



**HAL**  
open science

# Modificări chimice ale polizaharidelor și ale hidrogelurilor lor prin procedeul "click chemistry"

Ancuta Uliniuc

► **To cite this version:**

Ancuta Uliniuc. Modificări chimice ale polizaharidelor și ale hidrogelurilor lor prin procedeul "click chemistry". Other. Université Claude Bernard - Lyon I; Universitatea tehnică "Gheorghe Asachi" (Iași, Roumanie), 2011. Romanian. NNT: 2011LYO10220 . tel-00834679

**HAL Id: tel-00834679**

**<https://theses.hal.science/tel-00834679>**

Submitted on 17 Jun 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI  
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI  
PROTECȚIEI SOCIALE  
AMPOSDRU



Fondul Social European  
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale  
2007-2013

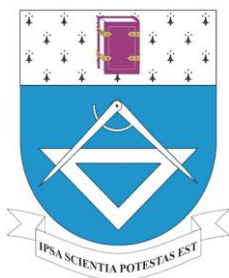


MINISTERUL  
EDUCAȚIEI  
CERCETĂRII  
TÎNERETULUI  
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU



UNIVERSITATEA TEHNICĂ  
"GHEORGHE ASACHI"  
DIN IAȘI



# UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI

Școala Doctorală a Facultății de Inginerie  
Chimică și Protecția Mediului

în cotutelă cu

UNIVERSITATEA CLAUDE  
BERNARD LYON 1



## MODIFICĂRI CHIMICE ALE POLIZAHARIDELOR ȘI ALE HIDROGELURILOR LOR PRIN PROCEDEUL „CLICK CHEMISTRY”

- Teză de doctorat -

Conducători de doctorat:

Prof.univ.dr.ing. *dr.h.c.* Marcel Popa

Prof.univ.dr.ing. *dr.h.c.* Thierry Hamaide

Doctorand:  
Bioinginer Ancuța Uliniuc

IAȘI- 2011



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI  
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI  
PROTECȚIEI SOCIALE  
AMPOSDRU



Fondul Social European  
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale  
2007-2013



MINISTERUL  
EDUCAȚIEI  
CERCETĂRII  
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU



UNIVERSITATEA TEHNICĂ  
"GHEORGHE ASACHI"  
DIN IAȘI

Teza de doctorat a fost realizată cu sprijinul financiar al proiectului „Burse Doctorale - O Investiție în Inteligență (BRAIN)”.

Proiectul „Burse Doctorale - O Investiție în Inteligență (BRAIN)”, POSDRU/6/1.5/S/9, ID 6681, este un proiect strategic care are ca obiectiv general „Îmbunătățirea formării viitorilor cercetători în cadrul ciclului 3 al învățământului superior - studiile universitare de doctorat - cu impact asupra creșterii atractivității și motivației pentru cariera în cercetare”.

Proiect finanțat în perioada 2008 - 2011.

Finanțare proiect: 14.424.856,15 RON

Beneficiar: Universitatea Tehnică “Gheorghe Asachi” din Iași

Partener: Universitatea “Vasile Alecsandri” din Bacău

Director proiect: Prof. univ. dr. ing. Carmen TEODOSIU

Responsabil proiect partener: Prof. univ. dr. ing. Gabriel LAZĂR



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI  
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI  
PROTECȚIEI SOCIALE  
AMPOSDRU



Fondul Social European  
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale  
2007-2013



MINISTERUL  
EDUCAȚIEI  
CERCETĂRII  
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU



UNIVERSITATEA TEHNICĂ  
"GHEORGHE ASACHI"  
DIN IASI

*Recunoștința mea se îndreaptă în primul rând către îndrumătorul de doctorat, dl. prof. dr. ing. Marcel Popa, care m-a ghidat în domeniul științei polimerilor și m-a supravegheat în mod eficient și productiv pentru a realiza o cercetare academică. Tot ce am învățat prin intermediul său va fi foarte benefic pentru viitoarea mea carieră. Mulțumesc colegelor de birou și de laborator, care mi-au fost de un indispensabil ajutor de-a lungul timpului.*

*Sunt profund recunoscătoare celui de-al doilea îndrumător al acestei teze, dl. prof. dr. ing. Thierry Hamaide, fără de care nu aș fi reușit să duc la bun sfârșit această lucrare. Am apreciat ajutorul său necondiționat și prompt atât pe perioada stagiului meu în Lyon cât și după încheierea acestuia.*

*Mulumirile mele merg de asemenea către laboratorul IMP al universității din Lyon 1, loc unde am trăit experiențe de neuitat alături de oameni pe care am putut conta, indiferent de ora din zi sau noapte. Mulțumesc pentru prietenia voastră!*

*Aprecierea mea se îndreaptă de asemenea către Fernande Boisson și Didier Leonard pentru sugestii deosebit de folositoare în ceea ce privește analizele RMN și Tof-Sims.*

*Și nu în ultimul rând, mulțumiri familiei mele și prietenilor care au fost alături de mine!*

*Cu deosebită considerație,*

*Ancuța Uliniuc*

## CUPRINS

### Introducere

### STUDIUL BIBLIOGRAFIC

#### CAPITOLUL I .

<b>I.1. Polimeri amfifili pe bază de polizaharide</b>	1
I.1.1. Polimeri amfifili	2
I.1.2. Polizaharide amfifile	13
I.1.2.1. Metode de obținere	15
I.1.2.2. Caracterizare	17
I.1.2.3. Aplicații	20
<b>I.2. Reacția click chemistry</b>	21
I.2.1. Prezentarea reacției click chemistry	22
I.2.2. Aplicații ale reacției click chemistry în domeniul polizaharidelor	26
<b>I.3. Hidrogeluri pe bază de polizaharide cu hidrofilie redusă</b>	30
I.3.1. Metode de obținere a hidrogelurilor pe bază de polizaharide	30
I.3.2. Metode de caracterizare a hidrogelurilor pe bază de polizaharide	35
I.3.3. Metode de hidrofobizare a hidrogelurilor pe bază de polizaharide	37
I.3.4. Aplicații ale hidrogelurilor pe bază de polizaharide cu hidrofilie redusă	38

#### REZULTATE ORIGINALE

<b>CAPITOLUL II. MATERIALE ȘI METODE EXPERIMENTALE</b>	41
<b>II.1. Materiale utilizate</b>	43
<b>II.2. Metode și tehnici de lucru</b>	45
II.2.1. Determinarea procentului fracțiilor amiloză/amilopectină din amidon	45
<b>II.3. Metode de caracterizare</b>	
II.3.1. Caracterizare structurală	45
II.3.1.1. Rezonanța magnetică nucleară	45
II.3.1.2. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) și cu transformată Fourier prin reflectanță totală atenuată	45
II.3.1.3. Analiza suprafețelor prin spectroscopie fotonelectron cu raze X și prin Tof-Sims	45
II.3.2. Analiza termică - analiza termogravimetrică și calorimetria diferențială de baleiaj	46
II.3.3. Determinarea unghiului de contact	47
II.3.4. Analiza capacității de micelizare	48
II.3.5. Microscopia electronică de baleiaj	48

II.3.6. Microscopia electronică prin transmisie	48
II.3.7. Determinarea gradului de retenție a apei	48
II.3.8. Evaluarea <i>in vitro</i> a cineticii de încărcare/eliberare de principii active	48
II.3.9 Modelul teoretic de difuzie a principiului activ	50
<b>CAPITOLUL III. MODIFICAREA CHIMICĂ A AMIDONULUI</b>	51
<b>III.1. Modificarea chimică a amidonului solubil cu cloruri acide</b>	51
III.1.1. Principiul reacției	51
III.1.2. Analiza rezultatelor obținute	52
III.1.2.1. Analiza structurală a amidonului modificat cu lanțuri de clorură de palmitoil	53
III.1.2.1.1. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier	53
III.1.2.1.2. Analiza suprafeței prin XPS și determinarea gradului de substituție	54
III.1.2.2. Analiza tensiunii superficiale	57
III.1.2.3. Analiza morfologică	58
<b>III.2. Modificarea chimică a amidonului solubil prin introducerea grupării alchine</b>	58
III.2.1. Principiul reacției	58
III.2.2. Analiza rezultatelor obținute	
III.2.2.1. Analiza structurală	59
III.2.2.1.1. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier	59
III.2.2.1.2. Rezonanța magnetică nucleară	60
<b>III.3. Sinteza de poli (<math>\epsilon</math>-caprolactonă) cu grupare funcțională de tip azidă</b>	61
III.3.1. Principiul reacției	61
III.3.2. Analiza rezultatelor obținute	
III.3.2.1. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier	62
III.3.2.2. Rezonanța magnetică nucleară	62
III.3.2.3. Calculul gradului de polimerizare	63
<b>III.4. Concluzii</b>	65
<b>CAPITOLUL IV. GREFAREA POLI (<math>\epsilon</math>-CAPROLACTONEI) PE LANȚURILE DE AMIDON</b>	
<b>IV.1. Grefarea poli (<math>\epsilon</math>-caprolactonei) pe lanțurile de amidon <i>via</i> “click chemistry”</b>	67
IV.1.1. Grefarea poli ( $\epsilon$ -caprolactonei) pe lanțurile de amidon <i>via</i> “click chemistry” prin metoda convențională	67
IV.1.1.1. Principiul reacției	68
IV.1.1.2. Analiza rezultatelor obținute	
IV.1.1.1. Analiza structurală	68
IV.1.1.1.1. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR	68
IV.1.1.1.2. Caracterizarea prin spectroscopie $^1\text{H}$ -RMN	68
IV.1.1.2. Analiza suprafeței prin XPS	70

IV.1.1.3. Analiza suprafeței prin Tof-Sims	72
IV.1.1.3. Analiza termică	74
IV.1.1.4. Determinarea gradului de cristalinitate din PCL după grefare	77
IV.1.1.5. Analiza morfologică	78
IV.1.1.6. Comportamentul copolimerilor în diferiți solvenți	79
IV.1.1.7. Investigarea proprietăților de micelizare ale copolimerilor	79
IV.1.1.8. Concluzii	84
IV.1.2. Grefarea poli ( $\epsilon$ -caprolactonei) pe lanțurile de amidon via “click chemistry” prin metoda microundelor	85
IV.1.2.1. Principiul reacției	85
IV.1.2.2. Analiza rezultatelor obținute	86
IV.1.2.2.1. Influența solventului asupra timpului de reacție	88
IV.1.2.2.3. Analiza structurală	88
IV.1.2.2.3.1. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR	89
IV.1.2.2.3.2. Rezonanța magnetică nucleară	89
IV.1.2.2.4. Analiza termică	91
<b>IV.2. Grefarea poli (<math>\epsilon</math>-caprolactonei) prin polimerizarea <math>\epsilon</math>-CL la grupările –OH ale amidonului</b>	94
IV.2.1. Principiul reacției	94
IV.2.2. Analiza rezultatelor obținute	96
IV.2.2.1. Analiza structurală	96
IV.2.2.1.1. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR	96
IV.2.2.1.2. Rezonanța magnetică nucleară	97
IV.2.2.1.3. Determinarea gradului de substituție al grefelor de PCL pe scheletul amidonului	98
IV.2.2.2. Analiza termică	100
IV.2.2.3. Analiza suprafeței prin XPS și Tof-Sims	105
IV.2.2.4. Analiza tensiunii superficiale	107
<b>IV.3. Concluzii</b>	107
<b>CAPITOLUL V. OBȚINEREA HIDROGELURILOR PE BAZĂ DE AMIDON</b>	109
<b>V.1. Obținerea hidrogelurilor pe bază de amidon prin reticulare cu epiclорhidrină</b>	109
V.1.2. Principiul reacției	109
V.1.3. Program experimental	110
V.1.4. Analiza rezultatelor obținute	116
V.1.4.1. Analiza rezultatelor privind proprietățile de umflare în soluții apoase	111

<b>V.2. Modificarea chimică a hidrogelurilor pe baza de amidon funcționalizat cu grupare de tip alchină, prin reacția cu PCLN<sub>3</sub> via « click chemistry »</b>	112
V.2.1. Principiul reacției	112
V.2.2. Analiza rezultatelor obținute	113
V.2.2.1. Analiza structurală a hidrogelurilor	113
V.2.2.1.1. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR	113
V.2.2.1.2. Rezonanța magnetică nucleară	114
V.2.2.3. Analiza morfologică	115
V.2.2.4. Analiza termică	116
<b>V.3. Concluzii</b>	118
<b>V.3. Obținerea hidrogelurilor pe bază de amidon și amidon modificat cu cloruri acide și cu poli (<math>\epsilon</math>-caprolactonă) prin reticulare cu acid citric</b>	118
V.3.1. Principiul reacției	119
V.3.2. Program experimental	120
V.3.3. Analiza rezultatelor obținute	120
V.3.3.1. Analiza structurală a hidrogelurilor	120
V.3.3.1.1. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR-ATR	120
V.3.3.2. Analiza morfologică	123
V.3.3.3. Analiza rezultatelor privind proprietățile de umflare în soluții apoase	124
V.3.3.4. Analiza capacității de includere și eliberare a levofloxacinei	126
V.3.3.5. Studiul matematic al procesului de eliberare a medicamentului	130
<b>V.4. Concluzii</b>	140
<b>VI. CONCLUZII GENERALE</b>	143
<b>REFERINȚE BIBLIOGRAFICE</b>	144



## INTRODUCERE

Materialele pe bază de polizaharide au deschis noi drumuri în domeniul biomedical și anume în cel al regenerării tisulare, al sistemelor de eliberare controlată a medicamentelor și al imobilizării celulare. Proprietățile importante ale polizaharidelor includ biocompatibilitatea, biodegradabilitatea, activitatea biologică controlabilă și abilitatea lor de a forma hidrogeluri. Majoritatea polizaharidelor folosite sunt derivate din surse naturale, iar neajunsurile lor au impus noi metode sintetice de modificare chimică, scopul fiind de a promova noi activități biologice și de a modifica proprietățile finale ale acestora pentru scopuri specifice.

Eliberarea controlată a agenților bioactivi constituie un domeniu major al cercetărilor din ultimii ani. Au fost folosite metode variate pentru a elibera molecule biologic active în zone țintă și de a extinde durata lor terapeutică odată ajunse în corpul uman. Sistemele polimerice purtătoare de medicament au numeroase avantaje în optimizarea regimului de tratament al pacientului. Biomaterialele, în special copolimerii pe bază de amidon, sunt capabili de a elibera medicamente într-un ritm constant pe o perioadă îndelungată de timp. Pe de altă parte, amidonul nativ nu este adecvat în anumite sisteme de eliberare a medicamentelor, având în vedere proprietatea sa de a se umfla, ceea ce duce la o stabilitate scăzută pe termen lung cauzată de hidrofilia polizaharidului, faptul că este degradat enzimatic într-un ritm rapid în fluidele biologice, respectiv proprietățile sale mecanice slabe. Pentru a preîntâmpina cele enumerate anterior, au fost adoptate strategii sintetice de modificare fizică și chimică a polizaharidei, precum introducerea de grupări hidrofobe, ce duce la obținerea de polimeri amfifili astfel schimbând proprietățile acesteia, inclusiv vâscozitatea soluției, comportamentul de asociere și stabilitatea în cadrul produselor finale.

Prođușii sintetici rămân totuși indispensabili pentru numeroase aplicații și nu este întotdeauna posibil a-i substitui cu o moleculă naturală. Ideea asocierii unei componente sintetice cu una zaharidică în cadrul aceleiași structuri chimice a condus la o nouă clasă de materiale ce întrunește proprietățile fizico-chimice ale fiecărui compus.

Poli( $\epsilon$ -caprolactona) și materialele pe bază de PCL au fost intens investigate pentru aplicațiile lor farmacologice și biomedicale, datorită prețului scăzut, degradării lente, permeabilității crescute pentru multe medicamente și netoxicității. Unul din cele mai reprezentative exemple de copolimeri biodegradabili hidrofobici și amfifilici este ilustrat în cazul poliesterilor și a polizaharidelor.

În domeniul biomedical, copolimerii pe bază de polizaharide și-au găsit aplicabilitate ca sisteme de vectorizare a principiilor biologice active, ca suporturi pentru ingineria tisulară, ca agenți de biocompatibilizare, în terapia genică, componenta naturală a acestora asigurând acceptarea de către organism a produsului străin.

Sinteza copolimerilor amfifili a fost intens studiată în principal datorită proprietății lor de autoasociere în medii apoase. Acest fenomen are loc când un copolimer conține blocuri de natură diferită (hidrofob /hidrofil) și este dizolvat într-un solvent pentru care numai unul din blocuri prezintă afinitate. Autoasocierea va duce la formarea de particule cu o structură numită micelară, în care blocurile ce nu prezintă afinitate pentru solvent se vor dispune în interior, iar cele cu afinitate pentru solventul utilizat vor constitui un înveliș extern.

Un alt sistem de eliberare controlată este hidrogelul, material ce permite evitarea administrării frecvente, lucru extrem de benefic pentru confortul pacientului. Hidrogelurile actuale ce se doresc a deveni instrumente de eliberare a medicamentelor sunt limitate de natura lor hidrofilă datorită eliberării rapide a acestora în faza inițială. Mai mult, datorită interacțiunilor hidrofobe, se pot forma agregate mari de medicament în timpul procesului de încărcare a acestuia, fapt ce poate conduce la o concentrație locală mare și poate cauza efecte secundare sau chiar toxicitate.

Scopul acestei lucrări este de a hidrofobiza amidonul pentru obținerea și caracterizarea unor sisteme de eliberare a medicamentelor. Pentru aceasta, s-au sintetizat noi copolimeri pe bază de amidon, sistemele descrise fiind elaborate *via* «click chemistry» (CuAAC) între lanțurile de amidon purtătoare de funcții alchine laterale și lanțurile de policaprolactonă cu funcția azidică pe capătul terminal. Amfifilicătatea polimerilor obținuți depinde de lungimea lanțului de policaprolactonă, fiind proiectați pentru o viitoare utilizare în stabilizarea de nanoparticule purtătoare de principii biologice active. În paralel, au fost obținute hidrogeluri pe bază de amidon și amidon modificat cu lanțuri de acid gras și policaprolactonă, reticulate cu acid citric. A fost evaluată capacitatea lor de absorbție a apei și a eliberării de principii active.

- INTRODUCERE -

STUDIU BIBLIOGRAFIC

## CAPITOLUL I

### I.1. POLIMERI AMFIFILI PE BAZĂ DE POLIZAHARIDE

Medicina modernă utilizează o varietate extinsă de materiale sintetice și instrumente pentru tratarea de stări medicale și boli. Dispozitivele biomedicale precum stenturile, grefele vasculare, valvele cardiace, sacii de sânge, oxigenatorii sanguini, dializorii renali, cateterele, protezele de șold și genunchi, lentilele intraoculare, respectiv cele de contact, implanturile cohleare și dentare au jucat în mod categoric un rol important în transformarea vieții și a calității efective a acesteia. Progresele obținute în domeniul medicamentelor bazate pe proteine, în cel al terapiei genice, respectiv al livrării direcționate a medicamentelor și al ingineriei țesuturilor prezintă un potențial de revoluționare a medicinei contemporane.

Termenul de “biomaterial” este aplicat în categorizarea materialelor și instrumentelor ce “interacționează” în mod direct cu țesuturi și organe umane. Aceste interacțiuni pot implica, spre exemplu, plachetarea (agregarea trombocitelor) și coagularea sanguină în cazul dispozitivelor ce intră în contact cu sângele, răspunsul imunitar și reacțiile determinate de corpuri străine de tip biomaterial sau instrumente implantate în corp, sau, de preferat, conexiunea structurală și funcțională între implant și țesutul gazdă (această situație este denumită drept osteointegrare în cazul implanturilor dentare și ortopedice). Biomaterialele interacționează cu sistemele biologice prin intermediul suprafețelor lor. Controlul proprietăților suprafeței unui biomaterial prezintă, prin urmare, o importanță vitală, astfel încât acesta să se integreze în mod corespunzător cu țesuturile gazdă – adică de a fi transformat într-unul “biocompatibil”. Filmele și straturile organice subțiri, în particular cele din polimeri, constituie soluții atractive de biomateriale pentru acoperiri, deoarece oferă o excelentă versatilitate în cadrul grupărilor chimice care pot fi încorporate la suprafață (pentru a controla interacțiunile țesut – biomaterial); acoperirile prezintă, de asemenea, proprietăți mecanice similare țesuturilor biologice moi. Relativa ușurință în procesare reprezintă un alt motiv ce susține puternicul interes pentru filmele organice subțiri, deoarece suprafețele biomaterialelor pot fi acoperite cu polimeri <sup>1</sup>.

O preocupare majoră a comunității științifice a științei materialelor, în particular a polimerilor (copolimeri bloc și grefați, elastomeri termoplastici, rețele polimerice, polimeri amfifili etc.) este reprezentată de proiectarea de materiale funcționale, caracterizate de trăsături fizice adaptate necesităților progreselor tehnologice<sup>2</sup>.

Cu toate acestea, manipularea acestora la scări mai mari este nontrivială, în timp ce procesarea pentru fabricarea de dispozitive funcționale din molecule de mici dimensiuni este solicitantă. Pe de altă parte, copolimerii bloc amfifili, formați din homopolimeri cu hidrofilie diferită, se pot auto-asambla în rețele nanostructurate. Funcționalitatea încorporată este totuși limitată și necesită, în mod obișnuit, post-funcționalizare.

### I.1.1. Polimeri amfifili

Copolimerii bloc amfifili (*amphi*: de ambele tipuri; *philic*: cu afinitate pentru) sunt compuși din cel puțin două subunități, dintre care una posedă proprietăți de hidrofilie, iar cealaltă are un caracter hidrofob. În mod similar amfifililor cu masă moleculară redusă (lipide, surfactanți), copolimerii bloc amfifili se auto-asamblează, folosind solvenți bloc-selectivi, într-o varietate de structuri, precum micle, micle compuse, vezicule, tuburi, faze cristal-lichide liotropice<sup>3 4</sup>. Tipurile de morfologii pot fi controlate prin varierea compoziției copolimerilor, a concentrației inițiale a copolimerilor în cadrul soluției, prin natura solventului comun, cantitatea de apă prezentă în mediu, prin temperatură, prin prezența aditivilor ca ioni, homopolimeri sau tensioactivi, respectiv prin polidispersitatea lanțurilor copolimerice<sup>5</sup>. Compoziția copolimerilor este definită în mare parte de masa moleculară și dimensiunile blocurilor homopolimere<sup>6</sup>. Acestea din urmă reprezintă un parametru important, iar valoarea lungimii secvenței blocurilor depinde de tipul auto-asamblărilor<sup>7</sup>.

În soluțiile diluate în anumiți solvenți (ex. solvent bun pentru un bloc dar precipitant pentru celălalt) copolimerii bloc manifestă comportament de autoasamblare. Lanțurile polimerice tind să se organizeze spontan într-o varietate de structuri, de la micle sferice sau cilindrice până la vezicule (Figura 1)<sup>8</sup>.

În cazul cel mai simplu al unei micle sferice, blocul solubil se va orienta către solvent și va forma coroana, în timp ce partea insolubilă va fi protejată de solvent și va forma miezul dens. În comparație cu micelizarea surfactanților cu o greutate moleculară mică, blocurile copolimerice pot genera agregate cu stabilitate cinetică și termodinamică mare, fapt ce mărește gama lor de aplicații.

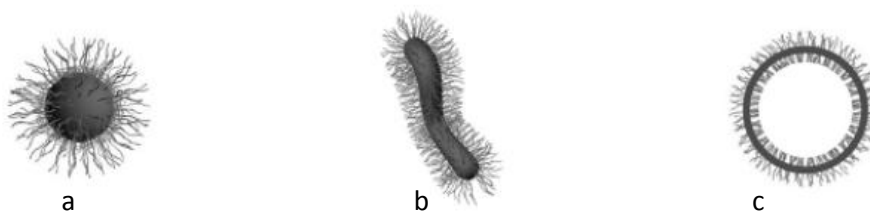


Figura 1. Morfologii ale agregatelor blocurilor polimerice în soluție a) micelă sferică, b) micelă cilindrică, c) veziculă.

Spre exemplu, Zhang și Eisenberg<sup>9</sup> au arătat că sfericele, cilindrii și veziculele au fost formate din copolimeri polistiren-co-poli(acid acrilic) PS200-co-PAA21, PS200-co-PAA15, PS200-co-PAA8, respectiv în soluții dimetilformamida (DMF) / apă. Gradul alungirii PS pentru aceste trei tipuri de agregate a fost de 1,41, 1,26 și 0,99<sup>10</sup>. Acest exemplu ilustrează modificările morfologice de la sfere la cilindri și ulterior vezicule, pe măsură ce gradul de alungire se micșorează. Dependența morfologiei de concentrație se poate vedea în mod clar în cadrul diagramelor de fază ale anumitor sisteme copolimerice. Shen și Eisenberg au investigat formarea veziculelor PS-co-PAA, funcție de concentrația soluției de polimer<sup>8,9</sup>.

Pentru un conținut fixat de apă, veziculele s-au format pentru concentrații ale copolimerului PS310-*co*-PAA52 mai mari decât aproximativ 0.6 wt. %. Cei doi au raportat, de asemenea, că, pentru majorarea concentrației polimerului de la 0.6 la 5.0 wt. %, diametrul mediu al veziculelor a crescut de la 90 la 123 nm. În general, odată cu mărirea concentrației soluției polimerice, morfologia agregatului tinde să se modifice în mod similar conform celor observate în cazul incrementării conținutului de apă <sup>11</sup>.

Pentru a induce auto-asamblarea copolimerului, este adesea necesar un solvent comun, pentru a dizolva atât blocurile hidrofobe, cât și cele hidrofile și a forma o soluție copolimerică înainte de adăugarea precipitantului. Alegerea solventului comun influențează, totodată, morfologiile auto-asamblărilor obținute <sup>12</sup>.

Prin urmare, Yu et al. au arătat formarea de agregate sferice din PS500-*co*-PAA58 în DMF, vezicule fiind însă obținute când solventul inițial a fost tetrahidrofuran (THF) sau dioxan. Controlul morfologiei agregatelor bloc – copolimerice poate fi realizat nu doar aplicând solvenți simpli, ci și micști. Adăugarea apei servește la modificarea interacțiunilor polimer – solvent și la inducerea de schimbări morfologice și de auto-asamblare <sup>13 14 15</sup>. Aceeași situație poate fi atinsă într-un solvent simplu prin variații ale temperaturii aplicate. Cu toate acestea, au fost raportate modificări ale auto-asamblării copolimerului bloc induse de temperatură pentru sisteme polimerice constituite în cea mai mare măsură din poli(etilen glicol) termoresponsiv <sup>16</sup> sau din blocuri din polielectroliți. Aspectele experimentale ale influenței forței ionice, pH-ului <sup>17</sup>, ale sării adăugate și homopolimerilor au fost investigate folosind în principal sisteme copolimerice bloc amfifilic pe bază de polielectroliți. În general, comportamentul de auto-asamblare al copolimerilor bloc amfifili poate fi influențat de o varietate de factori distincti. Cu toate acestea, există teorii ce conferă direcții pentru raționalizarea morfologiilor observate și care pot fi utilizate în predicția tipului de structuri auto-asamblate <sup>18</sup>.

Din altă perspectivă, influența compoziției macromoleculare sau a solventului comun asupra auto-asamblării polimerului poate fi exploatată cu scopul construirii tipului și proprietăților agregatelor. În plus, auto-asamblarea macromoleculară este mai degrabă tolerantă față de introducerea diverselor grupuri funcționale, ceea ce permite totodată existența proprietăților de reglare a ansamblurilor, pentru aplicații specifice. Acesta este unul dintre avantajele principale ale auto-asamblării polimerice, față de cea din compuși de masă moleculară redusă, precum lipidele și surfactanții. Alte avantaje sunt reprezentate de posibilitatea de a introduce mecanisme adiționale pentru stabilizarea coloidală, de controlul concentrației micelare critice a polimerului (CMC), permeabilitatea scăzută și stabilitatea îmbunătățită a membranelor polimerului amfifilic și pot fi folosite în diverse aplicații tehnologice <sup>19</sup>.

Este utilă menționarea faptului că sistemele biologice implică amfifili similari polimerilor (proteine, polizaharide) în rezolvarea problemelor de stabilizare a heterofazei. Acesta este un indiciu clar pentru cercetătorii în știința materialelor: arhitectura macromoleculară a copolimerilor amfifili și asamblarea acestora la diferite scale de lungime, de timp, respectiv

niveluri de interacțiune, fac utilizarea acestor compuși foarte atractivă. Cele mai interesante exemple de aplicații potențiale sunt reprezentate de eliberarea de substanțe diverse, diagnoză medicală și reconstituirea de molecule biologice<sup>20</sup>. Dintre diferitele auto-asamblări polimerice, micellele și veziculele au fost utilizate mai ales în biotehnologie. Spre exemplu, acestea servesc atât drept purtători de molecule hidrofobe (în capsula hidrofobă), cât și drept compuși hidrofilii (în interiorul apos)<sup>21</sup>.

Polimerii amfifili au fost intens studiați pe parcursul ultimilor treizeci de ani. Aceștia au fost inițial obținuți prin copolimerizarea monomerilor cu suprafețe active (ceea ce a condus la obținerea cunoscutelor polisăpunuri). A fost vizată combinarea dintre caracteristicilor macromoleculilor și comportamentul de suprafață activă al unităților individuale. Polimerii obținuți prin această metodă au format agregate intramoleculare, denumite "coliere", chiar și la concentrații foarte reduse, și au prezentat o foarte redusă solubilitate în apă. Legăturile permanente dintre unitățile cu suprafețe active au favorizat agregarea acestora în mod termodinamic, deoarece acesta a redus semnificativ pierderea entropică ce însoțește agregarea unităților individuale.

Ulterior, au fost sintetizați alți polimeri amfifili, prin combinarea mării majorității a unităților hidrofile cu doar câteva de tip hidrofob. În mod opus polisăpunurilor, acest tip de macromoleculă dispune de "un caracter amfifil global/general", determinat de prezența secvențelor hidrofile și hidrofobe în cadrul lanțurilor (în loc să fie lanțuri formate din unități amfifile individuale). Astfel de polimeri sunt în general solubili în apă (în funcție de cantitățile diferitelor unități) și formează asocieri intermoleculare caracterizate de concentrații suficient de ridicate<sup>3</sup>. Într-adevăr, în plus față de suprapuneri între molecule, tendința termodinamică a grupurilor hidrofobe de a se asocia pentru a minimiza contactele cu mediul înconjurător apos (efect hidrofob) crează interacțiuni suplimentare între macromoleculă. Aceasta conduce la formarea unei rețele reticulate fizic și deci la soluții apoase cu vâscozități ridicate (polimeri asociativi).

Un volum semnificativ de lucru a fost dedicat comportamentului soluțiilor polimerice apoase semidiluate și concentrate. În particular, a fost demonstrat că nivelul de vâscozitate poate fi considerabil modificat prin intermediul varierii atât a naturii unităților hidrofobe, cât și a distribuției acestora în cadrul lanțurilor polimerice. La interfețele dintre faza apoasă și suprafața hidrofobă, aceste macromoleculă adsorb și conduc la formarea unui strat polimeric dens<sup>22,23</sup>.

În cazul interfețelor lichid – lichid, acest strat polimeric conduce la obținerea unui răspuns mecanic specific la deformarea suprafeței. Acesta este sursa proprietăților de emulsionare ale macromoleculilor amfifile. Pentru interfețele solid – lichid, suprafața solidă este acoperită cu un strat polimeric ce controlează interacțiunile dintre particule și mediul ambiant. În general, stratul polimeric este suficient de dens pentru a preveni agregarea determinată de atracțiile Van der Waals. O altă caracteristică importantă a adsorbției macromoleculilor la interfețe este reprezentată de "ireversibilitatea cinetică" a acestui proces. Într-adevăr, desorbția

unui macromolecule individuale necesită desorbția simultană a tuturor unităților hidrofobe din interfață, un caz foarte puțin probabil. Prin urmare, dispersiile stabilizate polimeric pot fi în general diluate fără destabilizare, fapt important în varii situații <sup>22</sup>.

Sinteza polimerilor amfifili a fost realizată în principal prin două metode. Cea dintâi se bazează pe copolimerizarea a cel puțin doi monomeri, unul hidrofil și unul hidrofob. Distribuția diferitelor unități în cadrul lanțurilor este controlată în mare măsură de structura chimică a monomerilor (rapoarte de reactivitate) și de către mediul de reacție (omogen, eterogen, micelar etc.). S-a demonstrat că prin intermediul cantității de surfactant din copolimerizarea micelară se poate controla caracterul de bloc al copolimerilor amfifili.

Cealaltă procedură implică modificare chimică a unui polimer hidrofil existent, prin atașarea de grupări hidrofobe. În acest caz, distribuția unităților hidrofobe în lungul scheletului hidrofil este controlată în principal de către mediul de reacție. Folosind aceste două strategii de sinteză și datorită abundenței de structuri chimice, a fost posibilă obținerea de polimeri amfifili ce prezintă sensibilitate la alte variabile fizico – chimice, precum temperatura, tăria ionică, radiațiile UV vizibile și altele. Această situație conduce la obținerea de sisteme coloidale ce prezintă comportamente originale: variație inversă a vâscozității în funcție de temperatură, modificarea tipului de emulsie prin iradiere UV sau tărie ionică, comportament polielectrolitic etc.

Nu demult au fost emise noi cerințe legate de mediu. S-a manifestat un interes crescând pentru polimerii amfifili obținuți surse regenerabile, biodegradabili și biocompatibili. Solicitări similare au rezultat și din noi tipuri de aplicații legate de domeniul biomedical, precum materialele pentru repararea de țesuturi, respectiv dispozitivele de eliberare de medicamente. Această situație a condus la utilizarea de noi materiale, precum polizaharidele, pentru prepararea polimerilor amfifili. Polimerii hidrofili de tipul polizaharidelor prezintă proprietăți interesante, precum biodegradabilitatea și biocompatibilitatea, putând fi modificați din punct de vedere chimic, cu scopul obținerii de polimeri amfifili.

Pionieratul utilizării micelilor polimerice ca sisteme pentru eliberarea de medicamente a fost realizat de grupul lui Ringsdorf în 1984 <sup>24</sup>. În prezent, micelile polimerice sunt intens studiate ca un foarte promițător purtător nanoscopic de medicamente <sup>25</sup>, datorită atractivelor caracteristici de pe care le prezintă, ce respectă necesitățile eliberării selective de medicamente. Un aspect important este că miezul micelar hidrofob dispune de o capacitate ridicată de acomodare a medicamentelor hidrofobe. Au fost recent cercetate micelile polimerice și ca sistem de eliberare medicamentoasă orală <sup>26</sup>, dar acestea erau inițial considerate ca fiind cele mai potrivite pentru administrare intravenoasă. O largă varietate de medicamente, precum doxorubicin, paclitaxel, cisplatin, indomethacin și altele, au fost încorporate în micelile polimerice și testate pentru aplicații de eliberare de medicamente. Încărcarea și eliberarea acestora prin intermediul micelulelor polimerice și abordările de optimizare constantă a eficienței acestor sisteme de eliberare pe bază de polimeri sunt corespunzător descrise în cercetările lui Rijcken et



al. <sup>27</sup>, respectiv Rösler și coautorii săi <sup>28</sup>. Auto-asamblările veziculare polimerice au fost, de asemenea, utilizate ca purtători de medicamente <sup>29</sup>, cu toate că au fost obținute sisteme mai complexe prin inserția de proteine naturale în membrane veziculare .

A fost însă necesară parcurgerea a numeroși pași până la atingerea acestui punct, începând cu strategii de sinteză, urmate de analize complexe asupra auto-asamblării copolimerilor, folosind diverse tehnici. Sinteza copolimerilor bloc amfifili reprezintă cheia determinării structurii, funcționalității și proprietăților ansamblurilor potențiale. Prin urmare, trebuie făcută o alegere atentă a abordării sintetice, pentru a obține polimeri amfifili de compoziția, masa moleculară și polidispersitatea vizată.

Procesul de asamblare este guvernat de două forțe opuse, atracția dintre compușii insolubli și repulsia dintre părțile solubile. Competiția dintre aceste forțe depinde de geometria moleculelor. Prin urmare, morfologia rezultantă a bloc copolimerilor în soluțiile diluate poate fi prevestită folosind considerațiile geometrice.

Israelachvili și colab.<sup>30</sup> au dezvoltat o abordare foarte accesibilă prin introducerea unui parametru de asamblare ce este în legătură cu alți trei parametri geometrici:

$$p = \frac{v}{a_0 l_c} \quad \text{ecuația (1)}$$

unde  $v$  este volumul ocupat de lanțurile hidrofobice și  $a_0$  reprezintă interfața optimă, iar  $l_c$  este lungimea conturului lanțului hidrofobic (Figura 2). Tabelul 1 arată relația dintre  $p$  și morfologia agregatului.

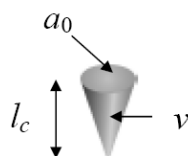


Figura 2. Parametrii moleculari ai copolimerului bloc.

Tabelul 1. Dependența morfologiei finale de parametrii moleculari intrinseci.

Parametrul de asamblare $p$	Geometria moleculară	Morfologie
$<1/3$		Micele sferice
$1/3-1/2$		Micele cilindrice
$1/2-1$		Vezicule, straturi flexibile
1		Lamele, straturi plane

Un parametru important ce are legătură cu dimensiunea micelilor este reprezentat de numărul de agregare  $Z$ , care reprezintă numărul de lanțuri copolimerice încorporate într-o micelă. Förster și colab.<sup>31</sup> au ilustrat o corelare generală între  $Z$  și gradul de polimerizare în sistemele puternic separate. Pentru un copolimer cu un bloc insolubil A și un bloc solubil B, relația poate fi exprimată ca fiind:

$$Z = Z_0 N_A^2 N_B^{-0.8} \quad \text{ecuația (2)}$$

$Z_0$  este în legătură cu parametrul de asamblare  $p$ , precum și cu parametrul Flory-Huggins,  $\chi$ , care ia în considerare atât interacțiunile polimer/polimer cât și pe cele polimer/solvent,  $N_A$  și  $N_B$ , fiind gradele de polimerizare ale blocurilor A respectiv B.

În funcție de polaritatea solventului folosit, micellele bloc copolimerilor se pot împărți în două tipuri: obișnuite și inverse. Într-un solvent polar, cum este apa, se formează micellele obișnuite, cu un miez hidrofob și un înveliș hidrofil, pe când într-un solvent apolar (sau de o polaritate joasă), localizarea blocurilor este inversată.

În funcție de lungimile relative ale lanțurilor bloc copolimerilor și ale parametrului de interacțiune, fiecare tip de micelă se împarte în alte două tipuri de structuri micelare.

Când  $N_A \gg N_B$ , vom avea „micela crew cut” (a), cu un miez mult mai mare decât stratul exterior<sup>32</sup>.

Când  $N_A \ll N_B$ , se formează micelle sub formă de stea (b) cu un miez mult mai mic decât coroana.

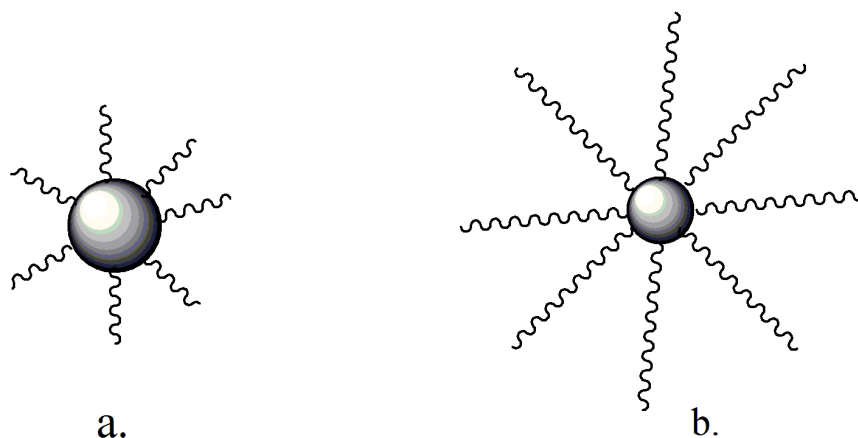


Figura 3. Structuri micelare a. „crew-cut”, b. micelă stea.

Dacă parametrul corespunzător interacțiunilor dintre două blocuri  $\chi_{AB}$ , este comparabil cu cel care descrie interacțiunile polimer/solvent al unui bloc  $\chi_{AS}$ , și acestea două sunt mult mai mari decât cel pentru interacțiunile polimer/solvent ale celuilalt bloc,  $\chi_{BS}$ , atunci miezul micelii

constă în principal din blocuri de tip A, coroana este alcătuită din B, umflat cu solvent, deși în faza solventului nici un bloc copolimeric nu este prezent.

Relațiile de scalare între raza micelui,  $R$ , numărul de agregare,  $Z$  și gradele de polimerizare sunt descrise în Tabelul 2.

Tabelul 2.

Structura micelară	Raza $R$	Numărul de agregare $Z$
Stea	$\sim N_A^{3/5}$	$\sim N_A^{4/5}$
Crew cut	$\sim N_A^{2/3}$	$\sim N_A$

Interacțiunea dintre polimeri și moleculele de mici dimensiuni din substanța dizolvată, precum surfactanții sau particulele coloidale, atrage un interes semnificativ datorită potențialului extins de aplicare industrială și importanței biologice<sup>33</sup>. Spre exemplu, polimerii sunt utilizați în controlul stabilității suspensiilor coloidale, micellele copolimerice bloc sunt folosite la eliberarea localizată de coloizi mici<sup>34</sup>, dar, în mod esențial, interacțiunea dintre biopolimeri și proteine sau fosfolipide membranare prezintă un interes fundamental. În plus, interacțiunile dintre polimeri hidrofilii și grupări din particule coloidale mari<sup>35 36</sup>, sau micelle reprezintă un subiect de cercetare intensă.

Prezența polimerilor hidrofilii induce formarea de agregate polimer – surfactant sub forma de micelle acoperite cu lanțuri polimerice<sup>37</sup>. Această asociere colaborativă are de obicei loc sub concentrația micelară critică (CMC) a surfactanților. Particule coloidale de mari dimensiuni formează agregate împreună cu polimerii, acolo unde există lanțuri polimerice hidrofile înfășurate în jurul particulelor coloidale. Lanțurile polimerice pot lega între ei diferiți coloizi, conducând la formarea de aglomerări de coloizi sau gel<sup>34</sup>. La rândul lor, mai multe lanțuri polimerice adsorbi pe aceeași particulă coloidală, formând și stabilizând coroana hidrofilă. O caracteristică importantă a acestui tip de agregate este că adsorbția este reversibilă, particulele coloidale putând aluneca eficient în lungul lanțului. În cazul multor lanțuri lungi adsorbite pe aceeași particulă coloidală, gradul de libertate aferent alunecării conduce la formarea de agregate în formă de stea, cu un număr variabil de brațe.

Asocierea sinergetică a copolimerilor bloc cu molecule de mici dimensiuni se poate caracteriza prin procesabilitate și auto-asocierea copolimerilor bloc cu funcționalitatea chimică amplă a moleculelor mici. Spre exemplu, Ikkala și colab. au dezvoltat o metodă versatilă de a construi supramolecule prin atașarea de molecule mici la capătul lanțului polimeric, prin intermediul legăturilor de hidrogen, al interacțiunilor electrostatice sau coordinarea metalului<sup>38</sup>.

Capacitatea suprafețelor hidrofile, în special a acoperirilor bazate pe poli(etilen glicol) (PEG), de a rezista la absorbția de proteine a fost demonstrată în mai multe studii.

Acoperirile cu copolimeri bloc amfifili, ce conțin compuși PEG-ilați și fluoroalchilici au prezentat forțe de interacțiune extrem de reduse cu moleculele proteice<sup>1</sup>.

În cele ce urmează, sunt descrise un set de tehnici de sinteză utilizate în mod obișnuit pentru prepararea diferitelor tipuri de copolimeri amfifili. Metodele curente de sinteză solicită de obicei tehnici de polimerizare “vie”, precum polimerizarea anionică, cea cationică sau cu transfer de grup. Abordările de polimerizare vie prezintă avantajul realizării polimerilor cu distribuție restrânsă a masei moleculare, respectiv cu grade predeterminate de polimerizare ce depind exclusiv de raportul molar dintre monomer și concentrația inițiatorului.

Cu toate acestea, atunci când una dintre componente nu poate fi polimerizată conform unui mecanism viu, sunt posibile următoarele variante: sinteza pornind de la macromonomeri sau încapsularea cu grupări terminale speciale pentru reinițializarea transferului în lanț, sau oprirea acesteia. Pentru majoritatea procedurilor de sinteză, se impune a fi îndeplinite condiții de puritate ridicată a reactanților, protocoale de izolare puțin consumatoare de timp și/sau protejarea unor grupări chimice. Toate metodele de sinteză au fost discutate și documentate detaliat de către Floudes și colab.<sup>39</sup>, de Gnanou și colab. săi<sup>40</sup> precum și de Forster<sup>41</sup>. Mai jos, sunt prezentate pe scurt o parte din tehnicile ce implică creșterea secvențială de blocuri prin polimerizare vie, urmând o descriere mai cuprinzătoare a polimerizării radicalice prin transfer de atomi (atom transfer radical polymerization, ATRP). Această ultimă tehnică este avută în vedere datorită utilizării ei în prepararea copolimerilor bloc amfifili în soluție și pe suprafețe.

Caracterizarea surfactanților din punct de vedere al grupărilor ce prezintă cap hidrofil conduce la patru grupe distincte:

- a) Surfactanți anionici: surfactanți cu o grupare hidrofobă și o grupare cap încărcată negativ;
- b) Surfactanți nonionici: surfactanți cu o grupare hidrofobă și o grupare cap hidrofilă, cu dipol-moment puternic; surfactanții nonionici nu au încărcare formală;
- c) Surfactanți amfoterici: surfactanți cu o grupare hidrofobă și o grupare cap hidrofilă, cu o sarcină pozitivă și una negativă.

Pe lângă extinsa gamă de aplicații aferente vieții cotidiene, compușii amfifili iau, de asemenea, parte în natură – lipidele din membranele celulare. Combinarea părților hidrofile (polare) și hidrofobe (nepolare) marchează proprietățile amfifile – lanțul hidrofob favorizează faza uleioasă, în timp ce lanțul hidrofil o favorizează pe cea apoasă. Comportamentul surfactanților la nivel molecular depinde de lungimile și flexibilitatea secvenței hidrofobe.

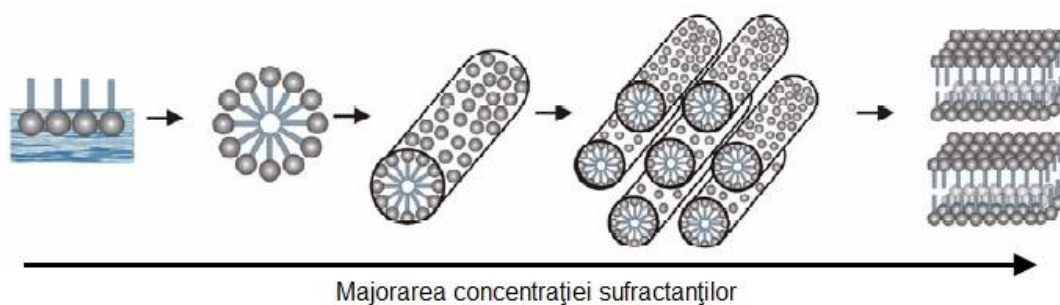


Figura 4. Agregarea surfactanților în funcție de creșterea concentrației lor <sup>42</sup>.

Diferitele proprietăți ale celor două părți ale moleculei determină un comportament fazic complicat, bazat pe auto-asamblarea moleculelor amfifile în soluție. Agregarea și comportamentul fazic aferente surfactanților și polimerilor amfifili sunt descrise schematic în Figura 4.

Prin adăugarea unui surfactant amfifil în apă, moleculele acestuia se dizolvă întâi ca molecule singulare, iar apoi formează un strat de adsorbție la suprafață. În cazul în care concentrația surfactantului depășește concentrația micelară critică (CMC), suprafața nu mai poate primi molecule de surfactant, formându-se miclele. La început, are loc formarea de miclele sferice iar apoi, prin majorarea cantității de surfactant, structura se modifică în miclele cu formă de baston. Formarea miclelelor controlează proprietățile de solubilizare, responsabile pentru procesele de curățare. Majorând în continuare cantitatea de molecule de surfactant, miclele sub formă de baston se aranjează într-o structură hexagonală și, odată cu mărirea concentrației, se obțin faze cubice, nematice sau lamelare.

O altă proprietate, pe lângă auto-organizarea amfifililor în faza volumică, este adsorbția la o suprafață sau interfață. Adsorbția de molecule amfifile pe suprafețe conduce la modificarea proprietăților fizice, în special reducerea tensiunilor superficiale.

Moleculele de la suprafețe sau interfețe se află într-o condiție energetică specifică. Interacțiunea dintre moleculele singulare poate fi explicată printr-o diagramă vectorială. În Figura 8 sunt prezentate toate forțele intermoleculare din faza volumică a unui lichid ce este compensat. La suprafață, compensarea nu are loc din cauza absenței de vecini la exterior. Există totuși o forță direcționată către interiorul fazei volumice.

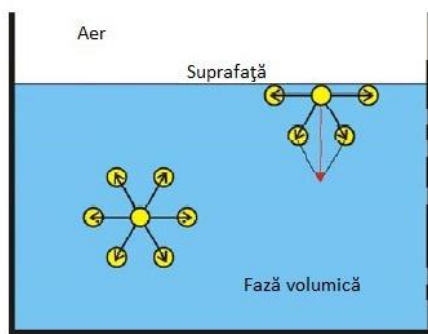


Figura 5. Forțele superficiale și din cadrul fazei volumice.

Precum a fost descris în Figura 4, sufactanții din soluție formează la suprafață, pentru concentrații reduse, straturi de adsorbție. Această situație determină o reducere a tensiunilor superficiale, proporțională cu majorarea concentrației surfactantului, până în momentul în care stratul de adsorbție este extrem de dens. Figura 6 prezintă în mod schematic adsorbția la suprafață a moleculelor de surfactant, până în momentul atingerii concentrației micelare critice (CMC). În acest punct (CMC), suprafața este complet acoperită cu molecule de surfactant, incrementarea concentrației acestuia determinând formarea de micle.

Figura 6(a) prezintă sistemul fără prezența surfactantului în soluție, iar 6(b) existența acestuia într-o concentrație sub CMC și un strat de adsorbție incomplet la suprafață. Figura 6(c) conține sistemul în punctul CMC, cu o suprafață total adsorbită. Pentru concentrații ce depășesc CMC, se formează micle în faza volumică.

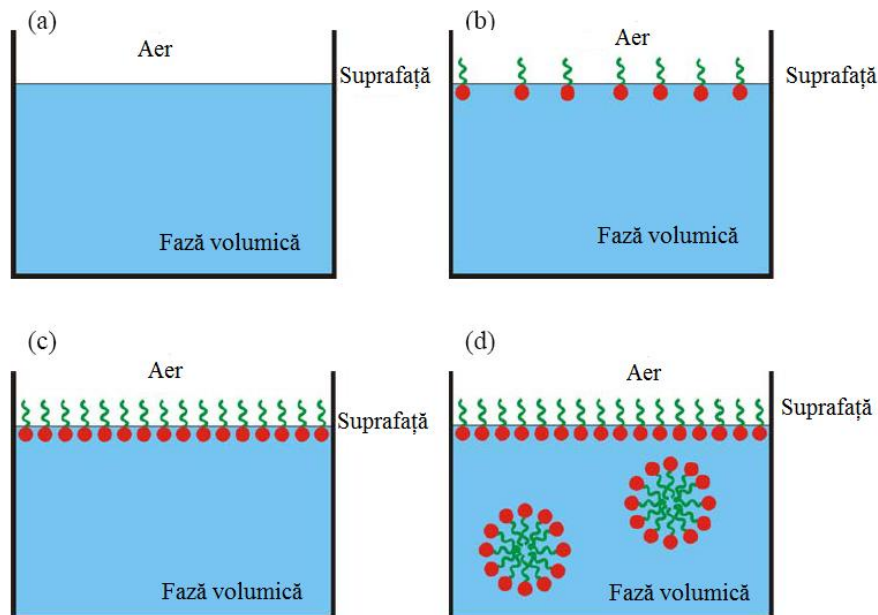


Figura 6. Adsorbția surfactanților la suprafață.

Pe parcursul procesului de adsorbție, tensiunea superficială scade constant, până la atingerea CMC și formarea unui strat de adsorbție complet la suprafață. La concentrații ce depășesc CMC, tensiunea superficială are o valoare constantă și nu mai scade, datorită stratului

complet de la suprafață. Moleculele adiționale de surfactant formează, din acest punct, miclele și nu mai afectează, prin urmare, tensiunea superficială.

Figura 7 prezintă graficul schematic al tensiunii superficiale. Zona cu gradient al tensiunii superficiale corespunde Figurii 6(b). Odată atinsă CMC, este format un strat de adsorbție complet (c) și pentru concentrații mai mari, tensiunea superficială rămâne constantă.

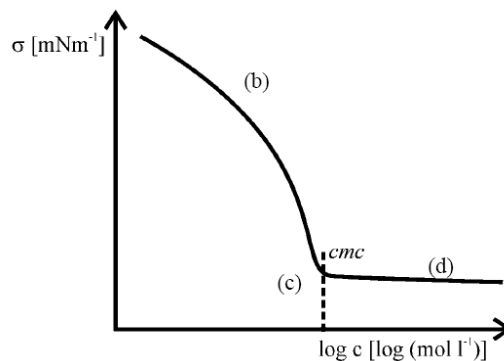


Figura 7. Graficul schematic al tensiunii superficiale.

Idei conceptuale creative au condus la un progres recent rapid în domeniul sistemelor de eliberare de medicamente (drug-delivery systems – DDS). Folosind sisteme eficiente, proprietățile farmacologice și terapeutice ale medicamentelor convenționale pot fi îmbunătățite în mod excepțional<sup>1</sup>. Sistemele de eliberare pot optimiza eficiența și reduce toxicitatea unui medicament, respectiv îmbunătăți colaborarea și satisfacerea pacientului.

Diversitatea limitată de materiale biocompatibile și a tehnologiilor de asamblare a acestora restricționează adesea comercializarea de DDS. Printre variatele tipuri de DDS, miclele polimerice au fost cercetate extensiv, datorită proprietăților lor remarcabile. În plus față de abilitatea de a stabili medicamente hidrofobe, miclele polimerice prezintă dimensiuni reduse ale particulelor, o distribuție dimensională relativ îngustă, CMC redus, un ritm lent de disociere și previn absorbția rapidă de către sistemul reticuloendotelial.

Miclele se înscriu între câteva zeci și mai multe sute de nanometri în diametru, facilitând integrarea sistemelor încărcate cu medicament în cadrul veziculelor endocitare, permițând astfel inserarea în cadrul celulelor țintă. Până în prezent, copolimerii bloc amfifili au fost cel mai des utilizați în fabricarea miclelor polimerice. În sistemele amfifile, segmentul hidrofob formează miezul miclei, iar cel hidrofil înconjoară miezul, stabilizând interiorul. În mod normal, ambele segmente conțin secvențe repetitive de unități de structuri chimice biocompatibile. Datorită diversității limitate a unităților recurente, morfologia lanțurilor copolimerice a prezentat un interes principal.

Printre variatele forme ale moleculelor de copolimer, structura amfifilă de tip pieptene este unică, determinând proprietăți morfologice interesante, precum comportamentul cristalin lichid. Au fost sintetizați multipli polimeri tip pieptene<sup>43</sup>, bazați pe poli(oxietilenă). Conform analizei literaturii existente, nu s-a încercat utilizarea polimerilor tip pieptene drept purtător și

eliberator de medicamente, din cauza metodelor de sinteză complicate aferente. Tehnicile de polimerizare vie, precum polimerizarea anionică, sau cea radicalică și cu transfer de atom, sunt adesea necesare pentru producerea lanțurilor laterale monodispersate corespunzătoare polimerilor tip pieptene.

În mod normal, segmentele hidrofiele ale polimerilor amfifili au un efect mai redus asupra CMC decât cele hidrofobe. În general, majorarea lungimii blocurilor hidrofobe reduce CMC, cu toate că acest efect nu este întotdeauna evident.

Surfactanții farmaceutici cu masă moleculară redusă utilizați în prezent prezintă o toxicitate scăzută și o putere de solubilizare ridicată. Pe de altă parte, au dezavantajul că sunt caracterizați de o concentrație micelară critică (CMC) destul de mare și sunt instabili în cazul diluării intense. Cu toate acestea, prin utilizarea copolimerilor amfifili, aceste inconveniente pot fi eliminate, deoarece acești produși dispun de o putere mare de solubilizare și CMC redus, fiind astfel mai stabili *in vivo*<sup>44</sup>.

Luând în calcul aceste avantaje ale sistemelor de eliberare medicamentoasă, a fost dezvoltată o metodologie chemo-enzimatică pentru sinteza de polimeri amfifili funcționalizați, fiind folosiți poli(etilen glicol)i, PEG, deoarece aceștia sunt biocompatibili, netoxici și solubili în apă. S-a demonstrat<sup>45</sup> că prin modificarea lungimii și funcționalității lanțului lateral, caracterul hidrofoc și hidrofil relativ poate fi variat pe un interval generos. Datorită acestor modificări, miezul acestor nanoparticule poate fi, de asemenea, variat, pentru a fi conform caracteristicilor particulare ale unei molecule mici sau ale unui medicament.

### I.1.2. Polizaharide amfifile

Majoritatea carbohidraților în natură se găsesc sub forma polizaharidelor, categorie ce include nu numai acele substanțe compuse doar din reziduuri glicozidice legate la zaharuri, dar și din molecule ce conțin structuri zaharidice polimerice legate prin intermediul legăturilor covalente de amino acizi, peptide, proteine, lipide și alte structuri.

Funcția lor biologică de bază include: sursa de energie a naturii (care este indeplinită de către amidon și glicogen), precum și cea de material de structură (celuloza și chitina). Carbohidrații sunt cunoscuți pentru faptul că îndeplinesc un ansamblu de roluri biologice dincolo de conținutul descris mai sus. Cunoscut sub numele de glico-cod, carbohidrații sunt în măsură să transmită o densitate ridicată de informații cu privire la diversitatea lor structurală. În polizaharide, informația poate fi exprimată prin numărul și succesiunea de unități zaharidice, cu toate că sunt codate și în poziția și configurația ( $\alpha$  sau  $\beta$ ) a unităților glicozidice.

Având potențial pentru codarea informației biologice, carbohidrații joacă un rol important în procesele de recunoaștere celulă-celulă. Acest fapt poate fi atribuit proceselor de recunoaștere macromoleculară ce au loc la suprafața celulei și implică un număr mare de diferite proteine capabile de legarea carbohidraților.



Carbohidrații sintetici complecși și polimerii pe bază de carbohidrați s-au evidențiat ca agenți bine definiți pentru studierea rolului biologic al zaharurilor, datorită dificultății de extragere a glicoconjugatelor pure din surse naturale<sup>46</sup>.

În plus, polimerii ce conțin carbohidrați s-au dezvoltat ca materiale avansate pentru investigarea interacțiunilor multivalente din aplicațiile biomedicale, farmaceutice și medicale. Odată cu dezvoltările recente din tehnicile de polimerizare, au fost descrise variate tipuri de polimeri sintetici purtători de zaharuri<sup>47,48</sup> (figura 8), mai jos fiind ilustrate patru mari clase : a) polimeri liniari, conectați de obicei la poziția anomică cu alte grupări hidroxil adiacente resturilor de zahăr; b) polimeri pieptene, care sunt polimeri sintetici ce conțin zaharuri ca grupari laterale; c) macromolecule dendritice; d) hidrogeluri.

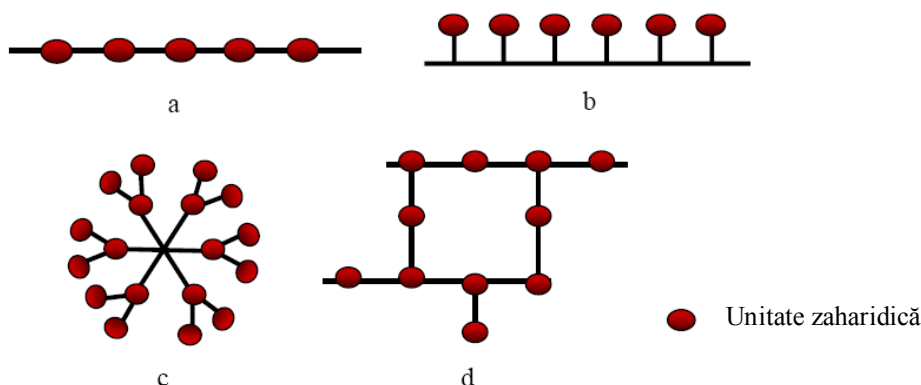


Figura 8. Clasele principale de polimeri sintetici ce conțin grupări zaharidice.

Polizaharidele, numite și glicani, sunt alcătuite din monozaharide și derivații lor. Dacă o polizaharidă conține doar un tip de moleculă monozaharidică, este cunoscută drept homopolizaharidă sau homoglican, iar cele care conțin mai mult de un tip de monozaharidă sunt cunoscute drept heteropolizaharide.

Polizaharidele diferă nu doar prin natura componentei monozaharidice dar și prin lungimea și modul de ramificare a lanțurilor lor. Chiar dacă un rest zaharidic are doar un carbon anomic și poate forma doar o legătură glicozidică cu grupările hidroxilice ale altei molecule, fiecare rest zaharidic poartă un număr de hidroxili, ce pot fi acceptori ai substituenților glicozilici. Această abilitate de a forma structuri ramificate distinge polizaharidele de proteine și acizi nucleici, care apar doar ca polimeri liniari.

Principalele funcții îndeplinite de polizaharide în natură sunt fie de stocare, fie de element structural. Cel mai comun polizaharid de stocare în plante este amidonul, care există în două forme  $\alpha$ - amiloza și amilopectina.

Polizaharidele structurale prezintă proprietăți foarte diferite de cele ale polizaharidelor de stocare, chiar dacă compoziția acestor două clase este similară. Celuloza, polizaharidă

structurală. este cel mai abundent polimer natural, fiind găsită în pereții plantelor, incluzând și algele marine în această categorie.

Cerințele pentru modificările chimice vizează în principal îmbunătățirea proprietăților mecanice, biocompatibilitate, solubilitate, controlul biodegradabilității și al formei<sup>49</sup>.

Surfactanții polimerici derivați din polizaharide au primit o atenție deosebită<sup>50 51 52 53</sup>. Atașarea lanțurilor hidrocarbonate pe scheletul diverselor polizaharide a fost foarte bine documentată de lucrările lui Landoll<sup>54</sup>. Inițial, polimerii surfactanți au fost studiați doar ca modificatori reologici. Abilitatea lor de a crește în mod semnificativ vâscozitatea fazelor apoase, precum și proprietățile vâscoelastice ce le aduceau formulărilor apoase, s-au dovedit valoroase în mai multe aplicații. Recent, proprietățile lor interfaciale au fost luate în considerare cu mai mult interes, în special pentru prepararea suspensiilor coloidale ce conțin particule cu caracteristici de suprafață bine definite.

Numeroase aspecte ale adsorbției lor la interfața lichid-lichid sunt puncte cheie în situații practice. Prezența grupărilor multiple hidrofobice de-a lungul lanțului polimeric duce la o adsorbție cvasi-ireversibilă. O consecință directă este stabilitatea emulsiei în diluție. Adicional, prezența buclelor hidrofilice ce acoperă suprafețele picăturilor uleioase generează repulsii sterice. Aceste repulsii previn fuzionarea picăturilor, precum și adsorbția altor macromolecule (cum ar fi proteinele, de exemplu). În cazul polielectroliților, repulsiile electrostatice contribuie, de asemenea, la stabilitatea picăturilor.

Polizaharidele stabilizate în emulsii ulei-apă pot servi ca intermediari în prepararea nanoparticulelor acoperite de polizaharide, ce pot avea aplicații în sistemele de eliberare a medicamentelor. Controlul proprietăților nanoparticulelor (dimensiune, înveliș) este realizată printr-o cunoaștere precisă a câtorva parametri cum ar fi vâscozitatea fazei continue (o soluție apoasă de polimer amfifil) și de proprietățile fizice ale emulsiei inițiale (variația mărimii cu timpul, stabilitatea cu temperatura, vâscozitatea, etc).

### **I.1.2.1. Metode de obținere**

Deoarece majoritatea polizaharidelor sunt de fapt polielectroliti, caracterul lor hidrofilic poate fi controlat prin varierea numărului de încărcări ionice pe unitate zaharidică, sau, când zonele ionice sunt baze sau acizi slabi, prin schimbarea pH-ului mediului, care modifică gradele de ionizare. Caracterul hidrofobic poate fi ajustat a) prin legarea covalentă a grupărilor hidrofobice pe lanțul hidrofilic al polizaharidei pentru a da, de exemplu, un polielectrolit alchilat, un așa numit polisăpun sau b) prin formarea asocierilor dinamice non-stoichiometrice între polizaharide și un surfactant încărcat opus, pentru a da un complex polielectrolit-surfactant. O atenție deosebită a fost acordată efectelor concentrației, gradului de substituție, lungimii secvenței hidrofobe<sup>55</sup>.

Copolimerii bloc sunt sintetizați pe două căi:

- Adiția secvențială a diferiților monomeri în procedee de polimerizare ce conțin centri de reacție vii.

Polimerizările ionice vii, polimerizările radicalice cu transfer de atom (ATRP), polimerizările cu adiția reversibilă a transferului de lanț fragmentat (RAFT), polimerizări cu deschidere de ciclu (ROP), sau combinațiile lor au fost toate utilizate pentru a obține copolimeri bloc foarte bine definiți ai unor compuși diferiți.

- Conectarea diferitelor lanțuri polimerice liniare prin funcțiile lor terminale.

Se găsesc în literatură multiple articole referitoare la întrebunțări de succes ale acestei reacții, ce folosesc ca substrat polizaharidele <sup>56 57</sup>, precum și tentative de grefare de lanțuri de policaprolactonă pe polizaharide (doar în cazul celulozei). Dintre proprietățile polizaharidelor menționăm capacitatea de a forma filme și geluri, stabilitatea într-o gamă largă de temperaturi și pH-uri, biocompatibilitate, biodegradabilitate, solubilitate în apă, distribuția moleculară, stereospecificitate și proprietăți funcționale.

Odată cu creșterea numărului de aplicații ale polizaharidelor amfifile în tehnologia biomedicală, mai mulți cercetători s-au concentrat asupra copolimerilor biodegradabili amfifili polizaharidă-poliester.

O strategie în prepararea acestor polizaharide amfifile constă în polimerizarea cu deschidere de ciclu a monomerului (lactida-diesterul ciclic al acidului lactic sau  $\epsilon$ -caprolactona) în prezența polizaharidei. Această metodă duce la o rată de substituție neomogenă și la o polidispersitate ridicată datorită grupurilor hidroxil de pe polizaharidă care poate iniția polimerizarea. În acest caz, un număr mare de lanțuri grefate poliesterice cu lungimi variabile pot forma/duce la mascarea catenei polizaharidei și modifica proprietățile ei fizico-chimice.

Acest lucru constituie un dezavantaj major pentru aplicațiile biomedicale, unde interacțiunile mediului biologic cu suprafețele polimerice sunt importante pentru bioadeziune, respingerea sterica a proteinelor serice sau orientare. Pentru a preîntâmpina aceste dezavantaje, o nouă abordare a fost recent adoptată pentru a prepara complexul polizaharida-poliester amfifil, în care lanțurile preformate poliesterice au fost grefate pe catena polizaharidei. Pentru a obține lanțurile poliesterice, sisteme catalitice bazate pe metal cum sunt octanoatul de staniu și trietilaluminu au fost folosite pentru polimerizarea cu deschidere de ciclu a esterilor ciclici. Chiar și în acest caz, resturile de catalizator metalic rămase pot împiedica folosirea lor în domeniul aplicațiilor biomedicale.

Polimerii amfifili prezintă o ridicată activitate de suprafață și interfață; combină grupări hidrofile și hidrofobe în structura macromoleculară principală sau în componente grefate. Cea dintâi este în mod normal bazată pe uretan, hidroxil, respectiv compuși carboxilici, iar cele din urmă, pe lanțuri alchil sau de acizi grași, ca exemple relevante imediate. Polimerii amfifili formează micle și agregate mono și polimoleculare în dispersii apoase și prezintă caracteristici ridicate de absorbție la interfață, această situație conducând la reducerea semnificativă a

tensiunilor de suprafață și de interfață. În plus, dispersiile apoase tind să manifeste vâscozități superioare datorate interacțiunilor intermoleculare dintre grupările hidrofobe, conducând astfel la formarea de asocieri polimoleculare și structuri de termen lung. Printre multiplele aplicații pentru acest tip de polimeri au fost sugerate formulările ecologice sau modificatorii de vâscozitate pentru sistemele terțiare de recuperare a petrolului<sup>58</sup>.

Cu toate că sistemele bazate pe polizaharide au fost luate în considerare pentru o gamă de aplicații<sup>59 60</sup>, un interes particular este prezentat de cele asociate utilizării în biomedicină. Polizaharidele sunt polimeri naturali, caracterizați printr-o bună biocompatibilitate, ce au fost nominalizați, pentru aplicații de eliberare medicamentoasă localizată, încapsulare și modificări reologice.

### I.1.2.2. Caracterizare

Caracterizarea micelilor bloc copolimerilor a fost intens revizuită începând cu Tuzar<sup>61</sup> și Munk<sup>62</sup>, în tabelul de mai jos fiind rezumate principalele tehnici.

Tehnici	Caracterizarea micelilor
TEM, crio-TEM, SEM, AFM	Formă, dimensiune
DLS	$R_h$
SANS și SAXS	Masă moleculară
SEC	Dinamica echilibrului micelar
Ultracentrifugare	Densitatea micelilor, masă moleculară
Fluorescenta	Dinamica lanțurilor, CMC, hibridizarea micelilor
RMN	Dinamica lanțului
Viscozimetrie	Vâscozitatea intrinsecă
Tehnici de oprirea a fluxului	Cinetica formării micelilor și disocierea

După cum se poate observa, o varietate de tehnici experimentale pot fi folosite pentru a caracteriza morfologiile micelare ale bloc-copolimerilor formați în soluții diluate. Se recomandă adoptarea microscopiei electronice prin transmisie (TEM) pentru a observa direct morfologia complicată, neregulată și polidispersă a agregatelor copolimerice.

Din tehnicile TEM se pot obține informații privind structura internă a micelilor prin combinarea de tehnici de colorare, deoarece contrastul slab electronic poate rezulta din aceste specimene, micelile conținând în general elemente ușoare cum ar fi C, H, N și O. De asemenea, multe din aceste materiale sunt supuse degradării în timpul observației, în zilele noastre tehnicile contrastante cu metale grele fiind folosite pentru a preveni acest lucru. Astfel, micelile sunt

depus pe un suport TEM, acoperite cu un film de carbon și observate mai departe în stare uscată. Tehnicile de contrast negativ se bazează pe folosirea unui agent de contrast care nu interacționează cu micellele și care se dispersează pe substrat. Astfel, micellele apar ca niște puncte luminoase pe un fond negru. Acidul fosforic este un astfel de agent. Dimensiunea micelului copolimerului poate fi măsurată direct din printurile negative ale microscopului.

Crio-TEM este o tehnică foarte convenabilă pentru identificarea microstructurilor locale în fluide complexe aflate într-o cantitate ridicată de apă, cum ar fi dispersiile micelare și veziculare.

AFM-ul a devenit, de asemenea, o investigație eficientă pentru vizualizarea directă a micelului bloc copolimerilor, măsurătorile putând fi realizate fie în stare uscată, fie *in situ*, direct în soluție.

Măsurătorile în stare uscată sunt cele mai folosite și realizate pe micellele absorbite sau depuse pe un substrat plat solid (mică, grafit, etc) ce au fost anterior uscate. Dimensiunea și forma micelului pot fi afectate de efectele de deconvoluție, prin interacțiuni specifice între substrat și unii compuși din acesta.

Tehnica microscopiei cu baleiaj (SEM), ca și AFM-ul oferă doar structura micelară a morfologiei de suprafață (structura externă). Combinând TEM, ce furnizează informații interne ale micelului copolimerului, cu SEM (sau AFM) care prezintă morfologia de suprafață, se pot obține informații prețioase privind structura micelară a bloc-copolimerilor.

Difracția laser (DLS) este o metodă comună de caracterizare, oferind detalii despre morfologia micelară, precum și o valoare medie a dimensiunii, calculată la un număr mare de micelle copolimerice. În plus față de această tehnică, difracția neutronilor (SANS) se folosește pentru a elucidă structurile micelare. Pentru a genera suficient contrast, măsurătorile SANS sunt în general realizate în solvenți deuterati și/sau copolimeri bloc parțial deuterati. Dezavantajul acestei tehnici constă în necesitatea unui calcul și în dependență de un model.

SANS oferă informații detaliate atât despre structura micelului bloc copolimerului cât și despre interacțiunile inter-micelare. În sistemele dense, această tehnică este folosită pentru a studia termodinamica tranzițiilor de fază dezorganizare-organizare și detalii despre fazele ordonate.

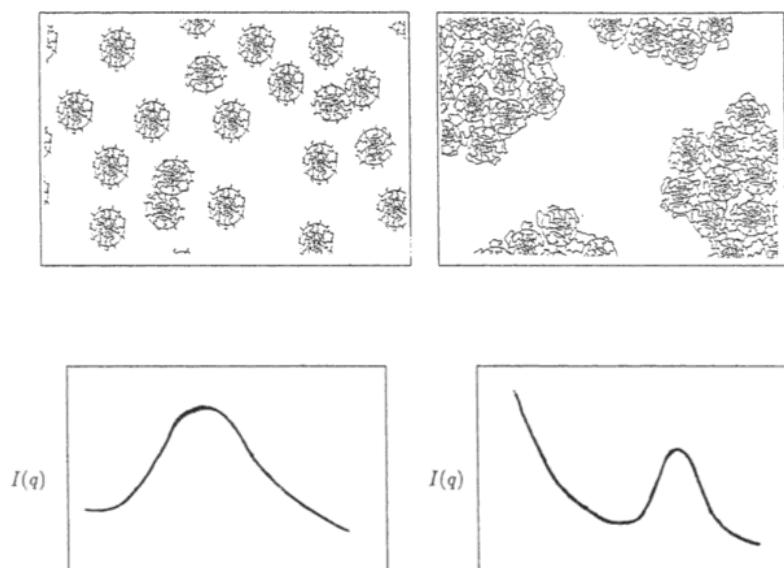


Figura 9. Reprezentări specifice pentru a) micelle individuale, sferice și b) rețele conectate de micelle sferice.

Fluorescența este utilizată frecvent pentru determinarea debutului agregării surfactantului, CMC. Această tehnică implică folosirea unei sonde fluorescente, ce partiționează favorabil în miezul hidrofob al micelilor. Agregarea compușilor hidrofobi ai amfifililor polimerici este considerată a fi sub formă micelară, dar procesul de agregare și caracteristicile agregatelor sunt diferite de cele ale micelilor surfactanților cu masă moleculară redusă. Polielectrolitii modificați hidrofobic, cu un conținut mai bogat în secvențe hidrofobe (>10 mol %), denumiți polisăpunuri, ar trebui să prezinte o valoare nulă a CMC, deoarece microdomeniile hidrofobe sunt prezente pentru orice concentrație și conținutul lor crește liniar, proporțional concentrației polimerului. Cu toate acestea, în unele cazuri, existența unei concentrații sub care nu a putut fi detectată prezența nici unui microdomeniu semnificativ a fost demonstrată prin intermediul a diverse metode, precum fluorescența, conductibilitatea, RMN. Prezența și valoarea acestei concentrații critice de agregare (CCA) depind în mare măsură de structura chimică a polielectrolitului amfifil, trebuind luată în calcul variația specifică a conformației polielectrolitului, în funcție de concentrație.

Agregarea intramoleculară a părților hidrofobe în polimeri amfifili poate conduce la constituirea mai multor microdomenii hidrofobe în lungul lanțurilor polimerice, conform modelului colier, sau poate forma un singur microdomeniu (unimer). Agregarea intermoleculară poate, de asemenea, avea loc prin asocierea de microdomenii via lanțuri hidrofobe, sau prin asocierea de unimeri (șiruri sau globule). Răcirea prin fluorescență reprezintă una dintre cele mai fiabile metode pentru măsurarea numărului de agregare micelară. Metoda se bazează pe răcirea unei emisii a unei sonde, printr-un “stingător” (S). Atât sonda, cât și stingătorul, trebuie să prezinte o afinitate ridicată pentru micelle și, pentru analiza datelor, trebuie presupusă o

distribuție Poisson a sondei și a lui  $S$  printre micelle. Această metodă a fost aplicată în determinarea numărului de agregare al microdomeniului ( $N_{agg}$ ), construit din polimeri amfifili, în soluție apoasă. Compararea lui  $N_{agg}$  cu numărul de unități hidrofobe per lanț polimeric ( $H_p$ ) poate oferi o primă aproximare (dar nu în mod necesar pe cea corectă) a tipului de agregare. Prin urmare, un  $N_{agg}$  redus și mai mic decât  $H_p$  poate indica o agregare intramoleculară (model colier). Când  $N_{agg} = H_p$ , unimerul pare a fi cea mai probabilă formă de agregare <sup>63</sup>, în timp ce  $N_{agg} > H_p$  poate face dovada existenței asocierii intermoleculare <sup>64</sup>.

Studiile de vâscozitate oferă perspectiva asupra comportamentului în ansamblu al soluției macroscopice, ca echilibru între forțele electrostatice și hidrofobe ce se manifestă în soluțiile apoase ale polimerilor amfifili. DS, masa moleculară și natura polizaharidelor se numără printre factorii care influențează vâscozitatea redusă în soluții apoase <sup>49</sup>.

Polimerii cationici amfifili <sup>65</sup> prezintă un progres în ceea ce privește vâscozitatea pentru  $C_p$  foarte redus, datorită predominanței respingerilor electrostatice în fața atracțiilor hidrofobe. Această tendință este mult mai pronunțată pentru polimerii cu DS ridicat, din cauza unei densități ridicate de sarcini, ce majorează respingerile electrostatice (comportament polielectrolitic).

Pentru polimerii amfifili, valorile vâscozității reduse se modifică odată cu scăderea lui DS în funcție de DS și lungimea  $R$ , datorită baleerii între asocieri hidrofobe și respingeri electrostatice. Polimerii cu DS ridicat prezintă o creștere mică a valorilor vâscozității reduse odată cu majorarea concentrației polimerice, cauza regăsindu-se în interacțiunile hidrofobe intramoleculare. Pentru un DS mic și  $R$  superior (dodecil și cetil), se obține o creștere puternică a  $\eta_{sp}/CP$  odată cu majorarea lui  $CP$  ca rezultat al asocierilor hidrofobe intermoleculare. Procesul de auto-agregare a polielectroliților amfifili este studiat folosind fluorescența în stare de regim staționar, anizotropia și măsurătorile de vâscozitate.

### I.1.2.3. Aplicații

S-a analizat vâscozitatea emulsiilor ulei în apă, cu fracția volumică a uleiului mai mică de 20%, stabilizate de derivați amifilici de dextran <sup>66</sup>. Muller *si colab.* <sup>67</sup> au studiat dezvoltarea pululanilor amfifili în vederea solubilizării integrale a membranelor proteinelor. Strategia lor a implicat sinteza unui set de derivați de pululan amfifil și compararea performanțelor lor în identificarea aceluși polimer ce solubilizează membrana proteinelor cel mai eficient. Modificarea hidrofobică a acestei polizaharide a constat în adăugarea de grupări alchil, grefate printr-o legătură esterică, ce este ușor de hidrolizat dacă este necesară eliberarea proteinei. S-a observat, în urma analizelor proteinelor, că legăturile amidice și esterice nu interferează cu legăturile peptidice. Au fost introduse, de asemenea, și grupări carboximetilice pentru a asigura solubilitatea în apă a polimerilor modificați.

Cele mai intens raportate sisteme polimer/solvent sunt copolimerii bloc nonionici, în special Pluronic-ul, care reprezintă o serie de copolimeri tribloc ce conțin un bloc hidrofilic E și

grupări P sau B hidrofobe, E, P, B fiind poli(oxietilen), poli(oxipropilen), respectiv poli(oxibutilen), într-un amestec de apă și solvent organic <sup>68</sup>.

Comportamentul fazic în apă al copolimerilor bloc a fost intens studiat, având în vedere ca majoritatea aplicațiilor copolimerilor sunt în soluție apoasă <sup>69</sup>. Solubilitatea copolimerilor bloc scade invers proporțional cu temperatura și, peste o anumită valoare a acesteia, are loc separarea de faze <sup>70, 71</sup>. Pentru concentrații ridicate ale polimerului, încolăcirea lanțurilor polimerice în soluție conduce la formarea de structuri omogene, imobile, asemănătoare gelurilor.

Prima structură de acest tip este de obicei una cubică, formată printr-o împachetare ordonată a micelilor sferice. Pentru concentrații polimerice și mai ridicate, distribuția regiunilor hidrofile și hidrofobe conduce la formarea de structuri hexagonale sau lamelare. Structuri cubice bilateral continue au putut, de asemenea, fi observate între regiunile hexagonale și lamelare <sup>72</sup>. Pentru micelile în formă de stea, formate de un copolimer bloc într-un solvent selectiv pentru blocul central, este de obicei obținută o rețea deschisă, fără nici o structură ordonată, pentru concentrații polimerice mari.

În general, sistemele bloc copolimerice pot oferi mai multe șabloane distincte, la scală nanometrică, precum împachetări cubice tridimensionale de unități sferice, împachetări hexagonate bidimensionale de unități cilindrice, sisteme lamelare periodice unidimensionale și morfologii cubice bicontinui tridimensionale. Considerând că lungimea totală a lanțurilor, raportul de lungimi al blocurilor, arhitectura lanțurilor și compoziția chimică a copolimerilor bloc sunt toate reglabile, șabloanele pot fi facil ajustate pentru a deservi necesități specifice. Uneori, micelile cu morfologii diferite (de exemplu, elipse sau bastoane) pot fi totodată obținute prin selectare unei combinații corecte dintre lungimile blocurilor și calitatea solventului. Prin urmare, nu sunt surprinzătoare aplicațiile masive a copolimerilor bloc în cadrul proceselor de nanofabricare. Formarea și stabilizarea veziculelor sau emulsiilor poate fi realizată prin selectarea surfactanților sau copolimerilor bloc amfifili corespunzători, în condiții atent definite. Anumiți polimeri speciali, precum dendrimerii sau unele micelile copolimerice bloc/grefate modificate, oferă micromedii unice ('nanoreactoare'), ce pot limita creșterea nanoparticulelor în soluție, astfel încât acestea să fie produse la dimensiuni uniforme <sup>73, 74</sup>.

Copolimerii amfifili prezintă caracteristici excelente ca purtători de medicamente cu caracter hidrofob. Părțile interioare hidrofobe ale polimerilor amfifili furnizează o bună acoperire a medicamentelor hidrofobe, în timp ce partea externă hidrofilă este compatibilă cu mediul biologic *in vivo*. Mai mult, ansamblele de nanoparticule obținute din polimerii amfifili formează domenii de insule disperse în zonele hidrofilice, ce depozitează medicamentele insolubile în apă și funcționează ca bariere înconjuratoare pentru a inhiba activitatea de pierdere a biocomponentelor <sup>75</sup>.

Descoperirea procedurii click chemistry a schimbat într-un mod drastic viziunea comunității științifice asupra sintezei copolimerilor bloc și grefați <sup>76</sup>.



Numeroși monomeri ce nu pot fi utilizați pentru a produce bloc copolimeri prin intermediul polimerizărilor vii (datorită reactivității extrem de mari a anumitor reactivi sau datorită diferențelor de solubilitate) se pot acum încorpora cu ușurință prin intermediul click chemistry, reacție care a deschis o ușă spre sintezele combinatorice de copolimeri bloc, permițând obținerea unor produși cu proprietăți unice ce pot fi sintetizați repede și ușor și cu numeroase aplicații în domeniul științelor farmaceutice <sup>77</sup>.

## I.2. REACȚIA CLICK CHEMISTRY

### I.2.1. Prezentarea reacției click chemistry

Principala țintă în chimia cu aplicații în domeniul medical constă în sinteza unor compuși sau clase de compuși reprezentând noi medicamente sau optimizări și, din acest motiv, acest domeniu este în mod particular atras de metode de sinteză ce permit construirea rapidă a moleculelor. Identificarea acestor strategii rapide de sinteză ar trebui să permită chimiei medicale asamblarea unui număr mare de componente biologice active într-o perioadă scurtă de timp, astfel mărindu-se procesul de descoperire și optimizare. Cu toate acestea, alături de faptul că trebuie să fie rapide, caracteristicile cheie ale unei sinteze ideale sunt reprezentate de eficiență, versatilitate și selectivitate.

În încercarea de obținere a proprietății structurale și funcționale precum cele ale macromoleculelor naturale, cercetătorii din domeniul științei materialelor, al polimerilor și biotehnologiei au fost într-o continuă căutare de strategii de legare bine definite ce pot fi folosite cu eficiență în prezența unui număr mare de grupări funcționale diferite, întâlnite în special în aceste domenii.

Cerințele cheie pentru aceste strategii includ: selectivitate ridicată, ortogonalitate pentru alte grupări funcționale, compatibilitatea cu apă și alți solvenți protici și, bineînțeles, randamente maxime.

Conceptul de „click chemistry” introdus în 2001 de câștigătorul premiului Nobel pentru chimie, Barry Sharpless este în mod indiscutabil unul din cele mai vizibile trenduri în chimia contemporană și se referă la o clasă de transformări chimice care prezintă numeroase caracteristici interesante: domeniu vast de aplicații, randamente ridicate, condiții de reacție simple și performante, o bună selectivitate în condiții experimentale normale, stereospecificitate.<sup>1</sup> În mod general, această reacție constă în utilizarea a două grupări care reacționează împreună într-o manieră specifică, ireversibilă și cu un bun randament. Este o metodă fiabilă ce permite legarea a două elemente distincte prin cuplaj *via* legături heteroatomice (C-X-C), într-o manieră simplă, eficientă și rapidă. Pentru a putea beneficia de calificativul de „click chemistry”, o reacție trebuie să satisfacă numeroase criterii și anume: condiții

experimentale simple, insensibilitate la prezența oxigenului sau a apei, stereospecificitate, recuperare rapidă a produșilor prin metode ne-cromatografice cum ar fi cristalizarea sau distilarea, randamente foarte bune, precum și un câștig termodinamic în general superior valorii de 20 kcal/mol.

Doar patru tipuri de reacții <sup>78 79 80</sup> (Figura 1) sunt considerate că respectă criteriile unei reacții „click chemistry” și anume:

- Reacții de cicloadiție, cum este cazul cicloadiției 1,3-dipolară Huisgen și al reacției Diels-Alder.
- Substituții nucleofile, în special cele cu deschidere de ciclu, deschideri forțate, electrofile de heterociclu, cum ar fi aziridinele, epoxidele, sulfații ciclici, ioni aziridinici, ioni episulfonici, etc.
- Chimia carbonică de tip non-aldol; exemplele includ formarea eterilor, ureelor, tioureeleor, hidrazonelor, amidelor, heterociclorilor aromatice, etc. Reacțiile carbonice de tip aldol au în general forțe termodinamice scăzute, prin urmare au timpi de reacție mai îndelungați și dau produși secundari de reacție, de aceea nu pot fi considerate reacții click în adevăratul sens al cuvântului.
- Reacții de adiție la dublele legături carbon-carbon, cum sunt epoxidările, aziridinările, reacțiile de adiție de tip Michaël.

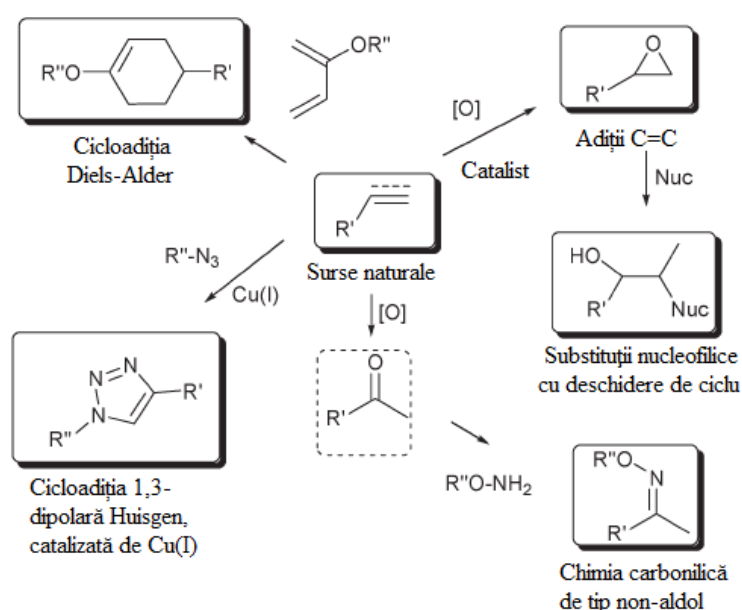


Figura 1. Reacții ce se încadrează în cerințele click chemistry <sup>2</sup>

Avantajele acestei noi chimii sunt numeroase, devenind astfel un capitol semnificativ în evoluția materialelor macromoleculare funcționale <sup>81 9</sup>.

Astfel, selectivitatea sa, absența reziduurilor și a produșilor secundari, modularitatea în termeni de temperatură, precum și toleranța sa atât în mediu apos cât și organic, au determinat alegerea acestui tip de reacție pentru îndeplinirea obiectivelor propuse.

### Cicloadiția Huisgen 1,3-dipolară

Descoperită în anii 1960 de Huisgen, cicloadiția 1,3-dipolară este exemplul tipic de «click chemistry», satisfacând criteriile enumerate mai sus. Această reacție presupune interacțiunea dintre un compus 1,3-dipolar (azida organică) (Figura 2) și o alchină terminală pentru a forma heterociclul cu 5 membri - triazolii 1, 2, 3 (Figura 3).

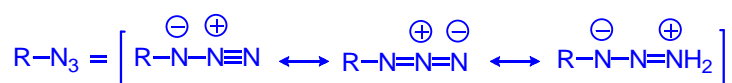


Figura 2: Natura dipolară a azidei

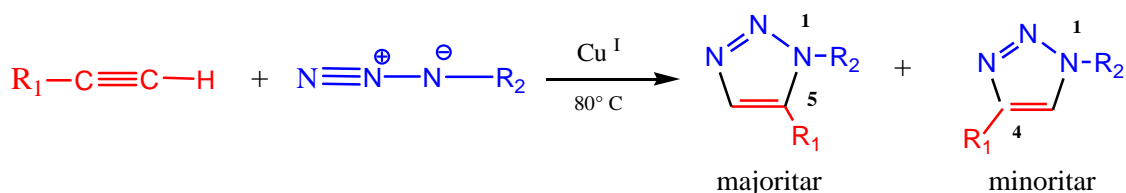


Figura 3: Principiul « Click Chemistry »: formarea triazolilor 1,2,3

Cercetările din ultimii ani au fost în principal consacrate acestei reacții care concentrează marea majoritate a publicațiilor pe acest subiect. S-a dovedit a fi atât de eficace, prin faptul că este realizabilă în orice solvent, aici fiind inclusă și apă, și prin randamentele sale cantitative în condiții fiziologice, fiind astfel compatibilă și cu sistemele vii<sup>82 83</sup>, încât a devenit o alegere atât pentru biologi cât și pentru organicieni și biochimisti, făcând din „click chemistry” o adevărată filozofie.

### Mecanismul de reacție

Această reacție generează într-o manieră ireversibilă doi izomeri, triazolii 1,4 și 1,5, printr-o abordare *anti*, respectiv *syn*. În prezența unui catalizator pe bază de cupru, cu grad de oxidare I, este favorizată obținerea regioizomerului *anti*<sup>84</sup>. Astfel, această reacție este în mod curent denumită CuAAC (*Cicloadiția Azidă-Alchină Catalizată de Cupru(I)*).

În 2001, cicloadiția Huisgen 1,3-dipolară a fost primită cu mare interes datorită imensei ameliorări în ceea ce privește regioselectivitatea și eficacitatea catalizatorului Cu(I).

Sharpless și colab. au propus mecanismul ciclului catalitic al reacției « click » în prezență de Cu(I) (Figura 4).<sup>6,7</sup>

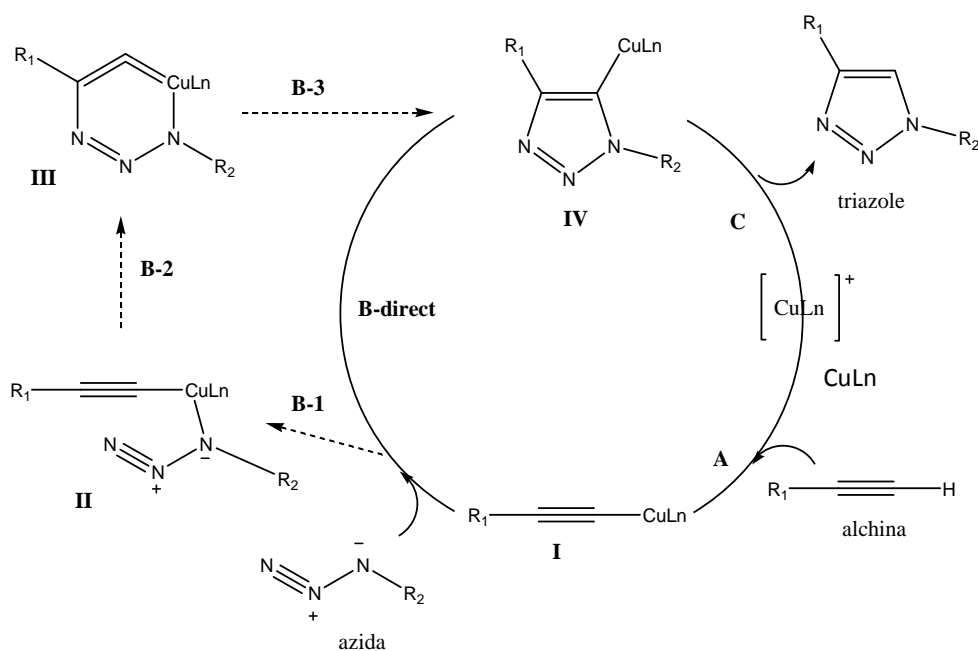


Figura 4 : Ciclu catalitic al unei reacții de tip click în prezența Cu(I)

În absența catalizatorului Cu(I), reacția este lentă (72 h la 120° C) și de un randament slab (20-40%), cuprul permițând, odată cu alchinele, formarea unui intermediar de tip C≡CCuLn ce accelerează reacția de cicloadiție<sup>85</sup>.

Ciclul este amorsat de formarea acetilurii de cupru(I)<sup>86</sup>. Calculele teoretice arată că cicloadiția [2+3] (B-direct : I → IV) este defavorizată vis-à-vis de adăugarea din etapele (B-1 → B-2 → B-3), care se produce printr-un metalociclu intermediar cu șase membri (III).

Alegerea Cu(I) drept catalizator depinde de solventul utilizat în reacție, el însuși ales în funcție de reactivi și de produsul final dorit. În mod general, procentajul de catalizator de Cu(I) utilizat în mediul de reacție se încadrează între 0,2% și 20% molar. Se pot folosi diferite tipuri de săruri de Cu(I) pentru un mediu organic sau apos și utilizarea liganzilor este de cele mai multe ori necesară pentru a stabili gradul de oxidare +I al cuprului.

În mediu organic, se poate folosi o bază azotată de tipul Et<sub>3</sub>N (trietilamina), PMDETA (N,N,N',N'-pentametilentetramina) sau, cel mai des întâlnită, DIPEA (N,N'-diizopropiletilamina)<sup>87</sup> necesară pentru a furniza derivatul acetilură de cupru, implicat în ciclul catalitic.

În mediu hidro-alcoolic, se alege de cele mai multe ori pentru reducerea *in situ* a CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, ascorbatul de sodiu, sub atmosferă inertă. Avantajul, ce generează de asemenea specii de Cu(I), constă în eliminarea necesității unei baze în sistemul de reacție<sup>88</sup>. Astfel:

- Sub formă de CuX (unde X: Br, I, Cl) solubilitatea constituie o problemă, de exemplu : CuBr este solubil în EtOH, MeOH, DMSO, DMF ; CuI este solubil în CH<sub>3</sub>CN ; CuCl este

insolubil în solvenți polari. Atunci este necesar să se utilizeze o bază (amină terțiară) sau temperaturi ridicate <sup>89 90 91</sup>.

- Sub formă de ligand (de exemplu,  $\text{Cu}(\text{PPh}_3)_3\text{Br}$ ). Cuprul (I) este stabilizat în prezența aerului și necesită prezența unei baze (amine terțiare) <sup>92</sup>.

Reacția “click chemistry” poate avea loc în solvenți organici, anorganici sau apoși, cum ar sunt:

- solvenți protici polari (alcool, apă) <sup>93</sup>
- solvenți aprotici polari (THF, DMSO,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , DMF, acetonă) <sup>94 95</sup>
- solvenți nepolari ( $\text{CCl}_4$ , hexan, toluen) <sup>15</sup>
- amestecuri de solvenți: apă/alcool, DMSO/apă, DMF/apă.

Se impune o anumită precauție atunci când se lucrează cu azide și derivați azidici, deoarece acestia formează compuși instabili dacă nu sunt manipulați cu grijă. Azida de sodiu ( $\text{NaN}_3$ ) va forma un compus foarte exploziv ( $\text{AgN}_3$ ) în prezența sării de argint, iar  $\text{NaN}_3$ , într-un mediu acid va da naștere la  $\text{HN}_3$ , un gaz toxic.

De asemenea, un raport prea mare de azidă pe un compus organic mic generează compuși explozivi. În acest context, există o regulă care exprimă raportul de siguranță între suma totală de carbon și oxigen împărțită la suma totală de azot, care nu ar trebui să fie mai mică de trei, pentru sinteza monomerilor și polimerilor funcționali <sup>96 97 98 99</sup>, a polimerilor bioconjugați <sup>100 101 102</sup> și pentru post functionalizarea polimerilor <sup>8 9</sup>.

Polizaharidele constituie cel mai mare segment al polimerilor disponibili, și, prin urmare, prezintă cel mai mare potențial regenerabil, durabil și biodegradabil în vederea înlocuirii polimerilor sintetici. Faptul că acest potențial rămâne neexploatat într-o mare măsură este o dovadă a provocărilor inerente din ultimii ani în ceea ce privește transformarea polizaharidelor din surse naturale, în forme mai potrivite pentru uzul uman.

Una dintre provocările majore în modificarea polizaharidelor constă în depășirea interacțiunilor non-covalente care caracterizează structurile polizaharidice și conduc la restricții semnificative asupra prelucrabilității lor. Acestea exercită o influență puternică prin restrângerea solubilității polizaharidului în solvenți, limitarea prelucrabilității și dictarea fezabilității și funcționalizării polimerului.

## I.2.2. Aplicații ale reacției “click chemistry” în domeniul polizaharidelor

Nu există numeroase referințe în ceea ce privește modificarea chimică a polizaharidelor prin “click chemistry”. Primul caz de grefare a unui polimer pe catenă principală polizaharidică a fost descris recent de Makuska și colab. <sup>103</sup> și anume, sinteza structurilor de tip pieptene, compusă din scheletul de chitosan și de grefele laterale de PEG.

În 2006, Shinkai și colab. <sup>104</sup> au fost primii care au utilizat această reacție pentru grefarea moleculelor mici pe lanțurile de (1-3)- $\beta$ -D-glucan, în vederea obținerii unor derivați cu diferite

module funcționale, ce s-au dovedit utili în transportul de gene. Ca mediu de reacție s-a folosit DMSO și N-metilpirolidona (NMP) la 25°C timp de 12h în prezența CuBr<sub>2</sub>, propilaminei și ascorbatului de Na. Conversia reacției de grefare variază între 68 și 73% în funcție de molecula grefată.

În același an, *Heinze si colab.*<sup>105</sup> au realizat cercetări de aceeași natură pe lanțurile de 6-azido-6- celuloză pentru a sintetiza un nou polielectrolit, ce va prezenta heterocicluri care conțin sulf sau azot și care vor prezenta activitate biologică, clasându-se printre cele mai promițătoare medicamente cu activitate anti-HIV și antitumorală. Reacțiile au avut loc în DMSO la 25°C și la 70°C timp de 24 h în prezența CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O și a ascorbatului de Na. Randamentele sunt cantitative pentru cele 2 temperaturi, ceea ce demonstrează eficacitatea reacției „click chemistry” la temperatura ambiantă (Figura 5).

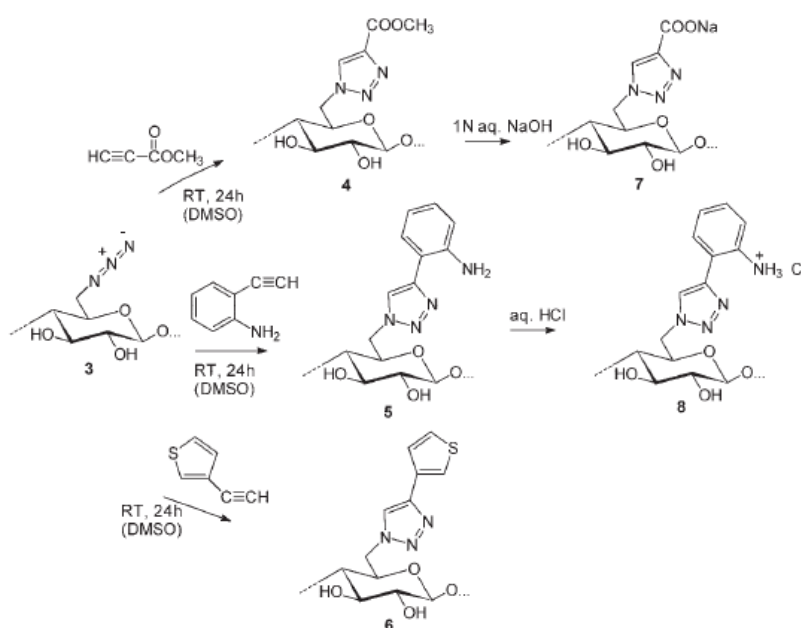


Figura 5. Grefarea de molecule simple pe derivați de celuloză<sup>31</sup>.

Hotha<sup>106</sup> a realizat cicloadiția Huisgen între alchinel și azidoetil glicozidă, în prezența CuI, pentru a obține oligozaharide hetero și homo dimerice ce au 1,2,3-triazole. Autorii au anticipat că aceste cicluri triazolice pot avea o varietate de bioactivități, de la antibacteriene la anti-HIV (Figura 6).

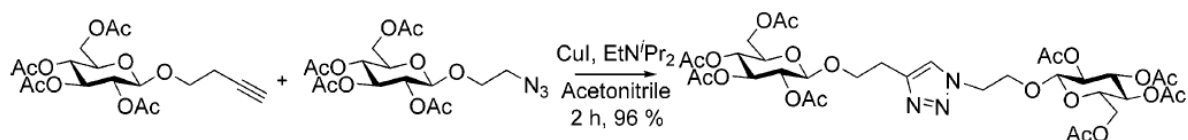


Figura 6. Sinteza *pseudo*-oligozaharidelor prin click chemistry.

Un an mai târziu, Shinkai *și colab.*<sup>107</sup> au deschis calea vectorizării de molecule non-hidrosolubile în mediu apos la pH neutru prin faptul că macromoleculele obținute posedă o conformație elicoidală în apă și sunt capabile de a complexa anumite molecule hidrofobe. Pentru aceasta, ei au introdus grupări de tip amoniu cuaternar pe lanțurile de  $\beta$ -(1,3) glucan. Polizaharida a fost functionalizată anterior la OH-ul din poziția C6 (prin prepararea unui intermediar bromurat cu  $\text{CBr}_4$  în DMF apoi reacția cu o sare de  $\text{LiN}_3$ ), urmată de reacția cu clorură 3-trimetil amoniu-1-cationic. Conversia este totală în 24h.

În 2008, Vasella *și colab.*<sup>108</sup> au lucrat pe derivații azidici ai celulozei grefând lanțuri alchil de talie crescândă (de la 1 la 8 atomi de C) și terminate cu funcție alchină. Reacția a avut loc în DMSO la cald timp de 2-3 zile. Grefarea este cantitativă, dar rezultatul nu este surprinzător ținând cont de timpul de reacție și de temperatura utilizată (între 60 și 100 °C).

Echipea coordonată de Heinze a descris recent sinteza derivaților celulozici ce au radicali laterali dendrimerici atașați la un lanț de celuloză printr-un ciclu triazolic. Au fost utilizate mai multe strategii de sinteză, cu functionalizarea lanțului celulozei. Acesta poate fi functionalizat cu grupări azidice<sup>109</sup> în urma substituirii cu un halogen cu grupări alchinice, folosind ca intermediar texidimetilsilan<sup>110</sup> sau tosilat<sup>111</sup>.

În 2009 Li<sup>112</sup> a raportat pentru prima dată administrarea orală a nanoparticulelor chitosan-ADN deschizând astfel calea vectorizării în domeniul terapiei genice. Producții pe bază de chitosan au manifestat o legare puternică de ADN și o protecție crescută a acestuia împotriva degradării nucleazelor.

Modificarea polizaharidelor prin „click chemistry” în soluție s-a dovedit eficace și cantitativă în toate lucrările. Până acum, câteva cazuri au arătat că această strategie de sinteză este posibilă și în mediu eterogen. Hafrén *și colab.*<sup>113</sup> au demonstrat pentru prima dată că suprafețele solide polizaharidice pot fi modificate printr-o combinație de organocataliză și click chemistry într-un mediu de reacție eterogen, la temperatura ambiantă. Astfel, a fost obținut un compus celulozic solid foarte fluorescent prin modificarea celulozei prin reacții de esterificare cu un acid carboxilic purtător de funcții alchinice, acidul 5-hexanoic. Apoi, reacția click a fost realizată cu un derivat azidic al cumarinului, în faza eterogenă, la temperatura ambiantă. Formarea ciclurilor triazolice a fost pusă în evidență prin fluorescența datorită grupărilor cumarinice. Autorii nu au dat nici o indicație asupra gradului de conversie.

O abordare similară a fost raportată de Bras *și colab.*<sup>114</sup> care au modificat fibre de celuloză prin grefarea de lanțuri de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) în faza eterogenă, în THF, la temperatura ambiantă. Eficacitatea reacției nu a fost cuantificată, dar împreună cu cele de mai sus dovedește fezabilitatea reacției „click chemistry” în ceea ce privește modificarea chimică a polizaharidelor, chiar și în mediu eterogen.

În ceea ce privește reticularea lanțurilor polizaharidice, doar câteva referințe sunt menționate.

Hilborn *și colab.*<sup>115</sup> au obținut primul exemplu de hidrogel preparat folosind CuAAC, pornind de la poli (vinil alcool)(PVA) cu o greutate moleculară medie de 16000, funcționalizat fie

cu o alchină fie cu o azidă printr-o reacție în doi pași ce implică drept intermediari carbonil-diimidazolele. Hidrogelurile obținute prin „click chemistry” au prezentat capacități de umflare mult mai mari și proprietăți mecanice îmbunătățite comparativ cu hidrogelurile obținute prin metodele cunoscute până în prezent.

Crescenzi și colab.<sup>116</sup> au reacționat la temperatura camerei, în apă, lanțuri de hialuronat de sodiu funcționalizat cu grupări azidice, cu altele purtătoare de funcții alchinice laterale. Formarea unei rețele chimice a fost confirmată prin analiza RMN <sup>1</sup>H HR-MAS și prin măsurători reologice. Gelurile obținute au fost supuse investigării în vederea eliberării controlate a biomoleculilor relevante terapeutic precum și pentru matrici de celule pentru ingineria tisulară, autorii demonstrând că rețelele hialuronice nu numai că au făcut posibilă eliberarea controlată în mod eficient a doxorubicinei dar și înglobarea celulelor de cultură, 60% din aceste celule prezentând activitate proliferativă după construcția scheletului hidrogelului prin metoda click.

Zhang și colab.<sup>117</sup> au elaborat rețele pe bază de derivați azidici multifuncționali de celuloză și de lanțuri de poli-isopropilacrilamidă cu grupări alchinice. În amândouă cazurile, timpul de gelificare este de câteva minute, ceea ce arată rapiditatea reacției „click chemistry” la temperatura ambiantă.

Hidrogeluri termosensibile pe bază de guar au fost obținute în soluții apoase de către Tizotti<sup>118</sup> și colab. între guaruri funcționalizate cu grupări alchinice și  $\alpha,\omega$ -diazido-poli(etilenglicol)-co-(propilen glicol).

Ringot<sup>119</sup> descrie în articolul său obținerea unei țesături de bumbac antibacterian obținută prin "click chemistry" prin grefarea unui derivat de porfirină pe celuloză modificată chimic. Materialul nou a fost capabil să ucidă bacteriile Gram-negative și Gram-pozitive, cum ar fi E. coli și S. Aureus, dovedindu-și utilitatea în domenii care ar beneficia de dezinfecție de suprafață, permanent și eficient.

În 2009, Heinze<sup>120</sup> a raportat sinteza unor derivați deoxi-azido celulozici, solubili în apă, obținuți în urma carboximetilării eterogene, într-un mediu alcătuit din 2-propanol/soluție apoasă de NaOH. Acest compus este de fapt un material de plecare pentru funcționalizarea cu dendroni de propargil-poli-amidoamină *via* click chemistry (Figura 7).



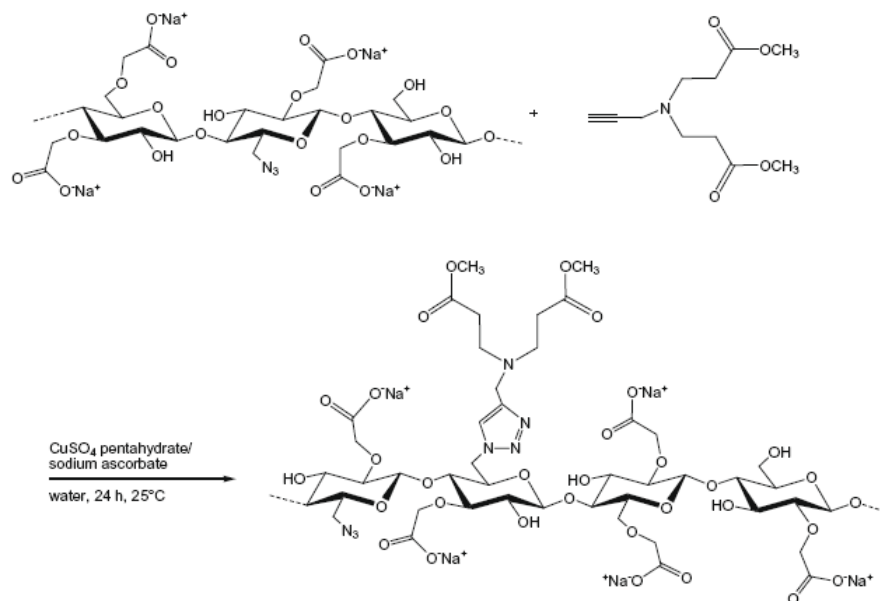


Figura 7. Conversia omogenă a carboximetil 6-deoxi-6-azidocelulozei cu prima generație de dendron propargilpoliamidoamină <sup>120</sup>.

Modificări în mediu apos ale dextranului au fost realizate de Seppala <sup>121</sup> și *colab.*, reacția constând în introducerea funcțiilor azidice pe lanțul polizaharidic folosind o bază drept catalizator meta-amestec apă/isopropanol, la temperatura ambiantă. Pentru valori scăzute ale DS-ului dextranului, s-a observat că o oră este suficientă pentru a avea o reacție cantitativă, mărirea timpului de reacție până la 24 ore neaducând îmbunătățiri în conversia azidelor, probabil datorită factorilor sterici.

### I.3. Hidrogeluri pe bază de polizaharide cu hidrofilie redusă

#### .3.1. Metode de obținere a hidrogelurilor pe bază de polizaharide

Hidrogelurile reprezintă o clasă de materiale polimerice care dispun de abilitatea de a reține o cantitate substanțială de apă, prezentând o consistență „moale și cauciucată” și o tensiune interfacială redusă. Aspectul structural al acestor materiale domină prin proprietățile lor de suprafață, permeselectivitatea și permeabilitatea, ceea ce conferă hidrogelurilor proprietăți unice și interesante, dar și similaritatea caracteristicilor lor fizice cu cele ale țesuturilor vii. Hidrogelurile sunt materiale cu potențial aplicativ în sfera aplicațiilor biomedicale, având în vedere că prezintă avantaje față de alte biomateriale polimerice. Natura structurii hidrogelurilor, datorită conținutului lor ridicat de apă, permite extragerea produșilor de reacție secundari nedorii, înainte de implantare, respectiv fluxul de lichide corporale dintre țesut și implantul *in vivo*. Posibilitatea de fabricare sub variate forme geometrice și alterarea facilă a formei fizice permit ajustarea proprietăților fizice, conform specificului unei aplicații. În general,

caracteristicile fizice ale hidrogelurilor sunt determinate de către metodele de sinteză, respectiv de către parametri.

Hidrogelurile transparente din punct de vedere optic, în forma lor densă, sunt utilizate pentru lentile de contact moi, în timp ce hidrogelurile poroase își găsesc aplicații ca biomaterial spongios, precum o grefă sintetică pentru repararea țesuturilor cartilajinoase, osoase și nu numai<sup>8-11</sup>. Pentru a îmbunătăți fixarea grefelor în locația de implant, creșterea țesutului se dorește a fi direcționată către interiorul structurii din hidrogel poros. Prin urmare, porii materialului trebuie să fie interconectați și suficient de mari pentru a permite invazia de celule și vascularizarea țesutului nou format<sup>9,12 122</sup>.

Abilitatea hidrogelurilor de a absorbi apă se datorează prezenței grupurilor hidrofile precum -OH, -CONH-, -CONH<sub>2</sub>, -COOH, și -SO<sub>3</sub>H<sup>123</sup>. Conținutul în apă al acestora influențează diferite proprietăți, precum permeabilitatea, caracteristicile mecanice și de suprafață, respectiv biocompatibilitatea. Hidrogelurile prezintă proprietăți fizice similare țesutului viu, această similaritate datorându-se volumului ridicat de apă înglobat, consistenței moi – cauciucate și tensiunii interfaciale reduse cu apa sau fluide biologice. Posibilitatea moleculelor de dimensiuni diferite de a difuza în (încărcare de medicament) și din (eliberarea de medicament) hidrogeluri permite utilizarea acestora ca sisteme de eliberare. Având în vedere că hidrogelurile au o permeabilitate ridicată pentru medicamentele solubile în apă și pentru proteine, cel mai întâlnit mecanism de eliberare medicamentoasă, aferent sistemului hidrogel, este difuzia.

Hidrogelurile sunt cel mai intens utilizate în eliberarea controlată a agenților bioactivi și pentru încapsularea de celule și biomolecule. În multe dintre aceste cazuri, structura tridimensională a hidrogelurilor trebuie să se dezintegreze în produși netoxici nepericuloși, pentru a asigura biocompatibilitatea gelului. Natura produșilor de degradare poate fi configurată printr-o selecție corespunzătoare a elementelor de bază ale hidrogelului. Având în vedere acest considerent, sunt utilizate în prezent multiple și variate metode<sup>124</sup> de reticulare chimice și fizice pentru proiectarea hidrogelurilor biocompatibile.

Gelurile *reticulate chimic* sunt destul de stabile din punct de vedere mecanic, datorită legăturilor ionice și covalente ce le caracterizează. Cu toate acestea, adăugarea unui agent de reticulare conduce la efecte adverse dacă acest compus este toxic, care, odată eliberat în corp, devine destul de nociv. Metodele de reticulare chimică sunt următoarele:

- Polimerizarea radicală a monomerilor cu masă moleculară redusă, sau a homopolimerilor ramificați, respectiv a copolimerilor, în prezența unui agent de reticulare. Această reacție este cel mai adesea efectuată în soluție pentru aplicații biomedicale. Majoritatea polimerilor hidrofilii dispun de grupări hidroxilice, precum aldehidele, acidul maleic și oxalic, dimetilurea,

diisocianatele etc., care condensează în cazul aplicării grupurilor hidroxile organice ca agenți de reticulare. Solventul utilizat pentru aceste reacții este în mod normal apa, dar metanolul, etanolul și ancoolul benzilic au fost de asemenea folosite. Acești solvenți pot fi implicați doar dacă după formarea structurii de rețea, solventul poate fi înlocuit cu apă. Figura 1 prezintă o schemă de reacție tipică acestui tip de reticulare :

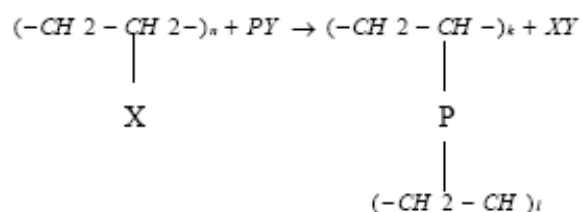


Figura 1. Schemă de reacție tipică structurii reticulate de tip Flory <sup>125</sup>.

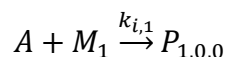
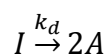
Reacțiile de reticulare pot de asemenea avea loc în absența agenților de reticulare, dacă poate fi aplicat un inițiator tip radical liber, care să formeze radicali liberi în lanțul principal.

-Reacțiile de copolimerizare sunt utilizate în producția gelurilor polimerice. Sunt produse în acest mod multiple hidrogeluri, precum poli(hidroxialchil metilacrilatele). Inițiatorii folosiți în cadrul acestor reacții sunt de tip radical și anionic, printre care: azoisobutironitrilul (AIBN), peroxidul de benzoil etc. Solvenții pot fi adăugați pe parcursul reacției, pentru a reduce vâscozitatea soluției.

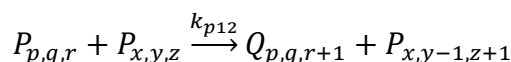
#### Mecanismul cinetic

Mecanismul de reticulare este compus din patru pași: inițiere, propagare, reticulare și finalizare. Finalizarea pot avea loc prin combinare, dispoziționare și tranfer de lanțuri către monomer. Un exemplu de reacție reprezentativă este următorul <sup>4</sup> :

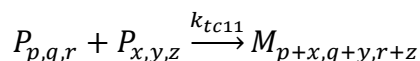
*Inițiere:*



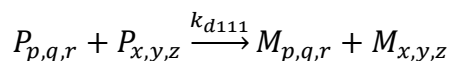
*Propagare și reticulare:*



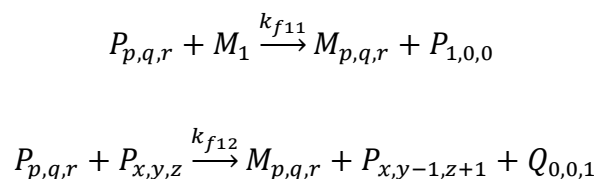
*Finalizare prin combinare:*



*Finalizare prin dispoziționare:*



*Transfer lanț către monomer:*



*Reticularea prin radiație cu energie ridicată*

Radiația cu energie ridicată, precum cea de tip gamma <sup>126</sup> sau din fascicule de electroni, poate fi aplicată la polimerizarea compușilor nesaturați. Polimerii solubili în apă, derivați cu grupări vinil, pot fi convertiți în hidrogeluri utilizând radiație cu energie ridicată. Spre exemplu, PEG derivat în PEGDA poate forma hidrogeluri în cazul iradierii UV (ultra-violet). Polimerii ce nu dispun de grupări vinil adiționale pot fi de asemenea reticulați folosind radiații. La expunerea la radiație gamma sau cu fascicul de electroni, soluțiile polimerice apoase formează radicali pe lanțurile polimerice (spre exemplu, prin ruperea hemolitică a legăturilor C-H).

În plus, radierea moleculelor de apă determină formarea de grupări hidroxile, ce pot ataca lanțurile polimerice, ducând la formarea de microradicali. Recombinarea acestor microradicali pe diferite lanțuri conduce la formarea de legături covalente și, în final, la o structură reticulată. Caracteristicile de umflare și permeabilitate ale gelului depind de nivelul de polimerizare, o funcție de dozaj între polimer și radiație (în general, densitatea de reticulare crește odată cu doza de radiație).

Avantajul aplicării acestui proces în formarea de geluri se regăsește în faptul că poate fi realizat în apă, în condiții blânde, fără necesitatea pentru un agent pentru reticulare. Există totuși și neajusuri: materialul bioactiv trebuie încărcat după formarea gelului, deoarece iradierea ar putea deteriora agentul. De asemenea, în cazul gelurilor precum PEG și PVA, reticulările sunt constituite din legături C-C, care nu sunt biodegradabile.

*Reticularea folosind enzime*

A fost publicată recent o nouă metodă <sup>127</sup>, ce folosește o enzimă pentru sintetizarea hidrogelurilor pe bază de PEG. Tetrahidroxi PEG a fost funcționalizat prin adăugarea de grupări glutamil, formându-se rețele prin adaos de transglutaminază în soluția de PEG și poli(lizină-cofenilalanină). Această enzimă a catalizat reacția dintre gruparea  $\gamma$ -carboxamidă de PEG și gruparea  $\epsilon$ -amină de lizină, pentru a obține o legătura amidă între polimeri. Proprietățile gelului pot fi modelate prin modificarea proporțiilor de PEG și lizină.

Gelurile reticulate chimic implică utilizarea unui agent de reticulare, care este adesea toxic. Această acțiune solicită eliminarea agentului de reticulare din gel, ceea ce poate afecta integritatea gelului.

Din aceste motive, variantele *reticulate fizic* devin din ce în ce mai importante, dizolvarea fiind prevenită datorită interacțiunilor fizice dintre lanțurile polimerice. Au fost cercetate mai multe metode, explorându-se prepararea gelurilor reticulate fizic. Cele mai utilizate metode și domeniilor lor de aplicare sunt:

### *Reticularea prin interacțiuni ionice*

Un exemplu de reticulare prin interacțiuni ionice este cea a alginatului. Acesta conține reziduuri de acid glucuronic și manuronic și poate fi reticulat folosind calciumioni. Reticularea poate fi realizată pentru valori normale ale temperaturii și pH-ului. Gelurile obținute sunt folosite ca matrici pentru încapsulare de celule și pentru eliberare de proteine. În plus, hidrogelurile bazate pe chitosan, precum și pe dextran, reticulate cu ioni de potasiu, reprezintă alte geluri sintetizate prin interacțiuni ionice. Pe lângă reticularea polimerilor anionici cu ioni metalici, hidrogelurile pot fi de asemenea obținute prin complexarea polianionilor și policationilor.

### *Reticularea prin cristalizare*

O soluție apoasă de PVA, trecută printr-un proces de înghețare-dezghetare, conduce la un gel rezistent și foarte elastic. Formarea gelului este atribuită obținerii de cristale de PVA, ce se comportă ca zone de reticulare fizică în cadrul rețelei. Proprietățile gelului pot fi modificate prin varierea concentrației polimerului, a temperaturii și a duratelor ciclurilor de înghețare și dezghetare. A fost demonstrată utilitatea acestor geluri în eliberarea de medicamente <sup>128</sup>.

### *Reticularea prin legături de hidrogen*

Acidul poliacrilic și cel polimetacrilic formează complexuri cu poli(etilen glicol), prin legături de hidrogen între oxigenul din poli(etilen glicol) și gruparea acidă carboxilică a acidului polimetacrilic <sup>129</sup>. De asemenea, au fost observate legături de hidrogen în acid polimetacrilic-g-etilen-glicol. Aceste legături se formează doar atunci când sunt protonate grupările de acid carboxilic. Rezultă că umflarea gelurilor este dependentă de pH. A fost recent dezvoltat un sistem de hidrogel folosind principiile hibridizării ADN prin legături de hidrogen <sup>130</sup>. În cadrul acestei metode, au fost cuplate oligodeoxiribonucleotide la o un polimer solubil în apă. Au fost preparate hidrogeluri prin adăugarea unei oligodinucleotide (ODN), fie conjugate aceluiași polimer solubil în apă, fie în forma sa liberă, la o soluție apoasă de copolimer derivat ODN, solubil în apă.

### *Reticularea prin interacțiuni proteice*

Ingenieria genetică a fost de asemenea utilizată la prepararea de hidrogeluri. Principalul avantaj constă în faptul că secvența de peptide și, prin urmare, proprietățile ei fizice și chimice, pot fi controlate precis prin proiectarea corectă a codului genetic aferent secvențelor de ADN sintetic <sup>131</sup>. Capello și colab. au constituit copolimeri bloc secvențiali, ce conțin o repetiție de

blocuri similare mătășii, respectiv elastinei, în cadrul căreia blocurile insolubile de segmente gen mătase sunt asociate sub formă de fibre sau pături beta aliniată, cu legături de hidrogen. Aceste hidrogeluri pot fi utilizate pentru eliberarea de medicamente, influențată de concentrație, compoziție a polimerului și temperatură. Reticularea prin interacțiuni antigen-anticorp a fost de asemenea realizată: un antigen (IgG de la iepuri) a fost grefat pe o poliarilaidă reticulată chimic, în prezența unui reticulator adițional. Mai mult, hidrogelurile au fost obținute prin imobilizarea atât a antigenului cât și a anticorpului, sub forma unei rețele polimerice interpenetrante. Această metodă poate permite eliberarea medicamentoasă ca răspuns la un antigen specific.

### I.3.2. Metode de caracterizare a hidrogelurilor pe bază de polizaharide

Caracterizarea hidrogelurilor presupune în primul rând, verificarea *solubilității* lor, proprietate ce se verifică prin două metode.

Metoda A.

În mod curent, conținutul de hidrogel dintr-un material este estimat prin măsurarea părții sale insolubile într-o probă uscată după imersarea sa în apă distilată timp de 16<sup>132</sup> sau 48 de ore la temperatura camerei<sup>133</sup>. Proba se pregătește la o concentrație diluată (aprox. 1%) pentru a asigura că hidrogelul este dispersat în întregime în apă. Frația gel este măsurată după cum urmează:

$$\text{Frația gel (hidrogel \%)} = \frac{W_d}{W_i} * 100 \quad \text{ecuația (1)}$$

unde,  $W_i$  este greutatea inițială a probei uscate și  $W_d$  reprezintă greutatea părții uscate insolubile a probei după extracția cu apă.

Metoda B.

O metodă mai precisă de măsurare a fracției insolubile, a hidrogelului de fapt, constă în măsurarea greutății după filtrarea sub vid<sup>134</sup>. Greutatea  $W_1$  a unei bucăți de hidrogel este determinată în urma uscării într-un cuptor la 105 °C pentru o oră și imediat răcită într-un exicator ce conține gel de siliciu. În funcție de materialul testat, o dispersie (S) de 1-2% poate fi pregătită în apă distilată urmată de hidratare peste noapte la temperatura camerei. Dispersia hidratată este ulterior centrifugată pentru 2-5 minute la 2500 rpm înainte de a fi filtrată. Uscarea hidrogelului se face într-un cuptor la 105 °C, urmată de o răcire până la o greutate constantă ( $W_2$ ). Procentul fracției insolubile poate fi calculat astfel:

$$\% \text{ Hidrogel} = \frac{W_2 - W_1}{S} * 100 \quad \text{ecuația (2)}$$

### *Măsurători ale gradului de umflare*

Pentru determinări ale gradului de umflare se folosește metoda japoneză standard K8150, conform căreia, hidrogelul uscat este imersat în apă distilată pentru 48 de ore la temperatura camerei. După umflare, hidrogelul este filtrat pe o plasă din oțel inoxidabil cu 30 de grile. Gradul de umflare este calculat

$$\text{Umflarea} = \frac{W_s - W_d}{W_d} \quad \text{ecuația (3)}$$

unde  $W_s$  reprezintă greutatea hidrogelului în fază umflată și  $W_d$  este greutatea hidrogelului în stare uscată.

O altă metodă de a caracteriza umflarea constă în imersarea gelului uscat în apă distilată pentru 16 ore la temperatura camerei. După umflare, hidrogelul a fost filtrat și s-a calculat gradul de umflare conform

$$\text{Umflarea} = \frac{C}{B} * 100 \quad \text{ecuația (4)}$$

unde  $C$  este greutatea hidrogelului obținut după uscare și  $B$  este greutatea părții insolubile după spălarea cu apă.

*FT-IR* este o tehnică folosită pentru identificarea structurii chimice a unei substanțe. Se bazează pe faptul că componentele de bază ale unei substanțe (ex. legăturile chimice) pot fi excitate și astfel ele pot absorbi lumină infraroșie la frecvențe ce sunt specifice pentru anumite tipuri de legături chimice. Această tehnică este frecvent folosită pentru a investiga aranjarea structurală<sup>135</sup> din hidrogeluri prin comparație cu materialele de plecare.

### *Microscopia electronică de baleiaj*

SEM-ul este utilizat pentru informațiile ce le oferă despre topografia suprafeței probei, fiind cea mai des tehnică utilizată pentru a capta structura rețelei caracteristice din hidrogeluri.

### *Difracția dinamică a luminii*

Cromatografia pe gel cuplată cu un aparat de difracție dinamică multiplă a luminii (GPC MALLS) este o tehnică utilizată pentru determinarea distribuției moleculare și a parametrilor unui sistem polimeric. Această investigație este folosită în cuantificarea hidrogelurilor din sistemele polimerice, cum sunt câteva hidrocoloide, guma arabică, gelatina și pululanul<sup>136</sup>.

### *Analiza sol-gel*

Pentru reticularea cu radiații, analiza sol-gel este o metodă de caracterizare importantă deoarece permite estimarea parametrilor cum ar fi randamentul de reticulare și degradare, doza de gelație,

etc. și de a corela acestea cu anumite proprietăți fizico-chimice. Relația fracției sol și doza absorbită conform ecuației Charlesby-Pinner este dată în ecuația de mai jos, ecuație frecvent folosită pentru polimerii liniari cum e cazul carboximetil celulozei <sup>137</sup>

$$s + \sqrt{s} = \frac{p_0}{q_0} + \frac{2}{q_0 \mu_{2,0} D} \quad \text{ecuația (5)}$$

unde  $s$  este fracția sol,  $p_0$  reprezintă densitatea de degradare, numărul mediu de scindări ale lanțului principal pe unitate monomerică și pe unitate de doză,  $q_0$  reprezintă densitatea de reticulare, proporția de unități monomerice reticulate pe unitate de doză,  $\mu_{2,0}$  este greutatea medie inițială a gradului de polimerizare și  $D$  reprezintă doza de radiație în  $G_y$ .

### *Reologia*

Proprietățile reologice sunt dependente de tipul structurii (ex. asociere, reticulare) prezente în sistem. Soluțiile polimerice sunt vâscoase la frecvențe joase, cu tendința de a urma legea  $G' \sim \omega^2$  și  $G'' \sim \omega$ . La frecvențe înalte, domină elasticitatea ( $G' > G''$ ). Aceasta corespunde comportamentului de tip Maxwell cu un singur timp de relaxare ce poate fi determinat de la punctul de joncțiune și timpul de relaxare crește cu concentrația.

### *Caracterizarea mecanică*

În prezent, cea mai folosită metodă în determinarea proprietăților mecanice ale hidrogelurilor este cea a rezistenței la întindere ce presupune aplicarea unei forțe pe fâșii de material imobilizate între două cleme.

Forța aplicată și elongația materialului sunt folosite pentru a obține un grafic al deformării forțelor, grafic ce se folosește pentru a obține câteva proprietăți mecanice ale hidrogelului cum ar fi modulul lui Young, limita de curgere, rezistența la întindere.

### *Alte tehnici*

Metodele principale folosite pentru a caracteriza și a cuantifica cantitatea de apă liberă și legată din hidrogeluri constau în DSC și RMN. Protonul RMN furnizează informații despre schimbul de molecule de apă dintre stările numite libere și legate. Folosirea DSC se bazează pe presupunerea că doar apa liberă poate fi înghețată, astfel încât se presupune că endoterma măsurată la încălzirea gelurilor înghețate reprezintă topirea apei libere și că valoarea sa va conduce la aflarea cantității de apă liberă din hidrogelul testat.

### **I.3.3. Metode de hidrofobizare a hidrogelurilor pe bază de polizaharide**

Pentru aplicații ne-biodegradabile, este esențial ca matricea gelului purtător să-și mențină integritatea fizică și mecanică. Stabilitatea mecanică a gelului este, prin urmare, un aspect



important în proiectarea unui sistem terapeutic. Spre exemplu, medicamentele și alte biomoleculă trebuie protejate de mediile dăunătoare din corp, precum pH-ul extrem dinaintea eliberării în locația țintă. Pentru aceasta, gelul purtător trebuie să aibă capacitatea de a-și menține integritatea fizică și rezistența mecanică, pentru a se dovedi un biomaterial eficient. Rezistența materialului poate fi majorată prin încorporarea agenților de reticulare și comonomerilor, respectiv prin creșterea gradului de reticulare. Există totuși un grad optim de reticulare, având în vedere ca o valoare prea mare a acestuia poate conduce la fragilitate și o elasticitate redusă. Elasticitatea gelului este importantă în conferirea de flexibilitate lanțurilor reticulate, pentru a facilita mișcarea agentului bioactiv încorporat. Este deci necesar un compromis între rezistența mecanică și flexibilitate, pentru utilizarea corespunzătoare a acestor materiale.

### **I.3.4. Aplicații ale hidrogelurilor pe bază de polizaharide cu hidrofilie redusă**

Hidrogelurile au fost intens studiate ca biomateriale pentru o gamă extinsă de aplicații, datorită similarităților lor structurale cu țesuturile din corp. Spre exemplu, sistemele de eliberare de medicamente bazate pe hidrogeluri prezintă un interes ridicat deoarece pot fi ușor modificate pentru a-și adapta caracteristicile și pot conduce la livrare direcționată, extinderea timpului de circulație și la reducerea toxicității și efectelor secundare. Moleculele de medicament sunt incluse fizic în rețea și eliberate din matricea hidrogelului prin difuzie, care poate fi ajustată prin modificarea conformației rețelei și/sau a afinității acesteia pentru medicament. Mai mult, hidrogelurile pot fi un excelent purtător nu doar pentru molecule mici, dar și pentru macromoleculă bioactive fragile, precum proteinele. Faptul că hidrogelurile conțin cantități ridicate de apă în rețeaua polimerică permite constrângerea activității proteinelor în rețeaua polimerică protectivă și previne denaturarea acestora, ceea ce transformă hidrogelurile în materialele ideale pentru stocarea și eliberarea de proteine.

Cu toate acestea, hidrogelurile curente, ca instrumente de livrare a medicamentelor, sunt limitate de către natura lor hidrofilă, care nu permite utilizarea lor sub formă de sisteme de eliberare pentru medicamentele hidrofobe, din cauza unei eliberări rapide în faza inițială. În plus, din cauza interacțiunilor hidrofobe, se pot forma agregate de medicamente de mari dimensiuni pe parcursul procesului de încărcare a medicamentului, ceea ce poate conduce la o concentrație locală ridicată și cauza efecte secundare sau chiar toxicitate.

Gelurile formate prin reticularea polizaharidelor ce prezintă grupări carboxilice, sunt cunoscute și folosite de mulți ani, în domeniile stomatologiei și tehnologiilor de preparare a mâncării. Dintre aceste geluri, cele mai întâlnite sunt compuse din alginat insolubile în apă care includ, cu excepția magneziului și a sărurilor metalice alcaline, grupa a doua de săruri metalice de acid alginic.

Aceste geluri alginat insolubile în apă sunt formate în mod tipic prin conversia chimică a alginatelor solubile în apă, într-o soluție apoasă, în alginat insolubile în apă. Această conversie este de obicei realizată prin reacția dintre alginata solubilă în apă și cationii polivalenți eliberați dintr-o sare metalică di- sau trivalentă solubilă.

Hidrogelurile pe bază de polizaharide insolubile în apă și încărcate cu medicament prezintă atât o utilitate particulară în pregătirea preoperativă a cavităților vaginale și/sau rectale pentru obținerea unui mediu aseptice, cât și aplicabilitate ca dispozitive de eliberare de medicamente pentru orice cavitate sau suprafață a corpului. Spre exemplu, pot fi folosite ca pansamente, medicamente cu eliberare susținută sau contraceptive vaginale<sup>138</sup>. Hidrogelul medicamentos poate conferi o eliberare prelungită a medicamentului în cavitatea corporală, pentru până la 24 de ore sau chiar mai mult și de asemenea este capabil de a absorbi exudați din cavitatea corporală, fără o umflare considerabilă. Rămâne umed, reducând prin urmare traumele și iritațiile țesutului înconjurător, dar menține suficientă integritate structurală pentru a fi eliminat întreg din cavitatea corporală, chiar și saturat cu lichide corporale sau alte lichide apoase.

Hidrogelurile au cunoscut o dezvoltare extraordinară în ceea ce privește încapsularea de celule și eliberarea controlată a agenților terapeutici dispuși în interiorul lor. O mare atenție a fost acordată gelurilor compuse din polizaharide – polimeri biologici, regăsiți în numeroase tipuri de țesuturi și organisme și care sunt capabili de a fi reticulați în hidrogeluri care încapsulează agenți activi (de exemplu, factori de creștere și alte macromolecule) sau celule pentru eliberare ori incubare, prin intermediul degradării hidrogelului pentru eliberarea agentului sau celulei încapsulate. Totuși, aceste hidrogeluri se degradează în mod tipic doar în prezența enzimelor care descompun scheletul polizaharidei. Prin urmare, există o necesitate pentru compoziții biocompatibile care se degradează în prezența unui mediu apos, de exemplu apa, astfel încât să elibereze un agent activ dispus în interiorul hidrogelului. Aceste hidrogeluri pot fi proiectate astfel încât să se degradeze pe parcursul mai multor zile sau chiar luni.

Pe parcursul ultimilor ani, hidrogelurile au fost de asemenea utilizate ca imitatori de matrici extracelulare tridimensionale, pentru a elimina limitările condițiilor culturilor celulare bidimensionale tradiționale. Hidrogelurile precum matrigelul și colagenul, care sunt bazate pe polimeri naturali, au fost cercetate extensiv pentru aplicații în domeniul culturilor celulare tridimensionale. Cu toate că au fost obținute rezultate promițătoare din prisma celulelor crescute cu aceste geluri naturale, din cauza compoziției lor complexe, variabile și insuficient de clar definite, nu a putut fi obținută o cultură celulară precis controlată. Pe de altă parte, hidrogeluri sintetice cu rețele și rezistență mecanică bine definite pot constitui platforme tridimensionale stabile pentru creșterea de celule, dar căreia îi lipsesc semnalele biologice care pot realiza comunicarea cu alte celule și controla comportamentul acestora. Prin urmare, sunt cercetate hidrogelurile sintetice conjugate cu diferite molecule biologice cu semn, pentru a înlocui gelurile naturale.

Numeroase studii abordează hidrogelurile pe bază de pululan, ca sisteme de eliberare medicamentoasă, în mod particular sub formă de microgeluri și nanogeluri. Se pot obține rezultate terapeutice evidente prin eliberarea lentă a medicamentelor în plasmă, modificând astfel profilele concentrației medicamentelor<sup>139</sup>.

Au fost pregătite nanoparticule de hidrogel din pululan reticulat cu glutaraldehidă, pentru a dezvolta sistem purtător de ADN, potențând astfel eficiența de încărcare a genelor, proprietățile de eliberare controlată, biocompatibilitatea și stabilitatea<sup>140</sup>. În particular, pululanii amfifili obținuți din grefe colesterile, acetile și cloroacetile pe grupări hidroxile, formează nanogeluri capabile de a intrapola molecule hidrofobe, proteine sau peptide și acizi nucleici. Mai mult, nanogelurile hidrofobizate bazate pe pululan interacționează cu totodată cu variate ansambluri moleculare, precum lipozomii și emulsiile apă-ulei<sup>141</sup>. Prin urmare, conjugatele hidrofobizate pe bază de pululan au fost utilizate ca purtători de medicamente direcționați, pentru substanțe bioactive, precum metronidazol, acid nicotinic, sulfatazol, mitoxantronă sau epirubicină, pentru legarea lor de variate substanțe hidrofobe și proteine solubile, precum și în biotehnologie, ca însoțitori în prezența  $\beta$ -ciclodextrinei sau pentru formarea de nanogeluri hibride.

Pot fi folosite ca nanopurtători polimerici în stabilizarea proteică pentru chimioterapia în caz de cancer și pentru vaccinuri artificiale. Nanogeluri ce răspund la stimuli, precum cele sensibile la pH, temperatură și lumină, au fost de asemenea proiectate, folosind o metodă de auto-asamblare similară<sup>142</sup>. Majoritatea studiilor importante din domeniul pululanului hidrofobizat raportează asupra auto-asamblării pululanului purtător de colesteril în nanoparticule stabile de hidrogel, în cadrul cărora lanțurile de pululan au fost reticulate ne-covalent prin asocierea compușilor pe bază de colesteril, ca în figura următoare:

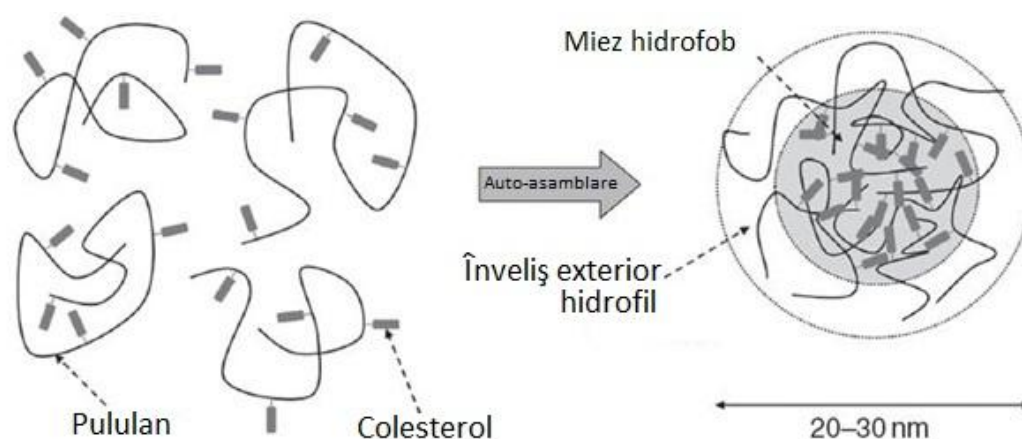


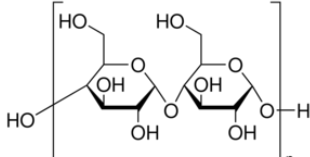
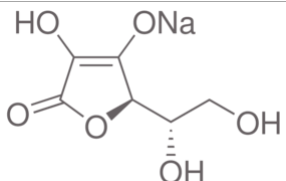
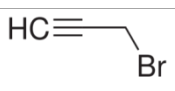
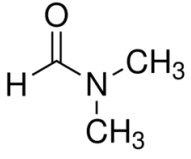
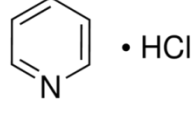
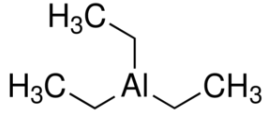
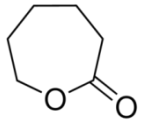
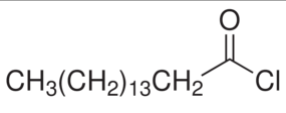
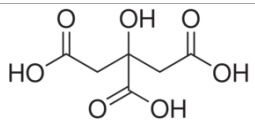
Figura 2. Formarea nanoparticulelor bazate pe conjugat de colesterol-pululan, prin auto-agregare în soluție apoasă<sup>143</sup>.

# PARTEA EXPERIMENTALĂ

## Capitolul II.

### MATERIALE ȘI METODE EXPERIMENTALE

#### II.1. Materiale utilizate

Denumire	Formulă	Alte specificații	Furnizor
Amidon solubil		ACS reagent 30% amiloză și 70% amilopectină	Sigma- Aldrich
L-ascorbat de sodiu			
Sulfat de cupru pentahidratat (II),	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	ACS reagent	
Bromura de propargil		80% wt soluție în toluen	
Azida de sodiu	$\text{NaN}_3$		
Dimetilformamida		(anhidra, 99,8%),	
Piridina		purit, $\geq 98.0\%$	
Trietilaluminiu		în soluție de toluen (1.9 M)	
Bromo-11 undecanol	$\text{BrCH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{OH}$		Fluka
$\epsilon$ -caprolactona		Anhidru 99%,	
Clorura de palmitoil		purit, $\geq 97.0\%$	
Acidul citric		Anhidru 99%	Acros Organics

În cadrul acestei teze, din lista lungă de polizaharide existente s-a ales spre modificare amidonul. Acesta va constitui componenta hidrofilă și poli( $\epsilon$ -caprolactona), componenta hidrofobă, în urma grefării lanțurilor de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) pe polizaharidă, conferindu-se caracterul amfifil produsului final.

Amidonul este principala sursă de carbohidrați din dieta umană și din punct de vedere chimic este alcătuit din două polizaharide principale, amiloza și amilopectina, ultima componentă constituie aproximativ 80% din amidonul cel mai des răspândit. Procentajul celor două polizaharide variază în funcție de originile botanice ale amidonului. Amiloza și amilopectina au structuri diferite și proprietăți care au fost intens studiate și discutate de numeroși autori.

Amiloza este un  $\alpha$ -glucan relativ lung, liniar, cu o masă moleculară  $MW = 100,000-500,000$ , ce conține aproximativ 99% de lanțuri (1 - 4)- $\alpha$ - și (1 - 6)- $\alpha$  și diferă în mărime și structură depinzând de originea botanică. Amiloza are o masă moleculară de aproximativ  $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ . Amilopectina este o moleculă mult mai mare ca amiloza, cu o masă moleculară de  $1 \times 10^7 - 1 \times 10^9$  și o structură foarte ramificată alcătuită din aproximativ 95% lanțuri (1 - 4)-  $\alpha$  și 5% (1 - 6)- $\alpha$ . Ramificările amilopectinei conțin în jur de 20-25 unități glicozidice. Lanțurile unității de amilopectină sunt relativ scurte comparativ cu moleculele de amiloză, având un profil de distribuție larg.<sup>144</sup> Prezența punctelor de ramificație din amilopectină permite lanțurilor scurte liniare să se grupeze împreună într-un mod eficient sub formă de dublu helix paralel, formând astfel baza granulelor de amidon semicristaline<sup>145</sup>. În mod contrar, amiloza formează cea mai mare parte din regiunile amorfe, ce sunt distribuite aleator între clusterelor de amilopectină. Regiunile de ramificare se constituie din stratul amorf ce separă cristalitele între ele.

Umflarea în apă a granulelor de amidon pur reprezintă un proces reversibil la temperaturi sub cea de gelatinizare, datorită structurii stabile semi-cristaline. Absorbția de apă este în mod normal mai mică de 40%. Atunci când este majorată temperatura unei suspensii de granule de amidon cu exces de apă către valoarea de gelatinizare, granula de amidon își va pierde caracteristicile de birefrință și cristalinitate, în paralel cu umflarea. Această modificare este ireversibilă și se numește "gelatinizare". Gelatinizarea completă are loc în mod normal pentru un interval de temperaturi (10-15 °C).

Gelatinizarea este procesul de umflare a granulelor, urmată de dezmembrarea structurii granulare, pentru care pierderea ordinii cristaline poate fi observată ca urmare a dispariției difracției de raze X. Încă dinainte de dezmembrarea granulei, unele materiale (în principal amiloza) încep să fie extrase prin dizolvare din aceasta. Acest material își majorează masa moleculară și, odată cu ridicarea temperaturii, încă mai mult astfel de material ramificat este extras. Cu toate acestea, pe parcursul gelatinizării, nu este extrasă întreaga cantitate de amiloză. Modificarea morfologică a granulelor pe parcursul umflării depinde de originea amidonului. Pentru unele variante, precum cele ce provin din cartofi și porumb, granulele se umflă pe toate

direcțiile, în timp ce în cazul grâului, orzului și secarei umflarea este restricționată pe o singură dimensiune, determinând o contracție complicată a granulelor.

Capacitatea de umflare a granulelor este în mod normal cuantificată prin puterea de umflare (greutatea granulelor umflate sedimentate per gram de amidon uscat) sau volumul de umflare (volumul granulelor umflate sedimentate per gram de amidon uscat) la o temperatură corespunzătoare<sup>146</sup>. Comportamentul de umflare a amidonului nu depinde exclusiv de originia acestuia, ci și de conținutul de amiloză. În plus, retrogradarea are loc după pierderea structurii ordonate, în timpul gelatinizării amidonului, ceea ce conduce la sinereză sau separarea apei în cadrul sistemelor alimentare ce conțin amidon. Totuși, aceste neajunsuri ale amidonului pur pot fi depășite, de exemplu prin introducerea în molecule de mici cantități de grupări ionice sau hidrofobe. Schimbările modifică proprietățile amidonului, inclusiv vâscozitatea soluției, comportamentul de asociere și stabilitatea în cadrul produselor finale. Funcționalitatea amidonului poate fi modificată prin metode fizice, chimice și biotehnologice. Un alt scop al acestor alterări este cel de a stabiliza granulele de amidon pe parcursul procesării și de a face amidonul adecvat unui număr mai mare de aplicații.

Amidonul solubil utilizat de grad ACS a fost achiziționat de la Sigma-Aldrich, are formula chimică  $(C_6H_{10}O_5)_x$  și o masă moleculară de 342,3. Este dispersabil în apă caldă și se prezintă sub forma unei pudre albe.

$\epsilon$ -caprolactona a fost uscată pe site moleculare de 3 Å timp de 3 zile înaintea utilizării, iar Br-11 undecanolul dizolvat în toluen a fost menținut în tuburi Schlenck sub argon.

## II.2. Metode și tehnici de lucru

### II.2.1. Determinarea procentului fracțiilor amiloză/amilopectină din amidon

Amiloza poate forma complexe cu iodul și diferiți compuși organici precum butanolul și acizii grași. Agenții de complexare sunt încorporați în spiralele de amiloză. Aceste complexe sunt în mod esențial insolubile în apă. Amiloza este extrasă cu ușurință din granulele umflate pentru temperaturi ușor peste cea de gelatinizare. Cantitatea de amiloză poate fi în mod normal izolată prin astfel de proceduri de extragere apoasă, prin metode de dispersie și precipitare, respectiv ultracentrifugare. Amilopectina prezintă una dintre cele mai mari molecule din natură. Masa moleculară a acesteia este de 100 de ori mai mare decât cea a amilozei. Comparativ cu aceasta din urmă, structura amilopectinei este mai complexă, având în vedere că 4-5% din totalul de legături formează ramificații. Datorită dominației sale generale în cadrul compoziției, structurii și proprietăților granulare, amilopectina a fost intens studiată din prisma dimensiunilor și structurii moleculare.

Tabelul 1. Caracteristici fizico-chimice importante ale amilozei și amilopectinei <sup>147</sup>.

Proprietate	Amiloza	Amilopectina
Structură moleculară	Liniară ( $\alpha$ -1, 4)	Ramificată ( $\alpha$ -1, 4; $\alpha$ -1, 6)
Masă moleculară	$\sim 10^6$ Daltoni	$\sim 10^8$ Daltoni
Grad de polimerizare	1500-6000	$3 \times 10^5 - 3 \times 10^6$
Complex elicoidal	Puternic	Slab
Culoare – iod	Albastră	Roșie-mov
Soluții diluate	Instabilă	Stabilă
Retrogradare	Rapidă	Lentă
Proprietate gel	Dens, ireversibil	Moale, reversibil
Proprietate film	Puternic	Slab și casant

Capacitatea de legare a iodului (CLI) de amiloză a fost determinată printr-o metodă spectroscopică care constă în urmărirea evoluției absorbției unei soluții de amiloză (10ml) după adăugarea succesivă (20  $\mu$ l) a unei soluții de iod. Măsuratoarea este realizată cu ajutorul unui spectrofotometru la lungimea de undă de 288 nm, lungime ce corespunde unui maxim de absorbție a iodului liber în soluție. Comparăția cu o dreaptă etalon obținută pentru o soluție fără amiloză dă cantitatea de iod fixată, după cum este reprezentat în figura de mai jos (figura 2). Amidonul dispersat va avea o culoare albastru intens, datorită formării unui complex helicoidal între amiloză și iod, mai exact a unor helixuri de tipul V, alcătuite din 6 reziduuri glucozice anhidre pe încolăcire, cu un pas de 0.8 nm și un diametru al cavității elicoidale hidrofobice de 0.5 nm. McGrance și colab. <sup>148</sup> au arătat că iodul este prezent în aproape fiecare întorsătură a helixului amilozei, paralel cu axa sa lungă.

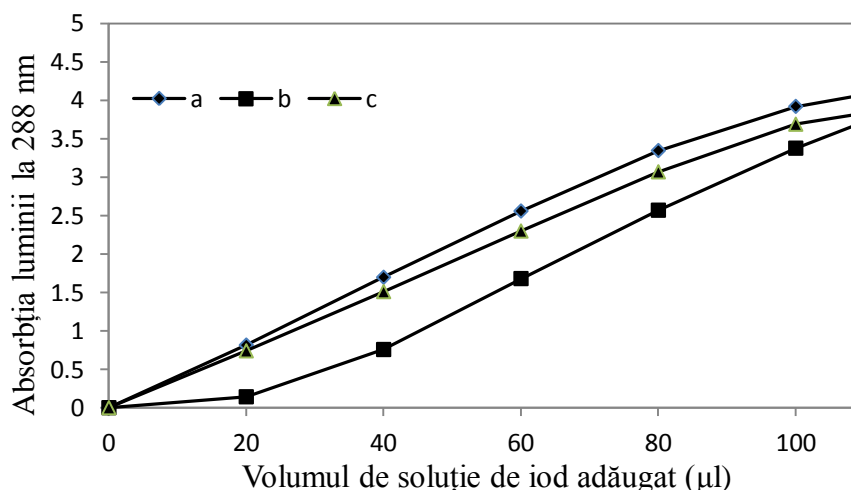


Figura 1. Evoluția absorbției în funcție de adăugarea iodului în timpul determinării CLI pentru a) blanc, b) amiloză, c) amidon.



### Prepararea soluției de amiloză

10 mg (masă uscată) de amidon sunt solubilizate în 2 ml de DMSO la 60°C sub atmosferă inertă. Soluția este diluată la 200ml cu apă. Se prelevează 10 ml din această soluție și se adaugă 83 mg de iodură de potasiu (ce corespunde unei soluții de 0.05N) înainte de dozaj.

### Prepararea soluției de iod

Se adaugă 100 mg iod și 830 mg KI în 2 ml de DMSO, apoi soluția este completată până la 100 ml cu apă și se lasă la agitat timp de o noapte pentru a permite să se solubilizeze cât mai bine. Soluția este imediat pastrată la frigider, dar durata sa de utilizare rămâne limitată la aproximativ o săptămână.

După marcarea cu iod, conținutul total de amiloză a fost de 30%, iar cel de amilopectină de 70%.

## **II.3. Metode de caracterizare**

### **II.3.1. Caracterizare structurală**

#### **II.3.1.1. Rezonanța magnetică nucleară (<sup>1</sup>H-RMN)**

Spectrele RMN <sup>1</sup>H și <sup>13</sup>C au fost înregistrate cu un spectrometru Bruker Avance III, funcționând la frecvența de 400 MHz <sup>1</sup>H și 100.6 MHz pentru <sup>13</sup>C. S-au utilizat solvenți deuterati.

#### **II.3.1.2. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) și cu transformată Fourier prin reflectanță totală atenuată (FTIR-ATR)**

Analiza IR s-a realizat cu un spectrometru Magna-IR Nicolet 550, 32 de scanuri, de la 400 la 4000 cm<sup>-1</sup> folosind pastile KBr prin majorarea produsilor cu bromură de potasiu solidă și aplicarea unei presiuni de 10 tone și cu un spectrometru Nicolet IS10 Smart iTRdiamondATR de la 600 to 4000 cm<sup>-1</sup>. În cazul compușilor lichizi, filmele au fost depuse pe pastile de NaCl.

#### **II.3.1.3. Analiza suprafețelor prin spectroscopie fotonelectron cu raze X (XPS)**

Proprietățile de suprafață ale polimerilor sunt foarte importante în cadrul multor aplicații. Adesea, acestea sunt diferite. Printre tehnicile de analiză a proprietăților chimice ale suprafețelor polimerice, XPS și TOF-SIMS sunt esențiale. Datorită simplității sale în utilizare și interpretarea de date, XPS este probabil cea mai utilizată tehnică de analiză a acestor suprafețe. Este capabilă de a oferi informații elementare cantitative și asupra legăturilor chimice. Cu toate acestea, informațiile moleculare și asupra rezoluției spațiale sunt reduse. TOF-SIMS, pe de altă parte,

oferă o combinație unică de specificitate moleculară ridicată, rezoluție spațială sub-micrometrică și sensibilitate superficială extremă, ideale pentru elucidarea complexeii chimii aferente suprafețelor polimerilor. Este de asemenea unica metodă ce poate oferi simultan informații despre compoziție și morfologie. Totuși, TOF-SIMS are dezavantajul dificultății de generare a datelor cantitative. Prin urmare, XPS și TOF-SIMS reprezintă o excelentă combinație pentru caracterizarea suprafețelor polimerice.

Compoziția chimică a suprafețelor probelor a fost analizată prin spectroscopia cu raze X a fotoelectronilor (XPS) folosind un spectrometru cu fotoelectroni PHI-5000 VersaProbe (F ULVAC-PHI, INC), cu un analizor de energie hemisferică (0,85 eV rezoluție de energie cu caracter obligatoriu, pentru materiale organice). O radiație monocromatică de raze X, Al Ka ( $h\nu = 1486.7$  eV) a fost utilizată ca sursă de excitare. Standardul unghiului de decolare utilizat pentru analiză a fost de  $45^\circ$ , producând o adâncime maximă de analiză în intervalul de 3-5 nm. Spectrul minim de rezoluție a fost înregistrat în trepte de 0,5 eV cu o energie de trecere de 117.4 eV. În plus, spectre de înaltă rezoluție au fost înregistrate în trepte de 0,1 eV cu o energie de trecere de 58,7 eV. Softul folosit pentru tratarea spectrelor a fost MultiPak V8.2C, analiza o zona, diamterul fasciculului de raze X = 100 micrometri, factori de sensibilitate C1s - 0.314, O1s - 0.733.

Măsurătorile ToF-SIMS s-au realizat folosind Physical Electronics TRIFT III ToF-SIMS instrument (Physical Electronics, Chanhassen, USA, folosind o sursă de ioni  $\text{Au}^+$  de 22 keV (current ionic de 2nA) pe o suprafață de  $300\ \mu\text{m} \times 300\ \mu\text{m}$ . Sursa de electroni a fost operată la energii scăzute ale acestora pentru a compensa încărcarea. Doza de ioni a fost menținută sub limitele condițiilor statice. Datele au fost normalizate la intensitatea totală minus intensitatea  $\text{H}^{+/-}$  datorită reproductibilității sale scăzute. Deviațiile medii și cele standard au fost calculate în urma a trei măsurători pe arii diferite ale aceleiași probe

### **II.3.2. Analiza termică - analiza termogravimetrică (ATG) și calorimetria diferențială de baleiaj (DSC)**

Stabilitatea termică a copolimerilor a fost investigată cu un echipament TGA Q50 de la firma T.A. Instruments, sub atmosferă inertă (100 ml/min). Toate experimentele au fost realizate în intervalul  $20^\circ\text{C}$ - $500^\circ\text{C}$ , la o viteză de încălzire de  $10^\circ/\text{min}$ .

Analiza termică a produșilor s-a realizat cu un DSC 822e de la Mettler-Toledo. Au fost folosite capsule ermetice de aluminiu ( $40\ \mu\text{L}$ ) și probele au cântărit între 4 și 6 mg. Valorile au fost înregistrate de la primul ciclu de încălzire.

### **II.3.3. Determinarea unghiului de contact**

Unghiul de contact a fost determinat prin metoda „picăturii” cu un aparat KRUSS DropShape Analysis system DSAMK2.

Tensiunea interfacială și de suprafață poate fi măsurată cu un tensiometru optic, prin așa-numita „metodă a picăturii”.

Forma unei picături de lichid ce atârna de vârful unei seringi este determinată din raportul de forțe care include tensiunea de suprafață din acel lichid. Tensiunea de suprafață sau tensiunea interfaciala la interfața lichidului pot fi legate de forma picăturii prin următoarea ecuație:

$$\gamma = \Delta\rho \cdot g \cdot R_0^2 / \beta \quad \text{ecuația (1)}$$

unde  $\gamma$  = tensiunea de suprafață

$\Delta\rho$  = diferența în densitate între fluide la interfață

$g$  = accelerația gravitațională

$R_0$  = raza curburii picăturii la apex

$\beta$  = factorul de formă

$\beta$ , factorul de formă, poate fi definit prin intermediul ecuației Young-Laplace exprimată prin trei ecuații adimensionale de ordinul I, după cum este arătat în figura de mai jos.

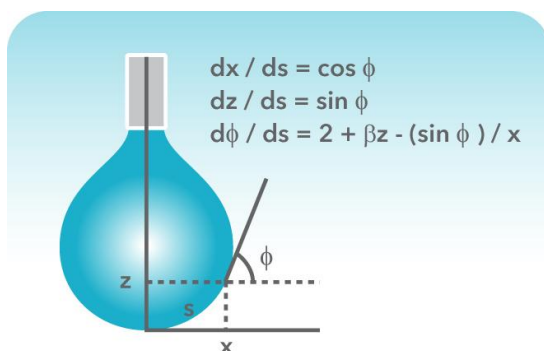


Figura 2. Ecuații ce definesc factorul de formă  $\beta$ .

Metodele moderne computerizate, ce folosesc aproximări iterative, permit calcularea ecuației Young-Laplace pentru factorul  $\beta$ . Astfel, pentru orice picătură cu densitate cunoscută, pentru cele două lichide aflate în contact tensiunea de suprafață poate fi măsurată conform ecuației Young-Laplace. Această abordare reprezintă un pas înainte față de metodele tradiționale, realizându-se cu ușurință și precizie. De asemenea, această metodă are avantajul că folosește volume foarte mici de lichid, măsoară foarte ușor tensiuni interfaciale foarte scăzute și materiale topite.

#### II.3.4. Analiza capacității de micelizare

Difracrometria laser (DLS) a fost realizată folosind aparatul Malvern Nanosizer S echipat cu un fascicul generator de laser de 10 mW He/Ne ce operează la  $\lambda=633$  nm unghi de  $90^\circ$ . Toate valorile au fost realizate în triplicate de zece măsurători fiecare, obținute

la 25°C. Pentru un coloid monodispers, indexul de polidispersitate ar trebui să fie sub 0.1, dar valorile ce depășesc acest număr pot fi folosite în diferite comparații.

### II.3.5. Microscopia electronică de baleiaj (SEM)

Microscopia de baleiaj (SEM) utilizată în cadrul acestei teze a utilizat un microscop Quanta 250 de la FEI .

### II.3.6. Microscopia electronică de transmisie (TEM)

Microscopia electronică de transmisie (TEM) a fost utilizată pentru a observa direct morfologia și polidispersitatea agregatelor copolimerice. S-a întrebuințat un CM120 de la Philips, probele fiind observate la o tensiune de 80kv după uscarea unei picături de soluție de polimer pe o grilă de cupru acoperită de un film de carbon.

### II.3.7. Determinarea gradului de retenție a apei

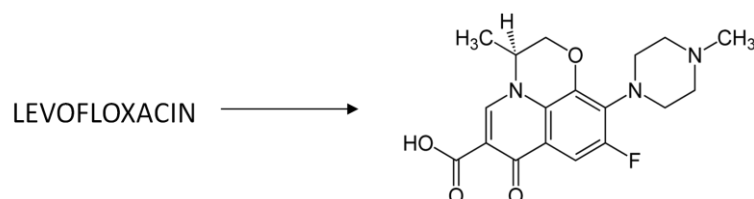
Gradul de umflare [Q%] a fost calculat conform ecuației de mai jos:

$$Q\% = \frac{m(t) - m(0)}{m(0)} \times 100 \quad \text{ecuația (2)}$$

unde,  $m(t)$  reprezintă masa hidrogelului umflat la timpul  $t$  și  $m(0)$  este masa inițială a hidrogelului uscat. Rezultatele constituie valoarea medie a trei determinări.

### II.3.8. Evaluarea *in vitro* a cineticii de încărcare/eliberare de principii active

Pentru studiile de încărcare/eliberare a fost utilizat un medicament model, levofloxacin, procurată de la Sigma Aldrich. Structura levofloxacinului este redată în schema 1.



Schema 1. Formula levofloxacinului.

Determinarea cantității de medicament încărcat și a cineticii sale de eliberare, s-a realizat cu ajutorul spectroscopiei UV-VIS. S-a utilizat un instrument de tip Nanodrop ND 100, ce permite analiza unui volum foarte mic de substanță (de ordinul microlitrilor). Atât pentru studiile de includere cât și pentru cele de eliberare a fost necesară realizarea unei curbe de etalonare.

Probele au fost cântărite și apoi imersate în 10 mL soluție de medicament în apă (10% w/w) unde au rămas timp de 24 de ore pentru definitivarea procesului de difuzie. S-a folosit ca medicament model, levofloxacină, un antibiotic hidrosolubil.

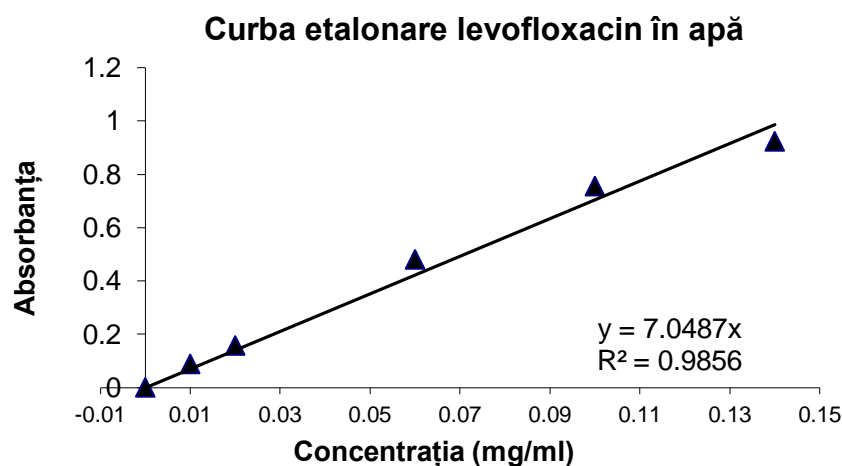


Figura 3. Curba de etalonare pentru levofloxacină în apă

Cantitatea maximă de medicament încărcat după 24 de ore a fost calculată spectrofotometric (lungimea de undă folosită pentru identificarea cafeinei a fost 300 nm) după cum urmează:

$$m_L = m_I - C_{L,f} \times V \quad \text{ecuația (3)}$$

unde  $m_L$  – levofloxacin încărcat (mg)

$m_I$  – cantitatea inițială de levofloxacin (mg)

$C_{L,f}$  – concentrația de levofloxacin în soluția rămasă de medicament după îndepărtarea probei, calculată din curba de calibrare pentru levofloxacin în apă (mg/mL)

$V$  – volumul soluției de medicament rămas ( $m_L$ ).

Hidrogelurile încărcate cu levofloxacin au fost imersate în 100 mL soluție tampon (pH=7,4) în recipiente acoperite și fixate într-o baie de apă cu termostatare și agitare GFL 1092, la o temperatură de 37°C și o viteză de agitare de 60 rpm.

Cantitatea de medicament eliberat la anumite intervale de timp a fost monitorizată spectrofotometric. Rezultatele au constituit media a trei determinări.

Cantitatea maximă de levofloxacină eliberată a fost calculată folosind ecuația curbei de calibrare în apă și masa fiecărei probe astfel:

$$m_L = \frac{C_L \cdot 100 \text{ mL}}{m_p} \quad \text{ecuația (4)}$$

unde:  $m_L$  – cantitatea maximă de levofloxacin eliberată,  $C_L$  – concentrația levofloxacinei calculată din ecuația curbei de calibrare ( $A_L = C_L \cdot 7,048$  în apă) (mg/mL),  $m_p$  – masa probei (mg).

Determinarea cantitativă a medicamentelor cedate în mediul receptor, s-a făcut prin spectrofotometrie UV-VIS.

### II.3.9. Modelul teoretic de difuzie a principiului activ

Ecuția de ordin 1 a lui Lagergren

$$q_t = q_e * [1 - \exp(-k_1 * t)] \quad \text{ecuația (5)}$$

$q_t$  = cantitatea de xx absorbita la un anumit timp  $t$  (mg/g)

$q_e$  = cantitatea de xx absorbita la echilibru (mg/g)

$k_1$  = constanta lui Lagergren ( $\text{min}^{-1}$ )

$t$  = timp

Ecuția de ordinul 2 a lui Ho

$$q_t = t * k_2 q_e^2 / (1 + t * k_2 q_e) \quad \text{ecuația (6)}$$

$h = k_2 q_e^2$

$k_2$  = constanta relativa a acestui model [ $\text{g}/(\text{mg} * \text{min})$ ]

Ecuția Korsmeyer–Peppas:

$$M_t / M_\infty = Kt^n \quad \text{ecuația (7)}$$

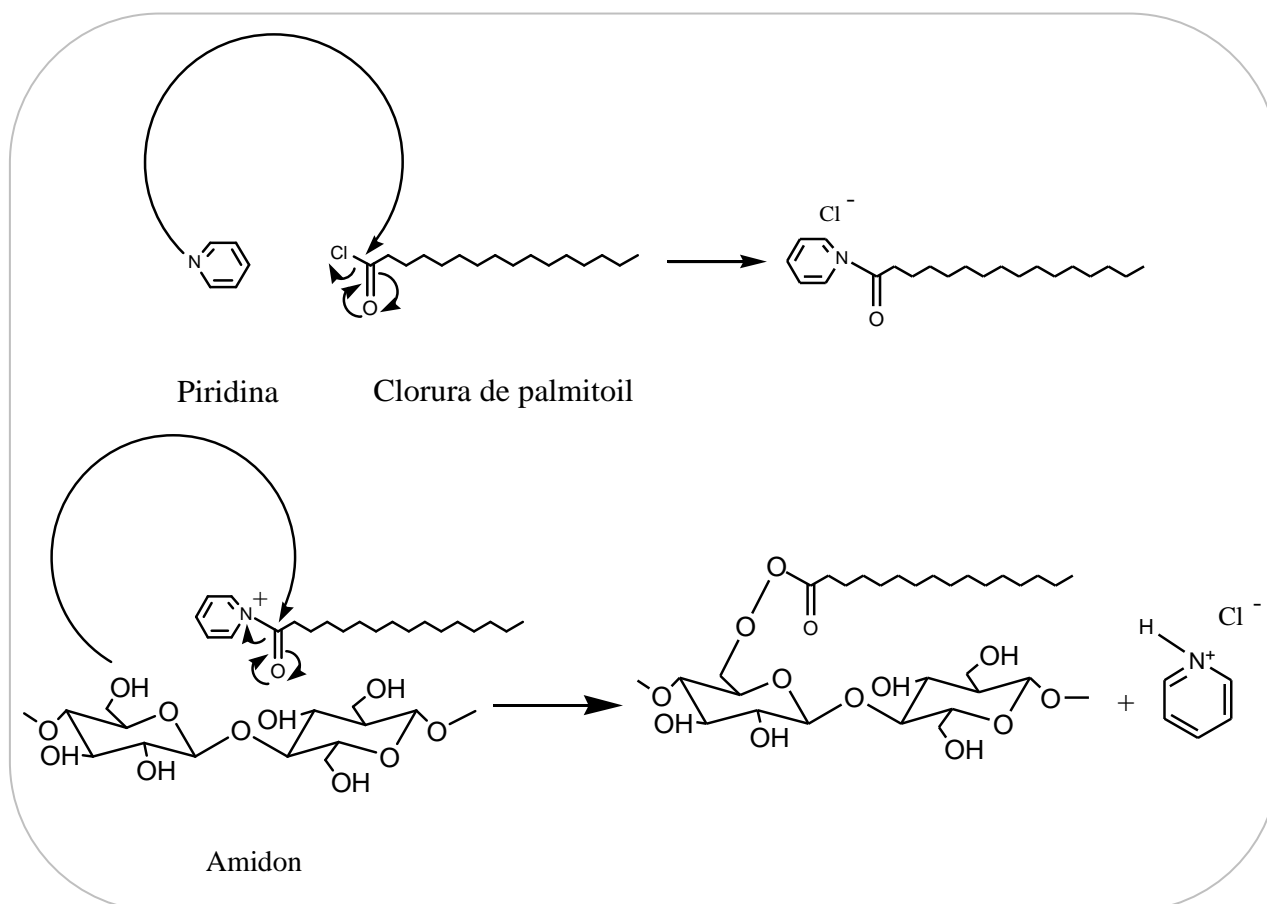
unde  $M_t / M_\infty$  reprezintă fracția de medicament eliberat la timpul  $t$ , iar  $k$  este constanta ratei de eliberare și  $n$  exponentul de eliberare.

## CAPITOLUL III

### MODIFICAREA CHIMICĂ A AMIDONULUI SOLUBIL

#### III.1. Modificarea chimică a amidonului solubil cu cloruri acide

##### III.1.1. Principiul reacției



Schema 1. Mecanismul reacției de esterificare a amidonului cu clorură de palmitoil.

Esterificarea amidonului (2 g, 0.012 mol) cu clorură de palmitoil (3.29 g, 0.012 mol) a fost realizată în 50 mL de dimetilformamida (DMF), pe o baie de ulei, sub o continuă agitare la 100° C timp de 6 ore, folosind piridina (1.13 g, 0.014 mol) drept acceptor de HCl. După ce mediul de reacție a fost răcit la 50° C, un strat asemănător cu o rășină este separat de restul solventului. Produsul este precipitat într-un amestec de 70% (v/v) de etanol și apă, sub o agitare puternică, apoi este filtrat și uscat.

### III.1.2. Analiza rezultatelor obținute

Polimerii naturali, cum este cazul amidonului, celulozei sau cel al proteinelor reprezintă o categorie interesantă de materii prime pentru diverse aplicații ce impun un caracter biodegradabil. În mod deosebit, amidonul este atractiv deoarece are un cost redus și este abundent. Cu toate acestea, folosirea lui în stare nativă este limitată datorită rezistenței scăzute, vâscozității ridicate (procesare slabă), fragilității ridicate și incompatibilității cu polimerii hidrofobi. De aceea este necesară o modificare a acestuia în scopul hidrofobizării și a îmbunătățirii proprietăților mecanice.

Dezvoltarea esterilor pe bază de amidon a început la mijlocul sec IX, cu cercetările lui Schuetzenberger care a reacționat amidonul acetat cu anhidrida acetică<sup>149</sup>. Reacția de esterificare este catalizată de H<sup>+</sup> și are loc cu formarea de apă; poate fi realizată cu anhidride acide în medii apoase sau pe bază de solvenți organici (piridină, DMSO, DMF sau isopropanol) cu catalizatorii acizi (acidul clorhidric sau sulfuric) sau alcalini (NaOH sau trietilamina)<sup>150</sup>. Catalizatorii neutri sau slabi acizi/alcalini duc la o substituție regioselectivă la grupările hidroxil ale amidonului de la C2, pe când catalizatorii alcalini (cum sunt carbonații, hidrogenocarbonații, acetatii și fosfații) vor determina substituții la C2, C6 și C3<sup>151</sup>.

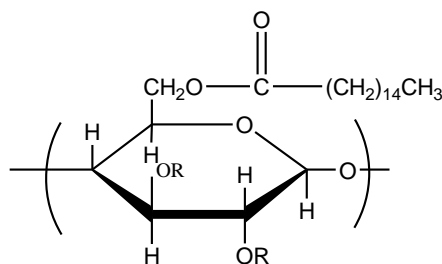
Sinteza esterilor cu lanțuri lungi de acizi grași ai amidonului a atras un interes vizibil în ultima perioadă, introducerea unui lanț lung de acid (C12 - C18) reducând fragilitatea amidonului nativ și mărindu-i hidrofobicitatea<sup>152</sup>.

Insolubili în apă, esterii polizaharidici ai acizilor grași își găsesc utilizarea în învelișuri pentru substanțe active și ca adezivi cu temperaturi înalte de topire. Dacă gradul de substituție al produșilor este prea mic, cum e în majoritatea cazurilor, atunci aceștia nu sunt suficient de hidrofobici. Permeabilitatea la apă a produșilor poate fi reglată ținând cont de lungimea lanțului acidului gras sau, prin amestecarea în produs a altor polimeri sau prin alterarea grosimii stratului de înveliș. Hidrofobicitatea poate fi indusă prin esterificarea parțială sau totală a amidonului. Agenții de esterificare preferați sunt cei cu formula RCO<sub>2</sub>H, unde, R reprezintă o grupare alchil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> liniară sau ramificată, sau amestecuri, sau derivați ai acizilor sau ai amestecurilor de acizi. Gradul de hidrofobicitate și proprietățile fizice ale amidonului modificat pot fi manipulate prin selecția agenților de esterificare. Amidonul hidrofobic se degradează în două etape. În prima etapă, esterul este hidrolizat de acțiunea microorganismelor din mediul înconjurător, iar în a doua etapă, are loc acțiunea amilazelor.

Gradul de esterificare poate varia după cum se dorește de la unu la trei, pe unitatea glicozidică a amidonului (schema 1), sau în funcție de numărul de grupări hidroxilice pe unitatea monomerică a polizaharidei dorite. De asemenea, polizaharide similare sau diferite cu grade de esterificare variabile pot fi amestecate împreună pentru a atinge performanțele dorite.



Amidonul esterificat este stabil la atacul amilazelor, însă, în mediul înconjurător, legăturile lor esterice sunt hidrolizate de microorganisme ce secretă esteraze. Astfel, mai departe, polizaharidul devine disponibil atacului amilazelor care îl vor transforma în unitățile sale monomerice, glucoza și dextrina.



Schema 2. Structura chimică a amidonului reacționat cu clorura de palmitoil.

Mecanismul acestei reacții constă într-un prim pas în atacul nucleofilic al electronului liber al azotului din piridină asupra carbonului carbonil din clorura de palmitoil. Astfel, este creat un complex cu un atom de azot încărcat pozitiv și cu un atom de oxigen încărcat negativ. Gruparea carbonilică este regenerată ulterior în timp ce atomul de clor părăsește sistemul. Într-o a doua etapă, un atac nucleofilic echivalent, asupra carbonului carbonil din complex, este realizat de perechea de electroni liberi din oxigenul (gruparea hidroxilică) din amidon. Gruparea carbonilică este regenerată ulterior după eliminarea piridinei, un nucleofil puternic și o grupare ce pleacă ușor. Gruparea hidroxil nu este un nucleofil puternic care să poată efectua atacul nucleofilic din prima etapă, unde atomul de clor este o grupare ce pleacă bună, dar un nucleofil slab. Din acest motiv reacția nu are loc invers, adică un atac nucleofilic asupra grupării carbonil de către un ion de clor. Piridina acționează atât ca și catalist și ca solvent. În plus față de efectul catalitic, piridina, o bază organică minimizează deteriorarea amidonului în timpul esterificării deoarece neutralizează acidul clorhidric format ca produs secundar. Izolarea produsului final se face facil și randamentul este foarte bun. S-a folosit ca solvent pentru această reacție N,N-dimetil formamida (DMF), fiind cel mai avantajos<sup>153</sup>. Produsul obținut în urma reacției a fost precipitat cu un amestec de 50% apă și etanol. Apa prezentă în etanol captează clorhidratul de piridină format și acizii grași liberi se dizolvă în etanol, produsul fiind insolubil în amandouă.

### III.1.2.1. Analiza structurală a amidonului modificat cu lanțuri de clorură de palmitoil

#### III.1.2.1.1. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)

Prezența radicalilor de palmitoil a fost confirmată de apariția grupărilor carbonil ale esterilor (C = O) la  $1742\text{ cm}^{-1}$ . Cele două pic-uri de intensități puternice ce corespund valorilor  $2922$  și  $2851\text{ cm}^{-1}$  sunt atribuite grupărilor metil și metilen asociate substituenților palmitoici. Vibrațiile puternice ce apar la  $3481\text{ cm}^{-1}$ , caracteristice grupărilor hidroxil ale amidonului nativ, sunt diminuate în intensitate după acilare, deoarece numărul lor scade. Intensitatea benzii OH de la  $3600$  la  $3400\text{ cm}^{-1}$  depinde de DS-ul esterilor. Banda de vibrație a grupărilor metilenice crește cu

creșterea DS-ului. La  $1746\text{ cm}^{-1}$  apare banda C=O a esterului. Semnalele de la  $1467\text{ cm}^{-1}$  și  $1414\text{ cm}^{-1}$  și cele de la  $1169\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$  sunt atribuite  $\nu\text{ C-O-C}$  și  $\nu_{\text{as}}\text{ C-O-C}$  din scheletul polimerului. Pic-ul  $\delta\text{C-H}$  apare la  $1377\text{ cm}^{-1}$  și este corespunzătoare polimerului și lanțului hidrocarbonic al acidului carboxilic.

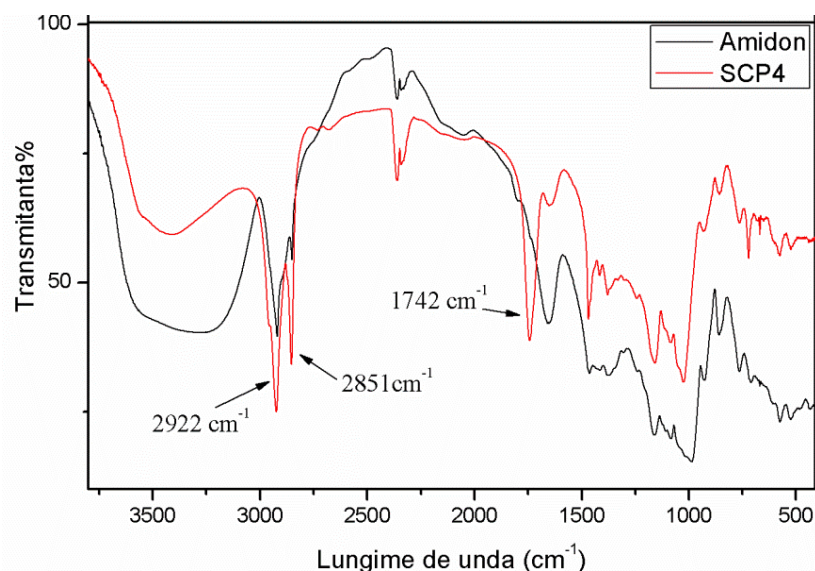


Figura 1. Spectru FTIR pentru amidonul nemodificat și pentru amidonul esterificat cu clorura de palmitoil (SCP4).

### III.1.2.1.2. Analiza suprafeței prin XPS și determinarea gradului de substituție

Spectroscopia RMN  $^1\text{H}$  și  $^{13}\text{C}$  este o metodă preferată în determinarea DS-ului, dar cu precădere în domeniul polizaharidelor neramificate și foarte substituie, și în special pentru esteri. Marele avantaj al acestei analize este că polizaharida intactă poate fi analizată, evitând orice depolimerizare și pași ulteriori de preparare a probei. Dar, în același timp, natura polimerică are și un dezavantaj, datorită vâscozității ridicate și caracterului de amestec, semnalele sunt largi, de multe ori, prezintă o rezoluție slabă și asimetrică. Această vâscozitate și mărirea a pic-ului poate fi parțial compensată de folosirea concentrațiilor scăzute, cu costul de a avea un semnal slab comparativ cu cel al artefactelor. De aceea, polizaharidele au fost parțial sau complet degradate de enzime, tartamente ultrasonice sau hidroliza acidă, rezultând un spectru RMN mai bun dar mai complex. Din acest motiv, adeseori pot avea loc calcule eronate datorită impurităților dacă semnalele de interes sunt ascunse de semnalele reziduurilor de reacție cum a fost cazul spectrelor noastre.

Gradul de substituție a fost calculat cu ajutorul analizei XPS (figura 2) după cum a fost descris anterior<sup>154</sup>, ca fiind raportul dintre suprafața picului (-O-C-O) ce corespunde esterului și aria picului -O-C-O din unitatea glucozidică (tabel 1).

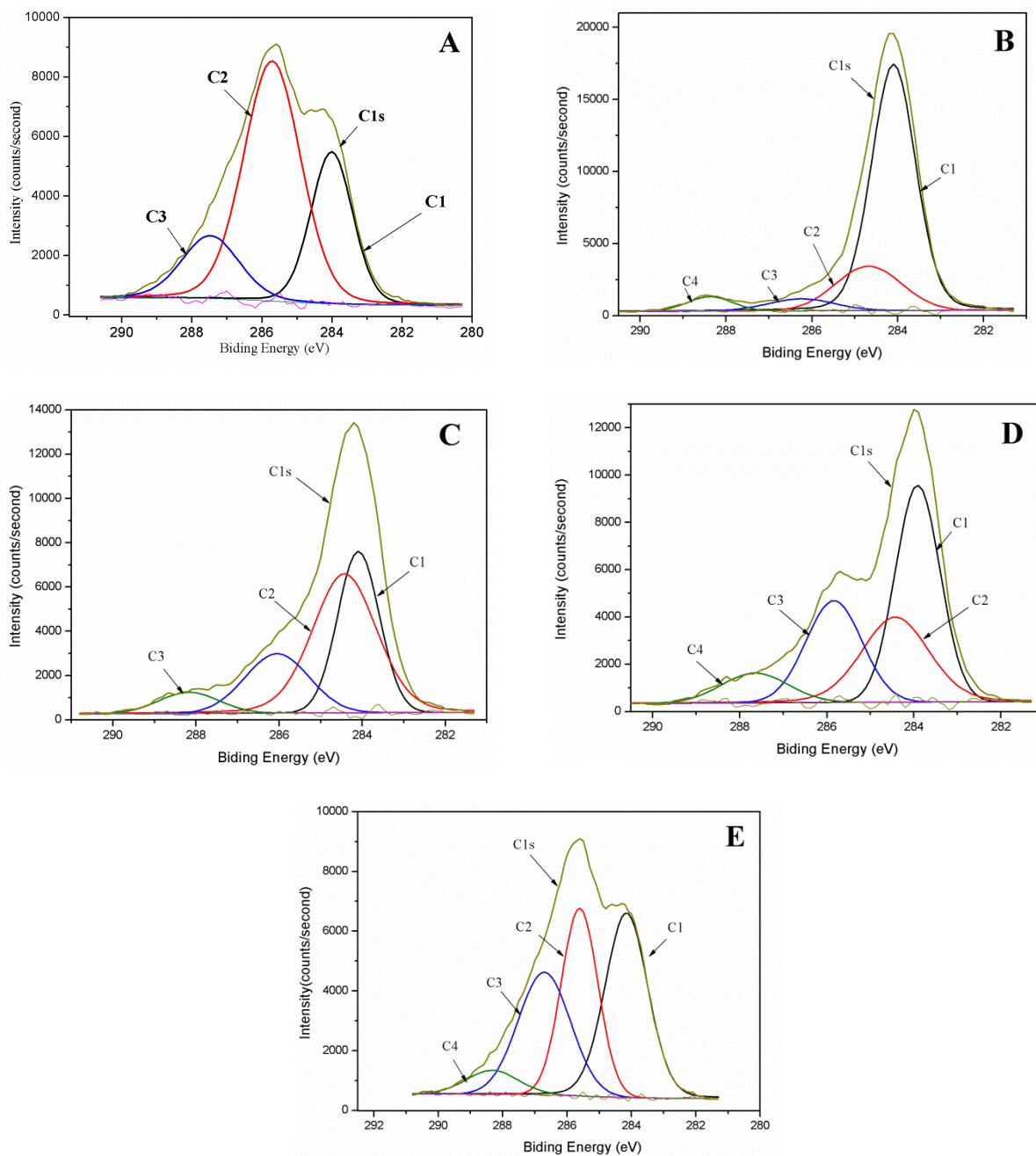


Figura 2. Deconvoluția XPS a picului C1s pentru a. amidon, b. SCP1, c. SCP2, d.SCP3,e. SCP4.

Tabel 1. Compoziția suprafeței chimice a amidonului, înainte și după esterificare, ca rezultat al deconvoluției semnalului C1s.

	C1 (C-C/C-H)	C2 (C-O)	C3 (O-C-O)	C4(O-C=O)
<b>Energie (eV)</b>	284	285.6	287.2	288.4
Amidon	36.21	30.15	28.03	-
SCP1	49.42	41.83	4.62	4.13
SCP2	31.18	45.49	17.45	5.88
SCP3	41.39	25.96	24.14	8.51
SCP4	72.66	20.90	2.59	3.85

Tabel 2. Valorile DS-ului conform calculelor descrise mai sus, în urma reacției amidonului cu clorura de palmitoil timp de 6 ore la 100° C.

Nume probă	Raport molar (amidon:clorură de palmitoil:piridină) mmol	DS
SCP3	1 :1.5 :1.72	0.3
SCP2	1 :1.2 :1.44	0.2
SCP1	1 :0.5 :1	0.15
SCP4	1 :0.2 :0.44	0.13

S-a obținut un grad ridicat de substituție pentru concentrații mari ale clorurii acide și pentru timpi de reacție lungi. S-a observat că un parametru important în maximizarea gradului de substituție este reprezentat de cantitatea de clorură de palmitoil folosită, pe când timpul este de o importanță minoră, iar temperatura nu are nici o influență în intervalul studiat. Piridina a fost folosită într-un exces constant față de clorura acidă de 0.22, cu excepția cazului când s-a verificat dacă aceasta are vreo influență asupra DS-ului. În ceea ce privește structura amidonului, și anume raportul amiloză, amilopectină, s-a arătat că amidonul cu 28% amiloză arată cea mai mare reactivitate, în timp ce amilopectina posedă cea mai mică reactivitate.

Tabel 3. Analiza elementală a amidonului înainte și după esterificare.

Nume probă	C	O	N
Amidon	60.2	39.5	0.3
SCP1	79.8	21.2	-
SCP2	80.2	19.8	-
SCP3	88.2	11.8	-
SCP4	72.3	27.7	-

Analiza XPS a probelor a dezvăluit o bună corelare a rezultatelor analizei de suprafață cu determinările gradului de substituție.

### III.1.2.2. Analiza tensiunii superficiale

S-au realizat măsurători al unghiului de contact la interfața lichid- aer prin metoda picăturii, folosind ca solvent DMSO.

Tabel 4. Valorile unghiului de contact la interfața lichid-aer.

Nume probă	$\gamma$ ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) în funcție de conc. soluției (10mg/ml)	$\gamma$ ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) DMSO
SCP1	38.6	
SCP2	37.1	43
SCP3	37.8	
Amidon	44	

Cu cât este mai mică valoarea pentru probele analizate comparativ cu valoarea DMSO-ului cu atât produșii sunt mai hidrofobi, analiză corelată și cu gradul de substituție obținut din analiza XPS.

### III.1.2.3. Analiza morfologică

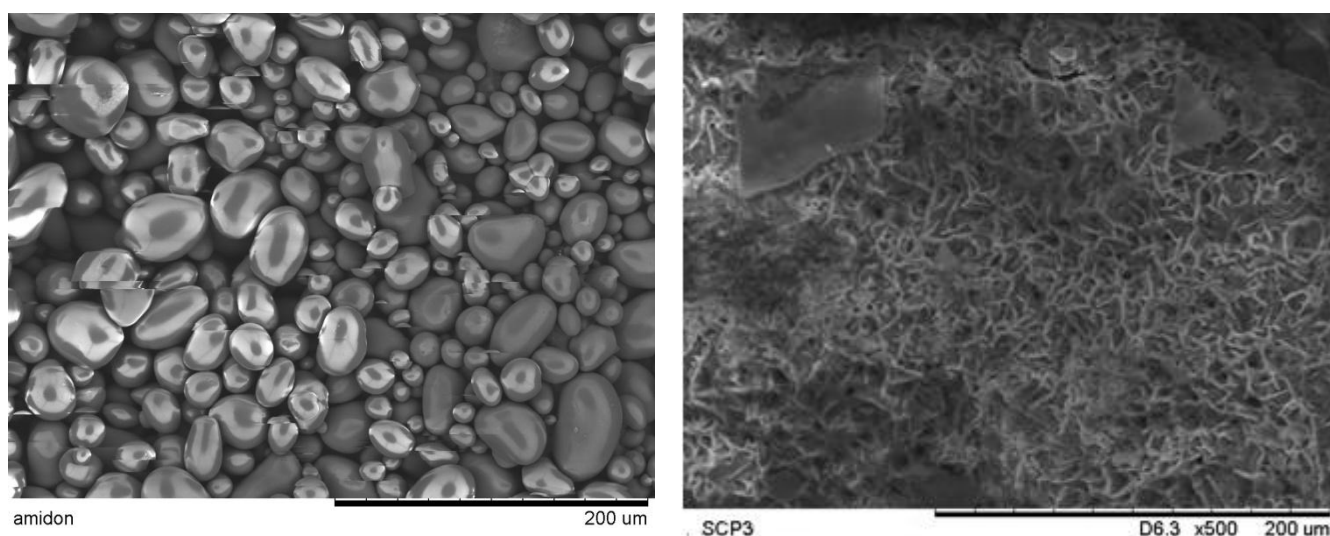


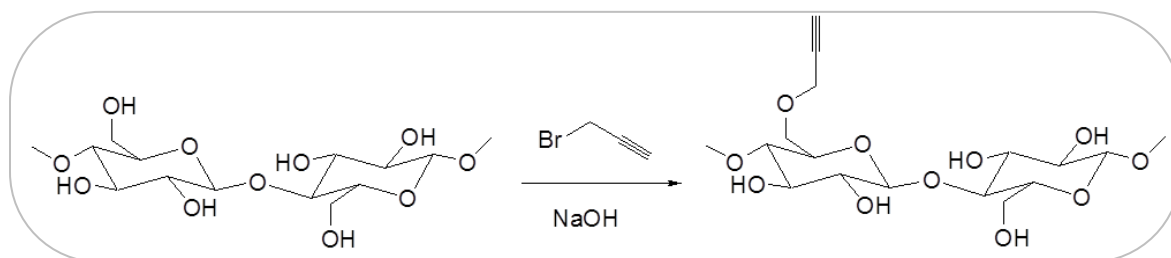
Figura 3. Imagini SEM pentru a. amidon și b. amidon modificat (SCP3)

Imaginile SEM au arătat schimbări semnificative în ceea ce privește morfologia amidonului după reacția sa cu clorura de palmitol, trecând de la o structură granulară la una poroasă. Aceste imagini au fost obținute pe probe neliofilizate.

## III.2. Modificarea chimică a amidonului solubil prin introducerea grupării alchine

### III.2.1. Principiul reacției

Principiul reacției constă în faptul că aceasta are loc între grupările hidroxil ale amidonului și bromul din bromura de propargil, pentru a forma un eter propargilic. Prezența hidroxidului permite activarea funcțiilor hidroxil, iar isopropanolul facilitează solubilizarea bromurii de propargil (schema 3) <sup>155</sup>.



Schema 3. Mecanismul reacției de modificare a amidonului cu bromură de propargil.

Reacția decurge astfel:

Se dispersează amidonul (6 g, 110 mmol de grupări hidroxil) într-un reactor cu mantă, prevăzut cu un refrigerent și un agitator tip ancoră acționat de un motor de 350 rpm (număr de rotații pe minut) în 100 mL de isopropanol și se agită la temperatura camerei timp de 10 minute. O soluție apoasă de hidroxid de sodiu (5 wt%, 31 mL, 39 mmol) se adaugă în picături și după 1 oră, tot în picături, bromura de propargil (17 g, 110 mmol). Se agită la 60° C timp de aprox 3 ore. Se dizolvă produsul final în apă și se precipită de două ori în isopropanol. Faza solidă se filtrează și se usucă sub nișă.

Amidonul funcționalizat recuperat se prezintă ca o pudră de culoare galben pai (5.42 g).

### III.2.2.1. Analiza structurală

#### III.2.2.1. 1. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier

Amidonul a fost funcționalizat printr-o substituție nucleofilică a bromurii de propargil cu alcoxi de sodiu, conform unei proceduri descrise anterior de Tizzotti și colab. <sup>[15]</sup> pentru funcționalizarea alchilică a guarurilor.

Achizițiile spectrelor FT-IR au fost realizate cu un aparat SMART OMNI-Transmission Nicolet IS10, spectre înregistrate între 400 și 4000  $\text{cm}^{-1}$  (32 scanări și o rezoluție de 4  $\text{cm}^{-1}$ ) și s-a făcut comparația cu cele ale amidonului nefuncționalizat (Figura 4), în urma căreia s-a observat prezența benzii de absorbție  $\nu_s = 2117 \text{ cm}^{-1}$ , caracteristică triplei legături, ceea ce a demonstrat reușita reacției.

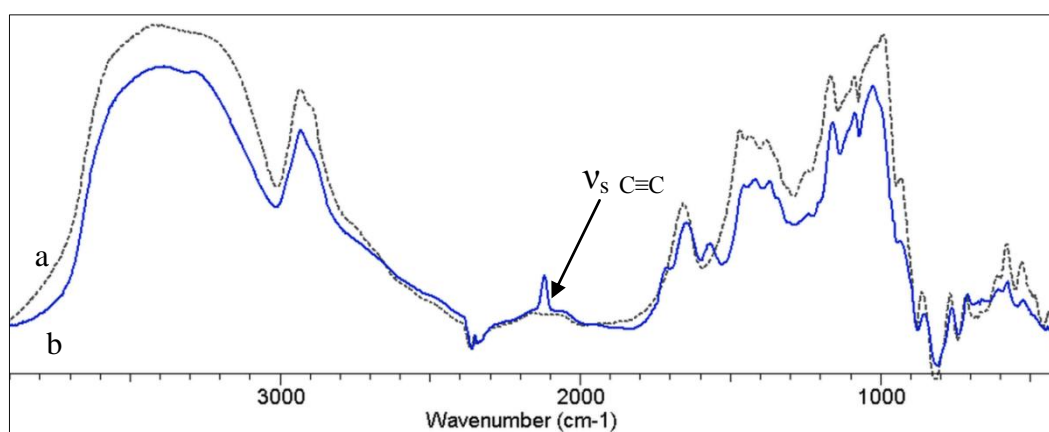


Figura 4. Comparație spectre FT-IR a) amidon nemodificat și b) amidon funcționalizat.

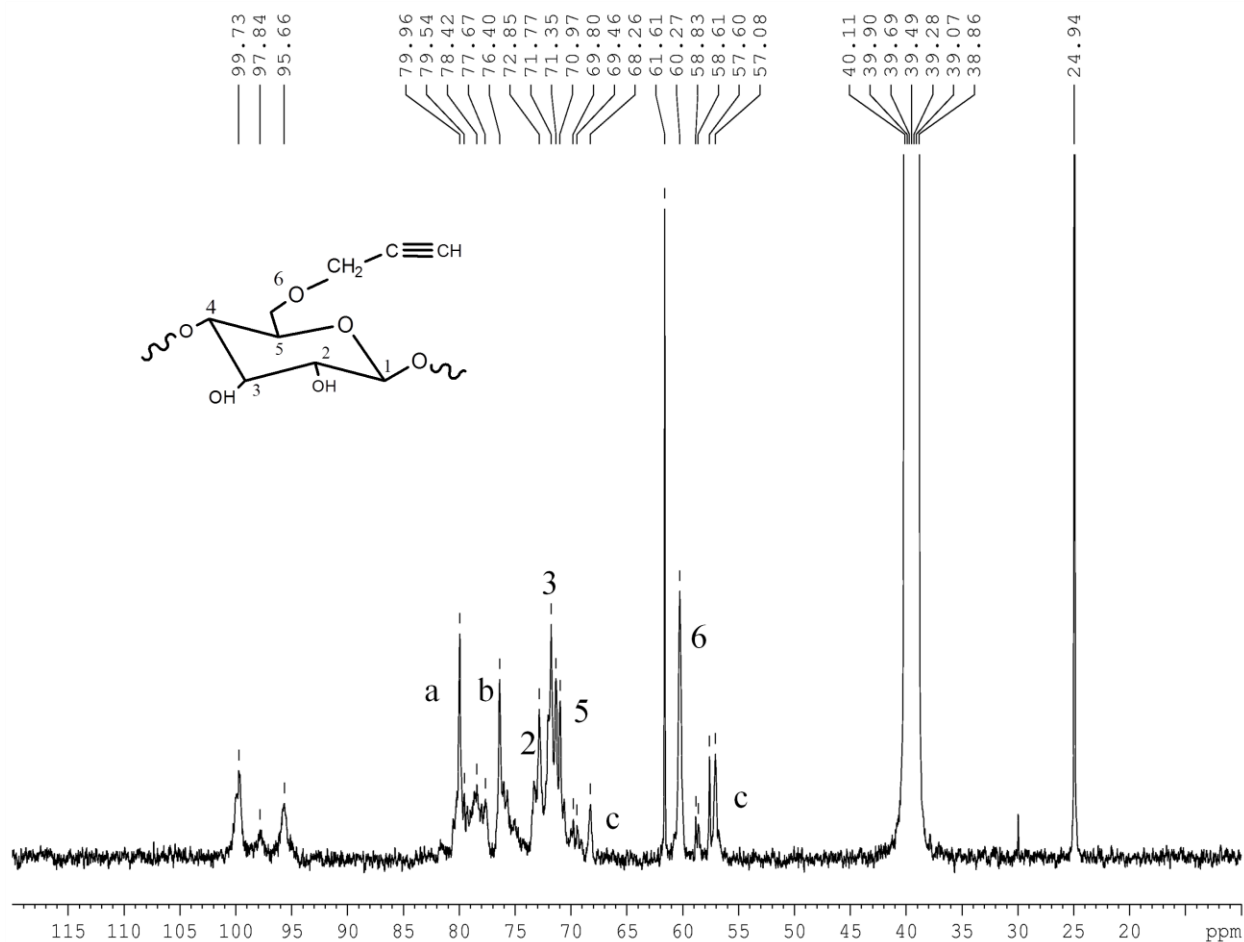
III.2.2.1.2. Rezonanța magnetică nucleară ( $^{13}\text{C}$ -RMN HR-MAS)


Figura 5. Spectru RMN HR-MAS  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 90°C,  $\delta$ , ppm) al amidonului funcționalizat cu triple legături.

Tabel 5. Valori deplasări chimice ale carbonului pentru amidon nemodificat și amidon funcționalizat.

	Deplasare chimică	
	Amidon	Amidon propargilat
C2	73.78	73.78
C3	72.70	72.70
C4	79.51	-
C5	72.28	72.28
a	-	80.9 (carbon cuaternar)*
b	-	77.33 (carbon cuaternar)*
c	-	58-59.79 (CH <sub>2</sub> nou apăruti)

\* a se vedea explicațiile din capitolul IV.1.1.1.2, caracterizare RMN.



### III.3. Sinteza poli( $\epsilon$ -caprolactonei) cu grupare azidică

#### III.3.1. Principiul reacției

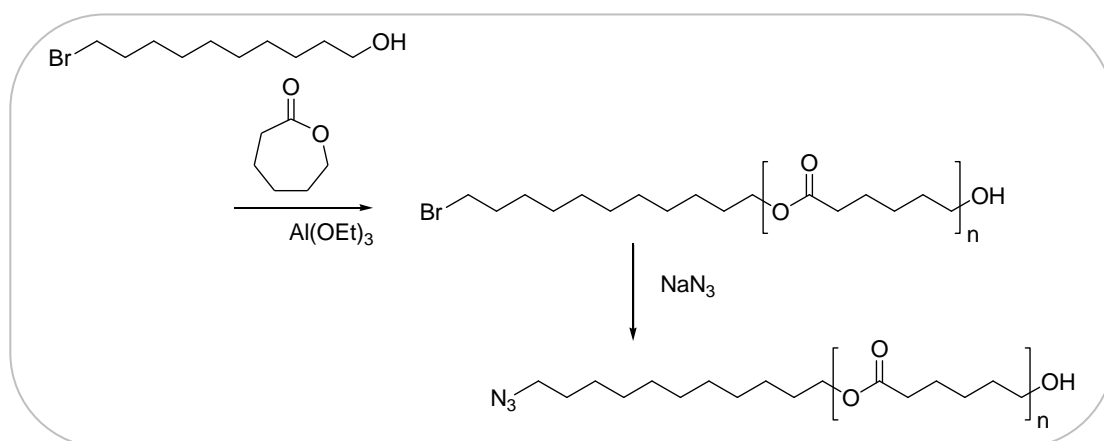
Sinteza decurge în două etape: în prima se obține PCL-funcționalizat pe capăt cu Br, iar în cea de a doua se introduce funcția azidă, terminală.

#### Obținerea poli( $\epsilon$ -caprolactonei) funcționalizată terminal cu Br

Polimerizările au fost realizate folosind tehnicile standard Schlenk sub atmosferă inertă de argon.  $\epsilon$ -caprolactona, soluția de bromo-11-undecanol în toluen au fost pastrate pe site moleculare ( $3\text{\AA}$ ) în tuburi Schlenk uscate în prealabil în etuvă <sup>156</sup>.

Reacțiile au fost realizate într-un balon de 250 mL, prevazut cu 3 gaturi. Pentru un grad de polimerizare DP=4, într-o primă etapă s-a adăugat o cantitate de toluen în balon, apoi s-a transvazat, tot sub argon, o cantitate determinată de soluție de bromo-11-undecanol în toluen (38 mL, 0.52 M, 0.020 mol) și o cantitate de  $\text{AlEt}_3$  (1 mL dintr-o soluție 1,1 mol/L). S-a încălzit baia de apă la  $50^\circ\text{C}$  și apoi s-a adăugat  $\epsilon$ -caprolactona (4.5 g, 38.6 mmol). După conversia completă a monomerului, care a durat aprox. 5 ore, polimerul a fost precipitat în heptan rece, menținut în prealabil la frigider peste noapte. Agitarea joacă un rol important în eliminarea toluenului din poli( $\epsilon$ -caprolactonă), de aceea se recomandă să fie cât mai puternică. Precipitatul s-a separat prin filtrare, apoi a fost uscat la temperatura camerei, sub nișă.

#### Azidarea poli( $\epsilon$ -caprolactonei) bromurată terminal



Schema 4. Mecanismul reacției de polimerizare a  $\epsilon$ -caprolactonei și a substituirii bromului terminal cu  $\text{NaN}_3$ .

PCL-Br (10 g, 39.8 mmol) și  $\text{NaN}_3$  (7.76 g, 119 mmol) s-au solubilizat în 200 mL de DMF. S-a agitat amestecul de reacție în absența luminii, timp de 15 ore, la temperatură ambiantă.

După filtrarea sărurilor reziduale și spălarea cu apă distilată produsul a fost extras cu diclormetan.

Faza organică s-a uscat cu  $MgSO_4$  anhidru, apoi a fost filtrată și evaporată sub vid. După evaporarea solvenților s-au obținut, în funcție de gradul de polimerizare, produși (7.89 g) sub formă vâscoasă (pentru un  $DP=4$ ) și pudre albe (pentru  $DP >4$ ).

### III. 3.2. Analiza rezultatelor obținute

#### III.3.2.1. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)

Achiziția spectrului pentru policaprolactona funcționalizată (Figura 6), a ilustrat prezența benzii de absorbție  $\nu_s=2100\text{ cm}^{-1}$ , caracteristică grupării azidice.

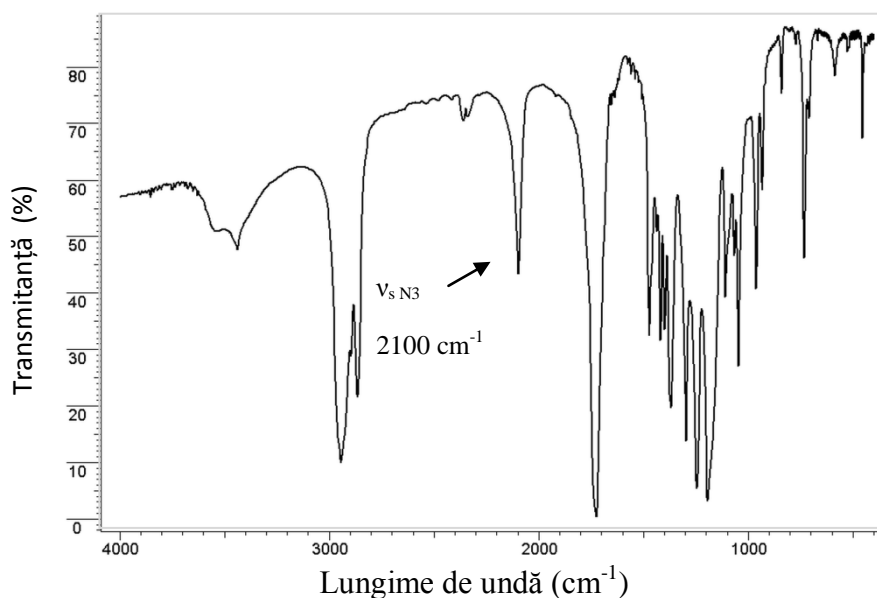


Figura 6. Spectrul FT-IR PCL- $N_3$  DP=13.

#### III.3.2.2. Rezonanța magnetică nucleară

Spectrul s-a înregistrat pe un spectrometru Bruker Avance 250 MHz. Ca solvent s-a folosit cloroform deuterat iar deplasările chimice (Figura 7) au fost exprimate în ppm, ținând cont și de referința reprezentată aici de tetrametilsilan (TMS) <sup>157</sup>.

Prin spectroscopia  $^1H$  NMR, s-a determinat gradul de polimerizare <sup>158</sup> din intensitățile relative ale pic-urilor ce aparțin lanțului polimeric,  $H_\alpha$  sau  $H_e + H_{e'}$  și a celor aparținând grupului terminal metilenic  $H_e$ .

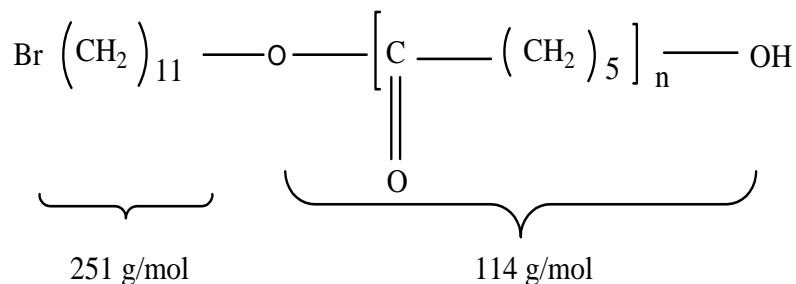
Ținând cont de faptul că  $I_\alpha$ ,  $I_e$  reprezintă valorile integralei pic-urilor de rezonanță, valoarea medie a gradului de polimerizare poate fi determinată folosind ecuațiile de mai jos:



semnalelor pertinente ( $\alpha$  și  $\epsilon'$  de exemplu). Funcționalizarea azidică a PCL a fost evidențiată prin  $^1\text{H}$  RMN prin apariția semnalului caracteristic al azidei terminale la valoarea 3.24 ppm (Figura 1).

Polimerul PCL-Br de diferite grade de polimerizare (4, 13, respectiv 20) a fost sintetizat prin polimerizarea anionică a  $\epsilon$ -caprolactonei, în prezența 11-bromo-undecanol ca agent de transfer și a trietilaluminului ( $\text{AlEt}_3$ ) pentru sinteza alcoolatului care va fi catalizatorul polimerizării.

Pentru a stabili cantitatea de  $\epsilon$ -caprolactonă necesară obținerii poli( $\epsilon$ -caprolactonei) cu un grad de polimerizare de 10, calculul s-a efectuat conform exemplului de mai jos.



Presupunem  $n=10$ . Atunci  $M_t = 1391$

Pentru a obține 10 g de produs :  $\frac{10}{1391} = 7.19 \times 10^{-3}$  mol

$7.19 \times 10^{-3}$  mol  $\times$  251 = 1.80 g Bromo-undecanol

Scăzând din masa totală a tubului Schlenk cele 5 g de bromo-undecanol utilizate, se obține cantitatea de toluen folosită, 33.71 g.

Astfel, cunoscând  $\rho_{\text{tol}}=0.9 \text{ g/cm}^3$  am determinat volumul  $V_{\text{tol}} = \frac{m}{\rho} = 37.45 \text{ mL}$  soluție de bromo-

undecanol în toluen și ulterior concentrația,  $c = \frac{m}{V} = \frac{0.02}{37.45} = 0.5 \times 10^{-4} \text{ mol/mL}$

Dacă pentru

$$\left. \begin{array}{l} 5 \text{ g de bromo-undecanol} \dots\dots\dots 37.45 \text{ mL} \\ 1.80 \text{ g bromo-undecanol} \dots\dots\dots x \text{ mL} \end{array} \right\} x = 13.48 \text{ mL soluție de BU}$$

În următorul pas se determină câți mL de  $\text{AlEt}_3$  se vor adăuga în balonul de reacție.

Astfel, știind că voi utiliza 10% de  $\text{AlEt}_3$  :  $\frac{10}{100} \times 7.19 \times 10^{-3} = 7.19 \times 10^{-4}$  moli de  $\text{AlEt}_3$  și

concentrația de  $\text{AlEt}_3$  este de 1.1 mol/L ceea ce înseamnă  $1.1 \times 10^{-3} \text{ mol/mL}$

$$\frac{1 \text{ mL}}{1.1 \times 10^{-3} \text{ moli/mL}} \times 7.19 \times 10^{-4} \text{ moli} = 0.65 \text{ mL AlEt}_3$$

Pentru un grad de polimerizare  $\text{DP}=10$  se obțin 0.053 moli CL ( caprolactonă)  $\times$  114g/mol = 6.09 g. Știind că  $\rho_{\text{CL}}=1.030 \text{ g/cm}^3$  se obține volumul de caprolactonă ce va fi adăugat în mediul de reacție  $V= 5.9 \text{ mL CL}$ .

### III.4. Concluzii

- S-a realizat esterificarea amidonului cu clorura de palmitoil. Mecanismul acestei reacții constă într-un prim pas în atacul nucleofilic al electronului liber al azotului din piridină asupra carbonului carbonil din clorura de palmitoil.
- În plus față de efectul catalitic, piridina, o bază organică minimizează deteriorarea amidonului în timpul esterificării deoarece neutralizează acidul clorhidric format ca produs secundar.
- Produsul obținut în urma reacției a fost precipitat cu un amestec de 50% apă și etanol. Apa prezentă în etanol captează clorhidratul de piridină format și acizii grași liberi se dizolvă în etanol, produsul fiind insolubil în amandouă.
- Prezența radicalilor de palmitoil a fost confirmată de apariția grupărilor carbonil ale esterilor (C = O) la  $1742\text{ cm}^{-1}$ . Cele două pic-uri de intensități puternice ce corespund valorilor  $2922$  și  $2851\text{ cm}^{-1}$  sunt atribuite grupărilor metil și metilen asociate substituenților palmitoici. Vibrațiile puternice ce apar la  $3481\text{ cm}^{-1}$ , caracteristice grupărilor hidroxil ale amidonului nativ, sunt diminuate în intensitate după acilare, deoarece numărul lor scade.
- Intensitatea benzii OH de la  $3600$  la  $3400\text{ cm}^{-1}$  depinde de DS-ul esterilor.
- Spectroscopia RMN  $^1\text{H}$  și  $^{13}\text{C}$  este o metodă preferată în determinarea DS-ului, dar cu precădere în domeniul polizaharidelor neramificate și foarte substituite, și în special pentru esteri.
- Gradul de substituție a fost calculat cu ajutorul analizei XPS după cum a fost descris anterior, ca fiind raportul dintre suprafața pic-ului (-O-C-O) ce corespunde esterului și aria pic-ului -O-C-O din unitatea glucozidică.
- S-a obținut un grad ridicat de substituție pentru concentrații mari ale clorurii acide și pentru timpi de reacție lungi.
- S-a observat că un parametru important în maximizarea gradului de substituție este reprezentat de cantitatea de clorură de palmitoil folosită, pe când timpul este de o importanță minoră, iar temperatura nu are nici o influență în intervalul studiat.
- Imaginile SEM au arătat schimbări semnificative în ceea ce privește morfologia amidonului după reacția sa cu clorura de palmitoil, trecând de la o structură granulară la una poroasă.
- S-a realizat modificarea chimică a amidonului solubil prin introducerea grupării alchine.
- Amidonul a fost funcționalizat printr-o substituție nucleofilică a bromurii de propargil cu alcoxizii de sodiu.
- Reacția are loc între grupările hidroxil ale amidonului și bromul din bromura de propargil, ducând la formarea eterului propargilic.
- Prezența hidroxidului permite activarea funcțiilor hidroxil, iar isopropanolul facilitează solubilizarea bromurii de propargil.

- Sinteza azido poli ( $\epsilon$ -caprolactonei) decurge în două etape: în prima se obține PCL funcționalizată pe capăt cu Br, iar în cea de a doua se introduce funcția azidă, terminală.
- Prin spectroscopia  $^1\text{H}$  NMR, s-a determinat gradul de polimerizare din intensitățile relative ale pic-urilor ce aparțin lanțului polimeric,  $\text{H}_\alpha$  sau  $\text{H}_\epsilon + \text{H}_\epsilon'$  și a celor aparținând grupului terminal metilenic  $\text{H}_\epsilon'$ .
- Alcoxizii de aluminiu sunt inițiatori eficienți, ceea ce a permis producerea în prezența alcoolilor ca agenți de transfer, a unor oligocaprolactone foarte bine funcționalizate, cu o masă medie moleculară controlată.
- Polimerul PCL-Br de diferite grade de polimerizare (4, 13, respectiv 20) a fost sintetizat prin polimerizarea anionică a  $\epsilon$ -caprolactonei, în prezența 11-bromo-undecanol ca agent de transfer și a trietilaluminului ( $\text{AlEt}_3$ ) pentru sinteza alcoolatului care a fost catalizatorul polimerizării.

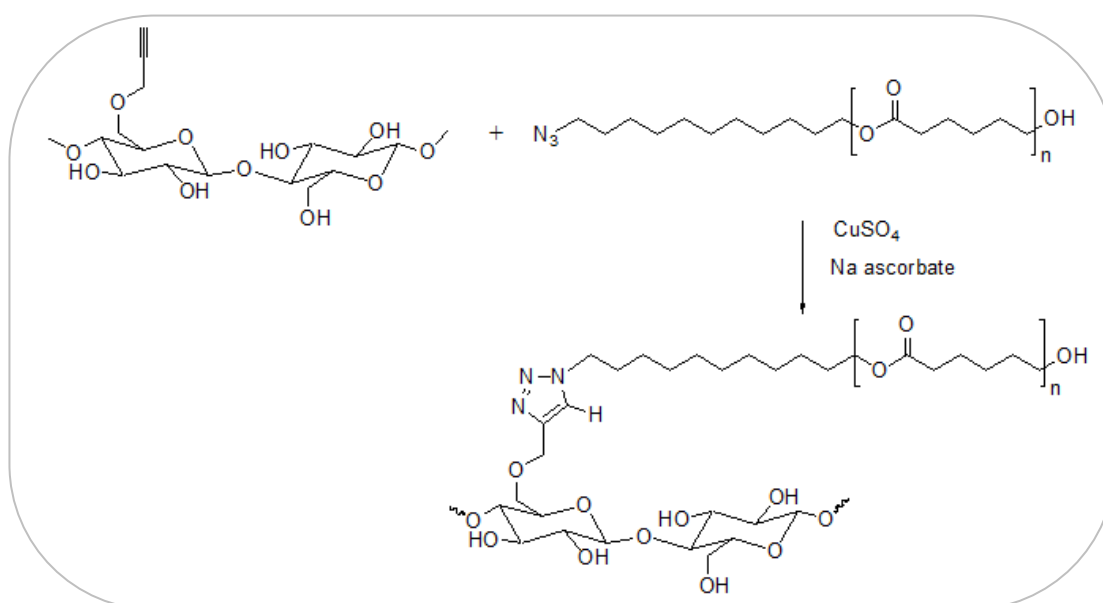
## CAPITOLUL IV.

### GRAFAREA POLI ( $\epsilon$ -CAPROLACTONEI) PE LANȚURILE DE AMIDON

#### IV.1. Grefarea poli ( $\epsilon$ -caprolactonei) pe lanțurile de amidon prin intermediul reacției « click chemistry »

##### IV.1.1. Prin metoda clasică

##### IV.1.1.1. Principiul reacției



Schema 1. Schema reacției „click chemistry” dintre amidonul funcționalizat cu grupare de tip alchină și PCL purtătoare de grupări azidice.

Reacția tipică de grefare a PCL pe lanțul de amidon prin “click chemistry” este descrisă în cele ce urmează: amidonul propargilat (0.6 mmol) și azido-PCL (0.6 mmol) se dizolvă într-un amestec 1:1 de apă și DMF (10 ml), peste care se adaugă soluții proaspăt preparate de ascorbat de sodiu (0.12 mmol, 120  $\mu$ L, 1M) în apă și o soluție 75% de sulfat de cupru II hidratat cu 5 molecule de apă (8  $\mu$ L, 0.024 mmol). Amestecul a fost agitat în absența luminii, timp de 24 de ore, sub atmosferă inertă, la 60° C. Produsul final a fost precipitat în apă și dializat într-o soluție apoasă de 0.1 M EDTA timp de 5 zile folosind o membrană celulozică de dializă (Orange Scientific, MWCO: 3500 Da) pentru a îndepărta catalizatorul. Apa a fost înlocuită de două ori pe zi. Produsul a fost liofilizat și, în funcție de DP-ul lanțului de PCL, s-au obținut compuși cerați (DP=4) sau pudre albe (DP>4), cu un grad de substituție, DS=0.25.

#### IV.1.1.2. Analiza structurală

##### IV.2.1.1. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR

Cicloadiția dintre azido-PCL și amidonul propargilat a fost realizată într-un amestec de apă și DMF. Succesul acestei cuplări a fost confirmat pentru început de FTIR. Inițial, alchina și azida prezentau pic-uri caracteristice la  $2117\text{ cm}^{-1}$  (Fig.1.a), respectiv la  $2100\text{ cm}^{-1}$  (Fig.1.b). După formarea triazolului, aceste pic-uri au dispărut, după cum se poate observa în spectrul copolimerului final (Fig.1.c).

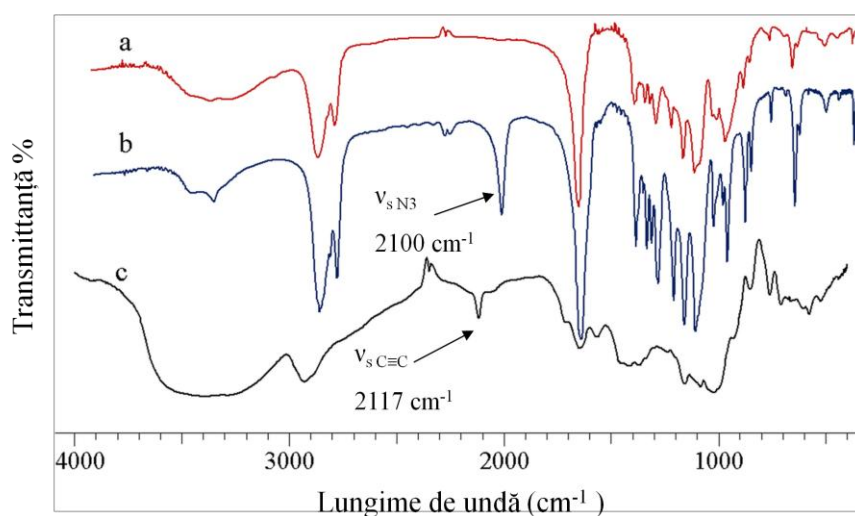


Figura 1. Spectrul FT-IR pentru a) copolimerul grefat, b) azido-policaprolactonă și c) amidon propargilat.

Alchinele interne, cu ai lor carboni sp atașati la alți carboni, vor prezenta benzi slabe pentru legătura triplă, în regiunea  $2100\text{-}2260\text{ cm}^{-1}$ . Totuși, această întindere este relativ redusă, nefiind câte-odată deloc prezentă în cazul în care alchina internă este simetrică. În aceste cazuri, spectrul IR își pierde valoarea de instrument util<sup>161</sup>. Alchinele terminale, pentru care carbonul sp este atașat la un hidrogen, vor prezenta benzi în spectrul IR atât pentru hidrogenul lor, cât și pentru legătura triplă. Întinderea C-H de pe alchina terminală tinde să se prezinte ca o bandă puternică și îngustă, în regiunea  $3260\text{-}3330\text{ cm}^{-1}$ , în timp ce legătura triplă prezintă un pic slab la  $2100\text{-}2260\text{ cm}^{-1}$ . Vor apărea curbe C-H adiționale între  $610\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ .

##### IV.2.1.2. Caracterizarea prin spectroscopie $^1\text{H}$ -RMN

Solubilizarea amidonului funcționalizat cu triple legături, s-a dovedit inefficientă atât în  $\text{D}_2\text{O}$  cât și în DMSO și semnalele protonului residual al apei s-au dovedit un factor perturbator pentru integrarea precisă a pic-urilor dorite și astfel pentru calcularea DS-ului.



Astfel, analizele  $^1\text{H}$  RMN și FT-IR arătând că cicloaditia este cantitativă, am determinat  $\text{DS}_{\text{alchina}}$  din spectrul copolimerului obținut în urma reacției “click”, presupunând că DS-ul este același înainte și după cuplarea “click”. Această procedură a fost aplicată cu succes și pentru caracterizarea guarului funcționalizat cu PEG [15]. Pic-ul pentru protonul  $-\text{CH}_2\text{N}_3$  de la 3.24 ppm a dispărut complet și un nou pic triazolic a apărut în intervalul 7.8 - 8.1 ppm (Figura 2).

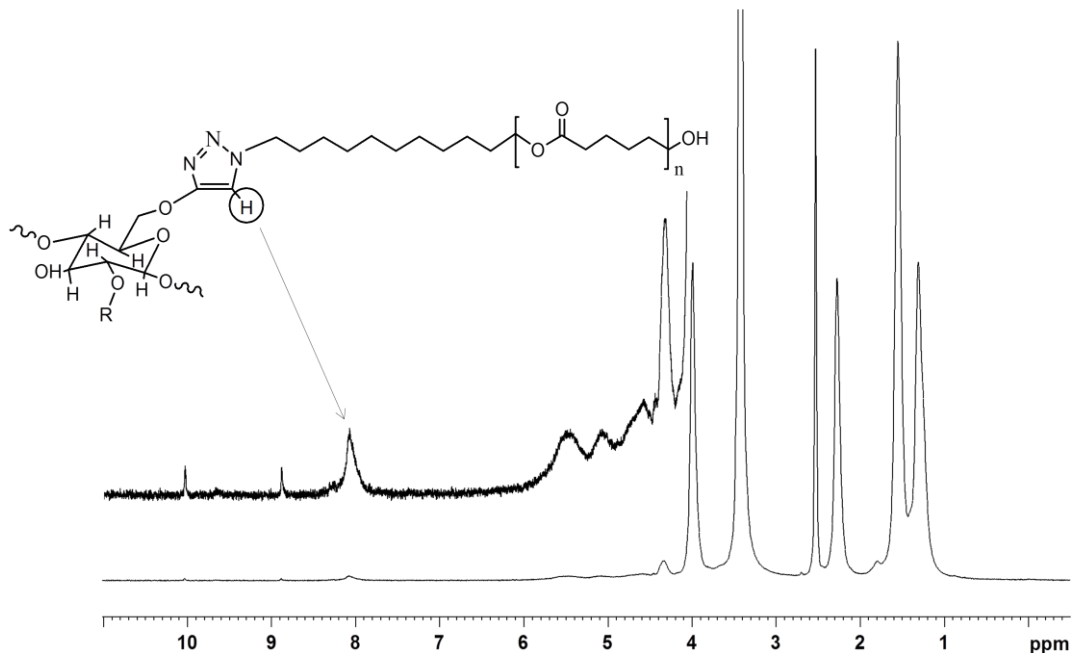


Figura 2. Spectrul  $^1\text{H}$  NMR al CC20.

RMN  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ , ppm): 1.31 (m,  $\gamma$ -PCL), 1.54 (m,  $\beta$  and  $\delta$ -PCL), 2.25 (t,  $\alpha$ -PCL), 3.37 (t,  $\epsilon'$ -PCL), 3.98 (t,  $\epsilon$ -PCL), 3.5–5.4 (m, pic-uri largi, amidon), 8.09 (s, C=CHN, inel triazolic).

Este important să menționăm că acest DS este legat de funcțiile acetilenice implicate în formarea triazolului. Am descoperit cu surprindere faptul că amidonul propargilat a suferit o cuplare oxidativă tip Glaser, care a dus la formarea de legături  $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-$ , în absența acetilurei de cupru, după cum este menționat în literatură pentru reacțiile ce implică acetilene [162,163]. Se cunoaște că oxidarea este promovată de folosirea acetilurilor de cupru, dar din punct de vedere preparativ, cele mai bune randamente ale dienelor sunt obținute prin oxidarea acetilurilor de oxigenul liber și nu de sărurile de cupru [164].

Până în prezent, în cazul amidonului propargilat, doar Tankam și colab. [165] au raportat modificări neașteptate, mai precis pierderea de reziduuri propargilice inițiate de adiția intramoleculară a OH-urilor libere la triplele legături, urmată de hidroliza acestor structuri enolice.

În cazul nostru, conform analizei  $^{13}\text{C}$  RMN, semnalele atribuite carbonului C2 și C4 din amidon au devenit foarte largi datorită substituției și două pic-uri atribuite carbonilor cuaternari (80.9 ppm și 77.3 ppm) au apărut sugerând prezenta structurilor diacetilenice.

Acest lucru este ilustrat în Figura 3 a spectrului de  $^{13}\text{C}$  și DEPT pentru amidonul acetilenic.

Este posibilă realizarea calculului pentru determinarea DS-ului direct pe amidonul acetilenic, când un spectru cantitativ RMN  $^{13}\text{C}$  este achiziționat pentru aceste probe. Semnalele folosite pentru calcul sunt în acest caz ale carbonului C1 și (C6+CH<sub>2</sub>CCH), toate grupările acetilenice fiind luate în considerare, atât cele libere cât și cele cuplate. În mod contrar, DS-ul calculat din spectru RMN  $^1\text{H}$  al polimerului click a inclus doar funcțiile acetilenice libere. Ca un exemplu, valoarea DS-ului probei CC20 a fost 0.25 conform spectrului  $^1\text{H}$  și 0.43 din carbonul cantitativ corespunzător unui procentaj de cuplare acetilenică în timpul sintezei.

Se poate observa de asemenea că semnalul carbonului la 80 și 77 ppm este prezent atât înainte cât și după reacția „click” dar în rapoarte diferite. Semnalul de la 77 ppm păstrează aproape aceeași integrare, în timp ce intensitatea semnalului de la 80 ppm descrește datorită formării grupării triazolice.

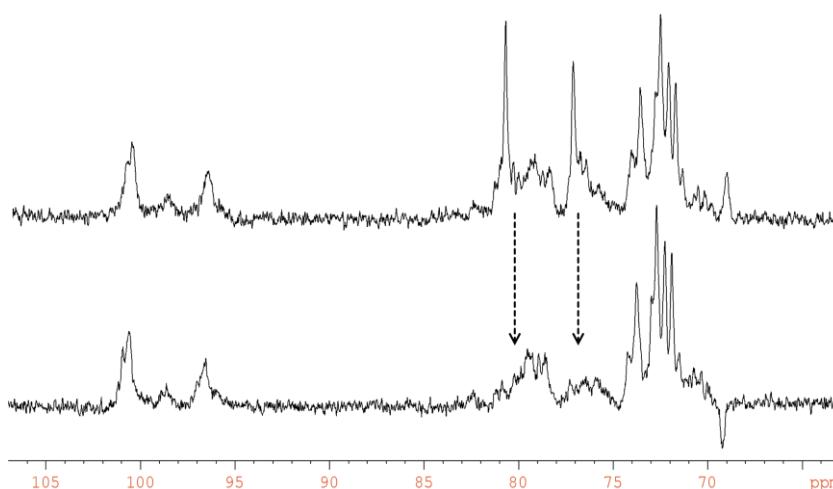


Figura 3. Spectrul DEPT și  $^1\text{H}$  NMR pentru CC13.

#### IV.2.1.3. Analiza suprafeței prin XPS

Analiza XPS a fost folosită pentru investigarea din punct de vedere chimic a schimbărilor rezultate în urma modificării suprafeței amidonului nativ și modificat. S-a efectuat deconvoluția pic-ului C1s din spectrul XPS pentru fiecare probă, după cum este ilustrat în Figura 4.

Energiile de legare diferite și procentajele atomice relative sunt date în Tabelul 1. Deși XPS-ul nu este o analiză foarte sensibilă, semnalul 1s al azotului de la 400 eV corespunzător grupării triazolice a fost detectat. Pic-urile largi găsite în regiunea corespunzătoare N1s la valoarea de 398 eV and 400 eV au fost atribuite grupărilor N–N, respective N= N <sup>166</sup>, ca rezultat al formării ciclului triazolic <sup>167</sup>.

În urma comparării pic-urilor C1s atât pentru amidonul nativ cât și pentru cel modificat, se observă o creștere în ceea ce privește pic-ul carbonului C1 de la 26.7% la 41.6% datorită prezenței lanțurilor de propargil, precum și o descreștere în intensitate pentru pic-ul C2 odată cu esterificarea suprafeței. Deplasările chimice relative la pic-ul C1 au fost de 1.6 eV pentru C2 și 3.5 eV pentru C3.

După modificarea cu PCL- $N_3$ , pic-ul corespunzător atomilor de carbon devine mai mare decât cel pentru atomii de oxigen (Figura 4) și raportul O/C este egal cu 0.31 (Tabel 1), indicând clar că atomii de carbon au fost grefați și prin urmare modificările chimice au avut loc. O astfel de diminuare a raportului O/C se datorează lanțului lung de PCL.

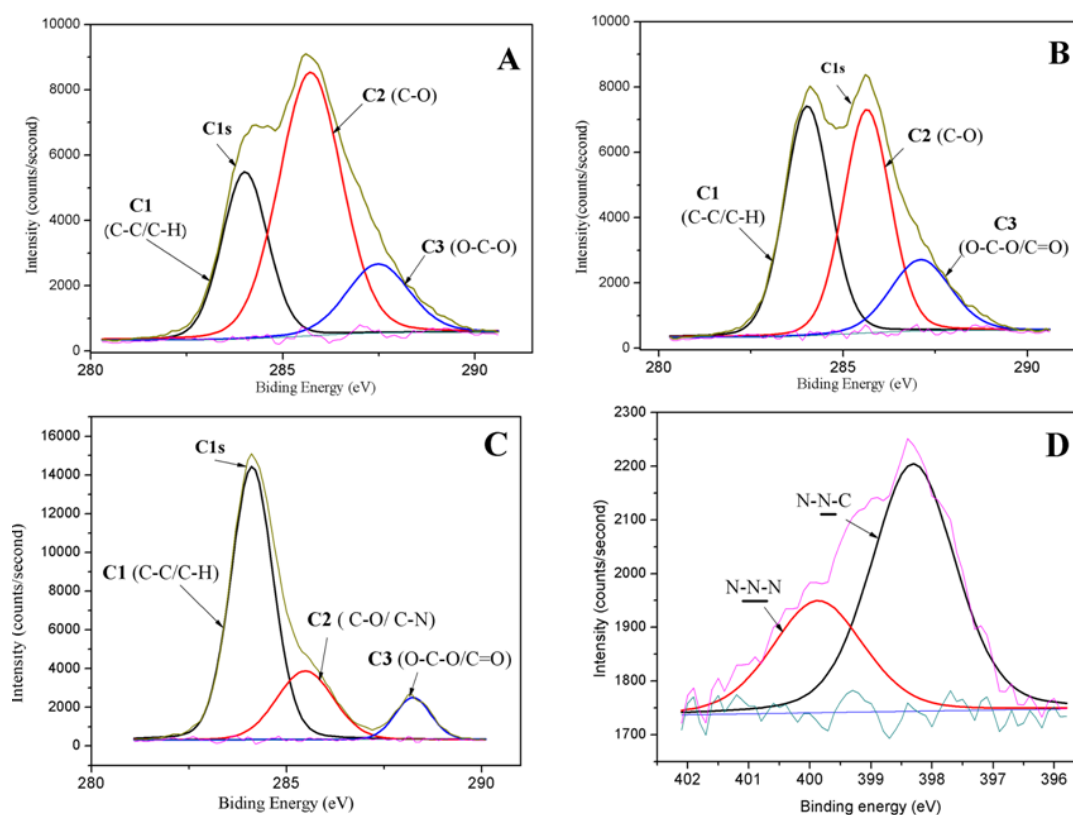


Figura 4 . Deconvoalția pic-ului C1s pentru a) amidonul nemodificat, b) amidonul propargilat, c) CC4 și d) deconvoalția N1s pentru CC4.

Tabelul 1 . Compoziția suprafeței chimice a amidonului, înainte și după modificări, ca rezultat al deconvoalției semnalului C1s.

	C1 (C-C/C-H)	C2 (C-O)	C3 (O-C-O/C=O)
Energia (eV)	284	285.6	287.5
Amidon	26.78	57.74	15.49
Amidon propargilat	41.59	41.39	17.02
CC4	68.7	22.5	8.73

Raportul teoretic O/C pentru amidon este 0.83 (obținut din formula amidonului:  $(C_6H_{10}O_5)_n$ ). Conform Tabelului 2 și Figurii 5, suprafața amidonului nemodificat este compusă și din alte componente, azotul fiind menționat în literatură ca provenind din proteinele ce sunt încă prezente în polimerii naturali<sup>168, 169</sup>.

Tabelul 2. Analiza elementală a amidonului, înainte și după modificare.

Proba	C (%)	O (%)	N(%)	O/C
Amidon	60.2	39.5	0.3	0.65
Amidon propargilat	65.9	30.3	-	0.45
CC4	74.2	23.4	2.4	0.31

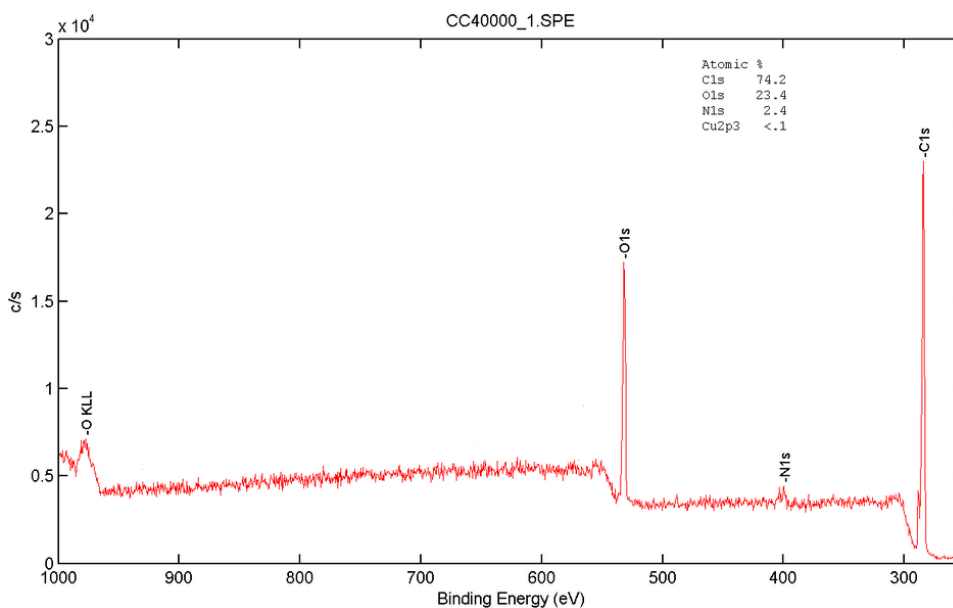


Figura 5. Spectrul larg XPS pentru CC4.

#### IV.2.1.4. Analiza suprafeței prin Tof-Sims

Analizele Tof-Sims au dezvăluit că, exceptând fragmentele  $C_xH_y^+$  și  $C_xH_yO_z^+$  caracteristice amidonului, au fost detectate și pic-uri proeminente de fragmente derivate din scheletul liniar al PCL (figura 6). Toate concluziile au fost în concordanță cu rezultatele găsite prin investigările XPS.

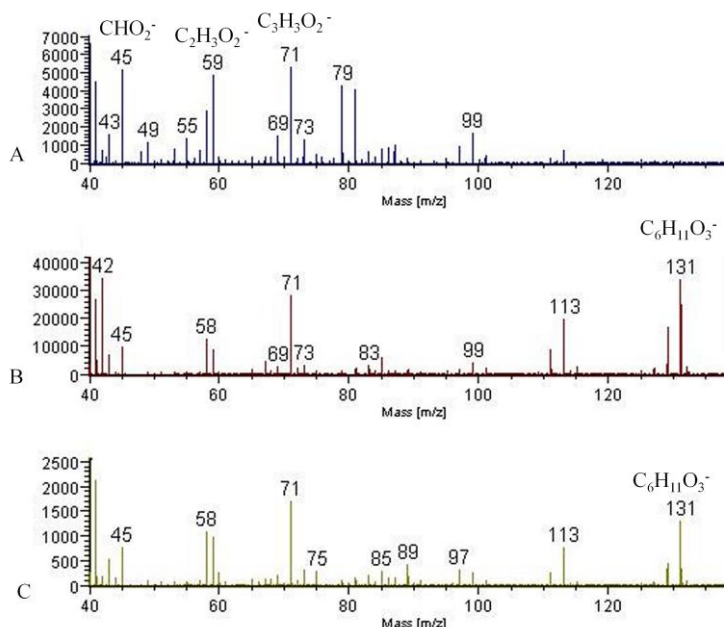


Figura 6. Modul negativ al spectrului TOF-SIMS pentru A- amidonul propargilat, B - PCLN<sub>3</sub>,  
C- CC4.

S-au observat pe probele analizate ioni ce conțin cupru (Figura 7), investigație ce a permis determinarea timpului necesar purificării polimerilor. Aceasta determinare este imperioasa pentru produsele sintetizate deoarece se dorește utilizarea lor în aplicații biomedicale.

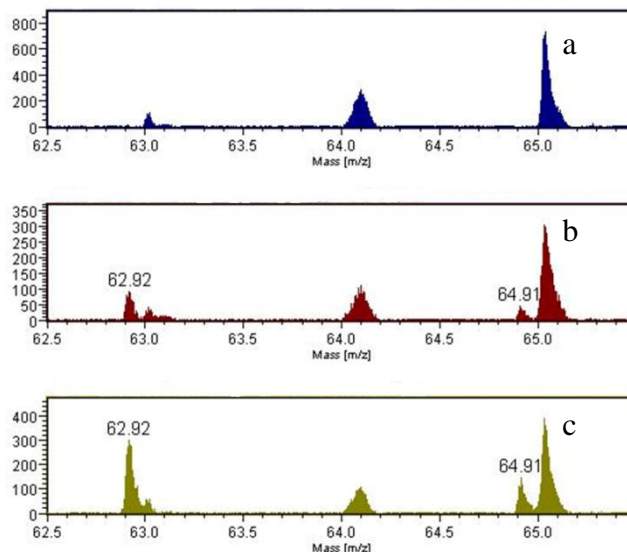


Figura 7. Spectrul pozitiv ToF-Sims al probelor cu conținut variat de cupru, purificate a) 5 zile, b) 3 zile, c) 2 zile.

Datele ToF-Sims au fost prelucrate de asemenea și în vederea unui tratament cantitativ, prin normalizarea intensității pic-ului de la valoarea 115, caracteristică pentru PCL în modul pozitiv ( $[M+H]^+$ ) și pentru 131, caracteristic pentru PCL în modul negativ ( $C_6H_{11}O_3^-$ ).

Tabelul 3. Cuantificarea ToF-Sims a intensităților pic-urilor caracterice PCL.

Proba	Intensitatea pentru 115	Intensitatea pentru 131	Cuantificare
PCLN <sub>3</sub>	82.6 ± 20.3	32.4 ± 5.0	1.1 ± 0.3
Amidon propargilat	7.4 ± 3.9	0.2 ± 0.1	0.6 ± 0.0
CC4	46.9 ± 2.3	6.7 ± 2.2	1.0 ± 0.1

#### IV.1.1.3. Analiza termică (DSC, ATG)

Un profil de degradare termică în 3 etape este vizibil pentru azido-policaprolactonă, în loc de două, pentru PCL grefată pe scheletul amidonului. Figura 14 arată în mod clar o rezistență termică scăzută a amidonului și a PCL-N<sub>3</sub> în comparație cu probele grefate. Aceste două curbe arată de asemenea o pierdere de masă destul de mare (aprox.10-20%) a substanțelor volatile, între temperatura camerei și 200°C. Policaprolactona grefată prezintă un început de degradare în jurul valorii de 250 ° C care este corelată cu cea a azido-PCL (curba albastră). În plus, curbele urmăresc în mod paralel degradarea convergență a amidonului și a policaprolactonei dar la o temperatură mai ridicată, ceea ce indică stabilitatea lor crescută. La 450 °C - 500 °C, sunt valori ale masei reziduale apropiate de cele ale amidonului. Profilele ATG pentru probe diferite arată că diferențele de stabilitate termică dintre copolimeri sunt puternic dependente de lungimea lanțului de PCL.

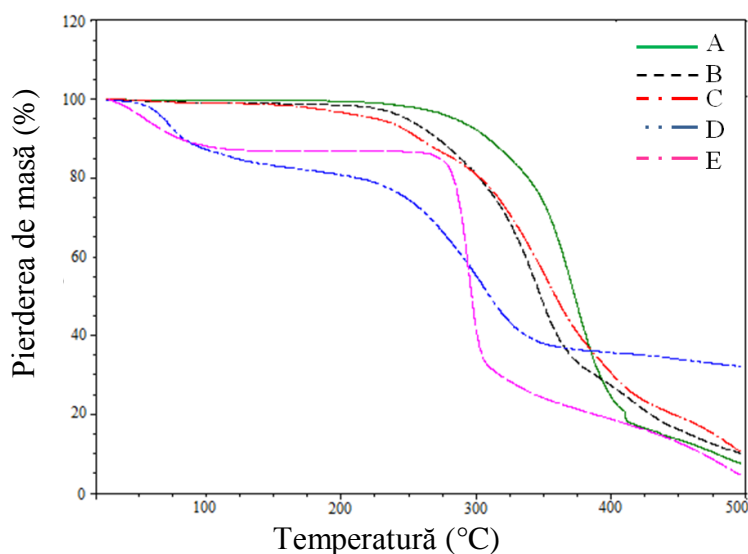


Figura 8. Analiza ATG pentru a) CC20, b) CC13, c) CC4, d) PCL-N<sub>3</sub> DP=13, e) amidon.

Fiecare probă a fost supusă unui experiment individual de topire-răcire, prin încălzire la 150°C și răcire imediată la -100°C la un debit de 5°C/min, sub o atmosferă constantă de azot la 80 ml / min. Două pasaje au fost realizate pentru a șterge istoria termică și pentru a observa efectele termodinamice (Figura 8).

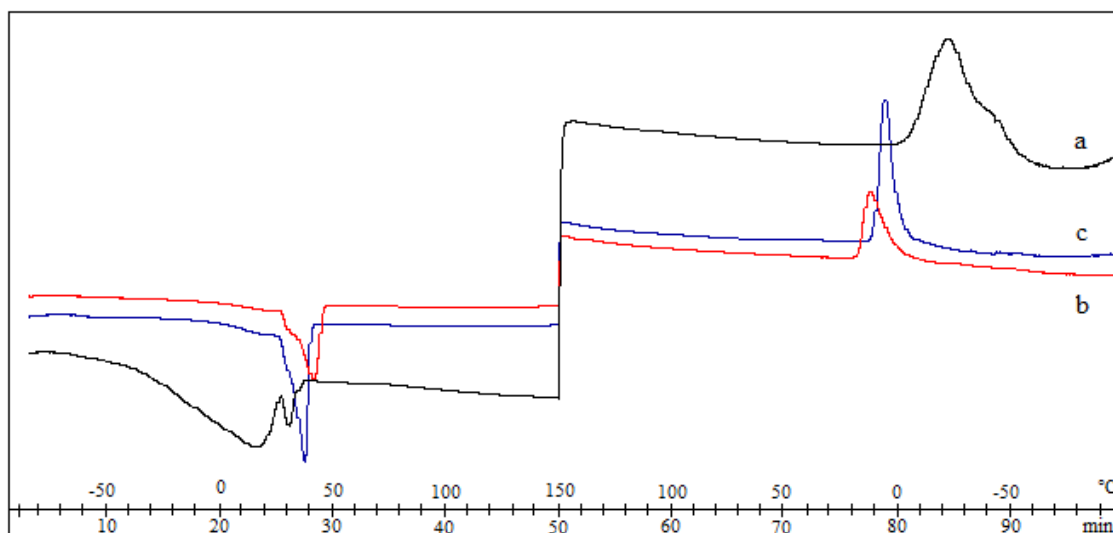


Figura 9. Curbele DSC pentru copolimerii a) CC4, b) CC13, c) CC20.

Termogramele ilustrează topirea (în timpul încălzirii) și recristalizarea (consecutivă răcirii) a lanțurilor de PCL grefate pe scheletul amidonului. După cum este de așteptat, cu cât este mai mică lungimea lanțului, cu atât sunt mai scăzute temperaturile de topire și recristalizare. Datorită masei medii moleculare reduse, polimerul cu lungimea lanțului de PCL,  $\overline{X}_n = 4$ , are aspectul de ceară, în timp ce ceilalți sunt sub formă de pudră.

PCL este un polimer semi- cristalin cu un punct de topire în jurul a  $60^\circ\text{C}$  și cu  $T_g$  de  $-60^\circ\text{C}$ <sup>170</sup>. Se poate observa că în intervalul de temperatură studiat, scheletul amidonului induce efecte perceptibile, temperatură de topire  $T_m$  corespunzătoare temperaturii de topire a fazei cristaline din PCL este detectată în jurul valorii  $35\text{-}45^\circ\text{C}$ . Toate cele trei curbe arată endoterme probabil relaționate cu topirea cristalelor de diferite mărimi din copolimerii finali. Răcirea arată exoterma de re-cristalizare. Al doilea pasaj încă arată endotermele dar cu valori mai scăzute decât cele din primul pasaj, fapt ce poate indica o fuziune a cristalelor de dimensiuni mai mici sau mai puțin «perfecte». Efectul de stabilitate termodinamică este clar vizibil pentru CC20 și CC13, datorită lanțurilor lungi de policaprolactonă, dar nu există o diferență semnificativă între cele două probe deoarece începutul fuziunii este același dar maximul endotermei este mai mare pentru CC13 decât pentru CC20.

Tabelul 4 arată comportamentul la topire și recristalizare al PCL-ului din copolimerii investigați pentru trei rate de răcire diferite.

Tabelul 4.

5°C/min

Probă	$\Delta H_t$	$\Delta H_C$	$T_m^{\circ}$ onset	$T_m^{\circ}$ max
CC4	47,9 J/g	-49,8 J/g	-35 °C	19°C
CC13	44,3 J/g	-39,6 J/g	30,6 °C	42,8°C
CC20	52,9 J/g	-49,2 J/g	29,5 °C	38,4°C

10°C/min

Probă	$\Delta H_t$	$\Delta H_C$	$T_m^{\circ}$ onset	$T_m^{\circ}$ max
CC4	20.97 J/g	18.61 J/g	19.36 °C	15.2°C
CC13	32.06 J/g	46,9 J/g	15,27 °C	8.27°C
CC20	48,87 J/g	36.08 J/g	20,13 °C	-1,8°C

20°C/min

Probă	$\Delta H_t$	$\Delta H_C$	$T_m^{\circ}$ onset	$T_m^{\circ}$ max
CC4	13.4 J/g	9.4 J/g	36.96 °C	42.57 °C
CC13	23.67 J/g	43,6 J/g	44.68 °C	54.27°C
CC20	56,6 J/g	30.34 J/g	44.03 °C	51.6°C

Valorile entalpiei sunt similare atât pentru topire cât și pentru re-cristalizare, pentru fiecare probă, dar diferă gradual pe măsură ce lungimea lanțului crește. O posibilă explicație ar fi că formarea cristalelor este mai dificilă și depinde de lungime.

Valorile crescute de energie pentru CC20 sunt corelate cu o mai bună stabilitate, fapt deja arătat prin ATG.

Această valoare a entalpiei este expresia unei cantități mari de cristale prezente în CC20 și în cazul acestei probe, această valoare este corelată cu rezultatele obținute din ATG. Faptul că temperatura este mai mică decât în cazul CC13, poate fi explicat prin cantitatea mică de cristale din probă, ce îi afectează stabilitatea.

Profilul ATG arată o mai mare stabilitate pentru PCL cu lanțuri lungi, dar stabilitatea termodinamică observată pentru fuziune nu respectă această corelație cu lungimea lanțului: maxima este pentru CC13 în loc de CC20. Se poate formula o ipoteză, cum că lungimea lanțului de PCL contribuie la stabilitatea termodinamică a produsului, de aceea cu cât este mai lung, cu atât mai rezistentă la temperatura este proba finală și, pe de altă parte, lungimea lanțului induce cristale mai stabile din punct de vedere termodinamic, adică temperatura de topire este mai ridicată.



### IV.1.1.3.1. Determinarea gradului de cristalinitate din PCL după grefare

Scăderea cristalinității a fost cel mai probabil cauzată de dificultatea crescută în aranjarea lanțului polimeric, datorită mișcării nepermissive a segmentelor polimerice din amidon.

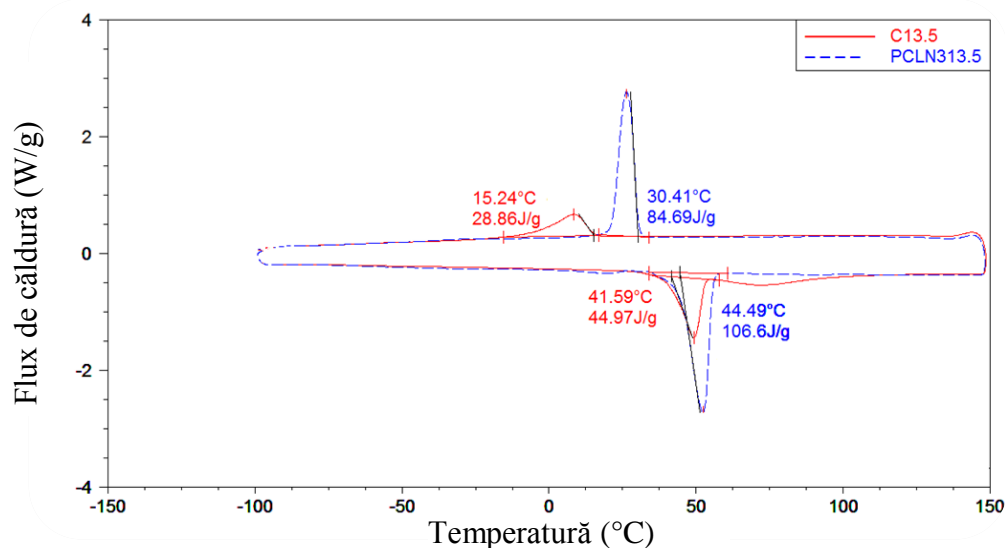


Figura 10. Pasajele DSC pentru CC13 și PCL-N3 cu DP=13

Conform calculelor din termogramele DSC (figura 9), indicele de cristalinitate scade de la 75% din PCL- N3 la 42% în copolimerul final.

Calcululele au fost efectuate ca în modelul de mai jos:

Pentru PCL pur  $\Delta H_f = 142 \text{ J/g}$

Pentru PCL-N<sub>3</sub> DP=13,  $\Delta H_f = 107 \text{ J/g}$  de unde rezultă o cristalinitate de 75%.

Pentru a realiza cuplarea „click”, s-au folosit 100 mg de amidon, adică  $6.17 \times 10^{-4}$  moli de ciclu polizaharidic.

Știind că DS=0.25, atunci avem  $1.54 \times 10^{-4}$  moli de cicluri grefate.

$M_{\text{PCL DP13}} \approx 1660 \text{ g}$

} → 0.255 g PCL-N<sub>3</sub>

Masa totală de amestec utilizată în reacție  $M_t = 0.355 \text{ g}$ , din care 0.255 g PCL-N<sub>3</sub>, adică 71%.

Pentru 1 g avem 710 mg PCL-N<sub>3</sub>.

Dacă aceasta ar fi 100% cristalină, atunci am avea  $0.71 \times 142 = 100.8 \text{ J}$

În final, conform DSC-ului valoarea  $\Delta H_f = 42 \text{ J/g}$  de unde rezultă că cristalinitatea copolimerului

grefat este  $\frac{42}{100.8} = 41.6\%$

Tabel 5. Cristalinitatea lanțurilor de PCL după grefarea pe scheletul amidonului.

Probă	Masa moleculară PCL	" Masa moleculară " a copolimerului	% N	% PCL masic *	$\Delta H_m$	% Cristalinitate
CC4	677	1325	3.17	34.41	13.4 J/g	27.4
CC13	1703	2351	1.78	63.03	23.67 J/g	26.4
CC20	2501	3149	1.33	72.40	56.6 J/g	55.0

$$\% \text{ PCL} = 114 * n / \text{masa totală} * 100$$

Pentru topirea PCL s-au luat în calcul valorile standard : $T_m = 64^\circ\text{C}$ ;  $\Delta H_m = 142 \text{ J/g}$ .

$$\% \text{ crist} = 100 * \Delta H_m / 142. \% \text{ PCL}$$

#### IV.1.1.4. Analiza morfologică

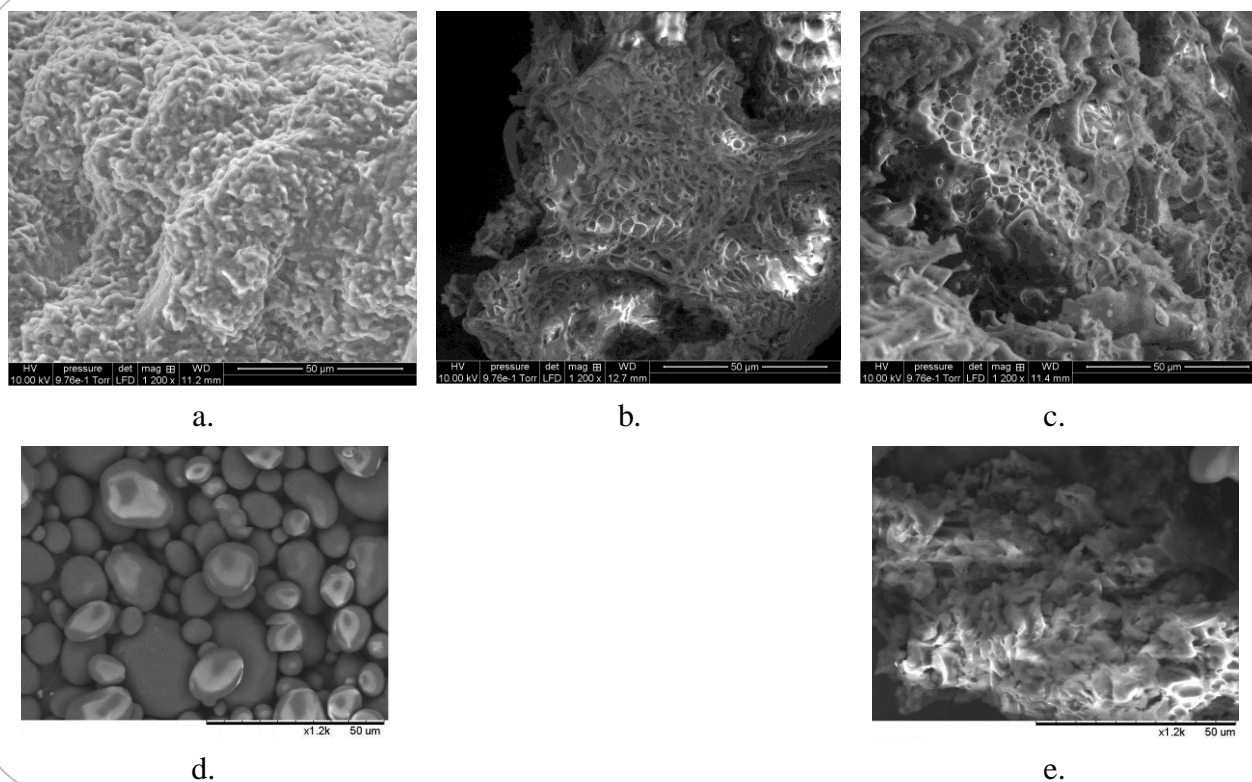


Figura 11. Imagini SEM ale morfologiei interne pentru a) CC4, b) CC13, c) CC20, d) amidon, e) amidon propargilat.

Morfologia copolimerilor a fost studiată cu ajutorul microscopiei de baleiaj. O modificare evidentă este observată în cazul probelor grefate comparativ cu amidonul de plecare. De la un aspect granular (d), până la probe cu lanțuri lungi de PCL ce prezintă o structură cu pori bine definiți.

#### IV.1.1.5. Comportamentul copolimerilor în diferiți solvenți

Comportamentul la umflare al copolimerilor grefați în diferiți solvenți a fost investigat calitativ, pe o scară de la 0 la 5, după 24 de ore de agitare, fără nici o cuantificare a gradului de umflare. După cum era de așteptat, doar CC4 a arătat afinitate pentru apă, datorită lanțului scurt hidrofobic. DMSO s-a dovedit cel mai bun solvent pentru toți copolimerii, indiferent de lungimea lanțului de PCL.

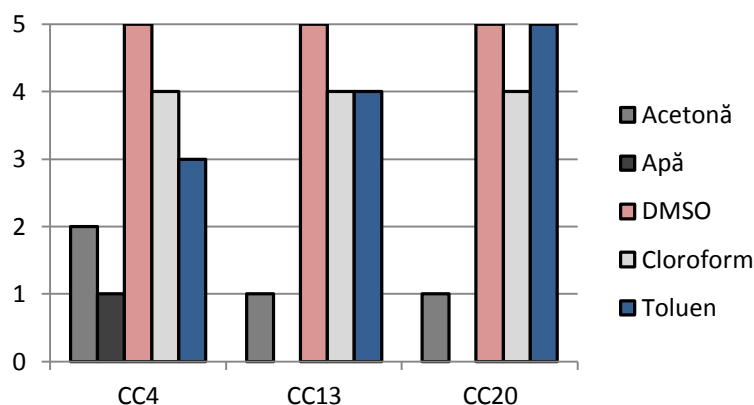


Figura 12. Comportamentul copolimerilor CC4, CC13, CC20 în diferiți solvenți.

Cloroformul, solvent nepolar, prezintă aceeași capacitate de umflare pentru toți copolimerii. În schimb, toluenul arată o creștere a gradului de umflare odată cu creșterea lanțului de PCL.

Acetona, care din punctul de vedere al polarității se situează între apă și cloroform, respectiv toluen, umflă mai puțin copolimerii, capacitatea ei de umflare scăzând cu creșterea lungimii grefelor.

#### IV.1.1.6. Investigarea proprietăților de micelizare ale copolimerilor

Datorită caracterului amfifilic al acestor copolimeri, a fost investigată abilitatea lor de a se organiza în structuri micelare.

Pentru a prepara soluții micelare din copolimerii bloc, s-a adăugat în picături apă dublu distilată (1 ml) la o soluție polimerică (5mg) de THF (20 ml) aflată sub o agitare blândă. Soluția micelară a fost obținută după evaporarea lentă a THF la rotavap, folosind pompa de vid (30 °C, 3h). Concentrația finală a fost de 0.5mg/mL atât pentru măsurătorile DLS cât și pentru TEM.

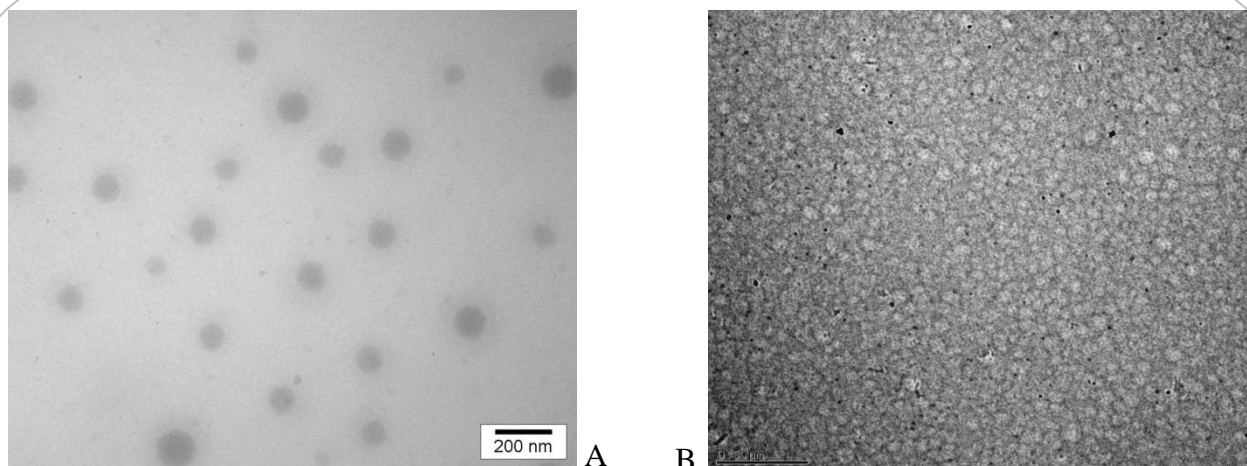


Figura 13. Imagini TEM pentru a) C20 și b) CC4

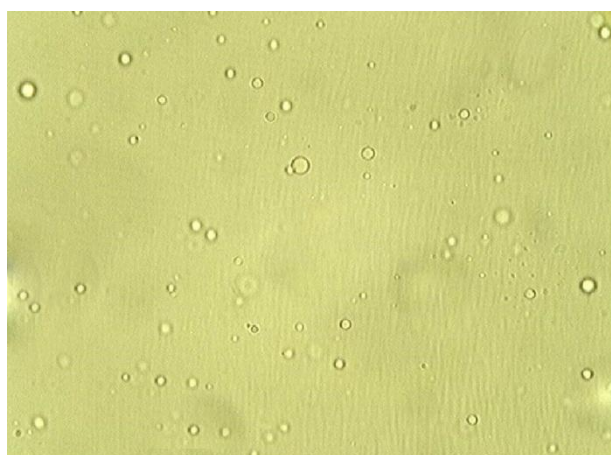


Figura 14. Imagini obținute cu microscopul optic pentru micellele C20

Morfologia micelilor formate a fost investigată prin tehnica TEM; Figura 13 arată micrografiile micelilor polimerice pentru copolimerii cu lungimea lanțului PCL 20. Se observă că forma agregatelor în apă este sferică și că dimensiunea particulelor este uniformă pe întreaga suprafață. Influența lungimii lanțului de PCL este evidentă când se face compararea celor trei copolimeri. Așadar, datorită lanțului hidrofobic scurt, CC4 și CC13 au arătat o imagine TEM diferită, cu micelle mai puțin individualizate decât CC20.

Investigații complementare au fost efectuate privind dimensiunea micelilor polimerice și distribuția lor dimensională prin măsurători de DLS, când s-a constatat un fenomen de agregare a ce a tulburat distribuția diametrelor, dând naștere la o creștere a polidispersității.

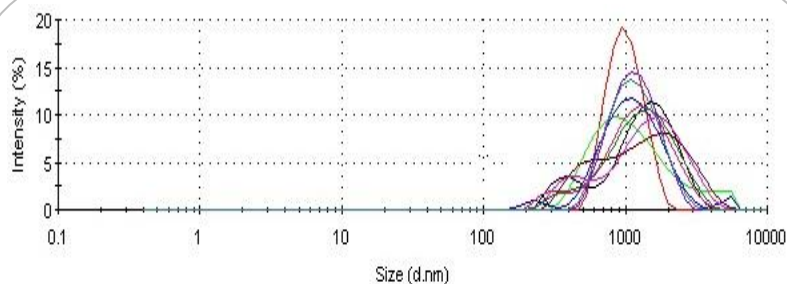


Figura 15. Distribuția dimensiunii micelor pentru CC20

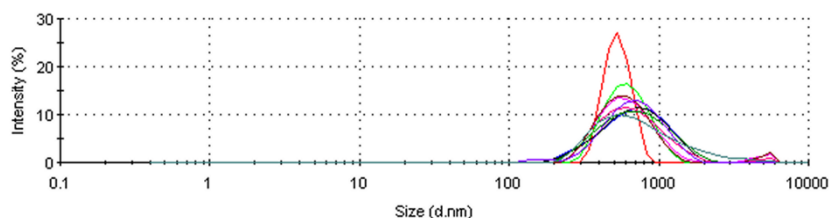


Figura 16. Distribuția dimensiunii micelor pentru CC4

S-a constatat că diametrul micelor crește (tabel 5) odată cu majorarea lungimii lanțului grefat de PCL.

Tabel 6. Diametrul micelor conform măsurătorilor DLS.

Proba	CC4	CC13	CC20
Diam. (nm)	594	772	1016
PDI	0.18	0.27	0.23

O variantă ce poate explica dimensiunea diferită a particulelor detectată de TEM și DLS constă în prepararea probei. Măsurătorile DLS au fost realizate în soluții în timp ce agregatele polimerice depuse pe gridele de carbon au implicat uscarea probelor, fapt ce a condus, în cel mai probabil caz, la micșorarea particulelor și prin urmare la diametre mai mici detectate prin TEM. De asemenea, în timpul procedurilor de pregătire, auto-asamblările polimerice pot fi aplatizate pe grilele TEM datorită forțelor de absorbție.

Compușii obținuți sunt solubili în solvenți organici și în anumite condiții ei se pot autoasambla. În contact cu soluții apoase, lanțurile moleculare tind să se reorganizeze, formând agregate de tip micelar datorită asocierilor intra sau inter-moleculare dintre componentele hidrofobice, pentru a minimiza energia liberă interfacială. Concentrația critică micelară (CMC) este concentrația minimă necesară pentru un polimer de a forma micelă prin procedeul de auto-asamblare. Concentrația critică de agregare (CAC) este definită ca o concentrație minimă necesară pentru ca polimerul să poată agrega. În mod normal, valorile CMC sunt mai mari decât CAC. Acești parametri sunt indicatori necesari pentru abilitatea de micelizare și pentru stabilitatea micelului. Micelele sunt supuse unei diluții extreme după injectarea intravenoasă în

corpul uman. Dacă sunt stabile din punct de vedere cinetic, o disociere lentă permite micelor polimerice să-și mențină integritatea și conținutul în medicament pe perioada circulației în mediul sangvin deasupra sau sub raportul CMC/CAC pentru un anumit timp.

Un raport scăzut CMC/CAC poate garanta că micellele vor reține morfologia originală până în momentul atingerii zonei țintă, fapt ce constituie un avantaj al polimerilor amfifilici în comparație cu surfactanții mici moleculari <sup>171</sup>.

În ceea ce privește prepararea micelor două metode sunt mai exploatate. Prima metodă este implică dizolvarea directă a copolimerului în apă sau în mediu apos. Tehnica dializei, a doua metodă, necesită dizolvarea copolimerului mai întâi în compuși organici miscibili cu apa, cum este dimetilformamida, tetrahidrofurantul sau dimetilacetamida și apoi amestecarea soluției cu apa la o rată controlată, cu eventuala evaporare a solventului organic, ce duce la obținerea moleculelor de copolimer sub formă de micelle în apă.

Alegerea metodei se face în funcție de solubilitatea copolimerului în apă sau în medii apoase. Dacă solubilitatea copolimerului este satisfăcătoare, se preferă dizolvarea sa directă, în timp ce pentru o solubilitate scăzută se preferă metoda dializei.

Moleculele amfifile constau în două segmente diferite, care diferă prin solubilitatea lor și care este determinată de lungimea blocurilor.

În metoda dializei, dimensiunea și distribuția dimensională a micelor este influențată de solventul organic ales și de rata de amestecare a acestuia cu apa. La o concentrație critică a apei, este inițiată formarea micelor, iar după acest punct numărul lor continuă să crească. La și colab.<sup>172</sup> au folosit această metodă pentru sistemul lor micelar și au aflat că solventul afectează dimensiunea micelor. Folosirea DMSO-ului ca solvent organic a dus la creșterea micelor de poli(etilen oxid)-poli (benzil-L-aspartat) la dimensiunea de 17nm cu un randament de 6%. În cazul N,N-dimetilacetamidei(DMAc), micellele au fost obținute cu un randament mare, cu o dimensiune medie de 19 nm și cu o distribuție restrânsă. Astfel, metoda dializei poate fi folosită pentru a modela proprietățile micelor în funcție de cerințele aplicației dorite.

Încărcarea moleculelor de medicament în miezul hidrofob al micelor depinde de modul de preparare al acestora. Dacă metoda de dizolvare directă este folosită, amestecul de soluție de medicament poate fi preparat cu un solvent organic de tipul acetonei, ca strat protector. Apoi, amestecarea soluției micelare și soluției de medicament duce la încorporarea acesteia din urmă după evaporarea solventului în care s-a realizat soluția de medicament. Motivul folosirii acestui solvent este ca el poate solubiliza partea hidrofobică a copolimerului și a moleculelor de medicament. În timpul adăugării solventului organic ce conține copolimer și a moleculelor de medicament în apă, se formează micellele, medicamentul fiind încorporat în miezul micelar în același timp.

Având micellele formate și moleculele de medicament încorporate, următorul pas este transportul acestora fără a afecta în nici un fel circuitul sangvin. Din punct de vedere termodinamic, stabilitatea micellelor este măsurată cu ajutorul concentrației critice micelare. După cum s-a menționat în partea bibliografică, forțele opuse create de părțile hidrofobice și hidrofilice ale micellei necesită o limită inferioară pentru a menține stabilă structura sistemului de eliberare a medicamentului. Această limită devine importantă în momentul administrării intravenoase deoarece concentrația sistemului scade imediat și poate duce la disocierea micellelor, care la rândul lor vor conduce la eliberarea moleculelor de medicament. Pentru acest motiv, valoarea CMC ar trebui controlată foarte bine și luată în considerare când se crează sisteme micelare noi pentru aplicații terapeutice.

Valorile CMC depinde de raportul dintre lungimea părții hidrofobice și a părții hidrofilice. Un raport scăzut duce la o valoare mare a CMC comparativ cu un raport ridicat, deoarece forțele de atracție ce apar din segmentul hidrofobic duc la autoasamblarea micellelor și scăderea ponderei lanțului hidrofobic conduce la creșterea CMC-ului.

Numeroase studii au fost realizate până în prezent pentru a înțelege cum anume lungimea lanțului afectează CMC. Astafieva și colab.<sup>173</sup> au investigat efectele lungimii lanțului polimeric asupra CMC în cazul micellelor copolimerului polistiren-b-poli(acrilatului de sodiu). În cazul solventului apă, micellele formează zona miezului din blocuri de polistiren insolubil și hidrofob și în zona coroanei, din blocuri PAN hidrofilice. Creșterea raportului segmentelor hidrofobic/hidrofilic de la 6/400 la 110/380 unități monomeric rezultă într-o descreștere dramatică a CMC-ului de la  $4.2 \cdot 10^{-5}$  la  $8 \cdot 10^{-8}$  mol/L. În 2008, un studiu mai recent a fost realizat de Wang și colab.<sup>174</sup>, în care CMC a fost determinat prin folosirea unei metode de fluorescență spectroscopică bazată pe partiționarea preferențială a probei de piren în miez hidrofobic într-un mediu apos și s-a concluzionat că creșterea polimerizării blocului hidrofobic, PCL, de la 27 la 186 unități în copolimerul tribloc poli(etil etilen fosfat) și poli ( $\epsilon$ -caprolactonă) (PEEP-PCL-PEEP) a dus la odescreștere substanțială a CMC de la 10.2 la  $0.55 \cdot 10^{-3}$  g/L<sup>-1</sup>.

Astfel, așa cum o arată și aceste studii, creșterea segmentului hidrofobic a copolimerului descrește valoarea CMC care îmbunătățește potențialul lor de a fi folosite în tratamente actuale prin prevenirea disocierilor sistemelor de eliberare a medicamentelor odată cu administrarea lor intravenoasă.

Alte proprietăți cruciale ce ar trebui considerate în ceea ce privește prepararea sistemelor de eliberare a medicamentelor sunt dimensiunea și distribuția dimensională a micellelor. Acele micelle ce sunt mai mici decât 200 nm sunt mai puțin susceptibile la clearance și cele mai mici de 5  $\mu$ m sunt capabile de a pătrunde capilarele mici. Astfel, dimensiunea micellelor este unul din factorii determinanți ai eficacității acestor sisteme și de aceea parametrii ce afectează dimensiunea micellelor sunt necesari a fi relevați.

În plus față de caracteristica de dimensiune, distribuția dimensională a micelilor este un aspect important pentru sistemele de eliberare a medicamentelor. Ar trebui să fie evident faptul că micelile de dimensiuni de 10 și 200 nm vor prezenta un timp de eliminare și o circulație diferită. Pentru a câștiga mai multă putere de control a injectării și a eliminării sistemelor de medicament, distribuția dimensională a micelilor trebuie să fie cât mai uniformă. Una din explicațiile acceptabile de ce unele micelle sunt mai mari decât altele, deși sunt formate în același solvent, este aceea că clusterile de dimensiune mare pot fi formate prin aglomerarea micelilor de mici dimensiuni datorită forțelor de atracție secundare dintre miezurile hidrofobice ale micelilor. Pentru a evita formarea acestor agregate mari, concentrația soluției poate fi scăzută prin diluție.

Creșterea dimensiunii autoasocierilor când se folosește THF drept co-solvent, s-a mai explicat prin faptul că amestecarea acestuia cu apa se face foarte lent, datorită vâscozității mari și miscibilității scăzute cu aceasta. S-a raportat în literatură obținerea de particule mai mari atunci când s-a adăugat faza organică de THF peste faza apoasă, comparativ cu situația când ordinea de adăugare a fost inversă, acest lucru datorându-se ratei rapide de precipitare.

S-a mai arătat că se pot obține morfologii variate dacă copolimerul este asimetric în lungimile relative ale blocurilor componente (ex. blocul hidrofobic este în mod considerabil mai lung decât cel hidrofilic) și particulele sunt pregătite prin adăugarea lentă a apei peste polimerul dizolvat într-un solvent organic miscibil cu apa, după cum a fost și cazul nostru. Astfel, conform unor studii anterioare, aceste agregate micelare pot forma morfologii multiple care sunt dependente de lungimea blocurilor copolimerului, morfologii ce includ sfere, bastonașe, vezicule (polimerosomi), micelle lamelare.

Autoasamblarea copolimerilor amfifili în polimerosomi s-a demonstrat a fi dependentă de blocul hidrofilic<sup>175</sup>, în cazul nostru amidonul.

### **IV.1.1.7. Concluzii**

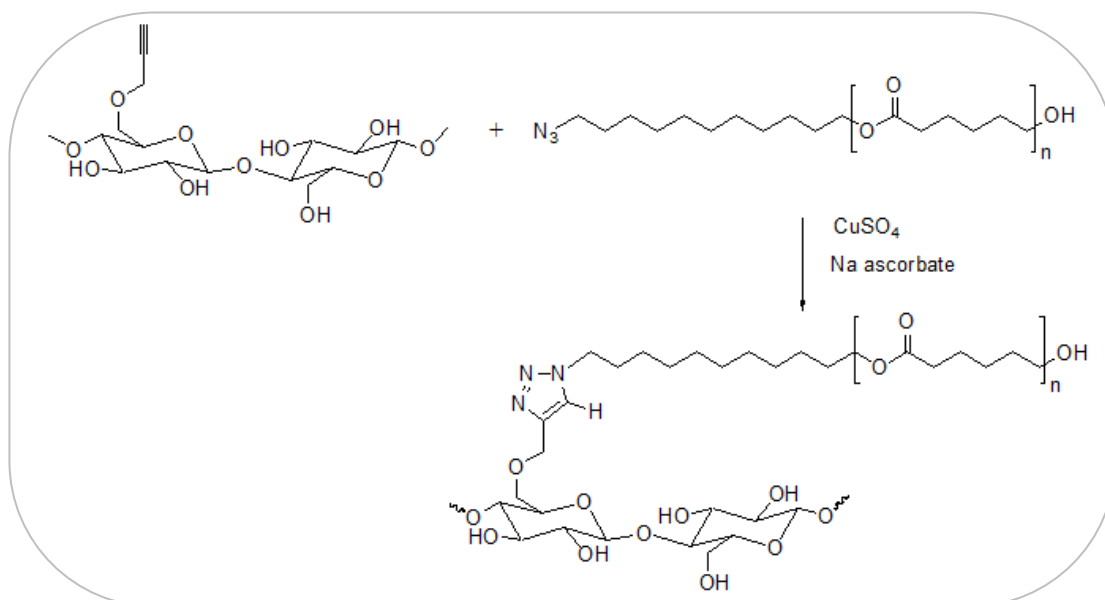
A fost obținut și caracterizat un nou copolimer pe bază de amidon grefat cu poliester prin procedeul click chemistry.

Introducerea unităților de PCL a eliminat unele dezavantaje ale polizaharidei abordate, prin mărirea hidrofobicității amidonului și de asemenea prin creșterea cristalinității copolimerului prin varierea lungimii lanțului de PCL, după cum s-a putut observa din analiza DSC. Caracterul amfifilic al copolimerului a fost evidențiat prin capacitatea sa de a forma polimerosomi în soluții apoase. Copolimerii grefați pot fi astfel potențiali candidați pentru a fi folosiți în diferite aplicații biomedicale.



## IV.1.2. Grefarea poli ( $\epsilon$ -caprolactonei) pe lanțurile de amidon *via* “click chemistry” prin metoda microundelor

### IV.1.2.1. Principiul reacției



Schema 2. Schema reacției „click chemistry” dintre amidonul funcționalizat cu grupare de tip alchină și PCL purtătoare de grupări azidice.

Grefarea PCL-ului pe lanțurile de amidon a fost realizată și cu ajutorul microundelor. Reacția tipică este după cum urmează: amidonul propargilat (0.6 mmol) și azido-PCL (0.6 mmol) sunt lăsați peste noapte să se dizolve într-un amestec 1:1 de apă și DMF (10 ml), apoi sunt transferați într-un flacon special, rezistent la presiune (până la 20 atm) și închis ermetic. Se adaugă soluții proaspăt preparate de ascorbat de sodiu (0.12 mmol, 120  $\mu\text{L}$ , 1M) în apă și o soluție 75% de sulfat de cupru  $\text{II}$  hidratat cu 5 molecule de apă (8  $\mu\text{L}$ , 0.024 mmol). Flaconul este amplasat într-un reactor monomodal cu microunde Discover® LabMate™ (Figura 15) și iradiat timp de 60 de minute la o putere de 150W, la temperatură constantă de 130  $^{\circ}\text{C}$ .

Menținerea temperaturii la această valoare a fost posibilă prin utilizarea aerului comprimat. Aerul suferă o destindere rapidă în momentul introducerii în cavitatea reactorului, consumând astfel o cantitate importantă de căldură. Produsul final a fost precipitat în apă și dializat într-o soluție apoasă de 0.1 M EDTA timp de 5 zile folosind o membrană celulozică (Orange Scientific, MWCO: 3500 Da) pentru a îndepărta catalizatorul. Apa a fost înlocuită de două ori pe zi. În final, produsul a fost liofilizat.



Figura 17. Reactorul Discover® LabMate™

Pentru a elimina diferențele dintre o reacție realizată în condiții clasice și una în prezența microundelor, au fost efectuate sinteze în paralel, utilizând aceleași sisteme, prevăzute cu refrigerent.

#### IV.1.2.2. Influența solventului asupra timpului de reacție

Iradieră cu microunde constă într-o iradiere electromagnetică în intervalul de frecvență de 0.3 până la 300 GHz. Toate cuptoarele domestice și reactoarele cu microunde dedicate sintezelor chimice operează la o frecvență de 2.45 GHz, pentru a evita interferențele cu telecomunicațiile și cu frecvențele telefoanelor mobile. Energia fotonului de microunde în această regiune de frecvență (0.0016 eV) este prea slabă pentru a rupe o legătură chimică și este de asemenea mai mică decât energia de mișcare browniană. Astfel, microundele nu pot induce reacții chimice<sup>176</sup>. Chimia amplificată de microunde se bazează pe încălzirea eficientă a materialelor prin încălzirea dielectrică cu microunde. Acest fenomen este dependent de abilitatea unui material specific (solvent sau reactiv) de a absorbi energia microundelor și de a o converti în căldură.

Caracteristicile de încălzire ale unui anumit material (un solvent, spre exemplu) în condiții de iradiere cu microunde sunt dependente de proprietățile sale dielectrice. Capacitatea unei substanțe de converti energia electromagnetică în căldură la o frecvență și temperatură dată este determinată de așa-numitul factor de pierdere  $\tan\delta$ . Acesta este exprimat drept coeficientul  $\tan\delta = e''/e'$ , unde  $e''$  este pierderea dielectrică, ceea ce reprezintă un indicator al eficienței cu care radiația electromagnetică este transformată în căldură, iar  $e'$  este constanta dielectrică, ce descrie abilitatea moleculelor de a fi polarizate de către câmpul electric. Este necesar un mediu de reacție caracterizat de o valoare ridicată a lui  $\tan\delta$  pentru o absorbție eficientă și, prin urmare, pentru o încălzire rapidă. Factorii de pierdere aferenți unor solvenți organici simpli sunt cuprinși în tabelul imediat următor. În general, solvenții pot fi clasificați ca absorbanți puternici ( $\tan\delta > 0.5$ ), medii ( $\tan\delta = 0.1 - 0.5$ ) sau slabi ( $\tan\delta < 0.1$ ) de microunde.

Tabel 7. <sup>177</sup> Factorul de pierdere tan $\delta$  pentru diferiți solvenți.

<b>Solvent</b>	<b>tan<math>\delta</math></b>	<b>Solvent</b>	<b>tan<math>\delta</math></b>
Etilen glicol	1.350	apă	0.123
etanol	0.941	cloroform	0.091
DMSO	0.825	Acetona	0.054
2-propanol	0.779	THF	0.047
Acid formic	0.722	diclormetan	0.042
metanol	0.659	toluen	0.040
DMF	0.161	hexan	0.020

S-a arătat că umflarea granulelor de amidon începe în masa fracției mobile amorfe și în regiunea mai moderat amorfă, imediat adiacentă regiunii cristaline. Atât capacitatea de umflare cât și solubilitatea crește cu creșterea temperaturii, dar descresc după iradierea cu microunde <sup>178</sup>. Tester și Morrison<sup>179</sup> au arătat că umflarea este o proprietate primară a amilopectinei și că amiloza acționează ca un diluant. Reducerea proprietății de umflare și a solubilității poate fi explicată printr-un rearanjament al regiunii cristaline din granulele de amidon, care pot fi distribuite aleatoriu.

Rezultatele raportate de Luo Z. și colab. au arătat că tratamentul cu microunde a indus rearanjarea moleculelor în secțiuni ale amidonului ce fac parte din regiunea cristalină și că iradierea a avut un efect mai pronunțat asupra amilozei decât asupra amilopectinei. Curbele DSC au arătat că cristalele imperfecte se topesc și recrystalizează în altele mai perfecte.

Pinkrova și colab. <sup>180</sup> au arătat că la o putere de 90 kW și la o temperatură de 100°C dintr-un total de 86.71% amidon, doar un conținut de 4.47% este degradat.

Ritter <sup>181</sup> a arătat recent că prezența apei crește randamentul reacției click cu microunde, datorită efectului ei favorabil asupra sistemului catalitic. CEM monomodal, iradiere la 150 C, 130 W timp de 30 min.

Iradierea cu microunde a fost primită cu mult interes în domeniul chimiei datorită încălzirii rapide și a penetrării omogene de energie în comparație cu metodele convenționale de încălzire<sup>182</sup>. Au fost dezvoltate multiple protocoale rapide și eficiente energetic pe bază de microunde și aplicate în sinteza sau modificarea de polimeri sau materiale <sup>183</sup>.

Cu toate acestea, aspectul de control al selectivității reacțiilor chimice prin utilizarea activării MW în sisteme închise sau deschise este un domeniu fascinant, care însă nu este încă pe deplin înțeles. Principalul motiv pentru progresul din reacțiile chimice este de fapt un simplu efect termic / cinetic, o consecință a temperaturii rapid obținute și a presiunii mai mari (în recipiente închise ermetic). Mecanismul de încălzire dielectric produce efecte specifice microundelor, care diferă de încălzirea convențională. Un solvent cu o putere mare de absorbție a microundelor poate fi supraîncălzit mai sus de punctul lui de fierbere prin utilizarea unui

recipient sigilat. Catalizatorii sau reactivii eterogeni polari duc adesea la accelerarea reacției într-un mediu mai puțin polar <sup>184 185</sup>.

În ceea ce privește polizaharidele, recent, Peng și colab. <sup>186</sup> au investigat aplicațiile iradierii cu microunde în sinteza carboximetil hemicelulozei, studiind structură chimică, masa moleculară, proprietățile termice și reologice. Producții au fost obținuți prin schimbarea condițiilor de reacție. Puterea de iradiere a fost menținută la 300 W pentru toate procedurile, timpii de reacție au variat de la 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 30, până la 40 minute și temperaturile au fost 30, 45, 65, și 85 °C.

„Click chemistry” asistată de MW este propusă ca o cale nouă de sinteză pentru obținerea de compuși heterociclici într-o reacție singulară, și într-o manieră complet regioselectivă.

Timpul de reacție poate fi scăzut de la ore la minute <sup>187</sup>. Astfel, această metodă aplicată: click chemistry”, a fost descrisă pe larg în literatura de specialitate. Liskamp și colab. <sup>188</sup> au sintetizat, folosind această reacție, peptide dendrimerice multivalente.

Impactul ridicat al microundelor în ceea ce privește progresul reacției a fost demonstrat prin randamente ridicate de 96% în comparație cu 43-56%, în condiții convenționale de încălzire pe baie de ulei. Morvan și colab. au descris cuplarea eficientă a oligonucleotidelor purtătoare de grupări alchilice cu galactozide funcționalizate azidic <sup>189</sup>, demonstrând că microundele au îmbunătățit semnificativ cinetica reacției.

Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) sub formă de stea a fost sintetizată prin „click chemistry” asistată de microunde de Schubert și colab. <sup>190</sup>, care au folosit poli ( $\epsilon$ -caprolactona) funcționalizată acetilenic și azido- $\beta$ -ciclodextrina.

### **IV.1.2.3. Analiza structurală**

#### **IV.1.2.3.1. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR**

Pentru a fi siguri că microundelor nu vor degrada amidonul, s-a pus la punct un protocol experimental cu o putere de iradiere de 150 W, raportată anterior ca fiind inofensivă în ceea ce privește polizaharidele.

Pentru a determina timpul necesar finalizării reacției „click” s-a realizat o cinetică din 20 în 20 de minute, monitorizată cu ajutorul FT-IR-ului. Spectrele au fost înregistrate folosind o celulă de NaCl.

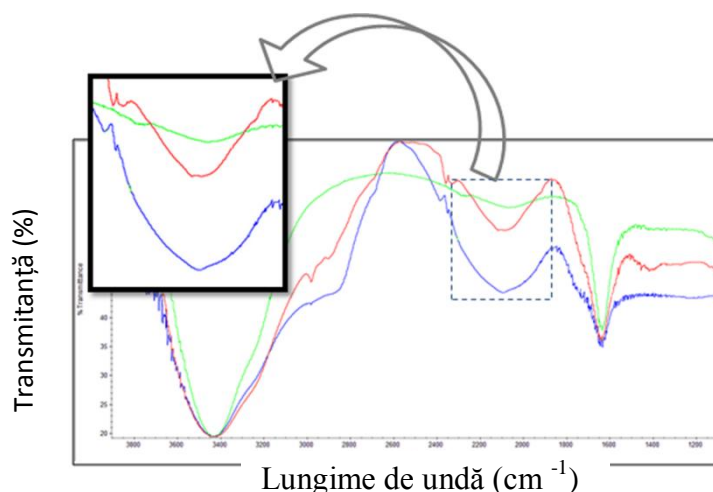


Figura 18 . Cinetica FT-IR pentru „click chemistry”, cu ajutorul MW.

#### IV.1.2.3.2. Rezonanța magnetică nucleară ( $^1\text{H}$ -RMN)

Spectrele RMN  $^1\text{H}$  și  $^{13}\text{C}$  au fost înregistrate în aceleași condiții ca în cazul cuplajului prin metoda convențională și nu s-au observat diferențe între ele.

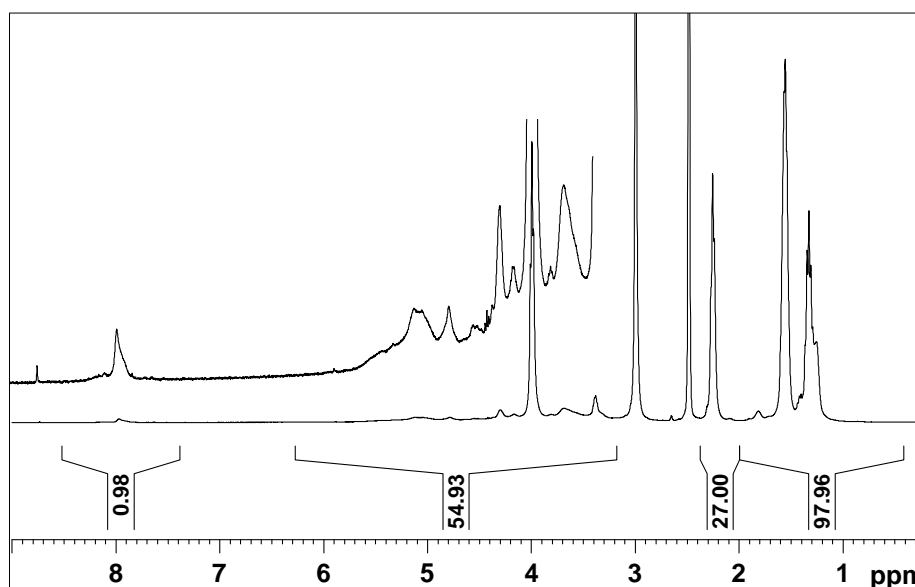


Figura 18. Spectru RMN  $^1\text{H}$  pentru MW2 cu un  $\text{DP}_{\text{PCL}} = 13$ .

Astfel, temperatura de reacție a fost redusă de la 24 ore la doar 60 de minute. Cu toate acestea, acest lucru nu este valabil decât pentru un mediu de reacție constituit dintr-un amestec apă/DMF, concluzie observată în urma unui spectru proton al unei reacții realizate într-un amestec apă/THF, când am descoperit că după 60 de minute încă aveam prezența azidei. Explicația acestui lucru constă în faptul că absorbția energiei generate de microunde este mai ridicată în cazul DMF-ului decât în cazul THF-ului, aspect definit de un factor numit  $\tan \delta$ . Pentru DMF acest factor este  $\tan \delta = 0.161$  și pentru THF,  $\tan \delta = 0.047$ .

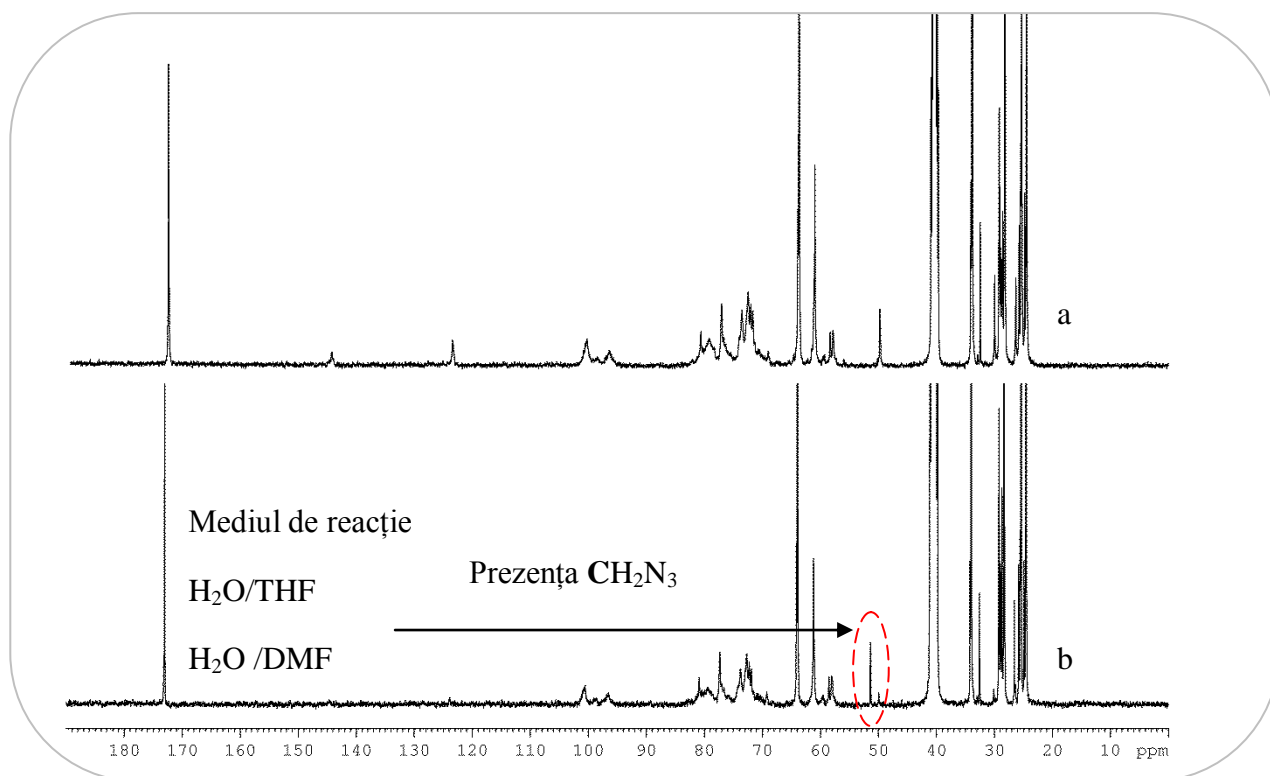


Figura 19. Comparație spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ale reacției "click chemistry" realizată în a) apă/DMF și b) apă/THF.

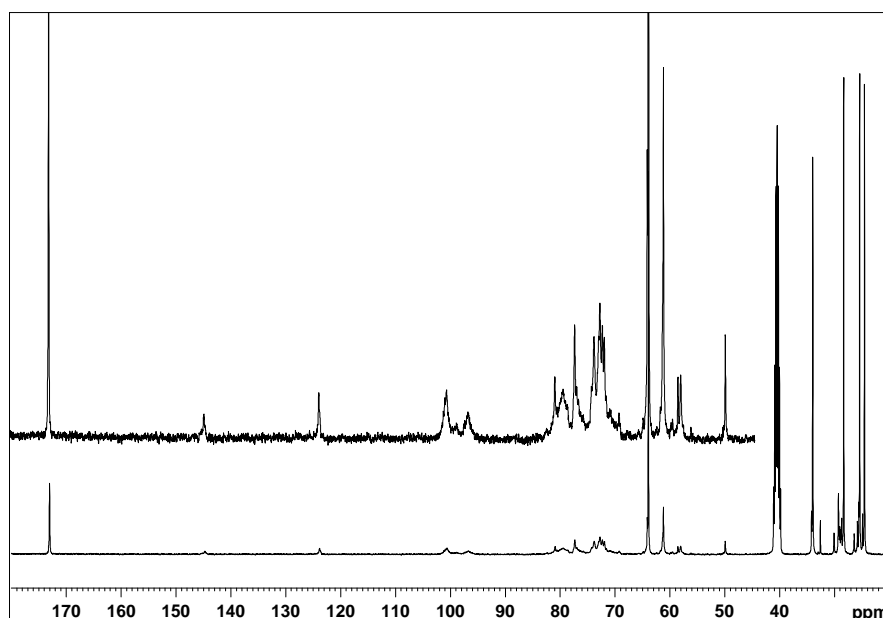


Figura 20 . Spectru RMN  $^{13}\text{C}$  pentru MW2 cu un  $\text{DP}_{\text{PCL}} = 13$ .

S-a demonstrat că microundele nu pot determina ruperea legăturilor chimice și că energia furnizată sistemului nu determină alinierea moleculelor. Pentru acuratețea rezultatelor, temperatura este măsurată *in situ* (figura 21).

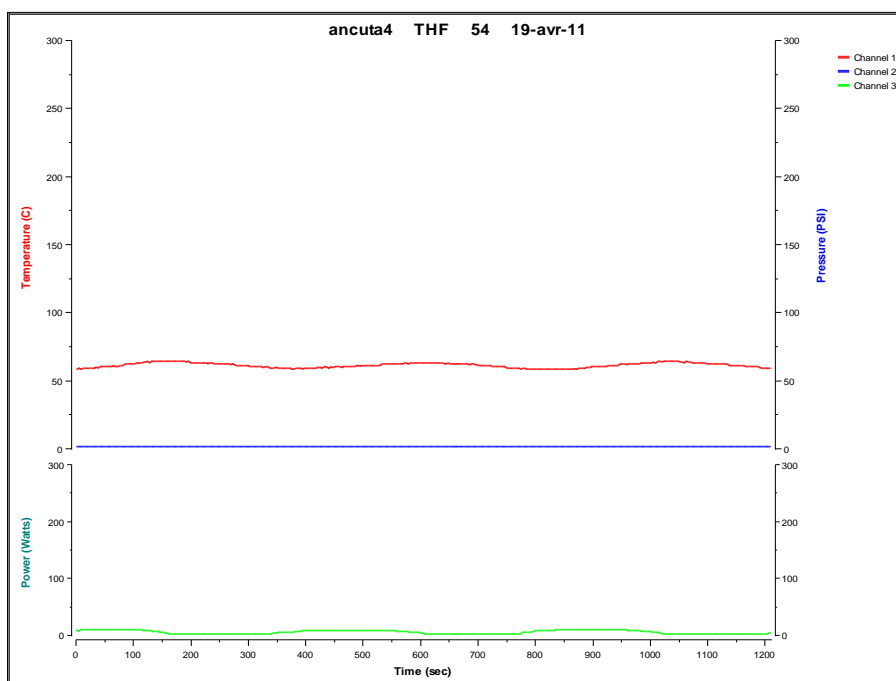
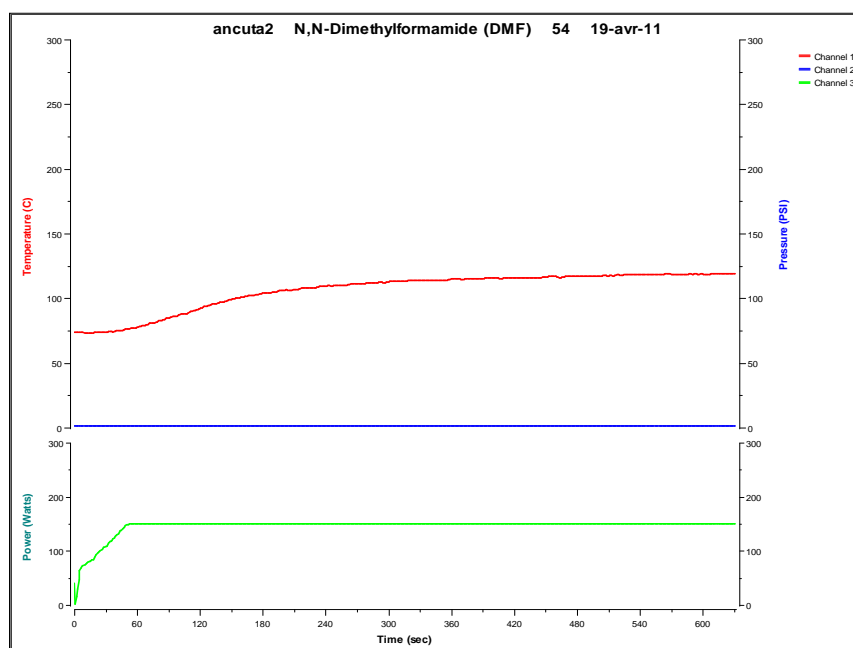
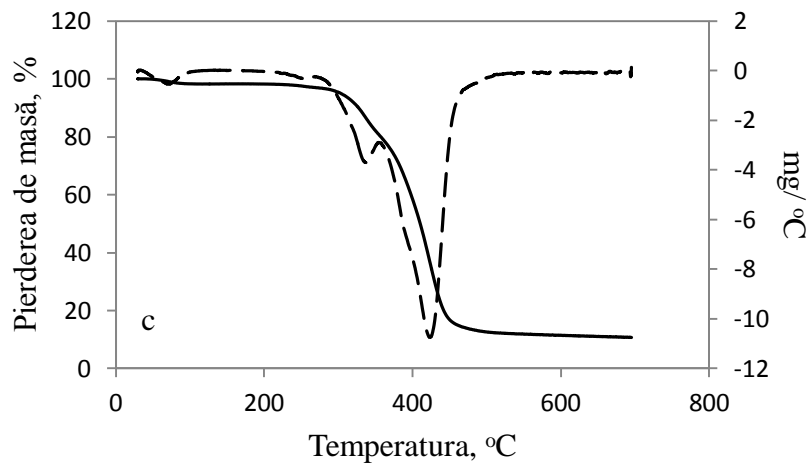
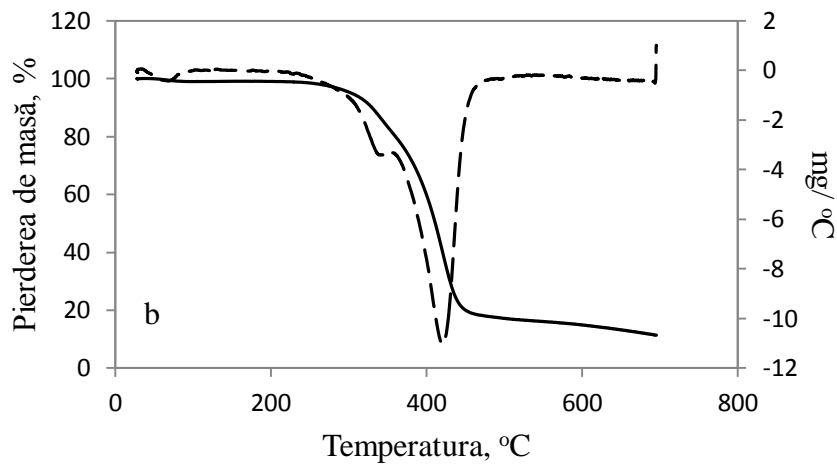
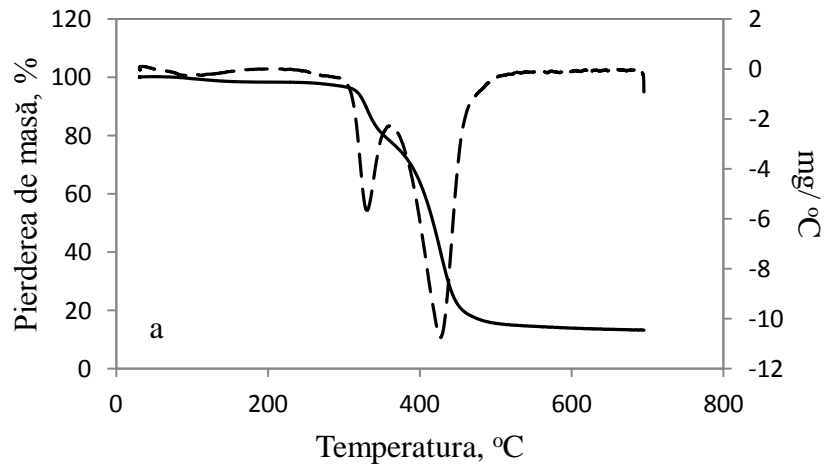


Figura 21. Parametrii de reacție pe parcursul reacției „click chemistry” în a) DMF și b) THF asistată de MW (— puterea — temperatura — presiunea)

#### IV.1.2.4. Analiza termică

Curbele de degradare termică ATG a copolimerilor obținuți în urma cuplajului click cu ajutorul microundelor sunt ilustrate mai jos, în figura 22.





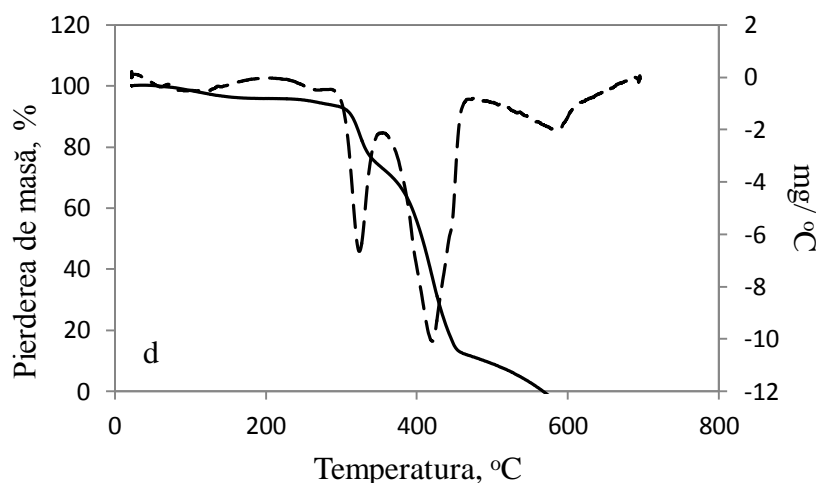


Figura 22. a) MW1, b) MW2, c) MW3, d) MW4.

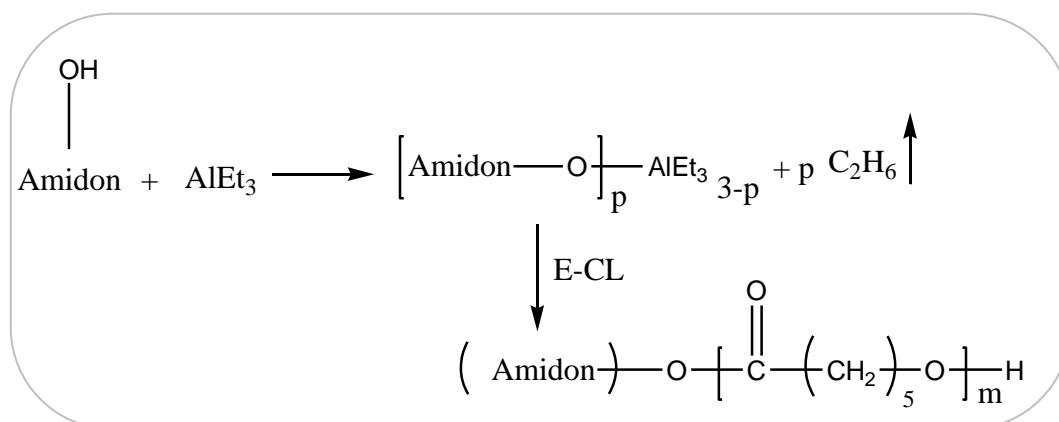
S-a observat că pentru MW1 și MW4, deoarece reacția nu a fost completă în 60 de minute, fiind realizată într-un amestec H<sub>2</sub>O/THF, termogramele prezintă încă amprenta puternică a amidonului, ceea ce nu este cazul pentru MW2 și MW3. Pic-urile corespunzătoare degradării termice a amidonului și PCL-ului au fost aceleași atât pentru probele cu cuplaj complet cât și pentru celelalte, prezentând valori identice cu click-ul realizat prin metoda convențională.

Faptul că cele două reacții nu au fost complete s-a văzut și prin analiza de suprafață Tof-Sims, prin prezența puternică a pic-ului N<sub>3</sub> la valoarea corespunzătoare, 26.

Urmând procedura descrisă la capitolul IV.1.1.4., de determinare a cristalinității PCL după grefare, s-a constatat că nu au fost diferențe considerabile între valorile obținute pentru reacția clasică și cea cu microunde.

## IV.2. Grefarea poli (ε-caprolactonei) prin polymerizarea ε-CL la grupările –OH ale amidonului

### IV.2.1.Principiul reacției



Schema 3. Mecanismul reacției de grefare a amidonului prin polymerizarea cu deschidere de ciclu a ε-caprolactonei.

Reacția generală de polymerizare are loc astfel: ε-CL (3 g, 0,026 mol ) se adăugă peste amidonul (3 g, 0,018 mol) uscat în prealabil o noapte la etuvă la 50°C. Se introduce o cantitate determinată de trietilaluminu în soluție de toluen printr-o seringă, la temperatura camerei. Apoi, mediul de reacție se încălzește la temperatura dorită. Polymerizarea se oprește prin răcirea rapidă la temperatura ambiantă. Reacția are loc într-un balon prevăzut cu trei găuri pentru a permite evaporarea substanțelor volatile, dar și condensarea lor într-un refrigerent, și menținerea unei atmosfere inerte. Lanțurile de PCL negrefate sunt îndepărtate prin extracția cu toluen (25 mL) la temperatura camerei. După 24 ore, fracția insolubilă este filtrată, purificată prin dializă într-o soluție 0,1 M EDTA pentru îndepărtarea Al din sistem folosind o membrană celulozică de dializă (Orange Scientific, MWCO: 3500 Dă) și în final uscată sub vid. Partea insolubilă conține lanțuri de amidon și poliester care au fost grefate chimic.

### IV.2.1. Analiza rezultatelor obținute

Metodele convenționale de procesare furnizează de obicei compozite pe bază de amidon cu proprietăți mecanice scăzute, în principal datorită descompunerii termice a amidonului, absorbției puternice a apei și a adeziunii interfaciale scăzute. Amestecurile polimerice și asocierile chimice, sub formă de copolimeri bloc sau grefați între amidon și poliesterii alifatici, cum e cazul poli(ε-caprolactona), prezintă un interes deosebit din punctul de vedere al obținerii unor noi materiale biodegradabile.<sup>191</sup>

Copolimerul bloc poli(ε-caprolactona) - amidon se pare a fi candidatul ideal deoarece în primul rând este rezistent la tratamente apoase, în al doilea rând, deoarece poli(ε-caprolactona) oferă o

bună biocompatibilitate combinată cu o bună permeabilitate pentru numeroase medicamente terapeutice și o compatibilitate cu o gamă largă de alți polimeri <sup>192</sup>.

O cale de a realiza un astfel de copolimer, cu dimensiune controlată a secvenței de polimer sintetic, o constituie utilizarea reacției „click-chemistry”. Aceasta presupune realizarea anterioară a unor derivați terminați în gruparea azido, respectiv în grupare alchină, prin modificarea polimerilor de bază (amidonul, respectiv PCL). Este cunoscut faptul că poli( $\epsilon$ -caprolactona) este un poliester alifatic biodegradabil și biocompatibil ce a beneficiat de o atenție sporită în utilizarea sa în domeniul medical, farmaceutic și în diverse aplicații ce țin de mediul înconjurător <sup>193</sup>.

Monomerul  $\epsilon$ -caprolactona, este esterul ciclic al acidului hidroxi caproic și este un lichid incolor. Inelul lactonic se desface relativ ușor cu ajutorul compușilor ce conțin atomi de hidrogen, în mod special alcoolii, fiind necesari însă și temperaturi ridicate și catalizatori. Fiecare deschidere de ciclu duce la formarea unei grupări hidroxilice primare, terminale, și a uneia carboxilice.

Alcoxizii de aluminiu [ $R_3-nAl(OR)_n$ ] sunt folosiți în mod curent drept inițiatori în sinteza poli(lactonelor) și poli(lactidelor). Datorită faptului că alcoxizii de aluminiu pot fi obținuți în urma reacției dintre un alcool și trialchil-aluminiu, o gamă largă de alcoolii este disponibilă drept opțiune pentru structura terminală  $\alpha$  <sup>194</sup>.

Pasul cheie în ceea ce privește această polimerizare este reacția de transfer care are loc în momentul adăugării alcoolului în mediul de reacție. Această reacție de transfer păstrează în capătul terminal al lanțului polimeric o grupare hidroxil ce poate fi folosită mai departe în altă reacție de transfer. Dacă alcoolul este în exces comparativ cu inițiatorul, gradul de polimerizare dorit este dat de raportul [monomer]/[alcool].

Numeroase informații experimentale din literatură confirmă într-adevar faptul că masa moleculară poate fi prezisă din raportul molar monomer/inițiator și că distribuția masei moleculare este limitată, paralel cu o inițiere rapidă spre deosebire de propagare. Viteza de propagare aparentă crește mai întâi cu excesul de alcool până la o valoare specifică, peste care cinetica încetinește. Obținerea unui poliester ce nu conține reziduu toxic metalic este o condiție obligatorie pentru aplicațiile biomedicale. Datorită faptului că eliminarea metalului durează, se recomandă scăderea cantității de inițiator prin folosirea unui alcool drept co-inițiator.

Amidonul, fie în starea sa nativă, fie modificat a fost un subiect de studiu intens de-a lungul anilor. Odată cu creșterea interesului în domeniul biomedical și farmaceutic asupra polimerilor biodegradabili ca matrici pentru sistemele de eliberare controlată, au fost publicate numeroase articole asupra modificărilor polimerilor naturali.

Kost și Shefer <sup>195</sup> au studiat două metode de formare a rețelelor în vederea înglobării de medicament în matricea amidonului pentru utilizarea lor în cadrul sistemelor de eliberare controlată. Deoarece degradarea enzimatică a amidonului are loc atât în structura sa cât și în cadrul morfologiei, gradul de degradare, până la eliberarea medicamentului, va fi afectat și va depinde de structura și rețeaua formată.

Deși folosit de secole, amidonul continuă să fie un material brut abundent, necostisitor, biodegradabil și care permite într-un mod facil realizarea de modificări chimice. Mai mult, este important faptul că moleculele de amidon sunt multifuncționale, având trei grupări hidroxil pe unitatea glucozică, care sunt în general accesibile pentru transformarea grupărilor OH tipice primare și secundare <sup>196</sup>.

Poliesterii alifatici biodegradabili acoperiți terminal cu molecule de zahăr au fost intens studiați pentru utilizarea lor în aplicații biomedicale, în special pentru sistemele de nanoîncapsulare destinate eliberării de medicamente.

O abordare diferită în sinteza copolimerilor grefați pe bază de amidon prin polimerizarea *in situ* este reprezentată de polimerizarea cu deschidere de ciclu (ROP) a monomerului  $\epsilon$ -caprolactonă în prezența polizaharidei.

În această reacție, grupările hidroxil ale amidonului se presupun a funcționa ca situri de inițiere. Studii anterioare au arătat că catalistii comuni pentru ROP, cum e cazul țin octoatului sau a isopropoxidului de aluminiu, au dus la eficiențe de grefare scăzute (0-14%) <sup>197</sup>. Amidonul este un material foarte hidrofilic ce are mereu un grad de umiditate. Apa din granulele de amidon concurează cu grupările hidroxilice ale amidonului în etapa de inițiere a reacției de polimerizare, ducând la formarea de homopolimeri PCL, în loc de amidon-*g*-PCL, rezultând astfel valori mici ale eficienței de grefare. O altă cauză pentru aceste valori scăzute este natura eterogenă a reacției.

Amidonul este insolubil în solvenții organici tipici folosiți pentru ROP (cum ar fi toluenul sau THF) și prezența unui sistem de reacție lichid-solid duce la o reducere a ratei reacției dintre amidon și  $\epsilon$ -caprolactonă. Cea mai mare valoare a eficienței de grefare (90%) a fost obținută când s-a folosit trietilaluminu drept catalist <sup>198</sup>, care, cu toate acestea, este extrem de sensibil la apă și aer și dificil de manipulat deoarece eliberează etan în timpul reacției, un produs rezidual foarte inflamabil.

Acest capitol descrie studiul experimental al ROP  $\epsilon$ -caprolactonei în prezența amidonului.

#### **IV.2.1.1. Analiza structurală**

##### **IV.2.1.1.1. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR**

Picurile de PCL caracteristice <sup>199</sup> (3300–3700, 1737, 1725, 850–1480, și 720)  $\text{cm}^{-1}$  apar în spectrele FIR, alături de absorbanta largă a grupărilor O-H de 3200–3700  $\text{cm}^{-1}$ . Rezultate similare au fost raportate și în alte surse <sup>200</sup>.

Figura următoare surprinde intensitatea vibrațiilor grupării  $\text{C}=\text{O}$  ca bandă largă la 1731  $\text{cm}^{-1}$  în spectrul PCL/amidon, un rezultat similar celui obținut de Wang și colab <sup>201</sup>.

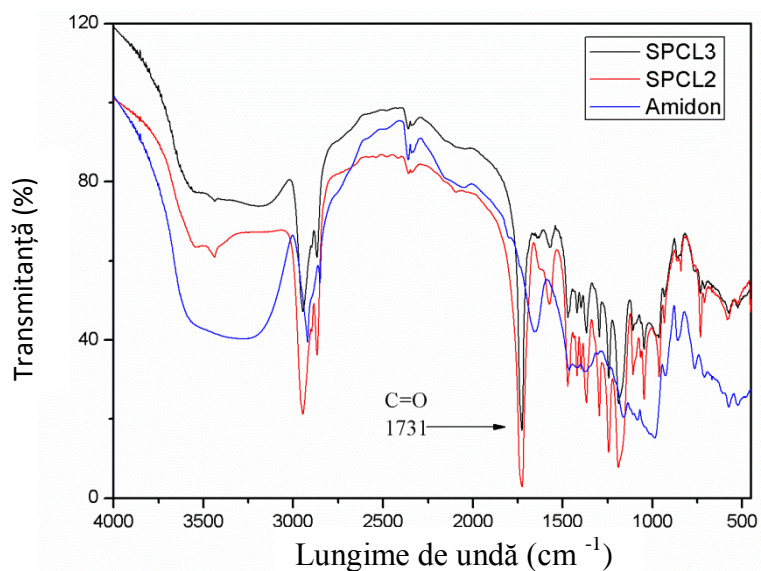


Figura 23. Spectrul FT-IR al pentru a) amidon, b) SPCL2, c) SPCL3.

#### IV.2.1.1.2. Rezonanța magnetică nucleară (<sup>1</sup>H-RMN)

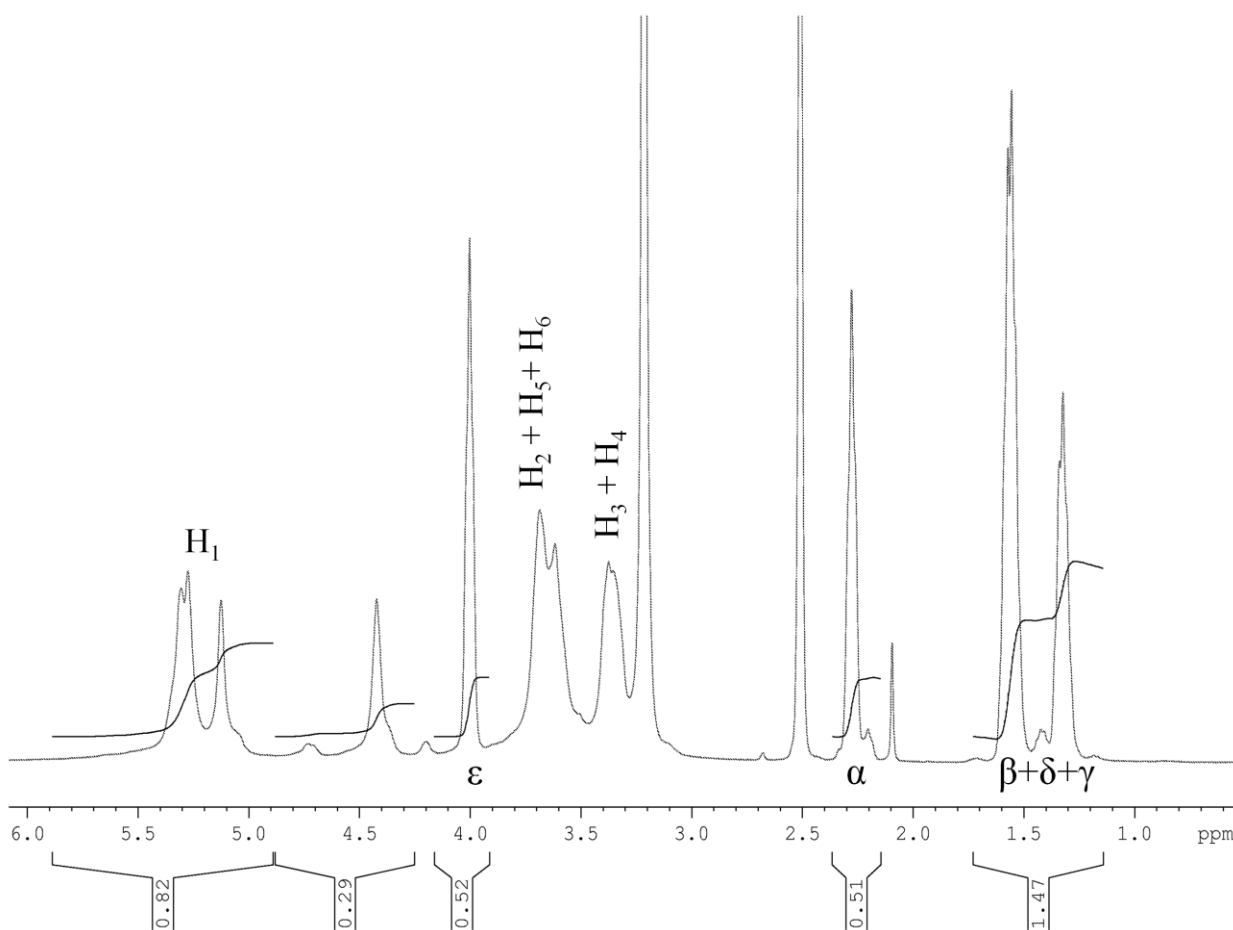


Figura 24. Spectrul <sup>1</sup>H RMN(DMSO) pentru proba SPCL2.

#### IV.2.1.1.3. Determinarea gradului de substituție al grefelor de PCL pe scheletul amidonului

Determinarea compoziției copolimerului s-a realizat plecând de la intensitățile semnalelor pentru caprolactonă și pentru unitățile structurale ale amidonului. După cum este arătat în tabelul 12, semnalele din intervalul 3.6-3.7 ppm conțin protonii H<sub>2</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub> ai unității de amidon, fiind clar diferențiate de protonii metilenici α-δ din caprolactonă(CL) ce apar între 1.3-2.3 ppm. De aceea, raportul molar relativ (CL/Amidon) al amidonului și al unității caprolactonice din copolimer poate fi calculat folosind spectrul <sup>1</sup>H RMN după o procedură descrisă anterior<sup>202</sup> și anume:

$$N_{CL} = \frac{CL}{Amidon} = \frac{\text{Intensitatea relativă a semnalelor protonilor metilenici } \alpha-\delta}{\text{Intensitatea relativă a semnalelor protonilor H}_2, H_5, H_6}$$

Fracția molară a componentei CL din copolimer poate fi de asemenea obținută printr-un calcul simplu folosind valoarea N<sub>CL</sub>. În plus, N<sub>CL</sub> = CL/Amidon \* 100, număr ce reprezintă totalitatea unităților de CL grefate pe 100 de unități de amidon.

$$I_2 + I_5 + I_6 = 8.6061$$

$$\delta + \beta + \gamma \text{ (6 protoni)} = 0.6555 + 0.0322 + 0.3716 = 1.0593$$

$$N_{CL} = \frac{(\delta + \beta + \gamma) / 6}{(I_2 + I_5 + I_6) / 4} = \frac{0.17655}{2.1515} = 0.082, 4 \text{ reprezentând numărul de protoni/ unitatea}$$

glucozidică.

Acest N<sub>CL</sub> va da numărul de unități de PCL pe unitatea glucozidică.

$$NG = F_{\delta b} * N_{CL} = 0.102 * 0.082 = 8.3 * 10^{-3} \text{ grefe pentru 100 de unități glucozidice.}$$

Pentru a înțelege mai în detaliu structura grefată a copolimerului, s-a luat în considerare diferența structurală între ramificațiile C<sub>2</sub>- și C<sub>3</sub>- și C<sub>6</sub>-. Protonii ramificațiilor C<sub>2</sub>- și C<sub>3</sub> sunt alcătuiți din unități -CH(OC=O)CH<sub>2</sub>- ce sunt atribuite protonului α-metilenic H<sub>a,b</sub>. Protonul terminal al ramurii C<sub>6</sub> nu se poate distinge de unitățile principale ale caprolactonei datorită structurii identice de tipul -CH<sub>2</sub>(OC=O)CH<sub>2</sub>, notat H<sub>α,a</sub>.

Fracția unităților caprolactonice pe ramurile C<sub>2</sub>- și C<sub>3</sub>- poate fi calculată astfel:

$$F_{\delta b} = \frac{I_{\delta b}}{I_{\delta a} + I_{\delta b}} = \frac{0.0322}{0.0322 + 0.2839} = 0.102$$

$$F_{\delta b} = I_{\delta (b+\gamma)} - I_{\beta} = 0.6555 - 0.3716 = 0.2839$$

unde I<sub>δ,a</sub> și I<sub>δ,b</sub> reprezintă intensitățile semnalelor protonilor H<sub>δ,a</sub> și H<sub>δ,b</sub>.

Pentru a afla nr de moli de caprolactonă grefată în poziția 2 sau 3 se procedează în felul următor:

$$NG_{2,3} = H_{ab} = 0.0284/2 = \frac{0.0142}{(I_2+I_5+I_6)/4} = 6.6 \cdot 10^{-3}, \text{ adică } 0.066 \text{ grefe în poziția 2 sau 3}$$

pentru 100 de unități de amidon.

$$NG_6 = NG - NG_{2,3} = 0.083 - 0.066 = 0.017 \text{ grefe în poziția 6.}$$

Cu toate că  $NG_{2,3}$  a fost deosebit de  $NG_6$ , gradul de polimerizare nu s-a putut calcula separat pentru fiecare grefă de PCL deoarece toate unitățile principale de CL de pe ramurile  $C_2$ - și  $C_3$ - și  $C_6$ - au arătat deplasări chimice similare în spectrul RMN. Totuși gradul de polimerizare relativ a fost calculat din ecuația  $GP = N_{CL}/NG$ , ca fiind 0.98.

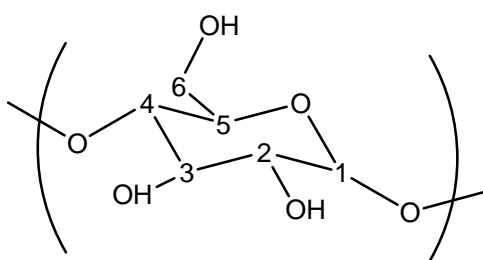
Tabel 8. Deplasările chimice  $^{13}C$  și  $^1H$  pentru copolimerul SPCL2.

$^{13}C$	Deplasare chimică (ppm)	$^1H$	Deplasare chimică (ppm)
$C_1$	100.22	$H_{1.a}$	5.09
$C_2$	73.37	$H_{1.b}$	5.02
$C_3$	72.19	$H_2$	3.67
$C_4$	79.10	$H_3$	3.32
$C_5$	71.77	$H_4$	3.36
$C_6$	60.85	$H_5$	3.60
		$H_{6.a}$	3.67
$C_\alpha$	33.55	$H_{6.b}$	3.60
$C_{\alpha t}$	33.76	$H_{\alpha.a}$	2.24
$C_\beta$	24.11	$H_{\alpha.b}$	2.17
$C_{\beta t}$	24.45		
$C_\gamma$	24.99	$H_\beta$	1.30
$C_{\gamma t}$	25.13		
$C_\delta$	27.89	$H_\gamma$	1.53
$C_{\delta t}$	32.13	$H_{\delta.a}$	1.54
$C_\epsilon$	63.51	$H_{\delta.b}$	1.40
$C_{\epsilon t}$	60.85	$H_{\epsilon.a}$	3.97
$C=O$	172.77	$H_{\epsilon.a}$	3.37

De menționat că în ceea ce privește notația protonilor din unitatea amidonului, a corespunde formei liniare, iar b celei ramificate.

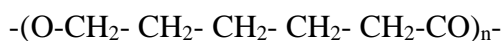
Eficiența grefării este dificil de determinat în cadrul acestui sistem prin tehnici de analiză standard, cum ar fi RMN-ul, datorită solubilității scăzute a produșilor în solvenții organici standard. Calculul descris mai sus nu s-a putut realiza decât pe o singură probă.

Conform literaturii <sup>203</sup> semnalele amidonului sunt atribuite după cum urmează



Carbonul glicozidic C1 (101.2 ppm), C4 (81.4 ppm), C2,3,5 (72.2 ppm) și C6 (61.9 ppm). Semnalul carbonului C4 s-a arătat că este caracteristic fazei amorfe deoarece nu a fost detectat în probele hidratate, cu o cristalinitate ridicată <sup>204</sup>.

PCL nemodificat are următoarele atribuiri ale semnalelor, pentru carbonii metilenici numerotați de la I la V:



I    III    V    IV    II

Tabel 9. Valorile deplasărilor chimice pentru carbonii PCL.

Grupare	Deplasare chimică
Carbonil	173.5
O CH <sub>2</sub> I	65.3, 64.0
CH <sub>2</sub> II	33.8, 33.1
CH <sub>2</sub> III	28.9
CH <sub>2</sub> IV	25.7
CH <sub>2</sub> V	25.2

#### IV.2.1.2. Analiza termică

De-a lungul ultimilor decenii, s-au realizat numeroase studii privind dezvoltarea polimerilor biodegradabili, amestecurile de polimeri și compozite folosind amidonul. Amestecurile amidon-PCL își găsesc locul în diverse studii de literatură dar obținerea lor comercială nu este foarte populară datorită prețului ridicat și a variațiilor ce apar în proprietățile lor mecanice.

Aceste studii au arătat ca proprietățile mecanice ale amestecului amidon/PCL devin slabe odată cu creșterea conținutului de amidon. Acest fapt se datorează incompatibilității dintre amidonul hidrofilic și PCL hidrofobic, precum și adeziunii interfaciale scăzute dintre cei doi compuși.



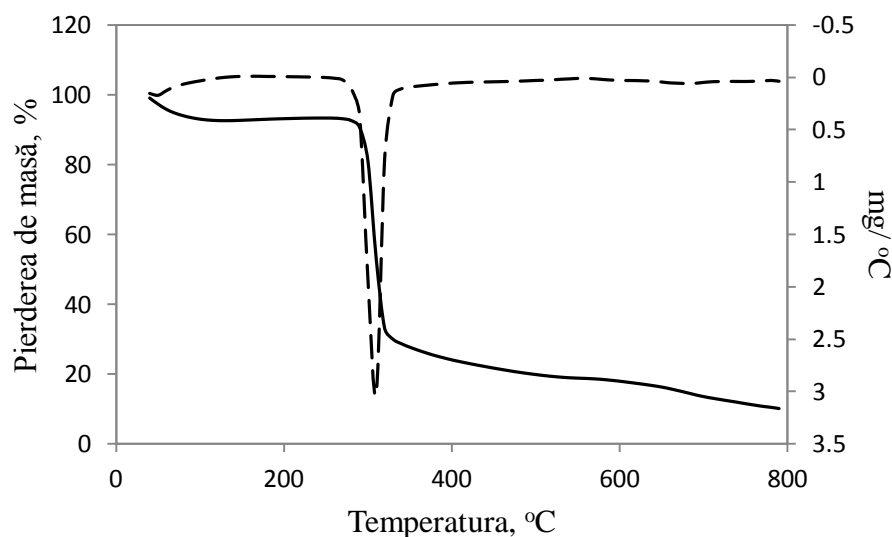


Figura 25. Termograma ATG a amidonului nemodificat.

Structura moleculară a amidonului este complicată. Cu toate acestea, numeroase investigații au fost realizate pentru a stabili nivelul de organizare din interiorul granulelor de amidon, cum ar fi difracția cu raze X, microscopia de forță atomică și cea cu transmisie de electroni. În forma nativă a amidonului, moleculele de amiloză și amilopectină sunt organizate în granule sub formă de straturi alternante semi-cristaline și amorfe. Stratul semi-cristalin constă din regiuni ordonate de helixuri duble formate de ramificațiile scurte ale amilopectinei. Regiunile amorfe ale straturilor semi-cristaline și ale straturilor amorfe sunt compuse din amiloză și ramuri neordonate de amilopectină<sup>205, 206</sup>. Cele două forme nu pot fi evidențiate prin DSC deoarece au valori similare pentru temperatură și entalpia de topire/decomplexare.

Temperatura și parametrii de entalpie au fost calibrați folosind topirea indiumului ( $T_m=156.6$  °C ,  $\Delta H = 28.45$  J/g). Pentru valorile acestor doi parametri, majorările indică o formare crescută a cristalelor, iar descreșterile au loc odată cu sporirea conținutului de amidon. O altă potențială cauză se regăsește în caracterul hidrofil al amidonului, ce ar putea determina o adeziune slabă cu PCL-ul hidrofob. Fenomele similare au fost identificate și de către Averous și colab.<sup>207</sup>, care au studiat proprietățile amidonului termoplastice și amestecurile acestuia cu policaprolactona. Tabelul redă faptul că  $T_m$  și  $\Delta H_f$  au scăzut odată cu majorarea conținutului de PCL/amidon. Reducerea lui  $T_m$  se datorează vâscozității inferioare a amidonului, comparativ cu cea a PCL<sup>208</sup>.

Măsurătorile de flux de căldură și temperatura de tranziție sunt căi de obținere a unor informații calitative și cantitative despre proprietățile unor compuși diverși. Proprietățile de amestecare ce pot fi prezise din măsurătorile DSC includ gradul de miscibilitate, gradul de interacțiune intermoleculară și gradul de cristalizare.

Ca un exemplu, o regulă generală pentru evaluarea miscibilității amestecurilor binare folosind DSC este după cum urmează: (a) nemiscibil- un amestec ce ilustrează două  $T_g$  și două  $T_m$  ce sunt independente din punct de vedere al compoziției, (b) miscibil, un amestec ce ilustrează un singur  $T_g$  și  $T_m$  în întregul interval de compoziție, (c) parțial miscibil, un amestec ce are două  $T_g$  și  $T_m$  ce sunt dependente de compoziție și un singur  $T_g$  și  $T_m$  într-un interval restrâns al compoziției. Profilele DSC al polimerilor individuali și ale compușilor finali sunt prezentate în figura 25, 26 și 27.

În tabelul 9 sunt prezentate cele mai importante caracteristici termogravimetrice ale amidonului pur și modificat.

Tabel 10. Caracteristici termogravimetrice ale amidonului pur și modificat.

Proba	$\Delta H$ topire J/g	$T^{\circ}_m$ onset	$T^{\circ}_{mmax}$	$\Delta H$ cristal J/g		$T^{\circ}_c$ onset		$T^{\circ}_c$ max	
				1*	2*	1	2	1	2
Amidon	2.97	30.71	28.23	2.63	2.92	40.94	40.55	44.32	43.68
SPCL2	13.13	30.71	28.05	14.38	12.54	51.81	40	55.51	43.87
SPCL3	22.6	23.06	18.72	25.35	24.10	52.20	45.11	58.28	50.18

\*Notație ce corespunde primului, respectiv celui de-al doilea ciclu de încălzire/răcire.

Se observă ca în cazul acestor compuși avem pic-uri distincte deoarece cristalizarea polimerului este distribuită uniform, fapt ce duce la topirea mai lentă a unor componente. De asemenea, existența ramificațiilor și sub-ramificațiilor contribuie la apariția diferitelor pante în punctul de topire, iar diferitele aranjamente și greutatea moleculare ale polimerului pot schimba modul cum aceste pante apar în profilul DSC.

Pentru fiecare copolimer sunt observate două endoterme distincte în ceea ce privește fenomenul de topire, fapt ce indică o fază de separare clară între domeniile hidrofobic și hidrofilic, atât punctul de topire,  $T_m$ , cât și căldura de topire ( $\Delta H_f$ ) sunt afectate de greutatea lor moleculară. Comparând ciclurile 1 și 2 care au același bloc de amidon, atât  $T_m$ , cât și  $\Delta H_f$  ale blocului PCL cresc odată cu creșterea greutății moleculare.

Pic-ul  $T_m$  din blocul amidonului din ciclul 2 este destul de larg cu  $\Delta H_f$  redusă, fapt ce indică dificultatea în cristalizarea segmentului de amidon, deoarece este înconjurat de segmentul de greutate moleculară mare al PCL.

Rezultate similare au fost observate în alte sisteme copolimerice amifile.<sup>209</sup> Prezența componentei amorfe AGU poate influența într-un mod puternic comportamentul ratei de cristalinizare al PCL prin faptul că acest component are un  $T_g$  mai mare decât temperatura onset de cristalinizare a PCL. Acest fapt ar duce la o descreștere a ratei de cristalinizare, în special atunci când conținutul compusului amorf crește.

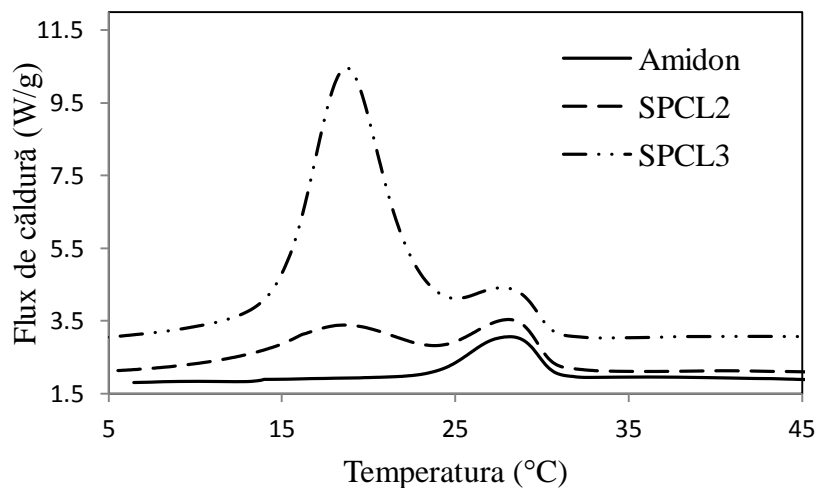


Figura 26. Primul ciclu de încălzire de la -50°C până la 100°C la o rată de 10°C/min

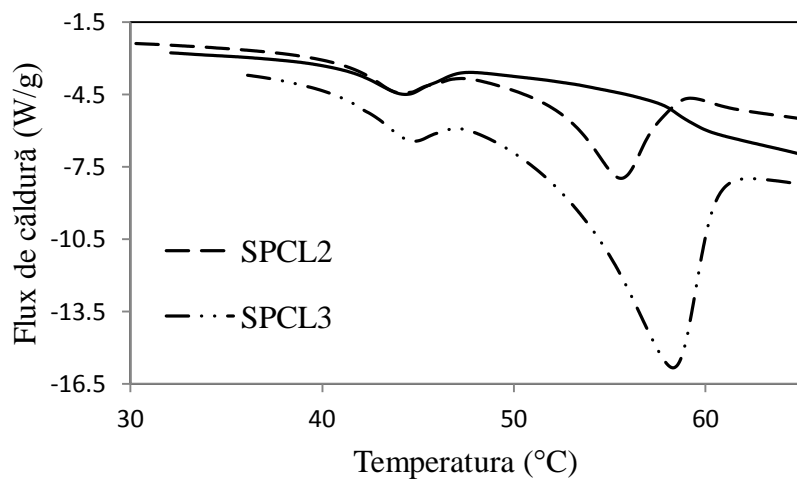


Figura 27. Primul ciclu de răcire de la 100°C până la -100°C la o rată de 10°C/min

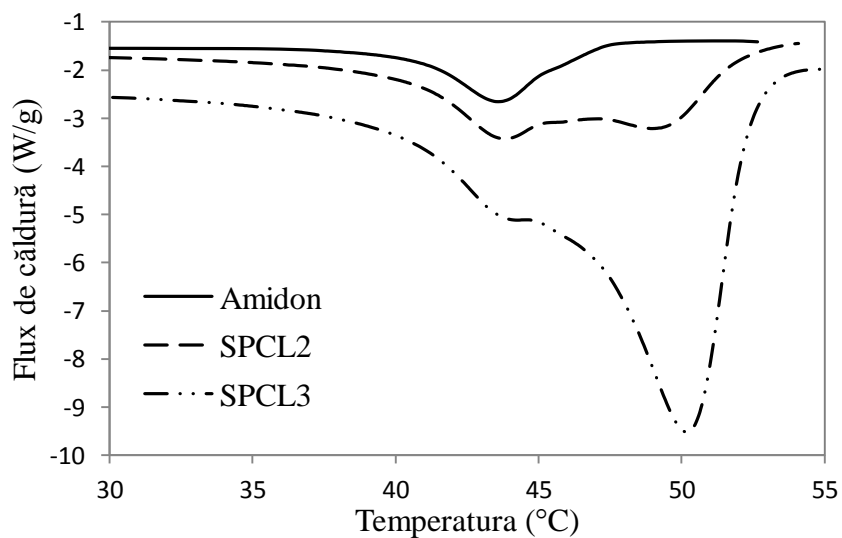


Figura 28. Al doilea ciclu de răcire de la 100°C până la -100°C la o rată de 10°C/min

O deplasare distinctă apare în curba DSC, după încălzirea amidonului. Considerând în timpul răcirii, etrapolarea celui de-al treilea segment al diagramei teoretice pentru un polimer semicristalin, se poate atribui această deplasare tranziției vitroase a amidonului. Pentru amidonul din grâu și amidonul din porumb cu conținut ridicat de amiloză, s-au localizat tranzițiile vitroase în intervalul 173 - 183 °C. Nu s-au observat alte schimbări în comportamentul acestei polizaharide la temperaturi mai mari <sup>210</sup>.

Apa acționează ca un plastifiant în ceea ce privește lanțurile de amiloză și amilopectină ale amidonului, afectând în mod dramatic și temperatura de tranziție vitroasă. Astfel, cu cât este mai mare conținutul de apă, cu atât este mai mare și  $T_g$ .

Gelatinizarea cu apă a amidonului din grâu are loc în intervalul 65-125°C, procedeu prin care cristalinitatea polimerului este distrusă gradual. Un amidon negelatinizat ar fi produs un pic endotermic în acel interval, dar nu a fost nici unul, fapt ce a indicat ca gelatinizarea completă a avut deja loc.

Cantitatea de dublu helix în amidonul nemodificat ar trebui să fie strâns corelată cu conținutul în amilopectină, cristalinitatea crescând odată cu aceasta<sup>211</sup>, amidonul cu conținut variat de amiloză indică că temperaturile de gelatinizare cresc cu creșterea cantităților de amiloză. Un studiu pe 11 tipuri de amidon cu proprietăți variabile de gelatinizare a arătat că polizaharida cu temperaturi scăzute de gelatinizare are material amorf mai mult și mai puțin cristalin comparativ cu polimerii cu temperaturi ridicate de gelatinizare. O explicație a acestui fenomen este că perfecțiunea cristalelor ar putea fi principalul mecanism ce controlează temperatura de gelatinizare. Alți factori, cum ar fi cantitatea de amidon deteriorat, tehnici de izolare și varierea condițiilor climatice în timpul cultivării, influențează de asemenea această temperatură. În ceea ce privește amidonul, un biopolimer parțial cristalin, fenomenul de topire nu poate începe înainte de a depăși regiunea caracteristică tranziției vitroase.

Nu a fost nici o deplasare semnificativă în ceea ce privește  $T_g$  –ul PCL în amestec indicând că structura cristalină a poliesterului nu este afectată de metoda de polimerizare cu amidonul. Proprietățile fizice ale amidonului sunt influențate de raportul amiloză/amilopectină. În timpul gelatinizării, granulele de amidon se umflă și formează particule de gel. În general, granulele umflate sunt bogate în amilopectină, în timp ce amiloza liniară difuzează în afara granulelor și realizează faza continuă din exteriorul acestora. Termenul de retrogradare este folosit pentru a descrie schimbările ce au loc în timpul răcirii și depozitării amidonului gelatinizat. Apariția cristalinității în gelurile de amidon este atribuită gelatinizării și cristalizării fracției de amiloză.

Rezultatele DSC indică că creșterea procentajului de PCL în compus rezultă într-o creștere a valorii temperaturii de topire, în timp ce cea de cristalizare a scăzut, comportament așteptat, datorită  $T_g$  –ului mare din structura amorfă a amidonului versus structura semi-cristalină a PCL.

Deoarece tranziția vitroasă este măsura mobilității moleculare, o valoare scăzută a acesteia indică o structură mai puțin compactă de amidon în prezența PCL.

Acest fapt este un alt indiciu al unei forme de interacție dintre cei doi polimeri.  $\Delta H_m$  și  $\Delta H_c$  din acești copolimeri au arătat o descreștere liniară odată cu creșterea concentrației de amidon.

Atât din spectrele FT-IR și RMN, cât și în DSC s-a văzut o creștere a intensității pic-ului corespunzător caprolactonei pentru proba SPCL2, ceea ce a dovedit o bună corelare a acestor analize.

#### IV.2.1.3. Analiza suprafeței prin XPS și Tof-Sims

Reziduurile datorate procesului de sinteză au fost identificate cu ajutorul XPS-ului și a Tof-Sims-ului. Astfel, prin XPS s-au detectat alcoizii de aluminiu generați *in situ* în urma reacției grupărilor –OH ale amidonului cu  $AlEt_3$ .

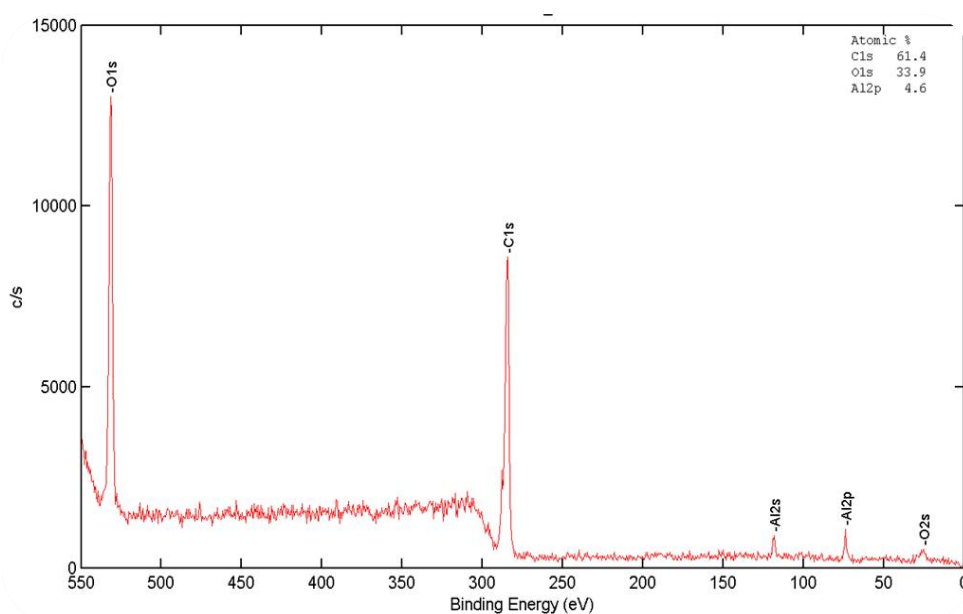


Figura 29. Studiul XPS pentru proba SPCL2.

Procentajul atomic (%) al elementelor detectate în suprafața atât a amidonului de plecare cât și a celui modificat cu caprolactonă sunt prezentate în tabelul 11.

Tabel 11. Procentajul atomic al elementelor în amidonul pur și cel modificat.

		Procentaj atomic (%)	
Amidon	C	60.2	
	O	39.8	
SPCL2	C	61.4	
	O	33.9	
	Al	4.6	

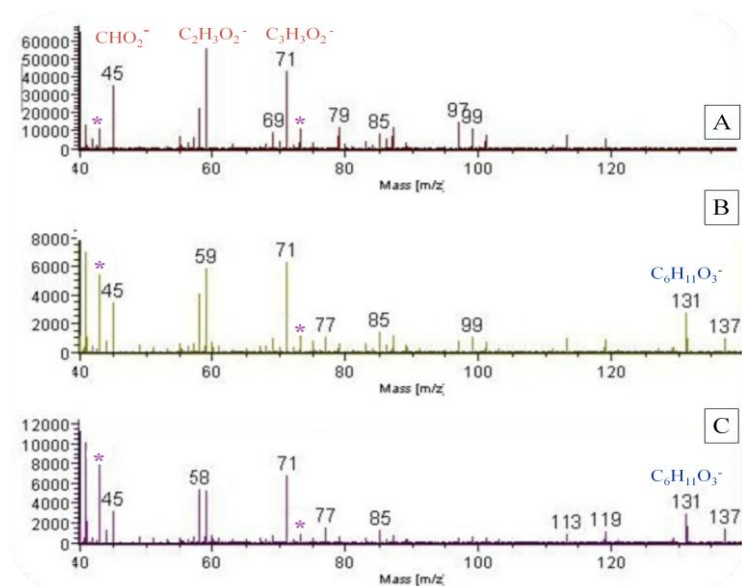


Figura 30. Spectrul TOF-SIMS, modul negativ pentru  
A- amidon, B și C- SPCL2, respectiv SPCL3

Cu toate că copolimerii SPCL2 și SPCL3 arată o compoziție de suprafață similară, pic-urile caracteristice ale amidonului și ale PCL prezintă diferențe superficiale în ceea ce privește intensitatea lor relativă.

Din deconvoluția XPS a pic-ului C1s pentru amidon și SPCL2 se observă modificări în suprafața a pic-urilor caracteristice.

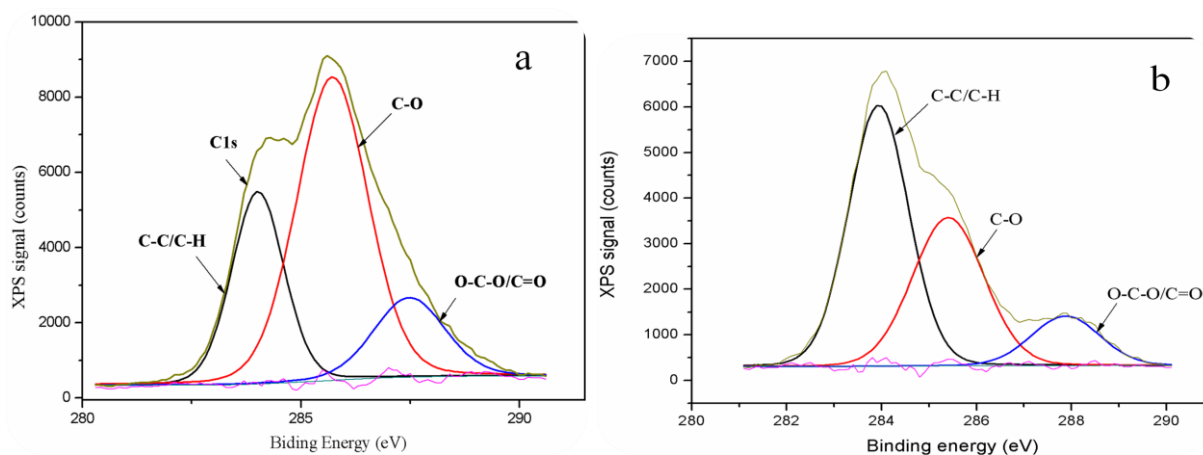


Figura 31. Deconvoluția C1s pentru a) amidon, b) SPCL2

Tabel 12. Normalizarea intensității pentru pic-ul caracteristic PCL, 131, în modul negativ ( $C_6H_{11}O_3^-$ ) și pentru pic-ul caracteristic PCL, 115, în modul pozitiv ( $[M+H]^+$ ).

Probă	Pic 131	Pic 115	Cuantificare
SPCL2	$3.3 \pm 0.1$	$5.4 \pm 1.5$	$0.6 \pm 0.0$
SPCL3	$3.1 \pm 0.7$	$4.0 \pm 1.7$	$0.8 \pm 0.0$

Cuantificarea atât pentru  $C_6H_{11}O_3^-$  cât și pentru  $[M+H]^+$  arată că diferențele dintre SPCL2 și SPCL3 sunt foarte mici și ca suprafața este dominată de semnatura amidonului, a se vedea raportul 58 ( $C_2H_2O_2^-$ )/59 ( $C_2H_3O_3^-$ ).

#### IV.2.1.4. Analiza tensiunii superficiale

Tensiunea superficială a fost obținută prin metoda picăturii, la interfața lichid-aer, în același mod descris anterior la capitolul III.1.2.2.

Tabel 13. Valorile unghiului de contact la interfața lichid-aer.

Nume probă	$\gamma$ ( $mN \cdot m^{-1}$ ) în funcție de conc. soluției (1mg/ml)	$\gamma$ ( $mN \cdot m^{-1}$ ) DMSO
SPCL2	42.05	
SPCL3	38.2	43
Amidon	44	

Cu cât este mai mică valoarea pentru probele analizate comparativ cu valoarea DMSO-ului cu atât produșii sunt mai hidrofobi, analiză corelată și cu gradul de substituție obținut din analiza XPS.

### IV.3. Concluzii

- Amestecurile polimerice și asocierile chimice, sub formă de copolimeri bloc sau grefați între amidon și poliesterii alifatici, cum e cazul poli( $\epsilon$ -caprolactona), prezintă un interes deosebit din punctul de vedere al obținerii unor noi materiale biodegradabile.
- S-a realizat reacția de grefare a amidonului prin polimerizarea cu deschidere de ciclu a  $\epsilon$ -caprolactonei.
- În această reacție, grupările hidroxil ale amidonului funcționează ca situri de inițiere.
- Cataliștii comuni pentru ROP, cum e cazul țin octoatului sau a isopropoxidului de aluminiu, duc la eficiente de grefare scăzute (0-14%).
- Picurile  $\hat{a}$ PCL caracteristice ( $3300 - 3700$ ,  $1737$ ,  $1725$ ,  $850-1480$ , și  $720$ )  $\text{cm}^{-1}$  apar în spectrele FIR, alături de absorbanța largă a grupărilor O-H de  $3200-3700$   $\text{cm}^{-1}$ .
- Determinarea compoziției copolimerului s-a realizat prin RMN plecând de la intensitățile semnalelor pentru caprolactonă și pentru unitățile structurale ale amidonului.
- Eficiența grefării este dificil de determinat în cadrul acestui sistem prin tehnici de analiză standard, cum ar fi RMN-ul, datorită solubilității scăzute a produșilor în solvenții organici standard.
- Proprietățile mecanice ale amestecului amidon/PCL devin slabe odată cu creșterea conținutului de amidon. Acest fapt se datorează incompatibilității dintre amidonul hidrofilic și PCL hidrofobic, precum și adeziunii interfaciale scăzute dintre cei doi compuși.
- Se observă ca în cazul acestor compuși avem picuri distinctive deoarece cristalizarea polimerului este distribuită uniform, fapt ce duce la topirea mai lentă a unor componente. De asemenea, existența ramificațiilor și sub-ramificațiilor contribuie la apariția diferitelor pante în punctul de topire, iar diferitele aranjamente și greutatea moleculară ale polimerului pot schimba modul cum aceste pante apar în profilul DSC.
- Pentru fiecare copolimer sunt observate două endoterme distincte în ceea ce privește fenomenul de topire, fapt ce indică o fază de separare clară între domeniile hidrofobic și hidrofilic, atât punctul de topire,  $T_m$ , cât și căldura de topire ( $\Delta H_f$ ) sunt afectate de greutatea lor moleculară.
- Prezența componentei amorfe AGU poate influența într-un mod puternic comportamentul ratei de cristalinizare al PCL prin faptul că acest component are un  $T_g$  mai mare decât temperatura onset de cristalinizare a PCL. Acest fapt ar duce la o descreștere a ratei de cristalinizare, în special atunci când conținutul compusului amorf crește.
- Reziduurile datorate procesului de sinteză au fost identificate cu ajutorul XPS-ului și a Tof-Sims-ului.

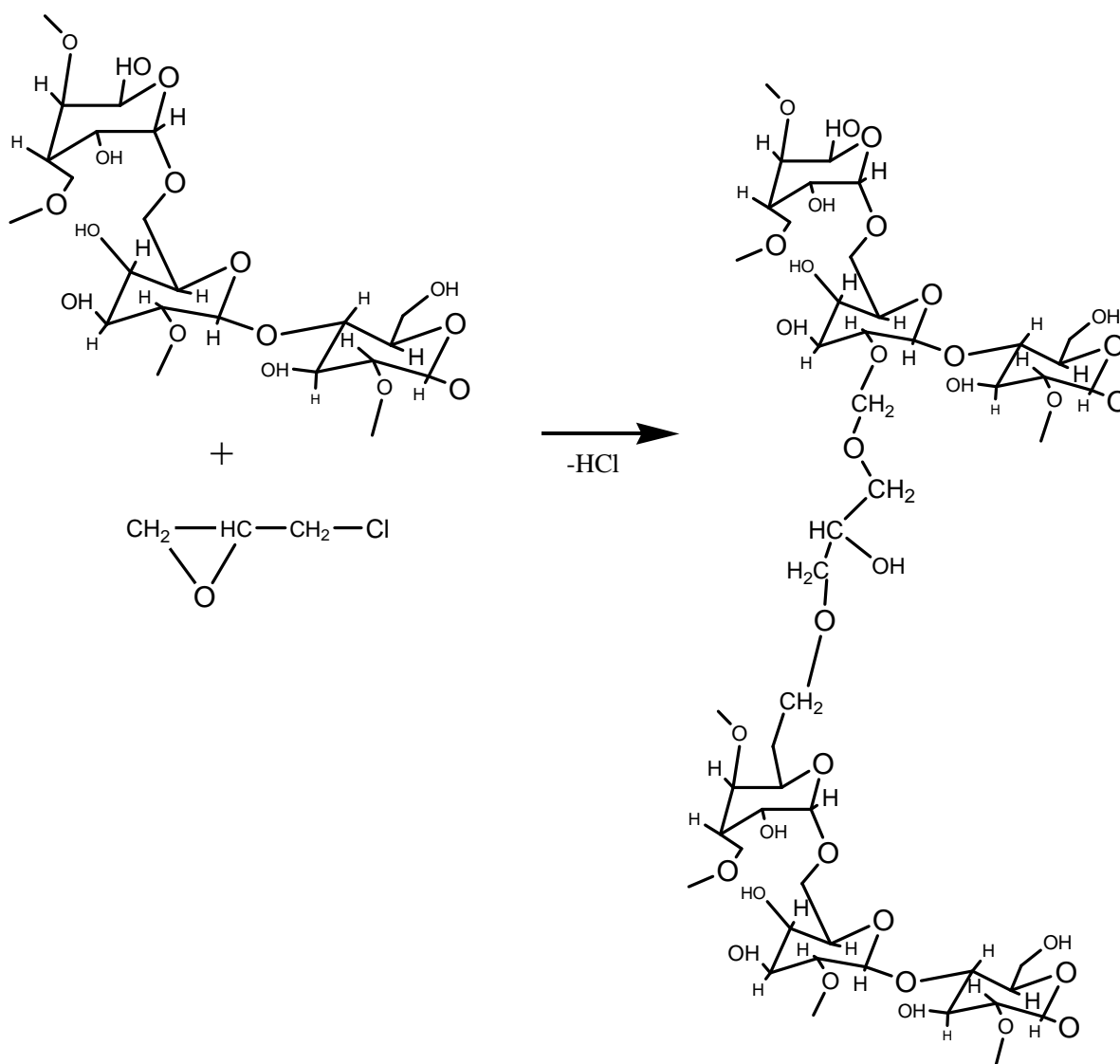


## CAPITOLUL V

### OBȚINEREA HIDROGELURILOR PE BAZĂ DE AMIDON

#### V.1. Obținerea hidrogelurilor pe bază de amidon prin reticulare cu epiclorhidrină

##### V.1.2. Principiul reacției



Schema 1. Mecanismul reacției de reticulare cu epiclorhidrină.

Hidrogelurile au fost pregătite după următoarea procedură generală: la o soluție polimerică de 12% amidon (0.3 g, 1.85 mmol) a fost adăugată o cantitate determinată de soluție

NaOH 1N și s-a realizat o agitare mecanică de cel puțin 10 minute. NaOH a fost folosit într-un raport masic față de epiclорhidrină de 1:1.

Înainte de a adăuga agentul de reticulare, se elimină aerul prezent sub formă de bule cu ajutorul unei bai cu ultrasunete. Se adaugă agentul de reticulare, se omogenizează timp de 1 oră, după care amestecul se depune între două plăci de sticlă, la etuvă pentru un timp corespunzător programului experimental.

Filmele se imersează în apă distilată pentru îndepărtarea compușilor nereacționați, cu schimbarea acestora până ce pH-ul apei de spălare coincide cu cel al apei distilate și se continuă cu imersarea în acetonă a hidrogelului până când toată apa este înlocuită.

Terminologia folosită în cele ce urmează este următoarea: HS- hidrogel pe bază de amidon nemodificat, HAPg- hidrogel pe bază de amidon modificat prin introducerea de triple legături.

Tabel 1. Programul experimental folosit pentru obținerea hidrogelurilor reticulate cu epiclорhidrină.

Cod probă	Timp de reticulare (ore)	Temperatura de reticulare (°C)	Raport molar grupări –OH primare/CA	
HS35	5	35°	10:1	
HS40		40°		
HS50		50°		
HS55		55°		
HS1	1	50°	10:0.25	
HS2	2		10:0.5	
HS3	3		10:1.5	
HS4	4			
HS5	5			
HAPg35	5		35°	10:1
HAPg40		40°		
HAPg50		50°		
HAPg55		55°		
HAPg1	1	50°	10:1	
HAPg2	2			
HAPg3	3			10:0.25
HAPg4	4			10:0.5
HAPg5	5			10:1.5

\* soluția polimerică de concentrație 12%.

Reacția amidonului cu EPCI duce la formarea de digliceroli ai amidonului, care sunt foarte rezistenți la pH și la tensiuni mecanice datorită formării legăturilor eterice dintre reticulări și grupările hidroxil din polizaharid.

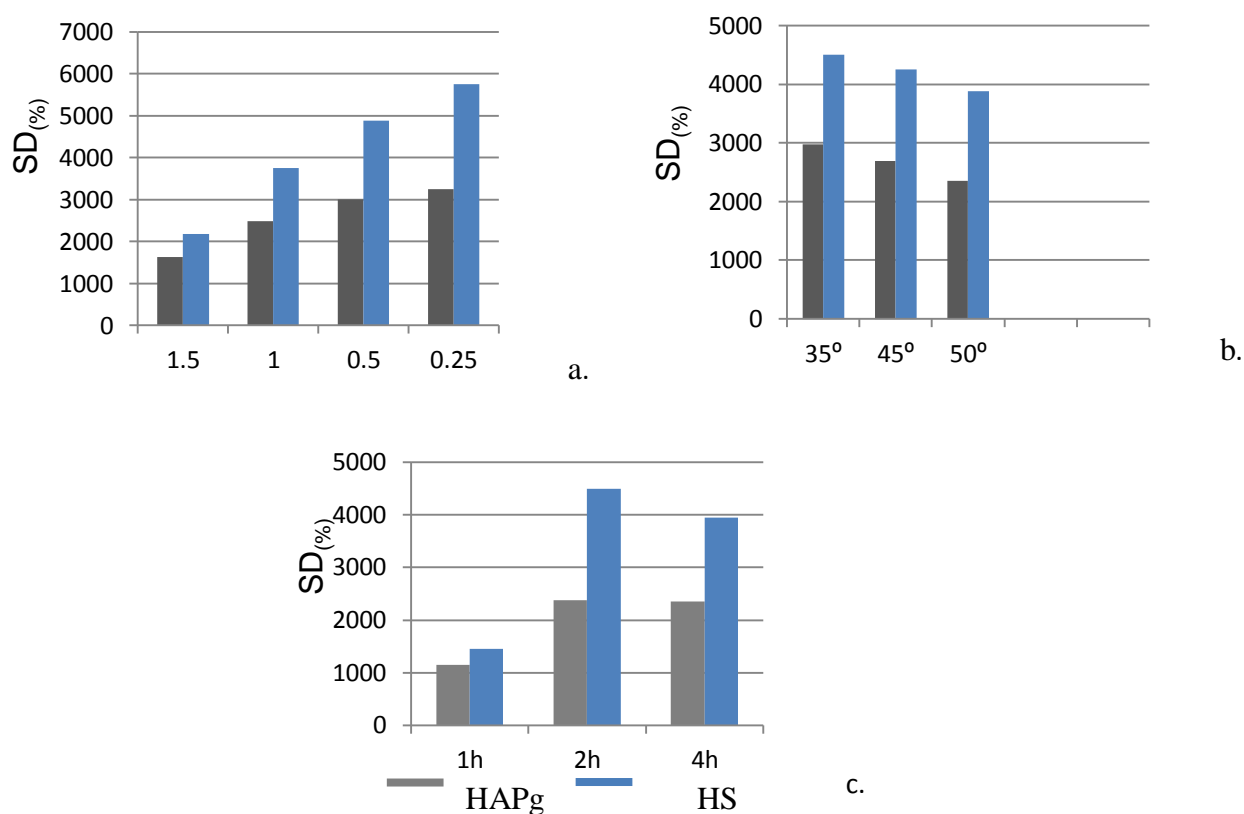


Figura 1. Gradul de umflare maxim (SD) pentru hidrogelurile obținute în urma varierii a. cantității de agent de reticulare, b. temperaturii, c. timpului de reticulare.

Se observă din reprezentările gradelor de umflare că acestea cresc odată cu scăderea cantității de agent reticulant și scad odată cu creșterea temperaturii de reticulare.

Pentru probele pe bază de amidon hidrofobizat prin introducerea triplelor legături pe lanțul său s-a observat un grad de umflare mai scăzut comparativ cu cel al amidonului nemodificat. Și în cazul acestor compuși, este evidentă dependența capacității lor de retenție a apei, de cantitatea de agent reticulant, durata și timpul de reticulare.

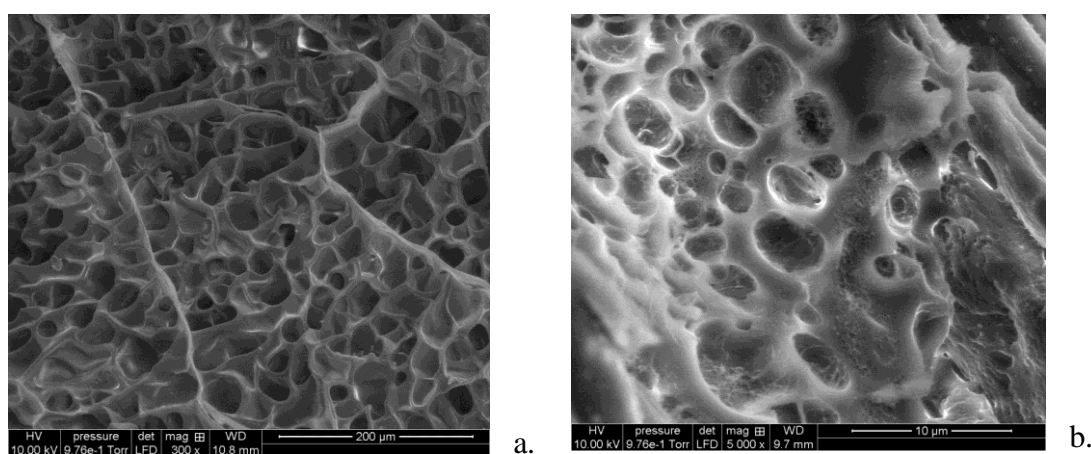


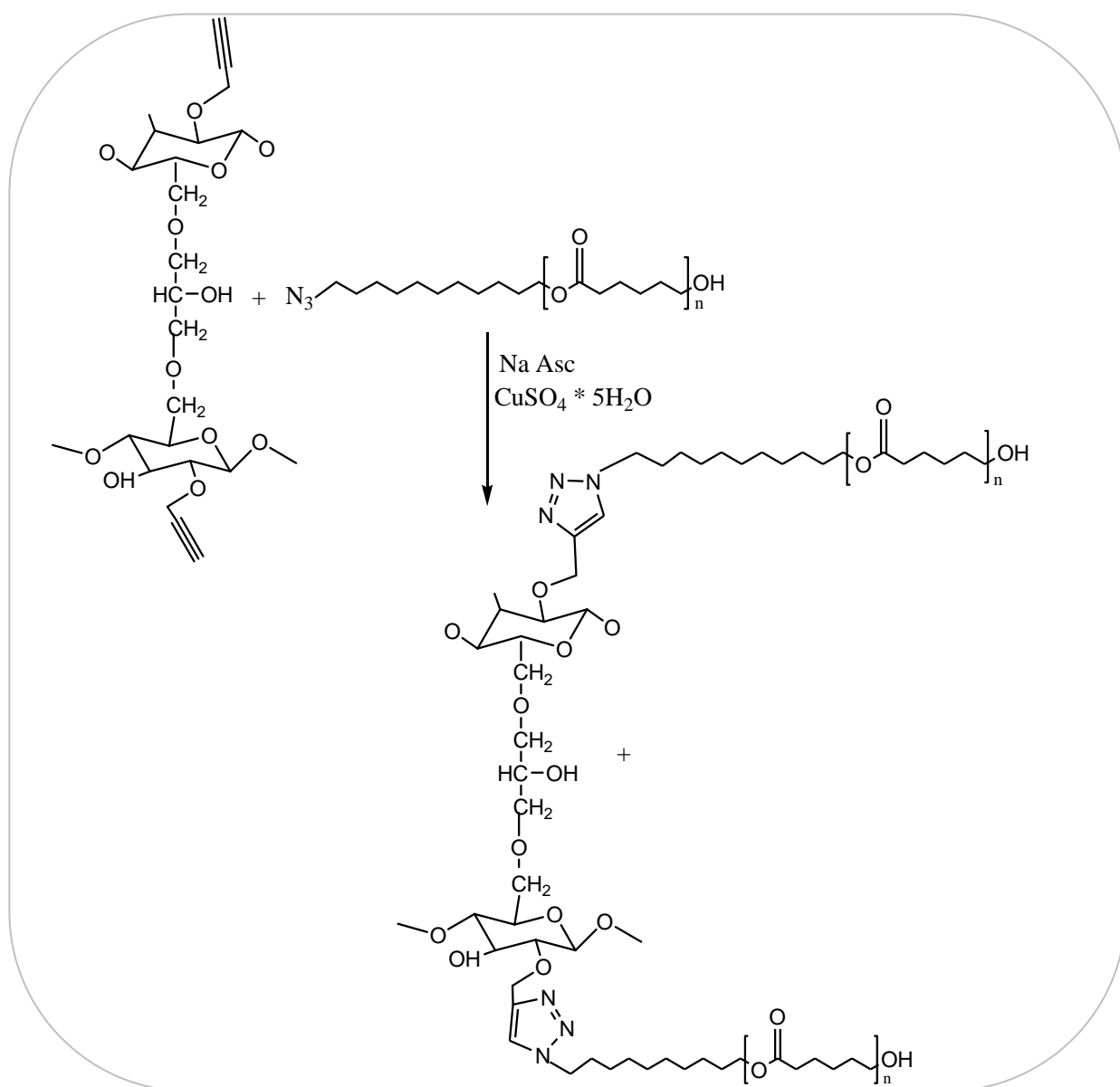
Figura 2. Imagini SEM pentru a. HAPg ret CA\* b. HAPg ret EPCL.

\* sisteme descrise în capitolul V.3

Imaginile SEM ale amidonului propargilat reticulat cu epiclorhidrină și acid citric au arătat structuri asemănătoare, poroase cu mici diferențe. Astfel, hidrogelul reticulat cu acid citric a prezentat o structură deosebit de uniformă, cu pori de dimensiuni apropiate, mai mici de 50μm. Hidrogelul reticulat cu EPCL, în schimb are pori de dimensiuni mai mici de 10μm însă aceștia nu sunt distribuiți la fel de uniform ca în exemplul de mai sus.

## V.2. Modificarea chimică a hidrogelurilor pe baza de amidon funcționalizat cu grupare de tip alchină, prin reacția cu PCLN<sub>3</sub> *via* click chemistry

### V.2.1. Principiul reacției



Schema 2. Mecanismul reacției „click chemistry” dintre PCL-N<sub>3</sub> și hidrogelul pe bază de amidon funcționalizat cu triple legături, reticulat cu epiclorhidrină.

Urmărind reacția tipică de grefare prin click chemistry a PCL-N<sub>3</sub> pe lanțul de amidon descrisă mai sus avem următorul protocol experimental: hidrogelul pe bază de amidon propargilat (0.6 mmol), reticulat cu epilorhidrină se lasă sub agitare peste noapte să se umfle în apă, apoi se adaugă azido-PCL (0.6 mmol) dizolvată în DMF; amestecul de apă și DMF (10 ml) se menține la raportul de 1:1. Sunt apoi adăugate soluții proaspăt preparate de ascorbat de sodiu (0.12 mmol, 120 μL, 1M) în apă și o soluție 75% de sulfat de cupru II hidratat cu 5 molecule de apă (8 μL, 0.024 mmol). Amestecul a fost agitat în absența luminii, timp de 24 de ore, sub atmosfera inertă, la 60° C. Produsul final a fost precipitat în apă și dializat într-o soluție apoasă de 0.1 M EDTA timp de 5 zile folosind o membrană celulozică (Orange Scientific, MWCO: 3500 Da) pentru a îndepărta catalizatorul. Apa a fost înlocuită de două ori pe zi. Produsul final a fost liofilizat.

## V.2.2. Analiza rezultatelor obținute

### V.2.2.1. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR

Spectrul FT-IR al hidrogelurilor pe baza de amidon funcționalizat cu grupare de tip alchină prin reacția cu PCLN<sub>3</sub> *via* click chemistry, notate cu HCC, a arătat ca și în cazul reacției amidonului propargilat cu poliesterul, benzile caracteristice lanțurilor de PCL prin prezența grupărilor esterice la 1733 cm<sup>-1</sup>. S-a remarcat însă și un pic mic corespunzător grupării azidice datorită prezenței PCLN<sub>3</sub> nereacționat în ochiurile hidrogelului.

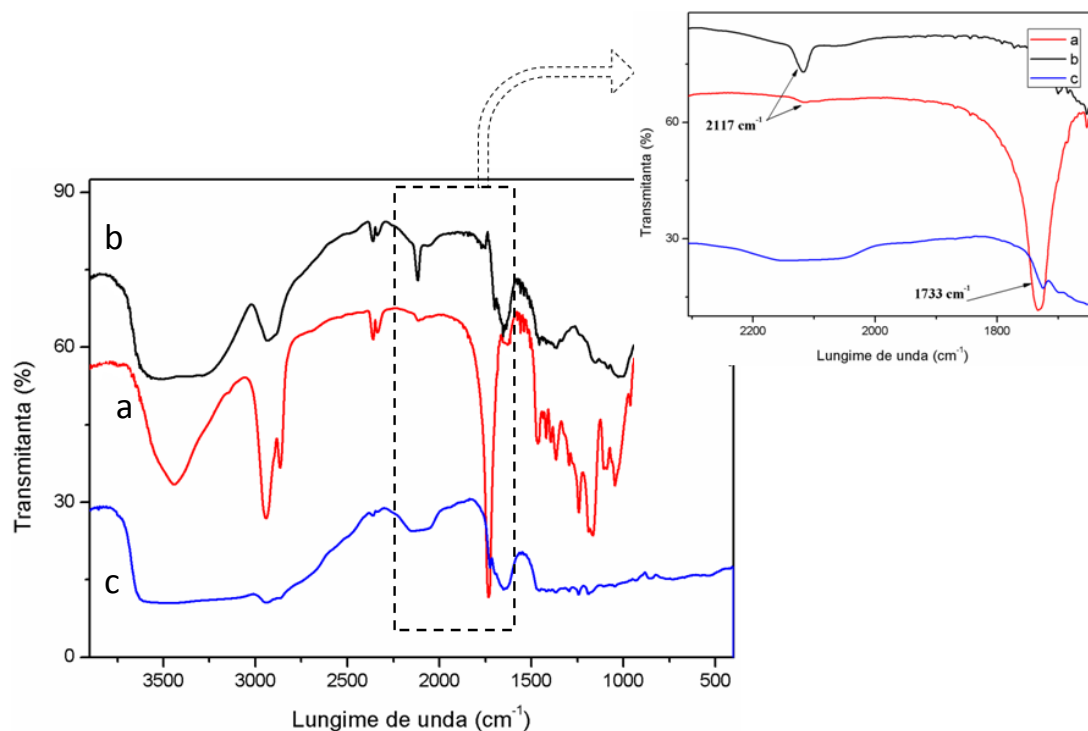


Figura 3. Spectru FT-IR pentru a.HCC, b. HAPg, c. HA

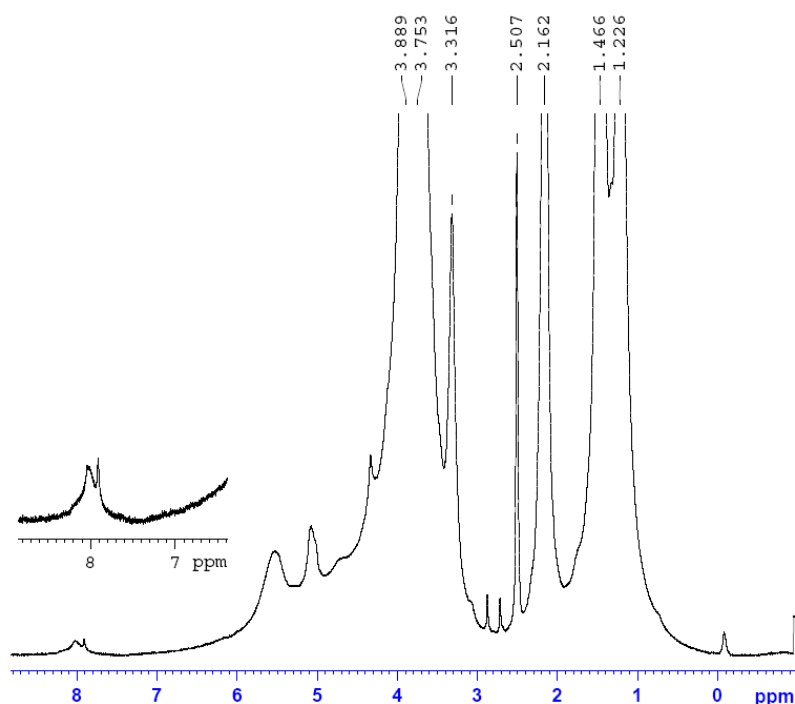


Figura 4. Spectrul RMN  $^1\text{H}$  HR-MAS (DMSO) pentru proba HCC.

RMN-ul  $^1\text{H}$  HR-MAS a arătat prezența grupării triazolice, astfel grefarea PCL- $\text{N}_3$  pe hidrogelul pe bază de amidon modificat cu triple legături a avut loc.

S-au realizat amestecuri de diferite concentrații apă/DMF în încercarea de a scoate PCL nereacționat, prins în rețeaua hidrogelului.

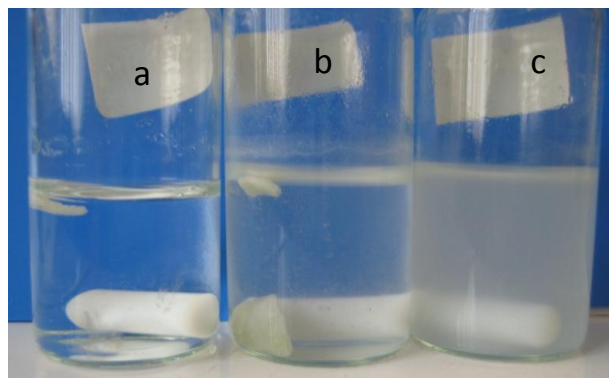


Figura 5. Comportamentul hidrogelului HCC în a.70/30% (v/v) apă/DMF, b.amestec 50/50% (v/v) apă/DMF, c. amestec 30/70% (v/v) apă/DMF.

După 14 zile de agitare continuă în amestecuri mai sus menționate s-a observat că ieșirea PCL din ochiurile hidrogelului a fost facilitată de proporția mai mare a DMF-ului, fapt ce a condus la o colorare intensă a mediului de dizolvare datorită lanțurilor de poliester și la revenirea la proprietățile de hidrogel a compusului. De asemenea spectroscopia FT-IR a confirmat existența cuplajului chiar și după purificarea mai sus menționată.

### V.2.2.3. Analiza morfologică

În figura 6 sunt ilustrate imaginile SEM pentru HCC spălate cu DMF și liofilizate și în figura 7 aceleași hidrogeluri uscate din acetonă când s-a constatat ca această metoda de uscare este prea dură, ducând la o morfologie fără pori a hidrogelurilor.

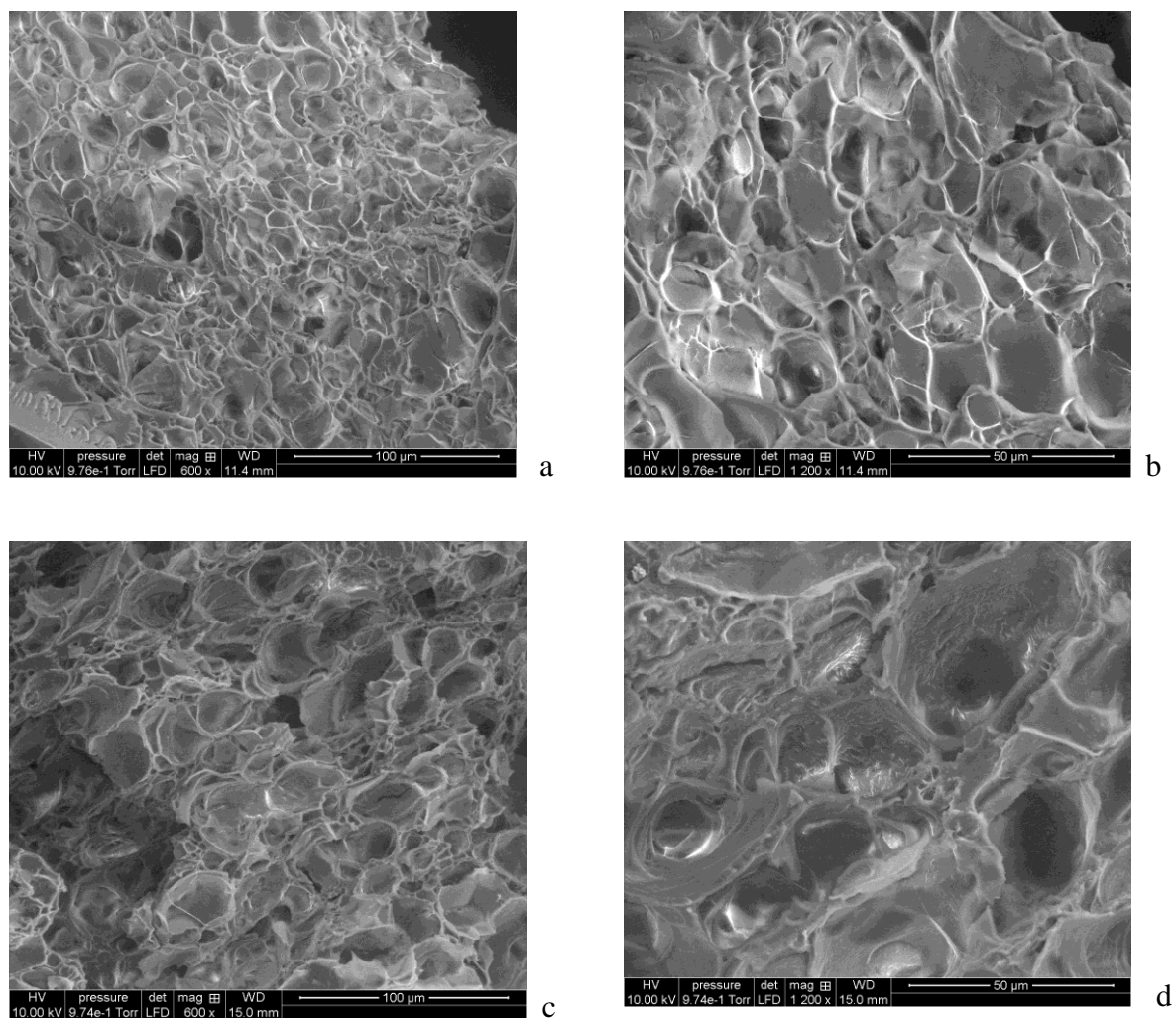


Figura 6. Imagini SEM a,b. HAPg , c,d.HCC.

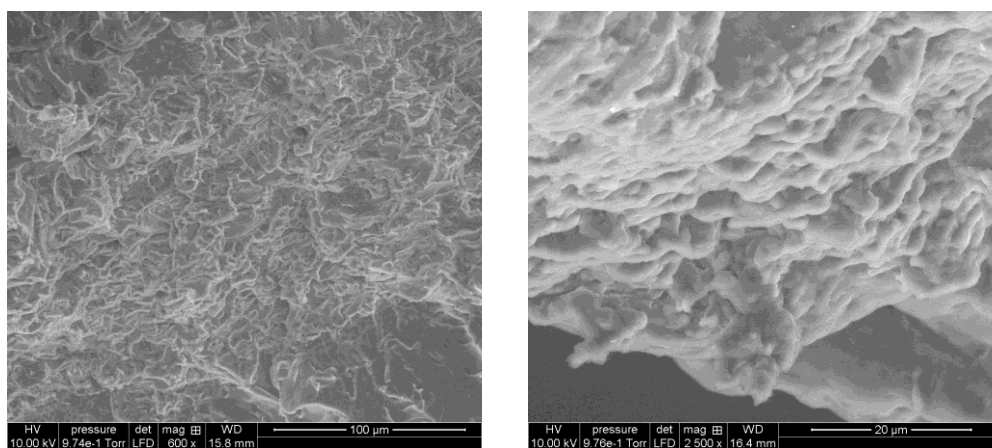


Figura 7. Imagini SEM pentru HCC uscate din acetonă.

#### V.2.2.4. Analiza termică

Stabilitatea termică a copolimerilor a fost evaluată folosind analiza termogravimetrică (ATG). Degradarea termică a policaprolactonei a fost studiată de mulți cercetători, Persenaire și colab.<sup>212</sup> propunând un mecanism de degradare în două etape, mai întâi prin ruperea la întâmplare a lanțului de PCL printr-o reacție de piroliză, urmată de formarea  $\epsilon$ -caprolactonei ca rezultat al scindării în urma procesului de degradare<sup>213</sup>. Aoyagi și colab.<sup>214</sup> au propus un mecanism de degradare într-o singură etapă, în care polimerul se degradează prin îndepărtarea specifică a monomerului de la grupările terminale. Așadar, mecanismul de degradare termică a PCL este ambiguu și controversat<sup>215</sup>. Figura 8 arată curbele de pierdere masică pentru hidrogelul pe bază de amidon propargilat, pentru PCL și pentru produsul final, obținut *via* „click chemistry” între polimerii menționați mai sus. Temperatura inițială de degradare a PCL este mai mică în copolimerul final față de polimerul simplu.

PCL se degradează într-o singură etapă (în jurul valorii de 400 °C) implicând manifestarea simultană a două tipuri de reacție, și anume scindarea aleatorie a lanțului și desfacerea hidroxilului terminal, ducând la formarea  $\epsilon$ -caprolactonei<sup>216,217</sup>. Figurile de mai jos arată că degradarea celor doi polimeri este neuniformă.

Figura 8a. arată termograma ATG a hidrogelului pe bază de amidon propargilat. De menționat ca această curbă este similară cu cea a amidonului nativ, dar proprietatea sa termică a fost afectată în direcția îmbunătățirii cu 20 °C a temperaturii de degradare. Descompunerea nu a fost completă până când temperatura nu a ajuns la 600 °C .



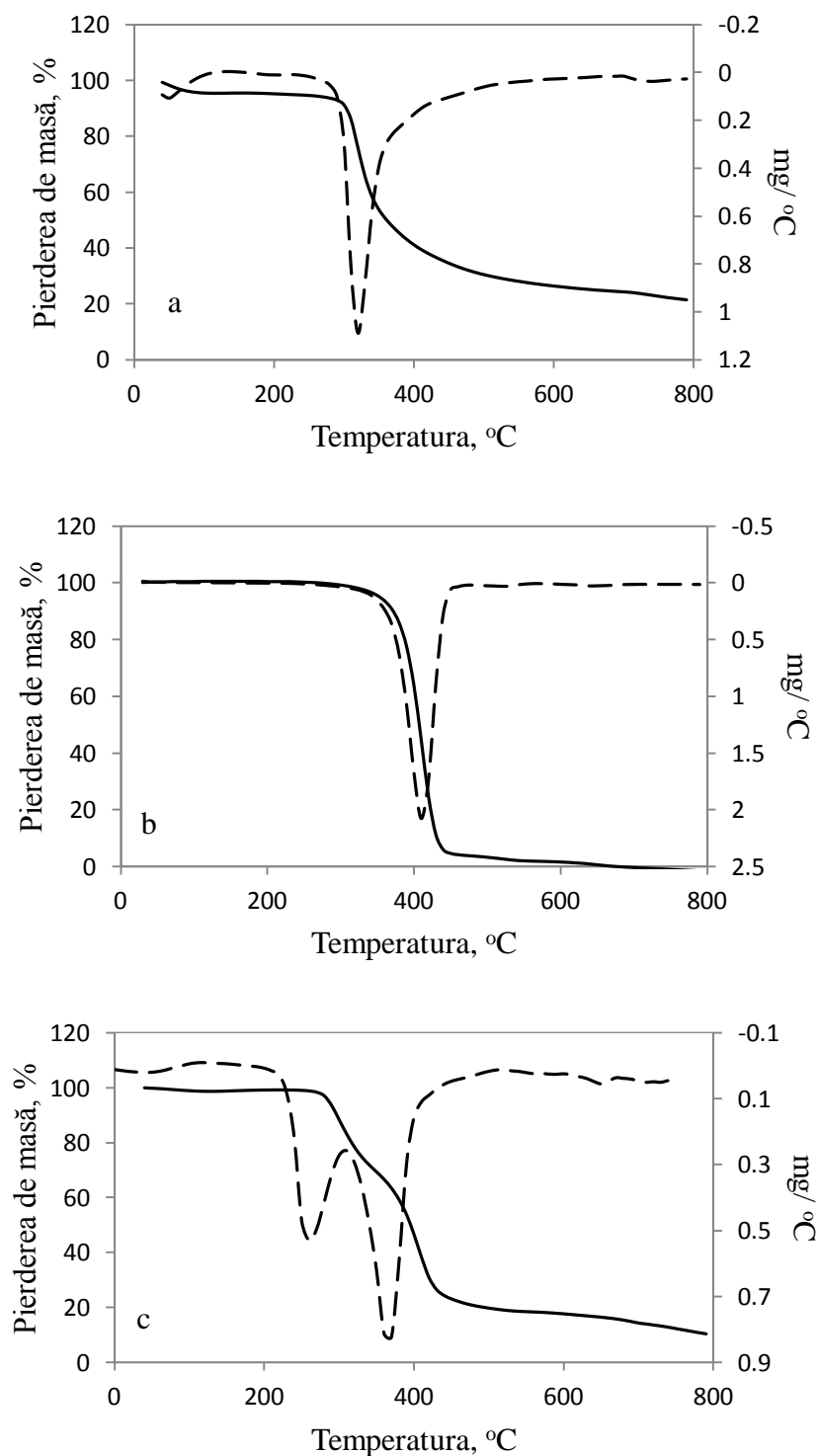


Figura 8 . Profilele ATG și derivatele lor pentru a. HAPg, b. PCL, c. CCH

Tabel 2. Valorile temperaturilor de degradare a polimerilor de plecare si a produsului final.

Probă	HAPg	PCL	CCH	
Temp (°C)	319.26	411.45	296.74	407.62

### V.3. Concluzii

- S-au obținut hidrogeluri pe bază de amidon și amidon modificat, reticulate atât cu epichelorhidrină cât și cu acid citric.
- S-a greșit prin procedeul click chemistry, PCLN<sub>3</sub>, pe hidrogelurile pe bază de amidon modificat cu triple legături.
- În urma greșirii s-a remarcat în spectrul FT-IR un pic mic corespunzător grupării azidice datorită prezenței PCLN<sub>3</sub> nereacționate în ochiurile hidrogelului.
- Prezența inelului triazolic din spectrul RMN <sup>1</sup>H HR-MAS a confirmat de asemenea reușita reacției.
- S-au realizat amestecuri de diferite concentrații apă/DMF în încercarea de a scoate PCL nereacționat, prins în rețeaua hidrogelului, ieșirea lanțului hidrofobic din ochiurile hidrogelului fiind facilitată de proporția mai mare a DMF-ului din amestec.

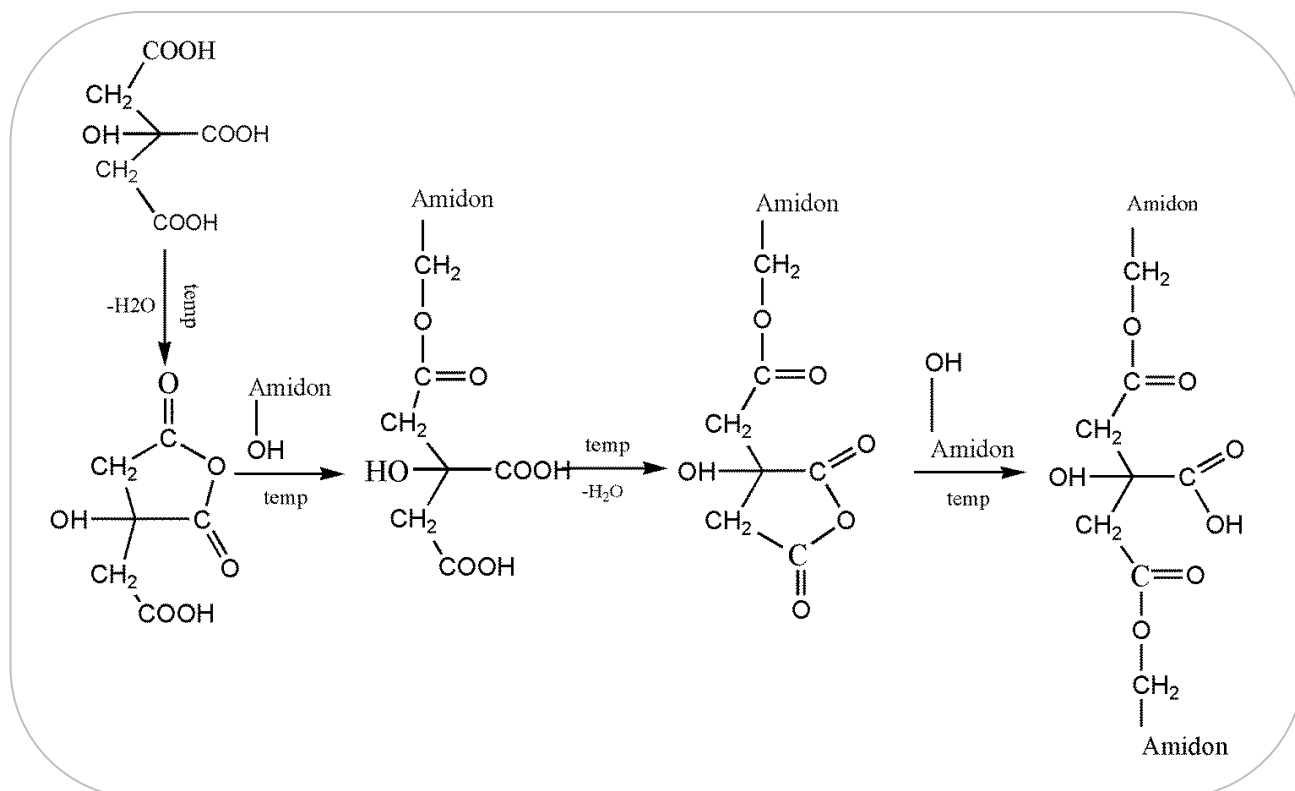
### V.3. Obținerea hidrogelurilor pe bază de amidon prin reticulare cu acid citric

Amidonul nativ nu este potrivit pentru a fi utilizat ca sistem de eliberare medicamentoasă controlată, din cauza curgerii și compresibilității modeste și, cel mai important, datorită proprietăților de eliberare rapidă ce rezultă din umflarea substanțială în medii apoase, alături de degradarea enzimatică accelerată prin  $\alpha$ -amilază în fluide fiziologice. Pentru a depăși aceste limitări și pentru a extinde domeniul aplicativ al amidonului ca exponent al eliberării susținute de medicamente, proprietățile acestuia pot fi configurate prin modificări fizice (retrogradare) și chimice (reticulare) sau prin hidroliză enzimatică (dextrine).

Mecanismul și randamentul de eliberare a medicamentului dintr-o matrice polimerică hidrofilă poate depinde de permeabilitatea apoasă, de umflarea polimerului, dizolvarea și difuzia medicamentului și de eroziunea matricii <sup>218</sup>. Acești factori pot afecta structura și rezistența rețelei gelului, din cauza proprietăților fizice ale polimerului în sine, a interacțiunilor lanț-lanț, respectiv lanț-solvent a polimerului. Amidonul conține două tipuri de hidroxili: primar (6-OH) și secundar (2-OH și 3-OH). Aceștia sunt capabili de a reacționa cu reactivi multifuncționali, rezultând amidonuri reticulate. Reticularea este realizată cu scopul restricționării umflării granulei de amidon în condiții de gătire, sau pentru a preveni gelatinizarea. Reactivii acceptați de către FDA<sup>219</sup> pentru obținerea de amidon reticulat de calitate alimentară sunt clorura de fosforil, trimetafosfatul de sodiu, anhidrida acetică adipică mixtă și amestecuri de trimetafosfat de sodiu și tripolifosfați. Epichelorhidrina nu mai este utilizată de către producătorii de amidon (SUA) deoarece clorohidrinele sunt agenți cancerigeni. Acidul citric este cunoscut ca fiind nedăunător în comparație cu alte substanțe folosite în acest scop și rata de digestie de pancreatină scade odată cu creșterea gradului de substituție (DS) în citratul de amidon <sup>220</sup>.

Cele două stadii ale reacției dintre amidon și acidul carboxilic constau mai întâi dintr-o atașare a acestuia via procedeul de esterificare cu gruparea hidroxilică și reacția acesteia mai departe, tot via esterificare, cu altă grupare hidroxilică a amidonului, producând astfel reticulări ale polizaharidei. Diverși autori au propus un mecanism bazat pe formarea intermediară a anhidridei. Atașarea acidului carboxilic la polimer prin esterificare reacția a primului ciclu anhidridic ar expune o nouă unitate de acid în acidul citric care are conectivitatea chimică exactă pentru a forma o nouă compus intra molecular anhidridic cu unitate adiacentă de acid carboxilic. Reacția următoare cu eterul amidonului poate conduce la reticulare. Datorită implicării grupărilor hidroxilice ale amidonului în legătura esterică, reticularea acestui polimer hidrofiliic s-a realizat pentru a limita afinitatea acestuia către apă. Substituția amidonului în stare granulară este cu precădere întâlnită în regiunea amorfă, deoarece reactivii pot penetra mai ușor aceste zone. Stabilitatea termică a citratului de amidon are legătură cu conținutul de amilopectină și/ sau structura amidonului. Așadar, citratul de amidon cu un conținut mai mare de amilopectină poate fi mai stabil termic decât cel cu conținut scăzut. Odată cu introducerea citratului, structura granulară este alterată. Substituentul citrat poate altera asocierile dintre amiloză și amilopectină și fiecare component cu el însuși în granule, ceea ce va împiedica umflarea granulelor de amidon.

### V.3.1. Principiul reacției



Schema 3. Mecanismul reacției de reticulare cu acid citric.

Probele au fost pregătite după următoarea procedura generală: la o soluție polimerică de 12% amidon (0.3 g) a fost adăugată o cantitate determinată de acid citric (Tabel 1) și s-a lăsat sub agitare 20 min. În cazul probelor pe bază de amidon nemodificat a fost necesară ultrasonarea pentru îndepărtarea bulelor de aer. Soluțiile au fost plasate într-o etuvă sub vid la 50°C pentru anumite intervale de timp, în funcție de compoziția lor.

Terminologia folosită pentru acest capitol este următoarea: HS- hidrogel pe bază de amidon nativ, HSCP- hidrogel pe bază de amidon modificat prin grefare cu lanțuri de clorură de palmitoil, HSPCL- hidrogel pe bază de amidon modificat cu lanțuri de policaprolactonă.

### V.3.2. Program experimental

Tabelul 3. Programul experimental al hidrogelurilor sintetizate.

Cod probă	Timp de reticulare (h)	Raport molar grupări –OH primare/CA
HS4	4	10:1
HS5	5	
HS6	6	
HS0.25	5	10:0.25
HS0.5		10:0.5
HS1.5		10:1.5
HSCP4	4	10:1
HSCP5	5	
HSCP6	6	
HSCP0.25	5	10:0.25
HSCP0.5		10:0.5
HSCP1.5		10:1.5
HSPCL4	4	10:1
HSPCL5	5	
HSPCL6	6	
HSPCL0.25	5	10:0.25
HSPCL0.5		10:0.5
HSPCL1.5		10:1.5

\* temperatura de reticulare a fost 50°C.

### V.3.3. Analiza rezultatelor obținute

#### V.3.3.1.1. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR-ATR

Figura 9 prezintă spectrul FTIR-ATR al citratului de amidon și al amidonului nemodificat. Rezultatele sunt aceleași cu cele raportate de Izuka și Aishima care au investigat modelele spectrale a cinci tipuri de amidon (amidon din porumb, din cartof, pe bază de orez, amiloză și amilopectină) prin FT-IR/ATR și au găsit că toate prezintă un model similar.

În studiul aici de față, hidrogelul pe bază de amidon reticulat cu acid citric (HS) a arătat 10 pic-uri în regiunea  $3700-800\text{ cm}^{-1}$ . Din studii anterioare, Irudayayaraj și Yang au arătat că absorbanta la  $3381$  și  $2931\text{ cm}^{-1}$  poate fi atribuit grupării O-H și C-H. Absorbanta de la  $1350\text{ cm}^{-1}$  a fost atribuită grupărilor O-C-H, C-C-H și C-O-H. Absorbantele de la  $1150$  și  $1080\text{ cm}^{-1}$  sunt atribuite amândouă cuplării C-O, C-C respectiv O-H. Absorbanta de la  $1022\text{ cm}^{-1}$  este atribuită vibrației C-O-H iar cele de la  $930$  și  $860\text{ cm}^{-1}$  sunt corespunzătoare pentru deformarea C-H.

Un nou pic la  $1724\text{ cm}^{-1}$  a fost prezent în toate hidrogelurile reticulate nu și în amidonul de plecare. Acest nou pic poate fi atribuit grupării esterice caracteristice din acidul citric prezente în structura produșilor reticulați.

Granulele de amidon nativ, prezintă o cristalinitate parțială cu un grad de cristalinitate de 20-40 %<sup>221</sup>. Pentru a investiga această proprietate de obicei se folosește difractometria cu raze X, dar s-au raportat rezultate în această direcție și folosind FT-IR. Banda de absorbție IR la  $1074\text{ cm}^{-1}$  este sensibilă la structura cristalină sau ordonată, iar banda de la  $1020\text{ cm}^{-1}$  este asociată cu structura amorfă din amidon. Astfel, raportul dintre intensitatea benzilor de la  $1020\text{ cm}^{-1}/1074\text{ cm}^{-1}$  poate exprima gradul de ordine din amidon<sup>222</sup>. Valorile mai ridicate indică faptul că în amidonul de plecare a existat o fază amorfă mai mare. Creșterea în intensitate a benzii de la  $1724\text{ cm}^{-1}$  indică faptul că mai multe grupări esterice au fost prezente în amidon prin legătura covalentă între acidul citric și moleculele polizaharidei. Raportul de mai sus a crescut odată cu gradul de substituție fapt ce a indicat că substituienții citrați au alterat împachetarea lanțului și a generat structuri mai amorse în amidon.

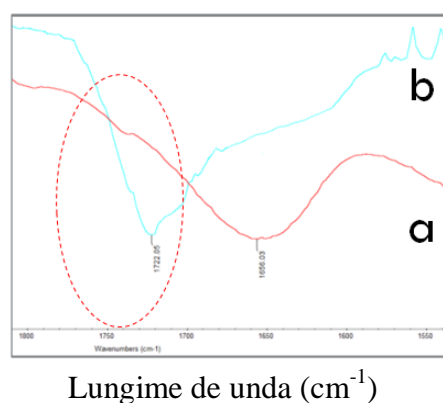


Figura 9. Spectrele FT-IR a. amidon, b.hidrogel pe bază de amidon nemodificat (HS)

Spectrul ATR-IR al hidrogelurilor HSCP a arătat benzile caracteristice pentru amidonul modificat cu clorură de palmitoil. Mai întâi, introducerea lanțurilor de palmitoil a fost confirmată de prezența grupărilor esterice de tip carbonil ( $C=O$ ) la  $1743\text{ cm}^{-1}$ . Cele două pic-uri de intensități puternice corespunzătoare valorilor  $2922$  și  $2851\text{ cm}^{-1}$  sunt atribuite grupărilor metil și metilen asociate substituenților palmitoilici.

Gruparea esterică formată în urma reticulării covalente absoarbe într-o zonă în care mai absorb și alte grupări funcționale și de aceea a fost necesară o deconvoluție spectrală între 1500-1800  $\text{cm}^{-1}$ . Banda de absorbție specifică pentru legătura esterică a fost găsită la 1743  $\text{cm}^{-1}$ .

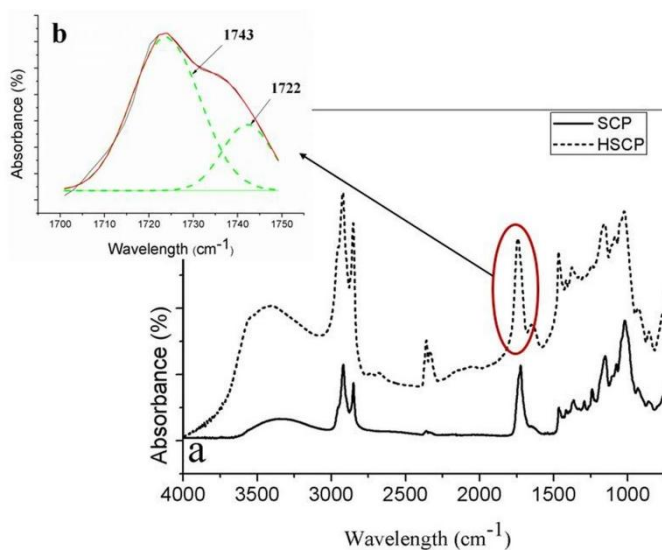


Figura 10. Spectrele ATR-IR al HSCP a) spectru integral, b) deconvoluția picului carbonil.

Vibrația puternică localizată la 3481  $\text{cm}^{-1}$  caracterică pentru grupările hidroxil din amidonul nativ descrește în intensitate atât după acilare cât și după reacția de reticulare, conform faptului că aceste grupări se diminuează. Este demn de menționat că intensitatea legăturii esterice este mai puternică odată cu creșterea conținutului de CA în hidrogel<sup>223</sup>.

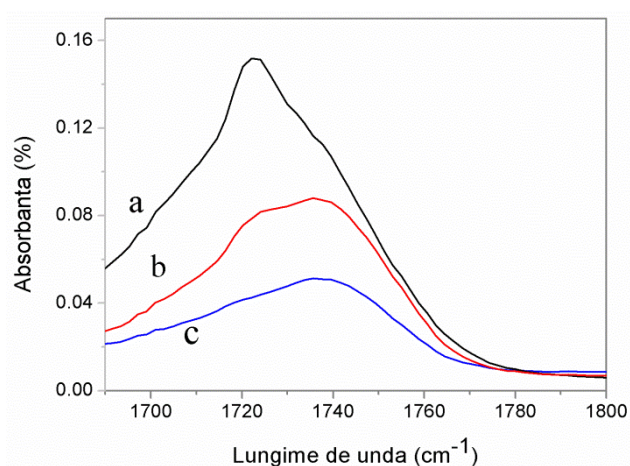


Figura 11. Spectrul FT-IR al intensităților pic-urilor carbonil pentru a) HSCP0.25, b) HSCP 0.5, c) HSCP 1.5.

Pic-urile caracteristice ale PCL apar atât în polimerul grefat cât și în cel reticulat. S-a realizat o deconvoluție (Figura 12) pentru a dezvălui pic-ul punții esterice caracteristice reticulării.

Singura diferență în spectrul FT-IR a fost diminuarea evidentă a vibrațiilor grupărilor –OH corespunzătoare polimerului grefat.

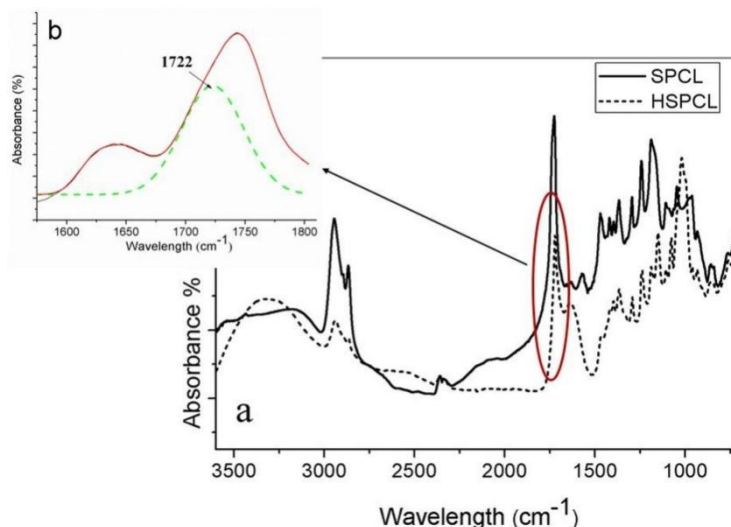


Figura 12. Spectrele ATR-IR al HSPCL a) spectru integral, b) deconvoluția picului carbonil.

Pic-urile caracteristice ale PCL, 3300-3700, 1735 (C=O din  $\epsilon$ -CL), 1725, 850-1480 și 720  $\text{cm}^{-1}$ , toate apar în ambii polimeri, un extra pic s-a observat pentru PCL modificată la 1722  $\text{cm}^{-1}$ , specific pentru –C=O, la 2871  $\text{cm}^{-1}$  este vibrația simetrică –CH<sub>2</sub>- din  $\epsilon$ -CL, iar la 2956  $\text{cm}^{-1}$  valoarea corespunzătoare vibrației asimetrice.

### V.3.3.2. Analiza morfologică

Imaginile SEM ale probelor liofilizate sunt prezentate în figura de mai jos.

Morfologia celor trei tipuri de hidrogeluri este în concordanță cu hidrofilia lor. Hidrogelul pe bază de amidon nemodificat, capabil să rețină cantități mari de apă, va forma prin liofilizare un material cu porozitate neuniformă, dar cu pori mai mari (Fig. 13A).

Reducerea hidrofiliei amidonului prin esterificare cu CP sau prin grefarea de PCL va conduce la reținerea unor cantități mai mici de apă cu formarea în urma liofilizării a unor materiale cu distribuție relativ uniformă a porilor și a dimensiunii mai reduse ale acestora. Din acest punct de vedere morfologia celor două tipuri de hidrogeluri este asemănătoare, cele pe bază de amidon modificat cu CP prezentând pori mai numeroși decât cele pe bază de amidon grefat cu PCL.

Morfologia atestată de micrografiile SEM ale celor trei materiale este în concordanță cu capacitatea lor de a reține apă care scade în seria HS >HSCP> HSPCL.

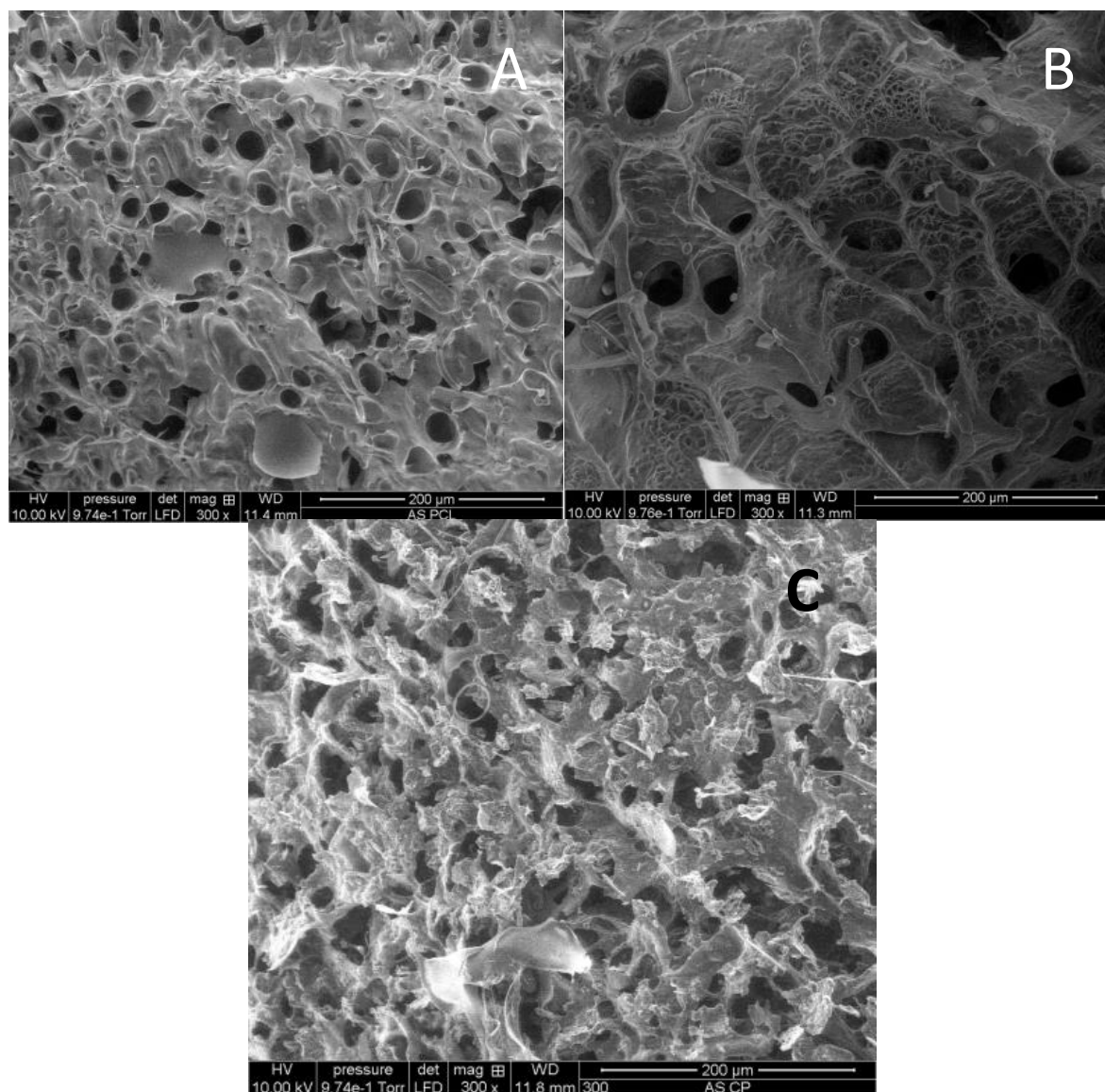


Figura 13. SEM pentru HS(A), HSPCL(B), HSCP(C).

### V.3.3.3. Analiza rezultatelor privind proprietățile de umflare în soluții apoase

Capacitatea hidrogelurilor obținute de a absorbi apa se datorează prezenței grupărilor hidrofilice rămase libere în polimerul ce formează structura acestor sisteme. Datorită contribuției acestor grupări în rețea, polimerul este astfel hidratat la diferite grade, în funcție de compoziția hidrogelului.

Capacitatea hidrogelurilor obținute de a absorbi apă se datorează prezenței grupărilor hidrofile din polimerii ce formează structura hidrogelului.

Datorită contribuției acestor grupări în rețea, polimerul va fi hidratat la grade diferite în funcție de compoziția hidrogelului. Caracteristica principală a hidrogelurilor este comportamentul la umflarea în apă, mediu în care structura lor finală este dezvaluită. Pentru aplicațiile farmaceutice,



este important a se cunoaște cinetica de umflare a hidrogelurilor deoarece este un proces direct legat de includerea de medicamente și de eliberarea acestora.

Retenția apei în raport cu timpul a fost obținută prin îndepărtarea periodică a probelor din apă, uscarea lor rapidă cu o hartie filtru și cântărirea lor din nou. Absorbția apei de către hidrogelurile inițial uscate a fost urmărită până ce acestea au atins un grad de umflare maximal, curbele fiind reprezentate în figurile 14 și 15.

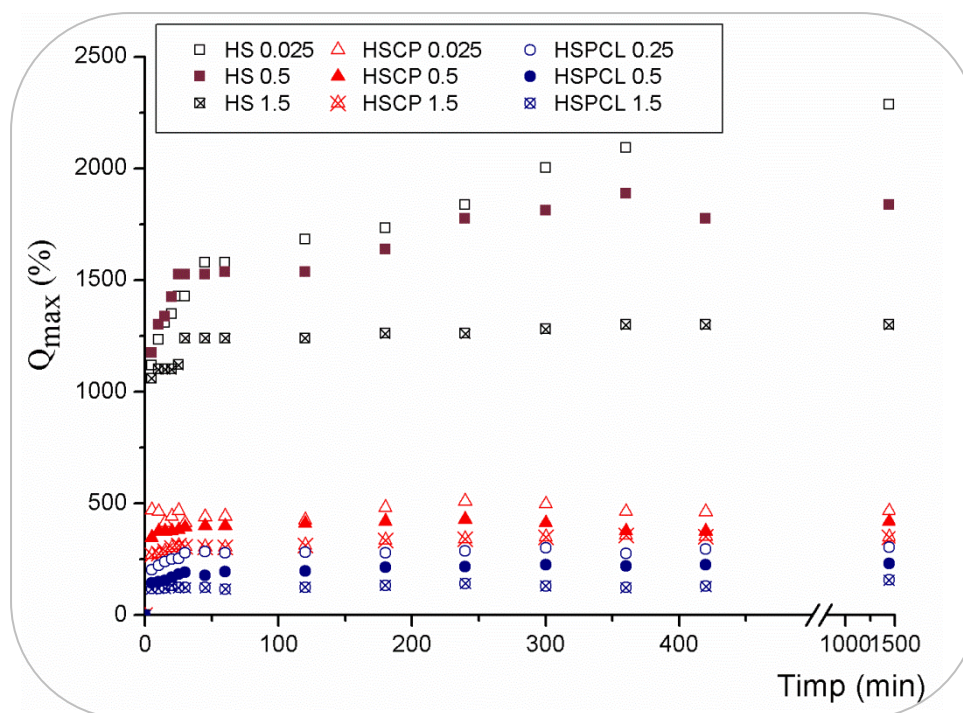


Figura 14. Cineticile gradului de umflare pentru hidrogelurile for HS, HSCP and HSPCL cu raport molar –OH primary/CA variat ( $T=50^{\circ}\text{C}$ ).

S-a observat că, inițial, rata de absorbție a apei crește brusc și apoi începe să se stabilizeze. Gradul de absorbție a apei de hidrogeluri a fost saturat în 4 ore. Măsurătorile gradului de umflare au arătat că absorbția de apă este mai mare atunci când valoarea cantității de CA este scăzută.

Hidrogelurile cele mai umflate sunt cele pe bază de amidon nemodificate. Deși în teorie HSCP este mai hidrofob decât HSPCL, gradul de umflare a dovedit contrariul. O posibilă explicație este legată de canalele de distribuție a PCL în jurul amidonului, acoperindu-l cu un strat hidrofob. În plus, prezența de grupări terminale -OH ar putea fi, de asemenea, implicate în reacția de reticulare, deși concentrația lor este mai mică cea a unităților de amidon.

Lanțurile de palmitoil, chiar dacă sunt mai lungi, distribuția de tip pieptene și DS-ul scăzut le permite să acționeze ca o rețea mai hidrofilă decât cea pe bază de PCL.

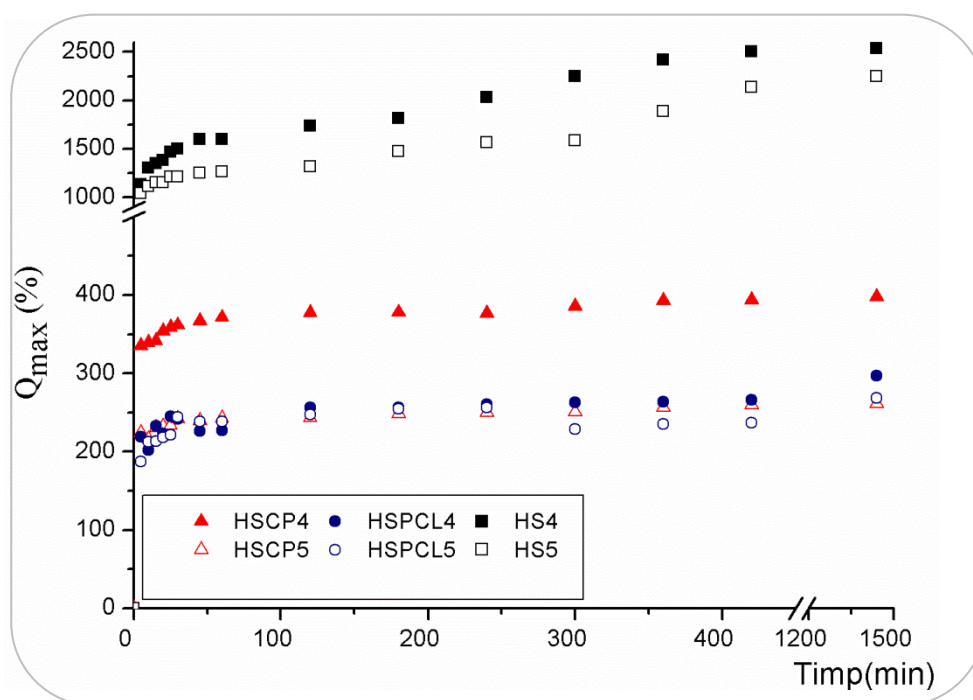


Figura 15. Cineticile gradului de umflare pentru hidrogelurile for HS, HSCP and HSPCL cu raport molar grupe  $-OH$  primare/CA 10:1, reticulate 4 și 5 ore ( $T=50^{\circ}C$ ).

Având în vedere că scopul acestor hidrogeluri a fost acela de imobilizare și de eliberare de medicamente, am încheiat cercetările cu includerea de levofloxacină (Schema 2) și urmărirea cineticii sale de eliberare. Au fost încărcate trei tipuri de hidrogeluri, cinetica de eliberare constatându-se ca fiind ca cea a sistemelor difuzionale tipice. În primele momente ale procesului se înregistrează o creștere rapidă a cantității de medicament eliberat, "burst effect", fenomen datorat faptului că se eliberează medicamentul de la suprafață, din pori și are o acțiune benefică constituind o primă concentrație de atac. Apoi, evoluția cinetică indică o eliberare mai lentă a medicamentului din structura hidrogelului. Cantitatea de medicament eliberată scade odată cu creșterea gradului de reticulare, dar este determinată, de asemenea, și de cantitatea de medicament inclusă care variază și ea.

#### V.3.3.4. Analiza capacității de includere și eliberare a Levofloxaciniei

Probele uscate și cântărite au fost imersate într-o soluție apoasă de levofloxacin (10 mL, 10% w/w) și lăsate 48 de ore, includerea constând în difuzia medicamentului în rețea prin reținerea sa în porii materialului.

Cantitatea maximă de medicament încărcată în fiecare probă a fost calculată folosind un măsurător de spectrofotometru (lungimea de undă pentru levofloxacin folosită pentru detecție a fost 300 nm) după cum urmează:

$$m_L = m_I - C_{L,f} \times V \quad \text{ecuația (1)}$$

- $m_L$  – levofloxacin încărcat (mg)
- $m_I$  – cantitatea inițială de levofloxacin (mg)
- $C_{L,f}$  – concentrația de levofloxacin în soluția rămasă de medicament după îndepărtarea probei, calculată din curba de calibrare pentru levofloxacin în apă (mg/mL)
- $V$  – volumul soluției de medicament rămas ( $m_L$ ).

### Eliberarea levofloxacinii din hidrogeluri

Probele încărcate cu levofloxacin au fost imersate în flacoane acoperite ce conțin 100 mL de soluție tampon, pH=7.4. PBS-ul a fost ales deoarece se dorește utilizarea hidrogelurilor într-un mediu biologic, iar concentrația ionilor din soluție se armonizează cu cea a corpului uman. Studiile de eliberare a medicamentului au fost realizate la 37°C într-o baie de apă cu agitare, GFL 1092 la 60 rpm, timp de 72 ore. Procesul de eliberare a levofloxacinii din hidrogeluri a fost monitorizat cu un spectrofotometru UV-VIS NanoDrop, (Nanodrop ND-1000) de la Thermo Scientific. Rezultatele reprezintă valoarea medie a trei determinări.

Levofloxacină eliberată a fost calculată folosind ecuația curbei de calibrare și greutatea fiecărei probe, după cum este descris mai jos:

$$m_{L,f} = \frac{C_{L,f} \times 100}{m_S} \quad \text{ecuația (2)}$$

unde,

$m_L$ , este cantitatea de levofloxacină eliberată,  $C_{L,f}$  este concentrația calculată pornind de la curba de calibrare a levofloxacinii ( $A_{L,f} = C_{L,f} \times 7,048$ ) (mg / ml) și  $m_S$  reprezintă greutatea probei (g).

Levofloxacină, un medicament solubil în apă, se eliberează imediat când este în contact cu mediul de dizolvare așa cum se vede în cazul hidrogelurilor pe bază de amidon (HS). Hidrogelurile cu lanțuri de PCL au susținut eliberarea levofloxacinii pentru mai mult de șapte ore, cu o cinetică liniară de susținută, în timp ce producția pe bază de palmitoil, ocupă locul al doilea, cu un interval de timp mai scurt. Examinarea cineticii de eliberare *in vitro* a levofloxacinii de către hidrogelurile pe bază de HSPCL au fost corelate cu comportamentul de umflare și s-a constatat că matricile pe bază de PCL au avut proprietăți îmbunătățite de eliberare susținută, comparativ cu hidrogelurile pe bază de HS și HSCP. După eliberarea medicamentului de la suprafața, eliberarea levofloxacinii a devenit mai lentă, deoarece polimerii hidrofobi împiedică penetrarea mediului de dizolvare în rețeaua de hidrogel.

La nivel hidrofob superior (cum e în cazul HSPCL), rata de eliberare a medicamentului a fost redusă în mod semnificativ ca urmare a porozității reduse a matricei, dar a crescut eliberarea.

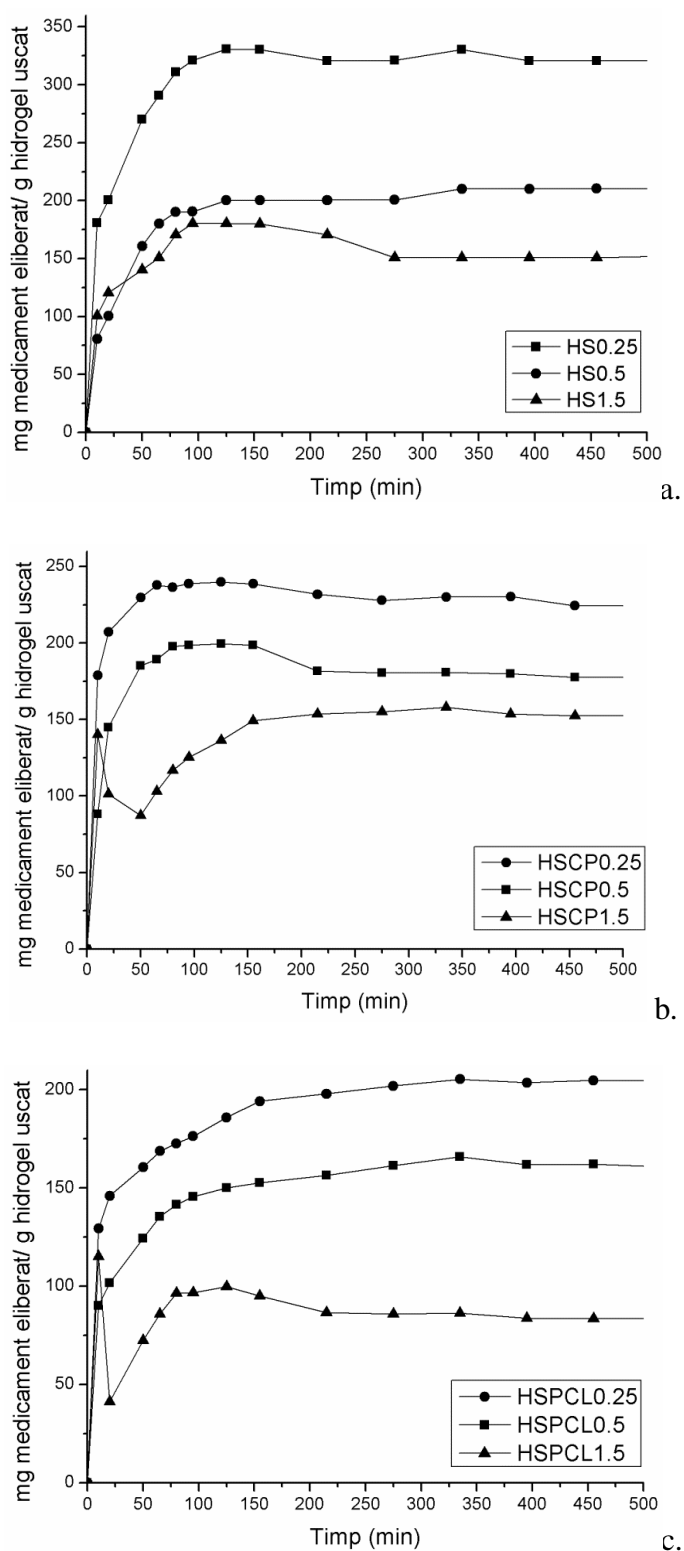
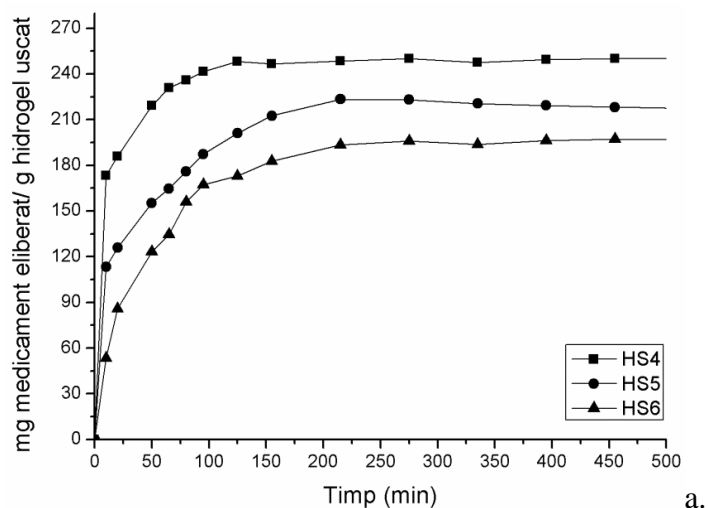
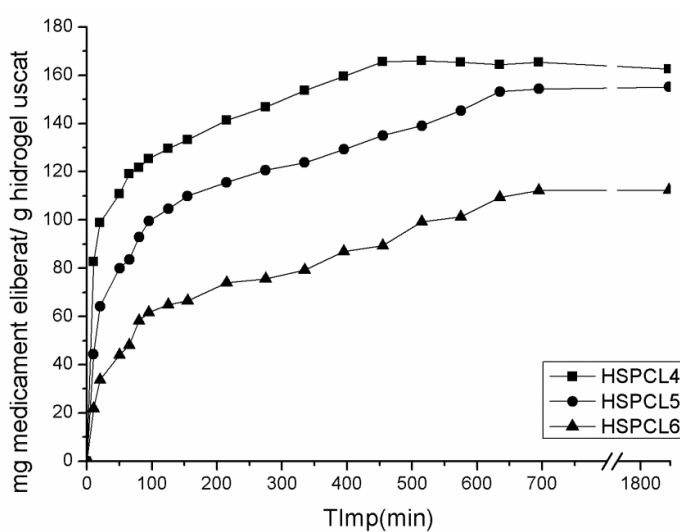


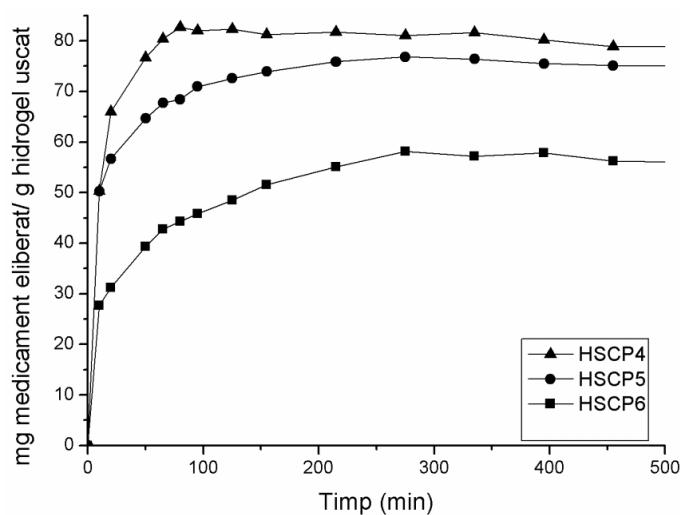
Figura 16. CINETICILE DE ELIBERARE A LEVOFLOXACINEI (mg) / g hidrogel uscat pentru HS (a), HSCP (b), HSPCL (c) obținute în urma varierii CA, la pH = 7,4, 37° C; Concentrația de medicament încarcată a fost de 20 mg / mL.



a.



b.



c.

Figura 17. Cineticile de eliberare a levofloxaciniei (mg) / g hidrogel uscat) pentru HS (a), HSCP (b), HSPCL (c) obținute în urma varierii timpului de reticulare (pH = 7,4, 37° C; Concentrația de medicament încarcată a fost de 20 mg / mL).

Hidrogelurile cu concentrații mai mici de CA prezintă o cinetică mai rapidă de eliberare, în timp ce hidrogelurile obținute prin reticularea la o durată mai scurtă de timp, susțin eliberarea de medicamente așa cum se vede în tabelul de mai jos:

Tabelul 4. Influența duratei de reticulare asupra timpului maxim al eliberării celei mai mari cantități de medicament (notat cu  $T_e$ ).

$t_{\text{reticulare}}$ (ore)	$T_e$ (min)		
	HS	HSCP	HSPCL
4	150	200	450
5	250	300	600
6	300	350	700

### V.3.3.5. Studiul matematic al procesului de eliberare al medicamentului

Descrierea matematică a procesului de eliberare este dificilă de realizat, datorită caracteristicilor fizice care trebuie luate în considerare, ca difuzia apei în hidrogel, umflarea matricii, difuzia medicamentului din rețea, dizolvarea polimerului, porozitatea, compoziția și schimbările în dimensiunea rețelei.

Fiecare model are caracteristicile sale datorită acestor presupuneri și aplicabilității respectivelor modele se restricționează pentru anumite sisteme medicament-polimer.

Pentru descrierea cineticii de eliberare *in vitro* a principiilor active se folosesc anumite modele matematice, iar pentru acest studiu s-au ales ecuațiile lui Lagergren de ordin întâi și a lui Ho, pseudo de ordin doi.

Ecuația empirică a lui Lagergren propusă la sfârșitul secolului XIX pentru a descrie cinetica absorbției la interfața solid/soluție a fost cea mai folosită ecuație de până acum.

Ecuația de ordin 1 a lui Lagergren

$$q_t = q_e * [1 - \exp(-k_1 * t)] \quad \text{ecuația (3)}$$

unde,  $q_t$  = cantitatea de medicament absorbită la un anumit timp  $t$  (mg/g)

$q_e$  = cantitatea de medicament absorbită la echilibru (mg/g)

$k_1$  = constanta lui Lagergren ( $\text{min}^{-1}$ )

$t$  = timp.

Ecuația de ordinul 2 a lui Ho

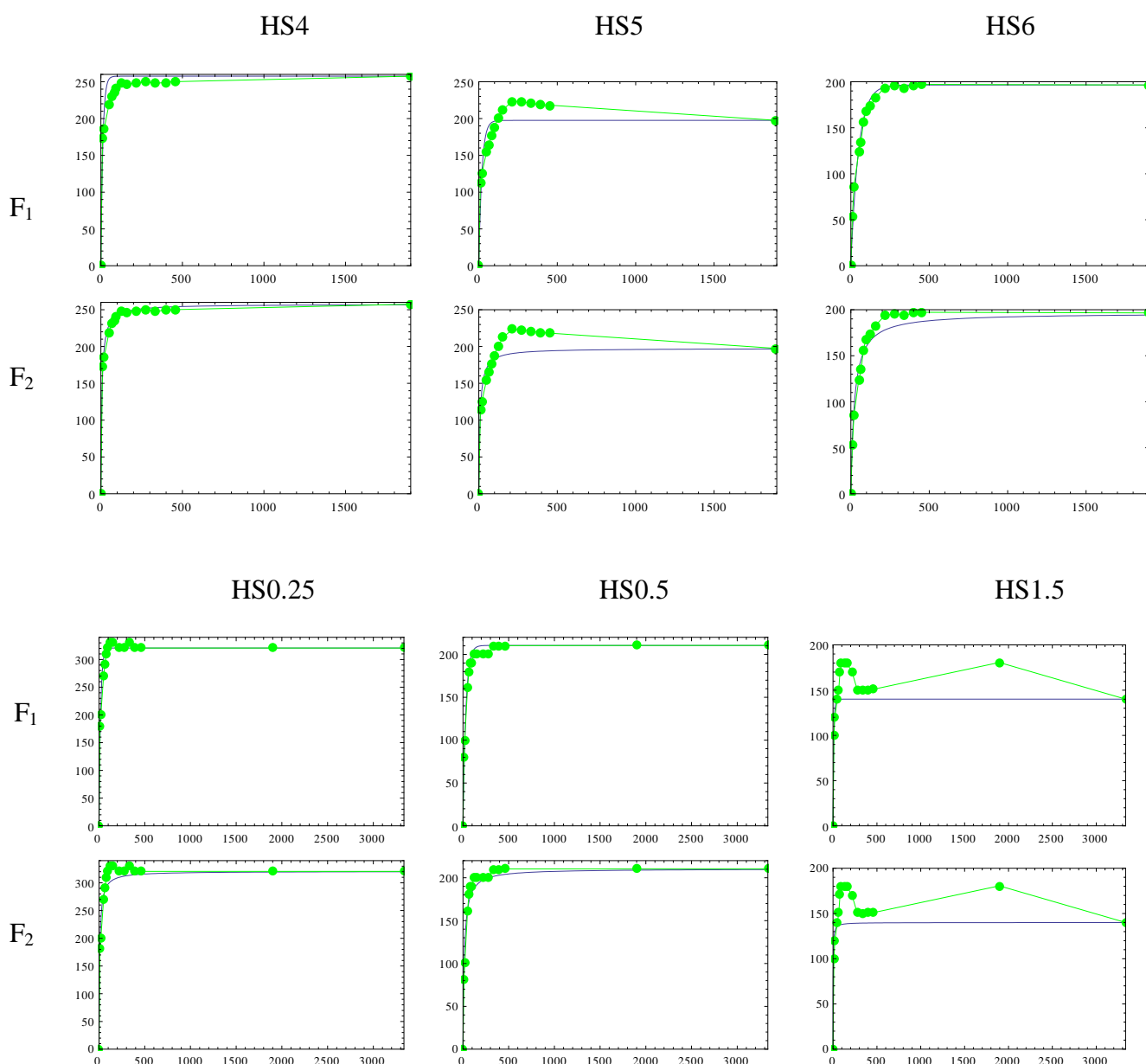
$$q_t = t * k_2 q_e^2 / (1 + t * k_2 q_e) \quad \text{ecuația(4)}$$

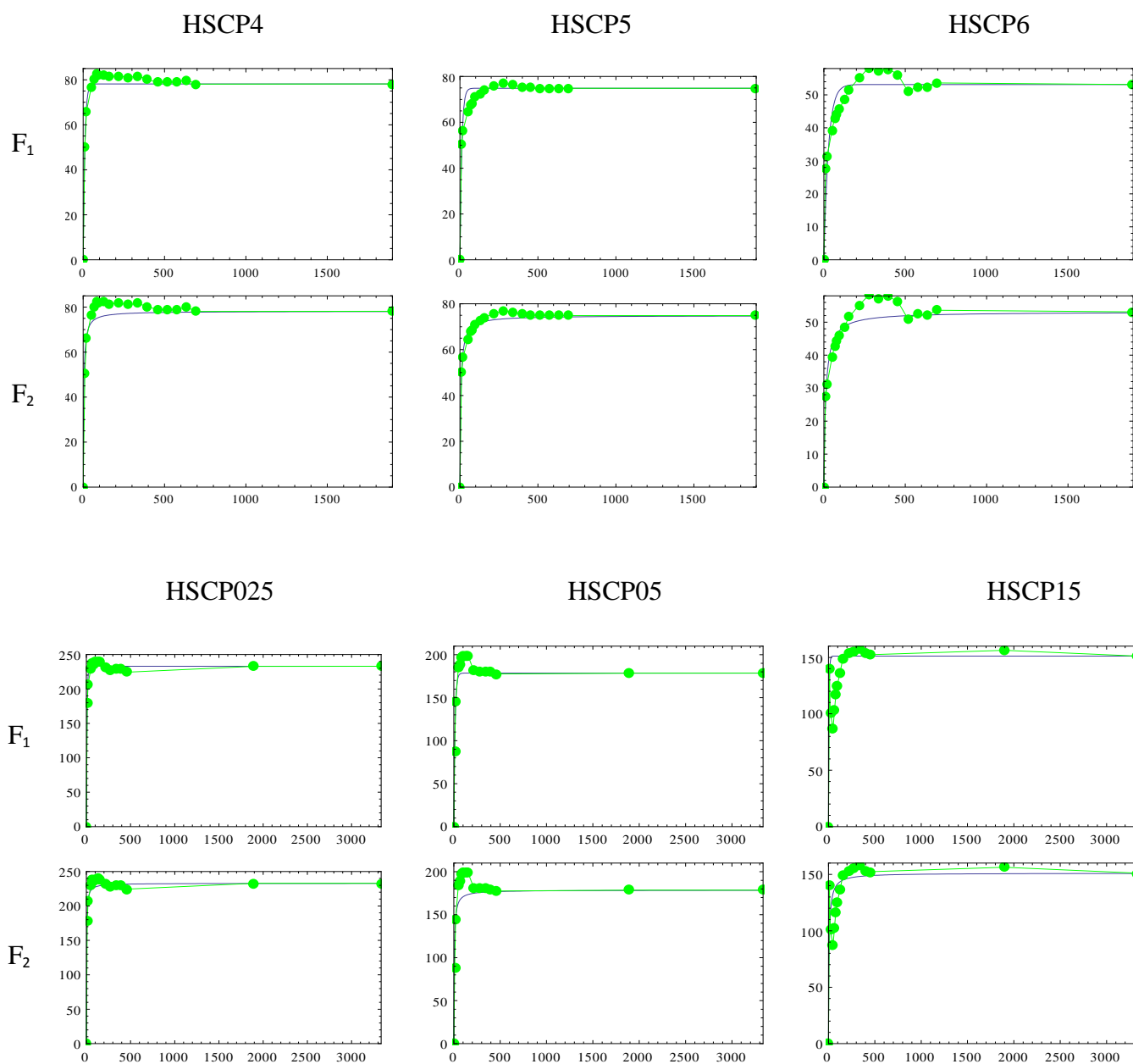
unde,  $h = k_2 q_e^2$

$k_2$  = constanta relativă a acestui model [ $\text{g}/(\text{mg} * \text{min})$ ]

S-a observat că valorile coeficienților de corelare pentru primul model de ecuație variază între 0,927 și 0,998 iar majoritatea valorilor  $q_e$  variază semnificativ față de valorile experimentale. Corelările ( $R^2$ ) au fost folosite ca indicatori pentru o mai bună fitare a fiecărei ecuații considerate, eliberarea levofloxacinii urmând îndeaproape modelele de ordinul unu și doi. În orice caz, conform valorilor neglijabile ale  $R^2$  pentru datele de eliberare, se constată că aplicarea acestor modele matematice este pur empirică.

Fitarea datelor experimentale cu cele trei modele de hidrogeluri este redată în figura 18.







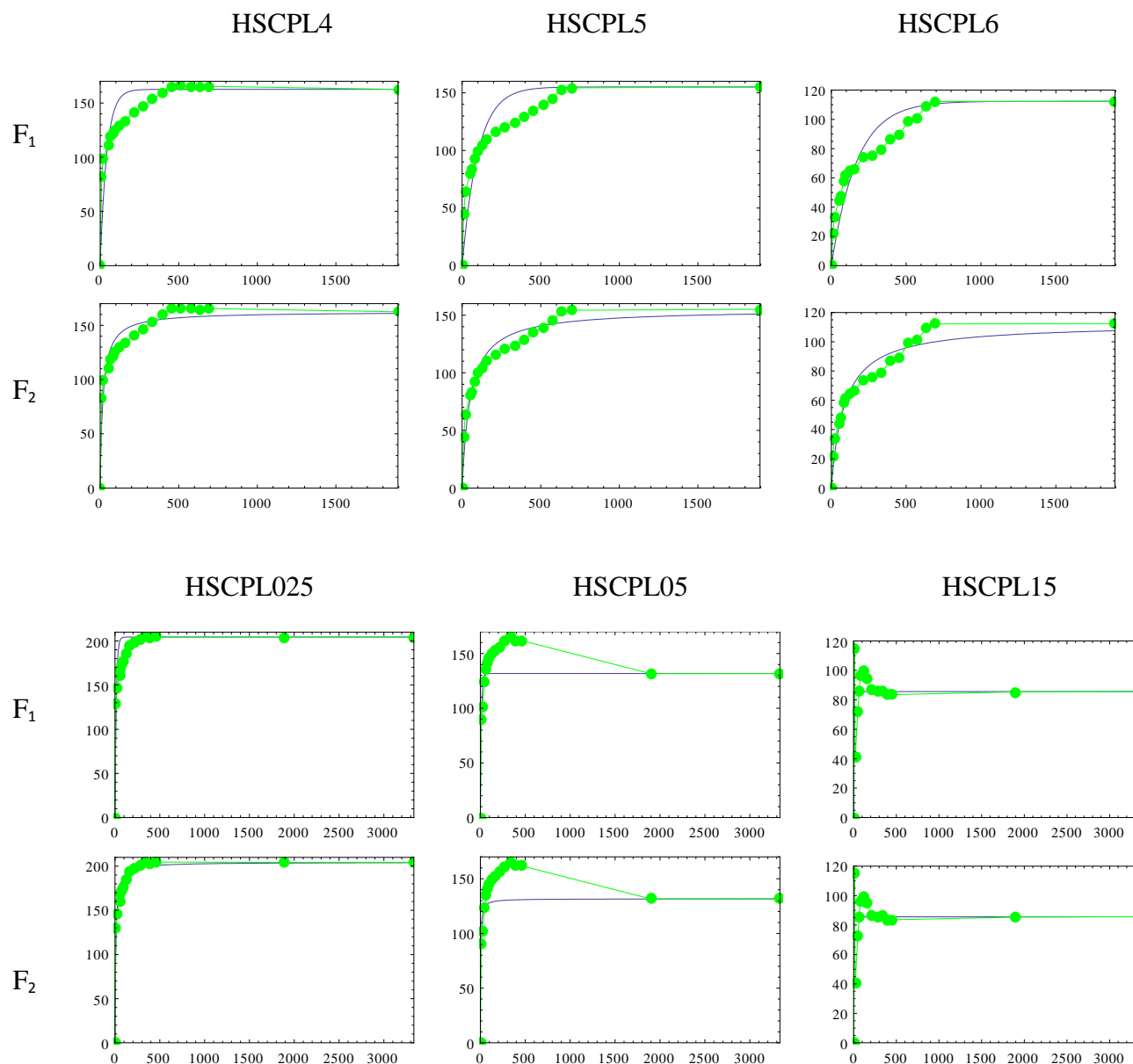


Figura 18. Fitarea datelor experimentale cu cele trei modele de hidrogeluri, unde  $F_1$  înseamnă fitarea după ecuația lui Lagergren, iar  $F_2$ , fitarea conform ecuației lui Ho.

Se observă o caracteristică comună a tuturor fitărilor: cantitatea de medicament eliberat crește până când atinge un platou. Coeficienții de corelare sunt apropiați de valoarea unității ( $R^2 = 0.99$ ). Aceste corelări ( $R^2$ ) au fost folosite ca indicatori pentru o mai bună fitare a fiecărei ecuații considerate, eliberarea levofloxacinii urmând îndeaproape modelele de ordinul unu și doi.

Toate rezultatele sunt în concordanță cu cele din literatură, astfel dovedesc că amândouă modelele cinetice au furnizat o descriere bună a rezultatelor obținute după cum se observă din valorile corelării coeficienților folosiți în cadrul studiului.

În orice caz, conform valorilor neglijabile ale  $R^2$  pentru datele de eliberare, se constată că aplicarea acestor modele matematice este pur empirică și nici o concluzie definitivă în ceea ce privește mecanismul dominant de transport de masă, nu poate fi subliniată.

Tabelul 5. Datele eliberărilor modelate după ecuațiile de ordinul 1 a lui Lagergren și de ordinul doi a lui Ho.

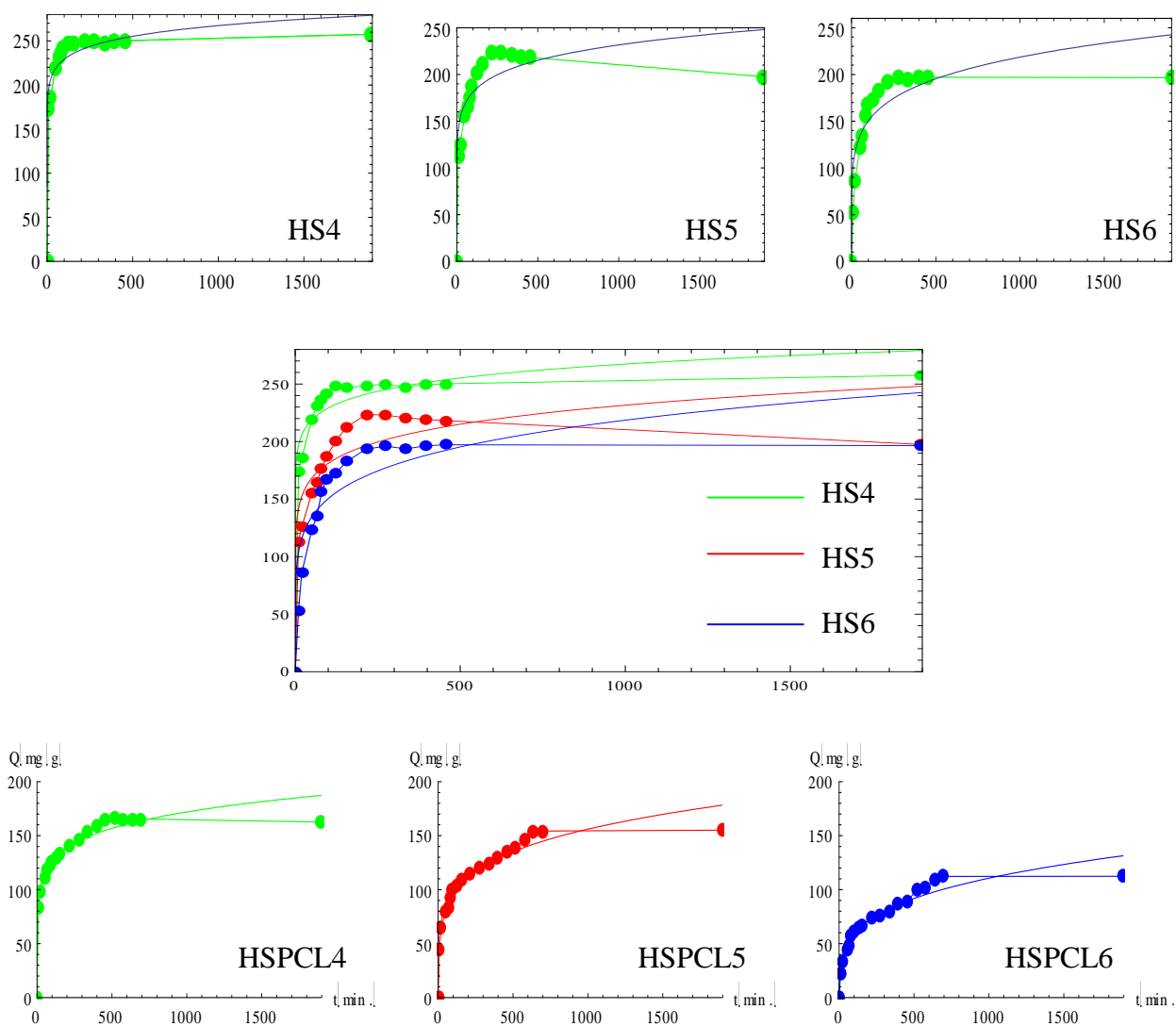
Sample code	Lagergren first-order		Ho second-order	
	$K_1$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$R^2$	$k_2 * 10^3$ (g/mg*min)	$R^2$
HS0.25	0.056482	0.984033	0.00040597	0.987539
HS0.5	0.0316211	0.994087	0.000323	0.99269
HS1.5	0.117487	0.936036	0.004673	0.906459
HSCP0.25	0.136494	0.995974	0.00181937	0.993129
HSCP0.5	0.0775174	0.986447	0.00123597	0.953802
HSCP1.5	0.168534	0.820371	0.00098299	0.855928
HSPCL0.25	0.06955	0.9544	0.000582	0.986862
HSPCL0.5	0.096288	0.943995	0.002643	0.932435
HSPCL1.5	101	0.815854	$10^{12}$	0.815854
HS4	0.08280	0.980836	0.00062	0.996239
HS5	0.0517335	0.944841	0.000644	0.963735
HS6	0.0205342	0.994028	0.000225	0.99217
HSCP4	0.0994252	0.996051	0.00368278	0.985231
HSCP5	0.0884048	0.979332	0.00242592	0.99574
HSCP6	0.0354149	0.953242	0.00163129	0.974334
HSPCL4	0.0237853	0.927039	0.000347	0.968867
HSPCL5	0.009950	0.95966	0.0001256	0.979288
HSPCL6	0.005934	0.966756	0.000103	0.979041

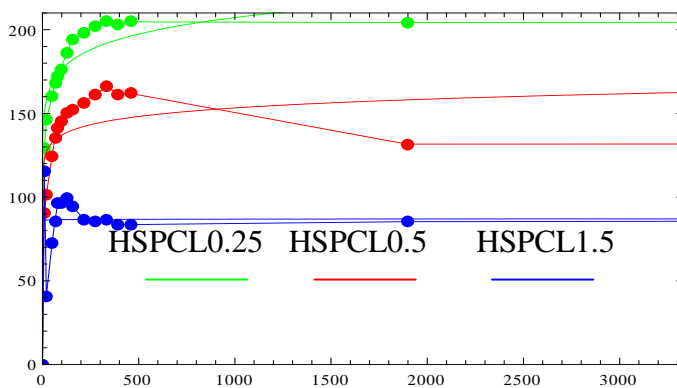
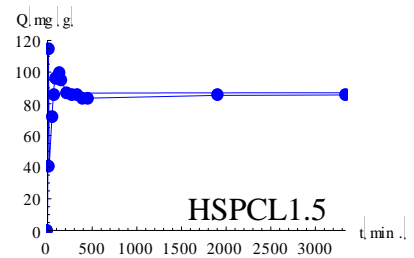
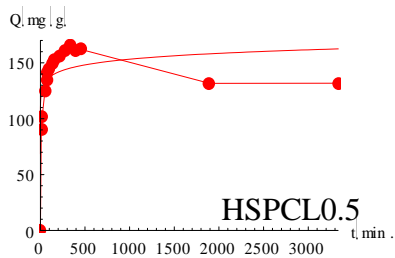
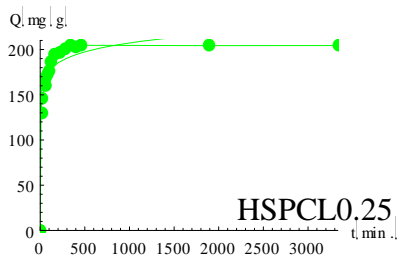
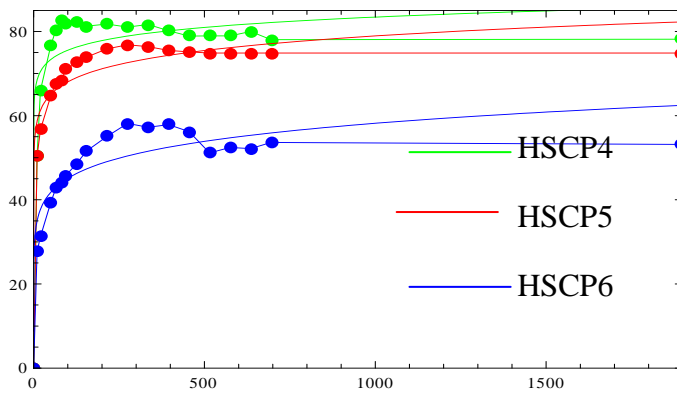
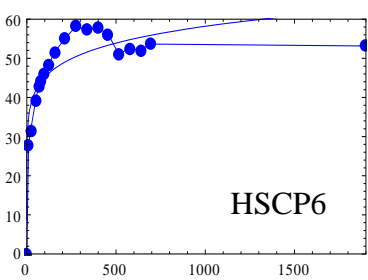
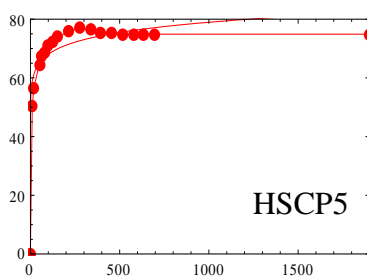
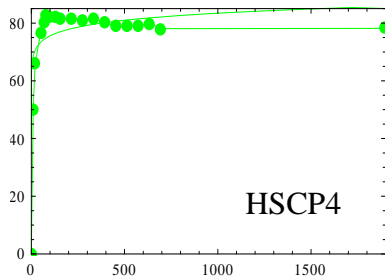
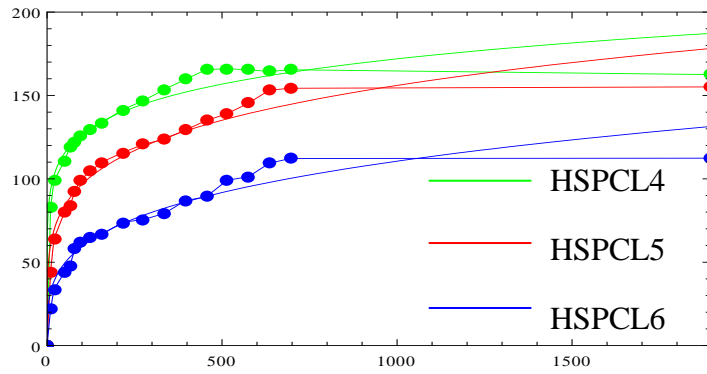
Datele obținute din studiile de eliberare a medicamentului *in vitro* au fost de asemenea fitate și după modelul Korsmeyer–Peppas<sup>224</sup>:

$$M_t / M_\infty = Kt^n \quad \text{ecuația (5)}$$

unde  $M_t / M_\infty$  reprezintă fracția de medicament eliberată la timpul  $t$ ,  $k$  este constanta și  $n$  exponentul de eliberare. Valoarea lui  $n$  este folosită pentru a caracteriza diferite mecanisme de eliberare.

În figura 19 sunt prezentate curbele de fitare ale eliberărilor de levofloxacină din hidrogelurile sintetizate.





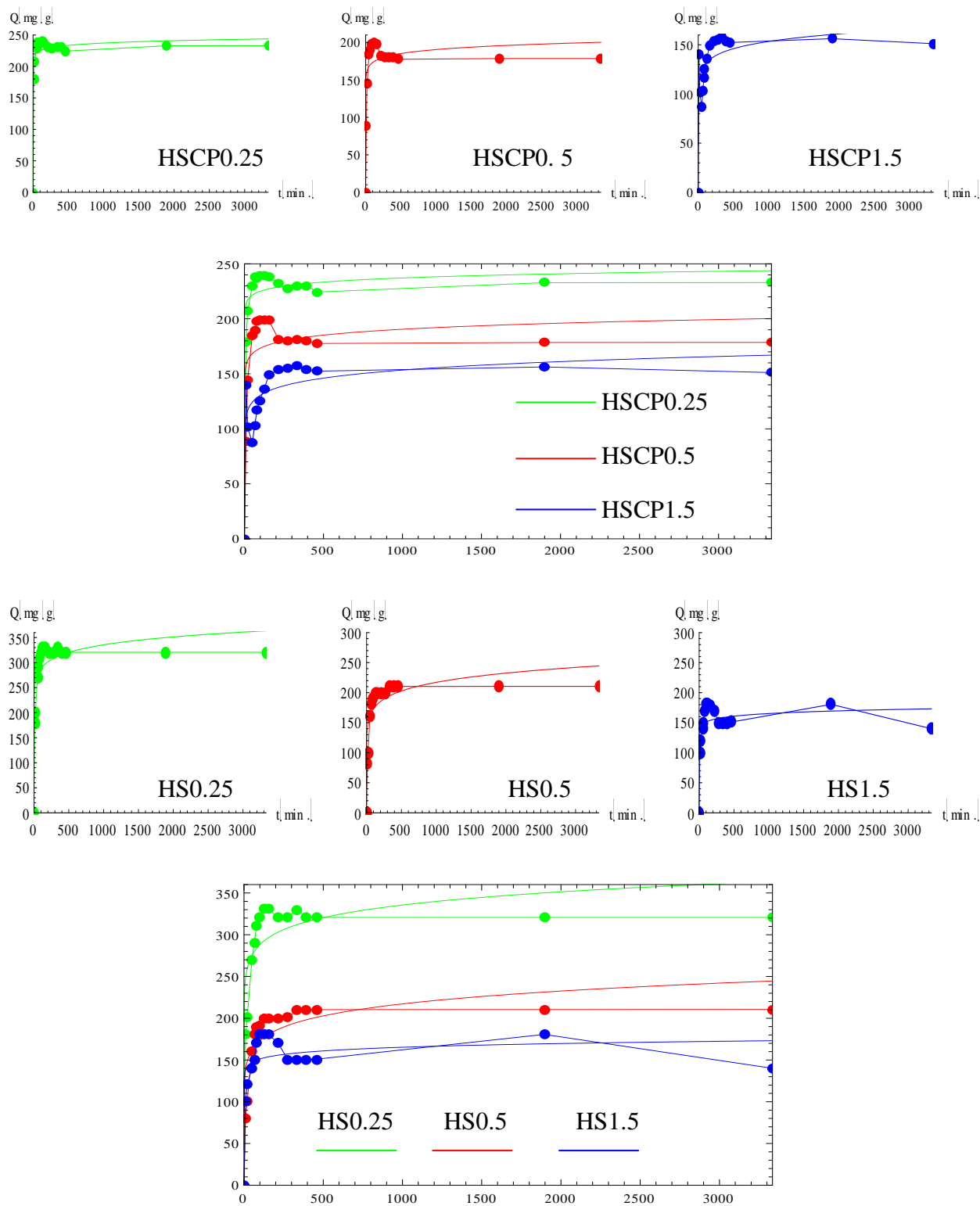


Figura 19. Curbele de fitare ale eliberărilor de levofloxacină din hidrogelurile sintetizate, cu următoarea precizare privind notația

- curbele de fitare după Peppas
- curbele experimentale

Tabel 6. Valorile obținute pentru  $n$  în urma fitărilor datelor experimentale de eliberare a levofloxacinii.

Cod probă	k	n	Corelația
HS4	0.653746	<b>0.066955</b>	0.9816
HS5	0.560196	<b>0.10693</b>	0.9325
HS6	0.362374	<b>0.162344</b>	0.919707
HSPCL4	0.421747	<b>0.133135</b>	0.981878
HSPCL5	0.239939	<b>0.207467</b>	0.980518
HSPCL6	0.153168	<b>0.26926</b>	0.973818
HSCP6	0.509797	<b>0.110631</b>	0.941769
HSCP5	0.674259	<b>0.0646923</b>	0.978209
HSCP4	0.792862	<b>0.0430326</b>	0.949006
HSPCL0.5	0.831628	<b>0.0486277</b>	0.893314
HSPCL0.25	0.623986	<b>0.0702459</b>	0.973754
HSPCL1.5	100,345	<b>0.001599</b>	0.815891
HSCP0.5	0.802455	<b>0.0412221</b>	0.881709
HSCP0.25	0.870321	<b>0.0227345</b>	0.975406
HSCP1.5	0.623743	<b>0.070475</b>	0.904985
HS0.25	0.661916	<b>0.0663089</b>	0.927848
HS0.5	0.52228	<b>0.0985701</b>	0.906348
HS1.5	0.904474	<b>0.0385136</b>	0.887163

Pentru studiul de față valoarea exponentului de eliberare “ $n$ ” a fost considerată  $n=0.45$  (o difuzie clasică Fickiană- eliberare controlată a medicamentului) și  $n=0.89$  (indică un tip de transport II de eliberare relaxată, non-Fickiană, eliberare de ordin zero). Valorile cuprinse între 0.45 și 0.89 pot fi văzute ca fiind un indicator pentru amandouă fenomene (difuzia de medicament în matricea hidratată și relaxarea polimerului) în mod uzual numit transport anormal.

În ceea ce privește exponentul de eliberare, din modelul Korsmeyer-Peppas obținut și ilustrat în tabelul 7 ( $n \sim 0.4$ ), se poate sugera că mecanismul ce a dus la eliberarea levofloxacinii a fost un transport de tip Fickian.

#### V.4. Concluzii

- Au fost obținute prin reticulare cu acid citric și epiclорhidrină hidrogeluri noi, pe bază de amidon și amidon hidrofobizat cu lanțuri palmitoil și PCL.
- Spectrul ATR-IR al hidrogelurilor HSCP a arătat benzile caracteristice pentru amidonul modificat cu clorură de palmitoil.
- Introducerea lanțurilor de palmitoil a fost confirmată de prezența grupărilor esterice de tip carbonil (C=O) și de prezența picurilor corespunzătoare grupărilor metil și metilen asociate substituenților palmitoilici.
- Gruparea esterică formată în urma reticulării covalente absoarbe într-o zonă în care mai absorb și alte grupări funcționale și de aceea a fost necesară o deconvoluție spectrală între 1500-1800 cm<sup>-1</sup>.
- Vibrația puternică caracteristică pentru grupările hidroxil din amidonul nativ descrește în intensitate atât după acilare cât și după reacția de reticulare, conform faptului că aceste grupări se diminuează.
- Intensitatea legăturii esterice este mai puternică odată cu creșterea conținutului de CA în hidrogel.
- Pic-urile caracteristice ale PCL apar atât în polimerul grefat cât și în cel reticulat.
- S-a realizat o deconvoluție pentru a dezvălui picul punții esterice caracteristice reticulării.
- Morfologia celor trei tipuri de hidrogeluri este în concordanță cu hidrofilia lor.
- Hidrogelul pe bază de amidon nemodificat formează prin liofilizare un material cu porozitate neuniformă, dar cu pori mai mari.
- Reducerea hidrofiliei amidonului prin esterificare cu CP sau prin grefarea de PCL conduce la materiale cu distribuție relativ uniformă a porilor și cu o dimensiuni mai redusă a acestora.
- Gradul de absorbție a apei de hidrogeluri a fost saturat în 4 ore.
- Măsurătorile gradului de umflare au arătat că absorbția de apă este mai mare atunci când valoarea cantității de CA este scăzută.
- Au fost încărcate trei tipuri de hidrogeluri, cinetica de eliberare fiind cea a sistemelor difuzionale tipice.
- Se înregistrează o creștere rapidă a cantității de medicament eliberat, "burst effect", fenomen datorat faptului că se eliberează medicamentul de la suprafață, din pori și are o acțiune benefică constituind o primă concentrație de atac.
- Cantitatea de medicament eliberată scade odată cu creșterea gradului de reticulare, dar este determinată, de asemenea, și de cantitatea de medicament inclusă care variază și ea.
- Hidrogelurile cu lanțuri de PCL au susținut eliberarea levofloxacinii pentru mai mult de șapte ore, cu o cinetică liniară de susținută, în timp ce producții pe bază de palmitoil, ocupă locul al doilea, cu un interval de timp mai scurt.

- Examinarea cineticii de eliberare *in vitro* a levofloxacinei de către hidrogelurile pe bază de HSPCL au fost corelate cu comportamentul de umflare și s-a constatat că matricile pe bază de PCL au avut proprietăți îmbunătățite de eliberare susținută, comparativ cu hidrogelurile pe bază de HS și HSCP.
- După eliberarea medicamentului de la suprafața, eliberarea levofloxacinei a devenit mai lentă, deoarece polimerii hidrofobi împiedică penetrarea mediului de dizolvare în rețeaua de hidrogel. La nivel hidrofob superior (cum e în cazul HSPCL), rata de eliberare a medicamentului a fost redusă în mod semnificativ ca urmare a porozității reduse a matricei, dar a crescut eliberarea.
- Hidrogelurile cu concentrații mai mici de CA prezintă o cinetică mai rapidă de eliberare, în timp ce hidrogelurile obținute prin reticularea la o durată mai scurtă de timp.
- Pentru descrierea cineticii de eliberare *in vitro* a principiilor active s-au folosit modelele matematice, ale lui Lagergren de ordin întâi și a lui Ho, pseudo de ordin doi.
- Se observă o caracteristică comună a tuturor fitărilor: cantitatea de medicament eliberat crește până când atinge un platou.
- Coeficienții de corelare sunt apropiați de valoarea unității ( $R^2 = 0.99$ ).
- Toate rezultatele sunt în concordanță cu cele din literatură, dovedind că amândouă modelele cinetice au furnizat o descriere bună a rezultatelor obținute după cum se observă din valorile corelării coeficienților folosiți în cadrul studiului.
- Datele obținute din studiile de eliberare a medicamentului *in vitro* au fost de asemenea fitate și după modelul Korsmeyer–Peppas.
- În ceea ce privește exponentul de eliberare, din modelul Korsmeyer-Peppas obținut  $n \sim 0.4$ , se poate sugera că mecanismul ce a dus la eliberarea levofloxacinei a fost unul de tip Fickian.



---

## Concluzii generale

- Am obținut polimeri cu hidrofilie controlată prin esterificarea cu clorura de palmitoil;
- Gradul de substituție a fost calculat cu ajutorul analizei XPS după cum a fost descris anterior, ca fiind raportul dintre suprafața pic-ului (-O-C-O) ce corespunde esterului și aria pic-ului -O-C-O din unitatea glucozidică.
- S-a obținut un grad ridicat de substituție pentru concentrații mari ale clorurii acide și pentru timpi de reacție lungi.
- S-a observat că un parametru important în maximizarea gradului de substituție este reprezentat de cantitatea de clorură de palmitoil folosită, pe când timpul este de o importanță minoră, iar temperatura nu are nici o influență în intervalul studiat.
- Imaginile SEM au arătat schimbări semnificative în ceea ce privește morfologia amidonului după reacția sa cu clorura de palmitoil, trecând de la o structură granulară la una poroasă.
- S-a realizat modificarea chimică a amidonului solubil prin introducerea grupării alchine.
- S-a sintetizat azido poli ( $\epsilon$ -caprolactonei) în două etape: în prima s-a obținut PCL funcționalizată pe capăt cu Br, iar în cea de a doua s-a introdus funcția azidică, terminală.
- Prin spectroscopia  $^1\text{H}$  NMR, s-a determinat gradul de polimerizare din intensitățile relative ale pic-urilor ce aparțin lanțului polimeric,  $\text{H}_\alpha$  sau  $\text{H}_e + \text{H}_e'$  și a celor aparținând grupului terminal metilenic  $\text{H}_e'$ .
- Polimerul PCL-Br de diferite grade de polimerizare (4, 13, respectiv 20) a fost sintetizat prin polimerizarea anionică a  $\epsilon$ -caprolactonei, în prezența 11-bromo-undecanol ca agent de transfer și a trietilaluminului ( $\text{AlEt}_3$ ).
- S-au obținut noi copolimeri de tip pieptene, bază de amidon grefat cu PCL prin procedeul „click chemistry” și ROP;
- Introducerea unităților de PCL prin „click chemistry” a eliminat unele dezavantaje ale polizaharidei abordate, prin mărirea hidrofobicității amidonului și de asemenea prin creșterea cristalinității copolimerului prin varierea lungimii lanțului de PCL;
- Caracterul amfifilic al copolimerului a fost evidențiat prin capacitatea sa de a forma polimerosomi în soluții apoase. Copolimerii grefați pot fi astfel potențiali candidați pentru a fi folosiți în diferite aplicații biomedicale;
- S-a realizat grefarea prin „click chemistry” a PCL pe scheletul de amidon și cu ajutorul microundelor, timpul de reacție scăzând de la 24 ore la 60 minute, în funcție de solventul folosit;
- S-a realizat grefarea prin ROP a PCL pe scheletul de amidon. Din curbele DSC s-a observat că PCL are o greutate moleculară suficientă pentru a permite lanțului poliesteric să cristalizeze;

- 
- Determinarea compoziției copolimerului s-a realizat prin RMN plecând de la intensitățile semnalelor pentru caprolactonă și pentru unitățile structurale ale amidonului.
  - Eficiența grefării este dificil de determinat în cadrul acestui sistem prin tehnici de analiză standard, cum ar fi RMN-ul, datorită solubilității scăzute a produșilor în solvenții organici standard.
  - Proprietățile mecanice ale amestecului amidon/PCL devin slabe odată cu creșterea conținutului de amidon. Acest fapt se datorează incompatibilității dintre amidonul hidrofilic și PCL hidrofobic, precum și adeziunii interfaciale scăzute dintre cei doi compuși.
  - Se observă ca în cazul acestor compuși avem picuri distincte deoarece cristalizarea polimerului este distribuită uniform, fapt ce duce la topirea mai lentă a unor componente. De asemenea, existența ramificațiilor și sub-ramificațiilor contribuie la apariția diferitelor pante în punctul de topire, iar diferitele aranjamente și greutate moleculare ale polimerului pot schimba modul cum aceste pante apar în profilul DSC.
  - Au fost obținute noi hidrogeluri cu hidrofobitate controlată prin natura agentului de modificare a amidonului precum și prin parametrii de reticulare ai procesului;
  - Au fost obținute prin reticulare cu acid citric hidrogeluri noi, pe bază de amidon și amidon hidrofobizat cu lanțuri palmitoil și PCL.
  - Acești produși sunt capabili de a încapsula și de a elibera medicamente la un pH fiziologic, caracteristici ce depind de compoziția lor.
  - Proprietățile de umflare, încărcare și eliberare a hidrogelurilor pot fi ușor controlate prin ajustarea parametrilor studiați;
  - Procedura de modelare teoretică a difuziei a fost condusă pe baza datelor experimentale și scopul acesteia a fost de a evalua influența condițiilor de reacție asupra gradului de umflare și a cantității de levofloxacină eliberate;
  - Creșterea concentrației de CA și a timpului de reticulare conduce la o densitate mai mare a rețelei finale, ceea ce conduce astfel la o scădere a retenției apei, respectiv a medicamentului, dar pentru hidrogelurile hidrofobe a fost observată o perioadă mai lungă de eliberare a levofloxacinei.
  - S-a constatat că cinetica de eliberare depinde de tipul de material hidrofob din rețea.
  - Studiul a ilustrat că este posibil să se obțină hidrogeluri prin combinația adecvată a matricilor hidrofobe pentru obținerea unui profil farmacocinetic acceptabil pentru mediul *in vitro*.
  - Eliberarea a fost dependentă de iar modelul propus pentru cinetica de eliberare a fost cel descris de indicii obținuți descriu odifuzie de tip Fikian.

---

## Referințe bibliografice

- <sup>1</sup> Venkat K. V., Lin W., Sitaraman K., Polymer Thin Films for Biomedical Applications, Nanomaterials for the Life Sciences Vol.5: Nanostructured Thin Films and Surfaces. WILEY-ISBN: 978-3-527-32155-1, **2010**;
- <sup>2</sup> Mishra M.K., Yagci Y., Handbook of vinyl polymers: radical polymerization, process, and technology. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, **2009**;
- <sup>3</sup> IUPAC. "Glossary of Basic Terms in Polymer Science". Pure Appl. Chem., 68, 2287-2311, **1996**;
- <sup>4</sup> Hamley I. W., Introduction to Block Copolymers In Developments in Block Copolymer Science and Technology, Hamley I. W. Ed.; Wiley, **2004**;
- <sup>5</sup> Soo P. L., Eisenberg A. J., Polym. Sci. B: Polym. Phys., 42, 923, **2004**;
- <sup>6</sup> Zhang L., Eisenberg A. J., Am. Chem. Soc., 118, 3168, **1996**;
- <sup>7</sup> Allen C., Maysinger D., Eisenberg A., Colloids Surf. B, 16, 3, **1999**;
- <sup>8</sup> Soo, P. L.; Eisenberg, A. Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics, 42, 923, 2004;
- <sup>9</sup> Zhang L., Eisenberg A., Science, 268, 1728, **1995**;
- <sup>10</sup> Zhang L., Eisenberg A. Macromol. Symp., 113, 221, **1997**;
- <sup>11</sup> Shen H., Eisenberg A. Macromolecules, 33, 2561, **2000**;
- <sup>12</sup> Yu Y., Zhang L., Eisenberg A. Macromolecules, 31, 1144, **1998**;
- <sup>13</sup> Hauschild S., Lipprandt U., Rumplecker A., Borchert U., Rank A., Schubert R., Förster S. Small, 1, 1177, **2005**;
- <sup>14</sup> Choi H.J., Brooks E., Montemagno C. D., Nanotechnology, 16, 143, **2005**;
- <sup>15</sup> Yang J., Levy D., Deng W., Keller P., Li M.-H. Chem. Commun., 4345, **2005**;
- <sup>16</sup> Kjoniksen A.L., Laukkanen A., Galant C., Knudsen K. D., Tenhu H., Nyström B., Macromolecules, 38, 948, **2005**;
- <sup>17</sup> Schilli C. M., Zhang M., Rizzardo E., Thang S., Chong Y. K., Edwards K., Karlsson G., Müller A. H. Macromolecules, 37, 7867, **2004**;
- <sup>18</sup> Bohbot-Raviv Y., Wang Z.-G. Phys. Re. Lett., 85, 3428, **2000**;
- <sup>19</sup> Mecke A., Dittrich C., Meier W. Soft Matter, 2, 751, **2006**;
- <sup>20</sup> Graff A., Sauer M., Van Gelder P., Meier W. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002, 99, 5064.
- <sup>21</sup> Rijcken C. J. F., Soga O., Hennink W. E., van Nostrum C. F. J. Controlled Release, 120, 131, **2007**;
- <sup>22</sup> Cohen S., Surf. Sci. Ser., 110, 1, **2003**;
- <sup>23</sup> Cosgrove T.: Colloid Sci., 113, **2005**;
- <sup>24</sup> Bader H., Ringsdorf H., Schmidt B. Angew. Makromol. Chem., 123/124, 457, **1984**;
- <sup>25</sup> Sperling R. A., Parak W. J., Phil. Trans. R. Soc. A 368, 1333-1383, **2010**;
- <sup>26</sup> Mathot F., van Beijsterveldt L., Preat V., Brewster M., Arien A. J. Controlled Release, 111, 47, **2006**;
- <sup>27</sup> Rijcken C. J. F., Soga O., Hennink W. E., van Nostrum C. F. J. Controlled Release, 120, 131, **2007**;

- 
- <sup>28</sup> Rösler A., Vandermeulen G. W. M., Klok H.A. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 53, 95, **2001**;
- <sup>29</sup> Cerritelli S., Velluto D., Hubbell J. A. *Biomacromolecules*, 8, 1966, **2007**;
- <sup>30</sup> Israelachvili, J. N. *Intermolecular and surface forces*; Academic Press Limited:London, **1992**;
- <sup>31</sup> Forster, S.; Zisenis, M.; Wenz, E.; Antonietti, M. *Journal of Chemical Physics*, 104, 9956, **1996**;
- <sup>32</sup> Schillen, K.; Brown, W.; Johnsen, R. M. *Macromolecules*, 27, 4825, **1994**;
- <sup>33</sup> Hamley I., *Block Copolymers in Solution: Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, **2005**;
- <sup>34</sup> Kataoka, A. Harada K., Nagasaki Y., *Adv. Drug Delivery Rev.* 47, 113, **2001**;
- <sup>35</sup> Bagatella-Flores N., Schiessel H., Gelbart W. M., *J. Phys. Chem. B* 109, 21305, **2005**;
- <sup>36</sup> Likos C. N., Mayer C., Stiakakis E., Petekidis G., *J. Phys.: Condens Matter* 17, S3363, **2005**;
- <sup>37</sup> Diamant H., Andelman D., *Macromolecules* 33, 8050, **2000**;
- <sup>38</sup> Ikkala O., ten Brinke G., *Science*, 295, 2407, **2002**;
- <sup>39</sup> Hadijichristidis N., Pispas S., Floudas G. *Block Copolymers by Group Transfer Polymerization*; In *Block Copolymers*, Wiley, p. 65, **2003**;
- <sup>40</sup> Angot, S.; Taton, D.; Gnanou, Y. *Macromolecules*, 33, 5418, **2000**;
- <sup>41</sup> Forster, S., Antonietti, M., *Adv. Mater.*, 10,195, **1998**;
- <sup>42</sup> Tharwat F. Tadros., *Applied Surfactants Principles and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 634 pp., ISBN. 3-527-30629-3, **2005**;
- <sup>43</sup> Ki-Hyun K., Jong-Chan L., Jonghwi L., *Macromol. Biosci.*, 8, 339, **2008**;
- <sup>44</sup> Torchilin V. P. , *J. Controlled Release* 73, 137, **2001**;
- <sup>45</sup> Watterson A. C., Parmar V. S., Kumar R., K. S. Sunil, A.S. Najam, Tyagi R., Sharma A. K., Samuelson L. A., Kumar J., Nicolosi R., Shea T., *Pure Appl. Chem.*, 77,1, 201, **2005**;
- <sup>46</sup> Plante O. J., Palmacci E. R., Seeberger P. H., *Science*, 291, 1523, **2001**;
- <sup>47</sup> Ladmiral, V.; Melia, E.; Haddleton, D. M. *European Polymer Journal*, 40, **2004**;
- <sup>48</sup> Wang, Q.; Dordick, J. S.; Linhardt, R. J. *Chemistry of Materials*, 14, 3232, **2002**;
- <sup>49</sup> d'Ayala G., Malinconico M., Laurienzo P., *Molecules*, 13, 2069, **2008**;
- <sup>50</sup> Stevens C.V., Meriggi A., Booten K., , *Biomacromolecules*, 2,1, **2001**;
- <sup>51</sup> Stevens C.V., Meriggi A., Peristeropoulou M., Christov P.P., Booten K., Levecke B., Vandamme A., Pittevils N., Tadros T.F., *Biomacromolecules*, 2, 1256, **2001**;
- <sup>52</sup> Tadros T.F., Vandamme A., Booten K., Levecke B., Stevens C.V., *Colloids Surf A*, 250, **2004**;
- <sup>53</sup> Desbrières J., *Polymer* 45:3285, **2004**;
- <sup>54</sup> Landoll L.M., *J Polym Sci Polym Chem*, 20, **1982**;
- <sup>55</sup> Desbrieres J., Babak V. G., *Polym Int* 55:1177–1183, **2006**;
- <sup>56</sup> Hafrén J., Zou W., Corbova A., *Macromol rapid commun*, 27, 1362, **2006**;
- <sup>57</sup> Bock V. D., Hiemstra H., Maarseveen J. H.-V., *Eur. J. Org. Chem.*,2006,51, **2006**;
- <sup>58</sup> Chang Y.H., Mc Cormick C.L., *Macromolecules*, 26, 6121, **1993**;
- <sup>59</sup> Rotureau E., Leonard M., Dellacherie E., Durand A., *Colloid J., Interf Sci.*, 279, 68, **2004**;
- <sup>60</sup> Beltran C.M., Guillot S., Langevin D., *Macromolecules*, 36, 8506, **2003**;

- 
- <sup>61</sup> Tuzar Z., Kratchvil P., Micelles of Block and graft copolymers in Solution In: Matijevic, E (Ed) Surface and Colloid Science, vol 15. Plenum, New York, **1993**;
- <sup>62</sup> Munk P., Classical methods for the study of block copolymer micelles, Webber, S. E.; Munk, P.; Tuzar, Z. (Eds), Nato ASI Series E: Applied Sciences, Vol. 327. Kluwer, Dordrecht, **1996**;
- <sup>63</sup> Yusa, S.; Sakakibara, A.; Yamamoto, T.; Morishima, Y. *Macromol.*, 35, 10182, **2002**;
- <sup>64</sup> Nichifor M., Lopes S., Bastos M., Lopes A., *J. Phys. Chem. B*, 108, 16463, **2004**;
- <sup>65</sup> Stanciu M.C., Nichifor M., B.C. Simionescu, *Chem. Bull. "Politehnica" Univ. Timisoara*, 55, 1, **2010**;
- <sup>66</sup> Rodrigues M.R., *J Carbohydr Chem.*, 24.733, **2005**;
- <sup>67</sup> Duval-Terrié C., Cosette P., Molle G., Muller G., Dé E., *Protein Science*, 12,681, **2003**;
- <sup>68</sup> Liua T., Burgerb C., Chu B., *Prog. Polym. Sci.*, 28, 5, **2003**;
- <sup>69</sup> Chu B, Zhou Z. VM, editor. Nonionic surfactants. New York: Marcel Dekker; **1996**;
- <sup>70</sup> Liu T., Nace VM, Chu B. *J Phys Chem B.*,101, 8074, **1997**;
- <sup>71</sup> Liu T., Burger C., Chu B., *Prog. Polym. Sci.*, 28, 5, **2003**;
- <sup>72</sup> Kon-no K. Properties and applications of reversed micelles. In: Matijevic E, editor. Surface and colloid science, vol. 15. New York: Plenum Press; **1993**;
- <sup>73</sup> Nguyen C., Hawker C.J., Miller R.D., Huang E., Hedrick J.L., Gauderon R., Hilborn J.G. *Macromolecules*, 33, 4281, **2000**;
- <sup>74</sup> Grohn F, Bauer BJ, Akpalu YA, Jackson CL, Amis E.J., *Macromolecules*, 33, 6042, **2000**;
- <sup>75</sup> Wan A., Æ Kou Y. , *J. Nanopart Res.*, 10, 437, **2008**;
- <sup>76</sup> A. Saha, S. Ramakrishnan, *Macromol.*, 10,1021, **2008**;
- <sup>77</sup> X. Jiang, E. B. Vogel, M. R. Smith III, G. L. Baker, *Macromol.*, 41, 1937-1944, **2008**.
- <sup>78</sup> Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B., *Angew Chem Int Ed*;40, 21, **2004**;
- <sup>79</sup> Rostovtsev V.V., Green L.G., Fokin V.V., Sharpless K.B., *Angew Chem Int Ed*;41:2596–9, **2002**;
- <sup>80</sup> Tornøe C.W., Christensen C., Meldal M., *J Org Chem*, 6730, 57, **2002**;
- <sup>81</sup> Meldal M., *Macromol. Rapid Commun.*, 29, 1016, **2008**;
- <sup>82</sup> Lutz J-F., Borner H.G.. *Progress in Polymer Science*, 33, 1, **2008**;
- <sup>83</sup> Lutz J-F., Zarafshani Z., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 958., **2008**;
- <sup>84</sup> Tornøe C.W., Christensen C., Mendal M., *Journal of Organic Chemistry*, 67, 3057, **2002**;
- <sup>85</sup> Rostovtsev V.V., Green L.G., Fokin V.V., Sharpless K.B., *Angew. Chem.*, 114, 2596, **2002**;
- <sup>86</sup> Van Koten G., Noltes J. G., *Comprehensive Chemistry*, vol.2, Ed. G Wilkinson, Pergamon, Oxford, cap. 14, p 720, **1982**;
- <sup>87</sup> Urbani C. N. Bell, C. A., Lonsdale D. E., Whittaker M. R., *Macromolecules*, 41, 76, **2008**;
- <sup>88</sup> Parrish B., Emrick T., *Bioconjugate Chem.*, 18, 263, **2007**;
- <sup>89</sup> Prakash S., Long T. M., Selby J. C., Moore, J. S., Shannon M. A., *Anal. Chem.*, 79, 1661, **2007**;
- <sup>90</sup> Ranjan R., Brittain W. J., *Macromolecules*, 40, 6217, **2007**;

- 
- <sup>91</sup> O'Reilly R. K. Joralemon M.J., Hawker C.J., Wooley K.L., *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 44, 5203, **2006**;
- <sup>92</sup> Chen G.J., Tao L., Mantovani G., Geng J., Nystrom D., Haddleton D. M., *Macromolecules*, 40, 7513, **2007**;
- <sup>93</sup> Lee J. W., Kim H., Kim B.K., Shin W.S., Jin S.H., *Tetrahedron*, 62, 9193, **2006**;
- <sup>94</sup> Liu Q., Chen Y M., *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 44, 6103, **2006**;
- <sup>95</sup> Liebert T., Hänsch C., Heinze T., *Macromol. Rapid Commun.*, 27, 208, **2006**;
- <sup>96</sup> Fournier D., Hoogenboom R., Schubert U.S., *Chem Soc Rev*;36, 1369, **2007**;
- <sup>97</sup> Binder W.H., Sachsenhofer R., *Macromol Rapid Commun*;29, 952, **2008**;
- <sup>98</sup> Lutz J.F., *Angew Chem Int Ed*;46,1018, **2007**;
- <sup>99</sup> Nandivada H., Jiang X.W., Lahann J., *Adv Mater*;19, 2197, **2007**;
- <sup>100</sup> Mantovani G., Ladmiral V., Tao L., Haddleton D.M., *Chem Commun.*,2089, 91, **2005**;
- <sup>101</sup> Lutz J.F., Borner H.G., Weichenhan K., *Macromolecules*, 39, 6376, **2006**;
- <sup>102</sup> Le Drounaguet B., Velonia K., *Macromol Rapid Commun*;29:1073–89, **2008**;
- <sup>103</sup> Kulbokaite R., Ciuta G., Netopilik M., Makuska R., *Reactive and Functionnal Polymers*, 69, 771, **2009**;
- <sup>104</sup> Hasegawa T., Umeda M., Numata M., Li C., Bae A.-H., Fujisawa T., Haraguchi S., Sakurai K., Shinkai S., *Carbohydrate Research*, 341, 35, **2006**;
- <sup>105</sup> Liebert T., Hansch C., Heinze T., *Macromolecular Rapid Communications*, 27, 208, **2006**;
- <sup>106</sup> Hotha S., Kashyap S., *J. Org. Chem.*, 71, 364-367, **2006**;
- <sup>107</sup> Ikeda M., Hasegawa T., Numata M., Sugikawa K., Sakurai K., Fujiki M., Shinkai S., *Journal of the American Chemical Society*, 129, 13,3979, **2007**;
- <sup>108</sup> Fuyi Z., Bernet B., Bonnet V., Dangles O., Sarabia F., Vasella A., *Helvetica Chimica Acta*, 91, 4, 608, **2008**;
- <sup>109</sup> Heinze T., Schöbitz M., Pohl M., Meister F., *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 46, 11, 3853, **2008**;
- <sup>110</sup> Fenn D., Pohl M., Heinze T., *Reactive and Functional Polymers*, 69, 6, 347-352, **2009**;
- <sup>111</sup> Pohl M., Heinze T., *Macromolecular Rapid Communications*, 29, 21, 1739, **2008**;
- <sup>112</sup> Gao Y., Zhang Z., Chen L., Gu W., Li Y., *Biomacromolecules*, 10, 2175, **2009**;
- <sup>113</sup> Hafrén J., Zou W., Córdova A., *Macromolecular Rapid Communications*, 27, 16, 1362, **2006**;
- <sup>114</sup> Krouit M., Bras J., Belgacem M.N., *European Polymer Journal*, 44, 12, 4074, **2008**;
- <sup>115</sup> Ossipov H.J., 1709e18, *Macromolecules*, 39, 5, **2006**;
- <sup>116</sup> Crescenzi V., Cornelio L., Di Meo C., Nardecchia S., Lamanna R., *Biomacromolecules*, 8,6, 1844, **2007**;
- <sup>117</sup> Zhang J., Xu X.-D., Wu D.-Q., Zhang X.-Z., Zhuo R.-X., *Carbohydrate Polymers*, 77, 585 **2009**;
- <sup>118</sup> Tizzotti M., Labeau M.-P., Hamaide T., Drockenmuller E., Charlot A.-L., Fleury E., *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 48, 2733, **2010**;
- <sup>119</sup> Ringot C., Sol V., Granet R., Krausz P., *Materials Letters*, 63, 1889, **2009**;

- 
- <sup>120</sup> Pohl M., Morris G.A., Harding S.E., Heinze T., *European Polymer Journal*, 45, 1098, **2009**;
- <sup>121</sup> Pahimanolis N., Vesterinen A.-H., Rich J., Seppala J., *Carbohydrate Polymers*, 82, 78, 2010;
- <sup>122</sup> J. M. Seidel, S. M. Malmonge, *Mat. Res.*,3,3, **2000**;
- <sup>123</sup> Satish CS, Satish KP, Shivakumar HG.. *Indian J Pharm Sci*,68:133-40, **2006**;
- <sup>124</sup> W.E. Hennink, C.F. van Nostrum, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 13-36, **2002**
- <sup>125</sup> N.A. Peppas: *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, Vol. 1. Fundamentals, CRC Press, **1986**;
- <sup>126</sup> Malcolm B. Huglin, M.B.Z., *J. Appl. Polym. Sci.*, 31, 457, **1986**;
- <sup>127</sup> Sperinde, J.J. and L.G. Griffith, *Macromolecules*, 33, 5476, **2000**;
- <sup>128</sup> I. Galeska, T-K Kim, S. D. Patil, U. Bhardwaj, D. Chattopadhyay, F. Papadimitrakopoulos, D. J. Burgess, *AAPS Journal*; 7,1, 22, **2005**;
- <sup>129</sup> A. K. Mishra, D. Pal, A. Kr. Mishra, V. Dwivedi, D. P. Singh, U. Dhaked, *International Journal of Drug Formulation & Research*, Vol. 1 (iii) 292, **2010**;
- <sup>130</sup> Gayet, J.C., G. Fortier, *Journal of Controlled Release*, 38, 2, 177, **1996**;
- <sup>131</sup> Hubbell, J.A., *Journal of Controlled Release*, 39, 2, 305, **1996**;
- <sup>132</sup> Katayama, T., Nakauma, M., Todoriki, S., Phillips, G. O. & Tada, M., *Food Hydrocolloids*, 20, 983, **2006**;
- <sup>133</sup> Nagasawa, N., Yagi, T., Kume, T. & Yoshii, F., *Carbohydrate Polymers* 58, 109, **2004**;
- <sup>134</sup> Al-Assaf, S., Dickson, P., Phillips, G. O., Thompson, C. & Torres, J. C., Compositions comprising polysaccharide gums. In World Intellectual Property Organization, Vol. WO2009/016362 A2, (ed. PCT), Phillips Hydrocolloid Research Limited (UK), Reckitt Benckiser (UK), United Kingdom, **2009**;
- <sup>135</sup> Mansur, H. S., Orefice, R. L. & Mansur, A. A. P., *Polymer*, 45, 7193, **2004**;
- <sup>136</sup> Al-Assaf, S., Phillips, G. O., Williams, P. A. & Plessis, T. A., *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 265, 37, **2007**;
- <sup>137</sup> Liu, P., Zhai, M., Li, J., Peng, J. & Wu, J., *Radiation Physics and Chemistry*, 63, 525, **2002**;
- <sup>138</sup> Cole, Susan M., Garbe, James E, Woodson, Lewis P., Water-insoluble polysaccharide hydrogel foam for medical applications, United States, Minnesota Mining and Manufacturing Company 5089606, <http://www.freepatentsonline.com/5089606.html>, **1992**;
- <sup>139</sup> Wooram P., Kyoung S. K., Byoung-chan B., Young-Heui K., Kun N., *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40, 367, **2010**;
- <sup>140</sup> Gupta M., Gupta A.K., *Journal of Controlled Release*, 99, 157, **2004**;
- <sup>141</sup> Taniguchi I., Akiyoshi K., Sunamoto J., Suda Y., Yamamoto M., Ichinose K., *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 14, 195, **1999**;
- <sup>142</sup> Sungwon K., Kyong M. P., Jin Y. K., Ick C. K., Hyeon G. C., Dongmin K., In T.Y., Kwangmeyung K., Kun N., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.*, 63, 55, **2008**;
- <sup>143</sup> B. Mishra, S. Vuppu, K. Rath, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 45, 50, **2011**;
- <sup>144</sup> Tester R. F., Karkalas J., Qi X., *Journal of Cereal Science*, 39, 151, **2004**;
- <sup>145</sup> Jobling S., *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 210, **2004**;
- <sup>146</sup> Konik C.M., Miskelly D.M., Gras P.W., *Starch/Stärke*, 45, 139, **1993**;

- 
- <sup>147</sup> Jane J., Carbohydrates: Basic concepts. In: Christen GL, Smith JS. editors. Food chemistry: Principles and applications. California: Science technology system. P43-45, **2000**;
- <sup>148</sup> McGrance S.J., Cornell H.J., Rix, C.J., Starch, 50, 158, **1998**;
- <sup>149</sup> Mullen J.W., Pacsu E., Ind. Eng. Chem., 34, 1209, **1942**;
- <sup>150</sup> Biobased packaging materials for the food industry, status and perspectives, raport al Food Biopack Project (Ed. C. J. Weber), Department of Dairy and Food Science, the Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg C., Denmark, **2000**;
- <sup>151</sup> Dicke R. A., Cellulose, 11, 255, **2004**;
- <sup>152</sup> Sagar A.D., Merrill E.W., Journal of Applied Polymer Science, 58, 9, 1647, **1995**;
- <sup>153</sup> Peltonen, S., and Harju, K. Applications and methods for the preparation of fatty acid esters of polysaccharides. US Patent 5589577, **1996**;
- <sup>154</sup> Bengtsson, M.; Koch, K.; Gatenholm, P., Carbohydrate Polymers, 54, 1, 1, **2003**;
- <sup>155</sup> Heinze T., Liebert T., Progress in Polymer Science, 26, 1689, **2001**;
- <sup>156</sup> Chaussona M., Fluchèrea A., Landreaux E., Agunia Y., Chevalier Y., Hamaide T., Abdul-Malak N., Bonnet I., International Journal of Pharmaceutics, 362, 153, **2008**.
- <sup>157</sup> Habnoui S., Blanquer S., Darcos V., Coudane J., Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, 47, 6104, **2009**;
- <sup>158</sup> Hamaide T., Pantiru M., Fessi H., Boullanger, Macromol. Rapid Commun., 22, 9, **2009**;
- <sup>159</sup> Tortosa K., Miola C., Hamaide T., J. Appl. Pol. Sci., 65, 2357, **1997**;
- <sup>160</sup> Miola-Delaite C., Hamaide T., Spitz R., Macromol. Chem. Phys., 200, 1771, **1999**;
- <sup>161</sup> Vollhardt, Peter, and Schore, Neal. Organic Chemistry: Structure and Function. New York: W.H. Freeman Company, **2007**;
- <sup>162</sup> Tedeschi C., Saccavini C., Maurette L., Soleilhavoup M., Chauvin R., J. Organomet. Chem., 670, 151, **2003**;
- <sup>163</sup> Liu Q., Burton D. J., Tetrahedron Lett, 38, 25, 4371, **1997**;
- <sup>164</sup> Clifford A. A., Waters W., J. Chem. Soc., , 3056, **1963**;
- <sup>165</sup> Tankam P. F., Muller R., Mischnicka P., Hopf H., Carbohydr. Res., 342, 2049, **2007**;
- <sup>166</sup> Liu X., Zheng H.-N., Maa Y.-Z., Yan Q., Xiao S.-J., Journal of Colloid and Interface Science 358, 116, **2011**;
- <sup>167</sup> Fukuda T., Onogi S., Miura Y., Thin Solid Films , 518, 880, **2009**;
- <sup>168</sup> Bengtsona M., Kochb K., Gatenholm P., Carbohydr. Polym., 54, 1, **2003**;
- <sup>169</sup> Rindlav-Westling A., Gatenholm P., Biomacromol., 4, 1, 166, **2003**;
- <sup>170</sup> Jeong J.H., kang H. S., yang S. R., Kim J-D., Polymer, 44, 583, **2003**.
- <sup>171</sup> Aranaz I., Harris R., Heras A., Current Organic Chemistry, 14, 308, **2010**;
- <sup>172</sup> La K., Sang C.L., Yong W. C., Journal of Controlled Release, 101, 59, **2005**;
- <sup>173</sup> Astafieva I., Zhong X. F., Eisenberg A., Macromolecules, 26, 7339, **1993**;
- <sup>174</sup> Wang J. E., Duchscherer T. M., Pietraru G., Cramb D. T., Langmuir, 15, 6181, **1999**;
- <sup>175</sup> K. Letchford, H. Burt, Europ. Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 65, 259, **2007**;
- <sup>176</sup> Kappe C.O., Angew. Chem. Int. Ed., 43, 6250, **2004**.



- 
- <sup>177</sup> P. Kocalka, N. K. Andersen, F. Jensen and P. Nielsen, *ChemBioChem*, 8, 2106, **2007**;
- <sup>178</sup> Luo Z., He X., Fu X., Luo F., Gao Q., *Starke/Starch* 58, 468, **2006**.
- <sup>179</sup> Tester R.F., Morrison W.R., *Cereal. Chem.*, 67, 551, **1990**.
- <sup>180</sup> Pinkrova J., Hubackova B., Kadlec P., Prihoda J., Bubnik Z., *Czech J.Food Sci.*, 21, 5, 176
- <sup>181</sup> Choi S., Munteanu M., Ritter H., *J. Polym.Res.*, 16, 389, **2009**.
- <sup>182</sup> Garca N., Benito E., Guzmán J., de Francisco R., Tiemblo P., *Langmuir*, 26, 5499, **2010**;
- <sup>183</sup> Kappe C. O., *Angew. Chem.*, 43, 6250, **2004**;
- <sup>184</sup> Lukaszewicz M., Bogdal D., Pielichowski J., *Adv. Synth. Catal.*, 345, 1269, **2003**;
- <sup>185</sup> Zhang X., Hayward D. O., Mingos D. M. P., *Catal. Lett.*, 88, 33, **2003**;
- <sup>186</sup> Peng X.-W., Ren J.-L., Zhong L.-X., Cao X.-F., Sun R.-C., *Agric. Food Chem.*, 59, 570, **2011**;
- <sup>187</sup> Appakkuttan P., Dehaen W., Fokin V. V., van der Eyken E., *Org. Lett.*, 6, 4223, **2004**;
- <sup>188</sup> Rijkers D. T. S., van Esse G. W., Merckx R., Brouwer A. J., Jacobs H. J. F., Peiters R. J., Liskamp R. M. J., *Chem. Commun.*, 4581, **2005**;
- <sup>189</sup> Bouillon C., Meyer A., Vidal S., Jochum A., Chevolut Y., Cloarec J.-P., Praly J.-P., Vasseur J.-J., Morvan F., *J. Org. Chem.*, 71, 4700, **2006**;
- <sup>190</sup> Hoogenboom R., Moore B. C., Schubert U. S., *Chem. Commun.*, 38, 4010, **2006**.
- <sup>191</sup> Pourcelle V., Freichels H., *Biomacromolecules*, 10, 966, **2009**;
- <sup>192</sup> Xu N., Wang R., Du F.S., Li Z.C., *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 47, 3583, **2009**;
- <sup>193</sup> Albertsson A., Varma I., *Biomacromolecules*, 4, 6, 1466, **2003**;
- <sup>194</sup> Ring opening polymerization, *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. Wiley & Sons, Vol 11;
- <sup>195</sup> Domb A. J., Kost J., Wiseman D. M., *Handbook of biodegradable polymers, Technology & Engineering*, **1997**;
- <sup>196</sup> Heinze T., Talaba P., Heinze U., *Carbohydrate Polymers*, 42, 411, **2000**;
- <sup>197</sup> Dubois P., Krishnan M., Narayan R., *Polymer*, 40, 3091, **2000**;
- <sup>198</sup> Rutot D., Degée P., Narayan R., Dubois P., *Composite Interfaces*, 7, 215, **2000**;
- <sup>199</sup> Wu C.-S., *Journal of Applied Polymer Science*, 89, 2888, **2003**;
- <sup>200</sup> Kim J., Tirrell, D. A., *Macromolecules*, 32, 945, **1999**;
- <sup>201</sup> Wan, J., Cheung M. K., Mi, Y. *Polymer*, 43, 1357, **2002**;
- <sup>202</sup> Choi E.J., Kim C.-H., Park J.K., *Macromolecules*, 32, 7402, **1999**;
- <sup>203</sup> Spěváček J., Brus J., Divers T., Grohens Y., *European Polymer Journal*, 43, 1866, 2007;
- <sup>204</sup> Bogracheva TY., Wang YL., Hedley CL., *Biopolymers*, 58, 247, **2001**;
- <sup>205</sup> Biliaderis C.G., *Food Technol.*, 6, 98, **1992**;
- <sup>206</sup> Godet M.C; Bizot H; Buléon A., *Carbohydr. Polym.*, 27, 47, **1995**;
- <sup>207</sup> Averous L., Moro L., Fringant C., *Polymer*, 41, 4157, **2000**;
- <sup>208</sup> Aburto J., Thiebaud S., Alric I., Bikiaris D., Prinos J., Panayiotou C., *Carbohydr Polym*, 34, 101, **1997**;

- 
- <sup>209</sup> Yingying Lu, Youliang Hu, Z. M. Wang, Manias, C. Chung *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 40, 3416, **2002**;
- <sup>210</sup> Delarue J., Giampaoli P., *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2372, **2000**;
- <sup>211</sup> Fredriksson H., J. Silverio, Andersson R., Eliasson A.-C., Aman P., *Carbohydrate Polym.*, 35, 19, **1998**;
- <sup>212</sup> Persenaire O., Alexandre M., Degee P., Dubois P., *Biomacromolecules*, 2, 288, **2001**;
- <sup>213</sup> Ting-Ting S., Heng J., Hong G., *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 47, 398, **2008**
- <sup>214</sup> Aoyagi, Y.; Yamashita, K.; Doi, Y.. *Polym. Degrad. Stab.*, 76, 53, **2002**
- <sup>215</sup> Yong-Feng Z., Xinghe F., Xiaofang C., Xinhua W., Qi-Feng Z., *Polymer*, 46, 5396, **2005**;
- <sup>216</sup> Sivalingam G, Karthik R, Madras G. *J Anal Appl Pyrol*; 70, 2,631, **2003**;
- <sup>217</sup> Persenaire O, Alexandre M, Degee P, Dubois P. *Biomacromolecules*, 2, 288, **2001**;
- <sup>218</sup> Marc Lemieux, Patrick Gosselin, Mircea Alexandru Mateescu, *International Journal of Pharmaceutics*, 382, 172, **2009**;
- <sup>219</sup> Seib P.A. *Starch Chemistry and Technology, Syllabus*. Kansas State University, Manhattan, KS, **1996**.
- <sup>220</sup> Xie X., Liu Q., *Starch/Starke* 56, 364, **2004**.
- <sup>221</sup> Hizikuri S., *Starch Analytical aspects. Carbohydrates in food* (pp.147-160). New York Marcel Dekker.
- <sup>222</sup> Van Soest J.J.G., Turnois H., de Wit D., Vliegthart J.F.G, *Carbohydrate Research*, 279, 201, **1995**.
- <sup>223</sup> Coma V., Sebti I., Pardon P., Pichavan, F.H., Deschamps A., *Carbohydrate Polymers* 51, 265, **2003**;
- <sup>224</sup> Kormeyer R.W., von Meerwall, E., Peppas, N.A. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics* 24. 409, **1986**;
- <sup>225</sup> Paquet O., Krouit M., Bras J., Thielemans W., Belgacem M.N., *Acta Materialia*, 58, 792, **2010**;
- <sup>226</sup> Patil S.A., Rane B.R., Bakliwal S.R., Pawar S.P., *IJRAP*, 2, 3, 758, **2011**;
- <sup>227</sup> Abdellatif M., Sherald H. , Girma B., *Journal of Applied Polymer Science*, 106, 1689, **2007**;
- <sup>228</sup> Hanna Lönnberg H., Fogelström L., Malmström E., Hult A., *European Polymer Journal*, 44, 2991, **2008**.

---

## Valorificarea rezultatelor cercetării

### Lucrări trimise spre publicare în reviste cu factor de impact

1. A. Uliniuc, M. Popa, T. Hamaide, F. Boisson, D. Leonard, "TOWARD TUNABLE AMPHIPHILIC GELS BY POLYCAPROLACTONE GRAFTING ONTO STARCH BACKBONE via CuAAC CLICK CHEMISTRY", trimisă spre publicare la revista *Macromolecular Chemistry and Physics* (2011).
2. A. Uliniuc, M. Popa, T. Hamaide, S. Băcăiță, "MODIFIED STARCH BASED HYDROGELS CROSSLINKED WITH CITRIC ACID", trimisă spre publicare la revista *Soft Materials* (2011).
3. A. Uliniuc, M. Popa, T. Hamaide, M. Dobromir, "NEW APPROACH IN HYDROGEL SYNTHESIS-CLICK CHEMISTRY", trimisă spre publicare la revista *Cellulose Chemistry and Technology* (2011).

### Comunicări prezentate la manifestări științifice internaționale

1. A.Uliniuc, M. Popa, T. Hamaide, "*Synthesis of new starch based hydrogel with low hydrophilicity via "click" chemistry*", 7<sup>th</sup> International Conference on Polymer and Textile Biotechnology, IPTB, 2-4 martie 2011, Milano, Italia.
2. A.Uliniuc, M. Popa, T. Hamaide, "*New amphiphilic copolymers based on polycaprolactone grafted starch*", *Frontiers in Polymer Science, FPS*, 29-31 mai 2011, Lyon, Franța.
3. A.Uliniuc, M. Popa, T. Hamaide, "*Modifying starch based hydrogel hydrophilicity via "click" chemistry*", European Exhibition of Creativity and Innovation, 12-14 mai 2011, Iași, Romania.
4. A.Uliniuc, M. Popa, T. Hamaide, M. Grigoras, "*Modifying soluble starch hydrophilicity – different approaches*", 24<sup>th</sup> European Conference on Biomaterials, ESB, 4-9 septembrie 2011, Dublin, Irlanda.
5. A. Uliniuc, M. Popa, T. Hamaide, "*Différentes voies de modification de l'hydrophilie d'hydrogels à base d'amidon*", X<sup>ème</sup> Colloque Franco-Roumain sur les Polymères, CFR. 6 -7 septembrie 2011, Douai, Franța.
6. A. Uliniuc, M. Popa, T. Hamaide, M. Dobromir, D. Leonard, "*ToF-SIMS study of starch based amphiphilic polymers*", 18th International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry, 18-23 septembrie 2011, Riva del Garda (Trento, Italia).