G., 2012. Melanin-like Hydrogels Derived from Gallic Macromers. *Advanced Materials*, 24(22), pp.3032-3036.
38. Ozbas, B., Kretsinger, J., Rajagopal, K., Schneider, J.P. and Pochan, D.J., 2004. Salt-triggered peptide folding and consequent self-assembly into hydrogels with tunable modulus. *Macromolecules*, 37(19), pp.7331-7337.
39. Kopeček, J. and Yang, J., 2009. Peptide-directed self-assembly of hydrogels. *Acta biomaterialia*, 5(3), pp.805-816.
40. Jayawarna, V., Ali, M., Jowitt, T.A., Miller, A.F., Saiani, A., Gough, J.E. and Ulijn, R.V., 2006. Nanostructured Hydrogels for Three-Dimensional Cell Culture Through Self-Assembly of Fluorenylmethoxycarbonyl-Dipeptides. *Advanced Materials*, 18(5), pp.611-614.

41. Argade, A.B. and Peppas, N.A., 1998. Poly (acrylic acid)-poly (vinyl alcohol) copolymers with superabsorbent properties. *Journal of applied polymer science*, 70(4), pp.817-829.
42. Lutz, J.F., Akdemir, Ö. and Hoth, A., 2006. Point by point comparison of two thermosensitive polymers exhibiting a similar LCST: is the age of poly (NIPAM) over?. *Journal of the American Chemical Society*, 128(40), pp.13046-13047.
43. Klouda, L. and Mikos, A.G., 2008. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68(1), pp.34-45.
44. Schmaljohann, D., 2006. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 58(15), pp.1655-1670.
45. Cao, Y., Zhang, C., Shen, W., Cheng, Z., Yu, L.L. and Ping, Q., 2007. Poly (N-isopropylacrylamide)-chitosan as thermosensitive in situ gel-forming system for ocular drug delivery. *Journal of controlled release*, 120(3), pp.186-194.
46. Guan, Y. and Zhang, Y., 2011. PNIPAM microgels for biomedical applications: from dispersed particles to 3D assemblies. *Soft Matter*, 7(14), pp.6375-6384.
47. Islam, M.R., Ahiabu, A., Li, X. and Serpe, M.J., 2014. Poly (N-isopropylacrylamide) microgel-based optical devices for sensing and biosensing. *Sensors*, 14(5), pp.8984-8995.
48. Huck, W.T., 2008. Responsive polymers for nanoscale actuation. *Materials today*, 11(7), pp.24-32.
49. Mitsuishi, M., Koishikawa, Y., Tanaka, H., Sato, E., Mikayama, T., Matsui, J. and Miyashita, T., 2007. Nanoscale actuation of thermoreversible polymer brushes coupled with localized surface plasmon resonance of gold nanoparticles. *Langmuir*, 23(14), pp.7472-7474.
50. Yin, X., Hoffman, A.S. and Stayton, P.S., 2006. Poly (N-isopropylacrylamide-co-propylacrylic acid) copolymers that respond sharply to temperature and pH. *Biomacromolecules*, 7(5), pp.1381-1385.

51. Kuo, C.K. and Ma, P.X., 2001. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials*, 22(6), pp.511-521.
52. Li, Z., Ramay, H.R., Hauch, K.D., Xiao, D. and Zhang, M., 2005. Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 26(18), pp.3919-3928.
53. Rowley, J.A., Madlambayan, G. and Mooney, D.J., 1999. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*, 20(1), pp.45-53.
54. Augst, A.D., Kong, H.J. and Mooney, D.J., 2006. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular bioscience*, 6(8), pp.623-633.
55. Kong, H.J., Smith, M.K. and Mooney, D.J., 2003. Designing alginate hydrogels to maintain viability of immobilized cells. *Biomaterials*, 24(22), pp.4023-4029.
56. Yu, L. and Ding, J., 2008. Injectable hydrogels as unique biomedical materials. *Chemical Society Reviews*, 37(8), pp.1473-1481.
57. Li, J., Ni, X. and Leong, K.W., 2003. Injectable drug-delivery systems based on supramolecular hydrogels formed by poly (ethylene oxide) s and α -cyclodextrin. *Journal of biomedical materials research Part A*, 65(2), pp.196-202.
58. Nguyen, M.K. and Lee, D.S., 2010. Injectable biodegradable hydrogels. *Macromolecular bioscience*, 10(6), pp.563-579.
59. Yucel, T., Cebe, P. and Kaplan, D.L., 2009. Vortex-induced injectable silk fibroin hydrogels. *Biophysical journal*, 97(7), pp.2044-2050.
60. Van Tomme, S.R., Storm, G. and Hennink, W.E., 2008. In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. *International journal of pharmaceutics*, 355(1), pp.1-18.
61. Bruchet, M. and Melman, A., 2015. Fabrication of patterned calcium cross-linked alginate hydrogel films and coatings through reductive cation exchange. *Carbohydrate polymers*, 131, pp.57-64.

62. Hauselmann, H.J., Fernandes, R.J., Mok, S.S., Schmid, T.M., Block, J.A., Aydelotte, M.B., Kuettner, K.E. and Thonar, E.J., 1994. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *Journal of cell science*, 107(1), pp.17-27.
63. Choi, B.Y., Park, H.J., Hwang, S.J. and Park, J.B., 2002. Preparation of alginate beads for floating drug delivery system: effects of CO₂ gas-forming agents. *International Journal of Pharmaceutics*, 239(1), pp.81-91.
64. Cho, S.H., Lim, S.M., Han, D.K., Yuk, S.H., Im, G.I. and Lee, J.H., 2009. Time-dependent alginate/polyvinyl alcohol hydrogels as injectable cell carriers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 20(7-8), pp.863-876.
65. Kuo, C.K. and Ma, P.X., 2001. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials*, 22(6), pp.511-521.
66. Tønnesen, H.H. and Karlsen, J., 2002. Alginate in drug delivery systems. *Drug development and industrial pharmacy*, 28(6), pp.621-630.
67. Liew, C.V., Chan, L.W., Ching, A.L. and Heng, P.W.S., 2006. Evaluation of sodium alginate as drug release modifier in matrix tablets. *International journal of pharmaceutics*, 309(1), pp.25-37.
68. Park, H., Kang, S.W., Kim, B.S., Mooney, D.J. and Lee, K.Y., 2009. Shear-reversibly crosslinked alginate hydrogels for tissue engineering. *Macromolecular bioscience*, 9(9), pp.895-901.
69. Lee, K.Y., Rowley, J.A., Eiselt, P., Moy, E.M., Bouhadir, K.H. and Mooney, D.J., 2000. Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by cross-linker type and cross-linking density. *Macromolecules*, 33(11), pp.4291-4294.
70. Tibbitt, M.W. and Anseth, K.S., 2009. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and bioengineering*, 103(4), pp.655-663.

71. Grevesse, T., Versaevel, M., Circelli, G., Desprez, S. and Gabriele, S., 2013. A simple route to functionalize polyacrylamide hydrogels for the independent tuning of mechanotransduction cues. *Lab on a Chip*, 13(5), pp.777-780.
72. Shih, Y.R.V., Tseng, K.F., Lai, H.Y., Lin, C.H. and Lee, O.K., 2011. Matrix stiffness regulation of integrin-mediated mechanotransduction during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(4), pp.730-738.
73. Chaudhuri, O., Gu, L., Darnell, M., Klumpers, D., Bencherif, S.A., Weaver, J.C., Huebsch, N. and Mooney, D.J., 2015. Substrate stress relaxation regulates cell spreading. *Nature communications*, 6.
74. Chaudhuri, O., Gu, L., Klumpers, D., Darnell, M., Bencherif, S.A., Weaver, J.C., Huebsch, N., Lee, H.P., Lippens, E., Duda, G.N. and Mooney, D.J., 2016. Hydrogels with tunable stress relaxation regulate stem cell fate and activity. *Nature materials*, 15(3), pp.326-334.
75. Dusseault, J., Tam, S.K., Ménard, M., Polizu, S., Jourdan, G., Yahia, L.H. and Hallé, J.P., 2006. Evaluation of alginate purification methods: effect on polyphenol, endotoxin, and protein contamination. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 76(2), pp.243-251.
76. Nakagawa, Y., Murai, T., Hasegawa, C., Hirata, M., Tsuchiya, T., Yagami, T. and Haishima, Y., 2003. Endotoxin contamination in wound dressings made of natural biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 66(1), pp.347-355.
77. d'Ayala, G.G., Malinconico, M. and Laurienzo, P., 2008. Marine derived polysaccharides for biomedical applications: chemical modification approaches. *Molecules*, 13(9), pp.2069-2106.
78. Yang, J.S., Xie, Y.J. and He, W., 2011. Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydrate polymers*, 84(1), pp.33-39.
79. Thorne, J.B., Vine, G.J. and Snowden, M.J., 2011. Microgel applications and commercial considerations. *Colloid and Polymer Science*, 289(5-6), pp.625-646.

80. Saunders, B.R., Laajam, N., Daly, E., Teow, S., Hu, X. and Stepto, R., 2009. Microgels: From responsive polymer colloids to biomaterials. *Advances in colloid and interface science*, 147, pp.251-262.
81. Das, M., Zhang, H. and Kumacheva, E., 2006. Microgels: old materials with new applications. *Annu. Rev. Mater. Res.*, 36, pp.117-142.
82. Hiltl, S., Schürings, M.P., Balaceanu, A., Mayorga, V., Liedel, C., Pich, A. and Böker, A., 2011. Guided self-assembly of microgels: from particle arrays to anisotropic nanostructures. *Soft Matter*, 7(18), pp.8231-8238.
83. Graham, N.B. and Cameron, A., 1998. Nanogels and microgels: The new polymeric materials playground. *Pure and Applied chemistry*, 70(6), pp.1271-1275.
84. Oh, J.K., Lee, D.I. and Park, J.M., 2009. Biopolymer-based microgels/nanogels for drug delivery applications. *Progress in Polymer Science*, 34(12), pp.1261-1282.
85. Hoare, T. and Pelton, R., 2004. Highly pH and temperature responsive microgels functionalized with vinylacetic acid. *Macromolecules*, 37(7), pp.2544-2550.
86. Das, M., Mardyani, S., Chan, W.C. and Kumacheva, E., 2006. Biofunctionalized pH-Responsive Microgels for Cancer Cell Targeting: Rational Design. *Advanced Materials*, 18(1), pp.80-83.
87. Amalvy, J.I., Wanless, E.J., Li, Y., Michailidou, V., Armes, S.P. and Duccini, Y., 2004. Synthesis and characterization of novel pH-responsive microgels based on tertiary amine methacrylates. *Langmuir*, 20(21), pp.8992-8999.
88. Garcia, A., Marquez, M., Cai, T., Rosario, R., Hu, Z., Gust, D., Hayes, M., Vail, S.A. and Park, C.D., 2007. Photo-, thermally, and pH-responsive microgels. *Langmuir*, 23(1), pp.224-229.
89. Geisel, K., Isa, L. and Richtering, W., 2012. Unraveling the 3D localization and deformation of responsive microgels at oil/water interfaces: a step forward in understanding soft emulsion stabilizers. *Langmuir*, 28(45), pp.15770-15776.

90. Geisel, K., Isa, L. and Richtering, W., 2014. The Compressibility of pH-Sensitive Microgels at the Oil–Water Interface: Higher Charge Leads to Less Repulsion. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(19), pp.4905-4909.
91. Richtering, W., 2012. Responsive emulsions stabilized by stimuli-sensitive microgels: emulsions with special non-Pickering properties. *Langmuir*, 28(50), pp.17218-17229.
92. Boretos, J.W. and Pierce, W.S., 1967. Segmented polyurethane: a new elastomer for biomedical applications. *Science*, 158(3807), pp.1481-1482.
93. Krol, P., 2007. Synthesis methods, chemical structures and phase structures of linear polyurethanes. Properties and applications of linear polyurethanes in polyurethane elastomers, copolymers and ionomers. *Progress in materials science*, 52(6), pp.915-1015.
94. Chattopadhyay, D.K. and Raju, K.V.S.N., 2007. Structural engineering of polyurethane coatings for high performance applications. *Progress in Polymer Science*, 32(3), pp.352-418.
95. Tieke, B., 2014. *Makromolekulare Chemie: Eine Einführung*. John Wiley & Sons.
96. Lamba, N.M., Woodhouse, K.A. and Cooper, S.L., 1997. *Polyurethanes in biomedical applications*. CRC press.
97. Zdrahala, R.J. and Zdrahala, I.J., 1999. Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and a vibrant future. *Journal of biomaterials applications*, 14(1), pp.67-90.
98. Guelcher, S.A., 2008. Biodegradable polyurethanes: synthesis and applications in regenerative medicine. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 14(1), pp.3-17.
99. Fromstein, J.D. and Woodhouse, K.A., 2002. Elastomeric biodegradable polyurethane blends for soft tissue applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 13(4), pp.391-406.
100. Wisman, C.B., Pierce, W.S., Donachy, J.H., Pae, W.E., Myers, J.L. and Prophet, G.A., 1982. A polyurethane trileaflet cardiac valve prosthesis: in vitro and in vivo studies. *ASAIO Journal*, 28(1), pp.164-168.

101. Zhang, Z., Wang, Z., Liu, S. and Kodama, M., 2004. Pore size, tissue ingrowth, and endothelialization of small-diameter microporous polyurethane vascular prostheses. *Biomaterials*, 25(1), pp.177-187.
102. Eberhart, A., Zhang, Z., Guidoin, R., Laroche, G., Guay, L., De La Faye, D., Batt, M. and King, M.W., 1999. A new generation of polyurethane vascular prostheses: rara avis or ignis fatuus?. *Journal of biomedical materials research*, 48(4), pp.546-558.
103. Laksin, O., Datascope Investment Corp., 2001. *Intra-aortic balloon catheter having an ultra-thin stretch blow molded balloon membrane*. U.S. Patent 6,213,975.
104. Goldberg, A.J., Craig, R.G. and Filisko, F.E., 1978. Polyurethane elastomers as maxillofacial prosthetic materials. *Journal of dental research*, 57(4), pp.563-569.
105. Nuyken, O.; Samarian, H.; Wurdack I.; Polyurethane III, Polyurethan-Elastomere, Chemgapedia.
106. Zhao, X., Huebsch, N., Mooney, D.J. and Suo, Z., 2010. Stress-relaxation behavior in gels with ionic and covalent crosslinks. *Journal of Applied Physics*, 107(6), p.063509.
107. Gould, F.E., Johnston, C.W. and Seems, G.E., Tyndale Plains-Hunter Ltd., 1991. *Thermally reversible polyurethane hydrogels and cosmetic, biological and medical uses*. U.S. Patent 5,000,955.
108. Petrini, P., Fare, S., Piva, A. and Tanzi, M.C., 2003. Design, synthesis and properties of polyurethane hydrogels for tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 14(8), pp.683-686.
109. Harada, H. and Matsushita, N., Dai-Ichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd., 1978. *Polyurethane hydrogel and method for the production of the same*. U.S. Patent 4,118,354.
110. Yoo, H.J. and Kim, H.D., 2008. Synthesis and properties of waterborne polyurethane hydrogels for wound healing dressings. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 85(2), pp.326-333.

111. Guan, J., Song, Y., Lin, Y., Yin, X., Zuo, M., Zhao, Y., Tao, X. and Zheng, Q., 2011. Progress in study of non-isocyanate polyurethane. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50(11), pp.6517-6527.
112. Delebecq, E., Pascault, J.P., Boutevin, B. and Ganachaud, F., 2012. On the versatility of urethane/urea bonds: reversibility, blocked isocyanate, and non-isocyanate polyurethane. *Chemical reviews*, 113(1), pp.80-118.
113. Kathalewar, M.S., Joshi, P.B., Sabnis, A.S. and Malshe, V.C., 2013. Non-isocyanate polyurethanes: from chemistry to applications. *RSC Advances*,3(13), pp.4110-4129.
114. Marangoni, A.G., Barbut, S., McGauley, S.E., Marcone, M. and Narine, S.S., 2000. On the structure of particulate gels—the case of salt-induced cold gelation of heat-denatured whey protein isolate. *Food hydrocolloids*, 14(1), pp.61-74.
115. Alting, A.C., de Jongh, H.H., Visschers, R.W. and Simons, J.W.F., 2002. Physical and chemical interactions in cold gelation of food proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), pp.4682-4689.
116. Alting, A.C., Weijers, M., de Hoog, E.H., van de Pijpekamp, A.M., Cohen Stuart, M.A., Hamer, R.J., de Kruif, C.G. and Visschers, R.W., 2004. Acid-induced cold gelation of globular proteins: effects of protein aggregate characteristics and disulfide bonding on rheological properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(3), pp.623-631.
117. Alting, A.C., de Jongh, H.H., Visschers, R.W. and Simons, J.W.F., 2002. Physical and chemical interactions in cold gelation of food proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), pp.4682-4689.
118. Seymour, R.W. and Cooper, S.L., 1973. Thermal analysis of polyurethane block polymers. *Macromolecules*, 6(1), pp.48-53.
119. Batich, C., Williams, J. and King, R., 1989. Toxic hydrolysis product from a biodegradable foam implant. *Journal of biomedical materials research*,23(S14), pp.311-319.
120. Alger, M., 1996. *Polymer science dictionary*. Springer Science & Business Media.

121. Khan, R., Konowicz, P.A., Gardossi, L., Matulova, M. and Degennaro, S., 1996. Regioselective deacetylation of fully acetylated mono-and di-saccharides with hydrazine hydrate. *Australian journal of chemistry*, 49(3), pp.293-298.
122. Reitsma, S., Slaaf, D.W., Vink, H., van Zandvoort, M.A. and oude Egbrink, M.G., 2007. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 454(3), pp.345-359.
123. Park, H., Rosencrantz, R.R., Elling, L. and Böker, A., 2015. Glycopolymer Brushes for Specific Lectin Binding by Controlled Multivalent Presentation of N-Acetyllactosamine Glycan Oligomers. *Macromolecular rapid communications*, 36(1), pp.45-54.
124. Cui, Y., Dong, H., Cai, X., Wang, D. and Li, Y., 2012. Mesoporous silica nanoparticles capped with disulfide-linked PEG gatekeepers for glutathione-mediated controlled release. *ACS applied materials & interfaces*, 4(6), pp.3177-3183.
125. Kam, N.W.S., Liu, Z. and Dai, H., 2005. Functionalization of carbon nanotubes via cleavable disulfide bonds for efficient intracellular delivery of siRNA and potent gene silencing. *Journal of the American Chemical Society*, 127(36), pp.12492-12493.
126. Koo, A.N., Lee, H.J., Kim, S.E., Chang, J.H., Park, C., Kim, C., Park, J.H. and Lee, S.C., 2008. Disulfide-cross-linked PEG-poly (amino acid) s copolymer micelles for glutathione-mediated intracellular drug delivery. *Chemical Communications*, (48), pp.6570-6572.
127. Wallenborn, J., October 2014. Responsive Microgel Particles via Microfluidics. Diploma Thesis, RWTH Aachen University, DWI Leibniz Insititute for Interactive Materials.
128. <http://www.elveflow.com/microfluidic-tutorials/microfluidic-reviews-and-tutorials/the-poly-di-methyl-siloxane-pdms-and-microfluidics>