



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



OPPOSDRU



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”

- Rezumatul tezei 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



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

UNIVERSITATEA TEHNICĂ “Gheorghe ASACHI” din IAȘI

RECTORATUL

Către.....

Vă facem cunoscut că în ziua de 18 noiembrie 2011 la ora 10⁰⁰, în sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat în cotutelă, intitulată:

**“MODIFICĂRI CHIMICE ALE POLIZAHARIDELOR ȘI ALE
HIDROGELURILOR LOR PRIN PROCEDUREL “CLICK CHEMISTRY” ”**

elaborată de domnișoara Bioing. **Ancuța ULINIUC** în vederea conferirii titlului științific de doctor în Ingineria Materialelor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

Prof.univ.dr.ing. Dan CAȘCAVAL	președinte
Universitatea Tehnică “Gheorghe Asachi” din Iași	
Prof.univ.dr.ing. Marcel POPA	conducător științific
Universitatea Tehnică “Gheorghe Asachi” din Iași	
Prof.univ.dr.ing. Thierry HAMAIDE	conducător științific
Universitatea Claude Bernard Lyon 1 (Franța)	
Prof.univ.dr.ing. Jacques DESBRIERES	membru
Universitatea din Pau et Pays de l'Adour (Franța)	
Prof.univ.dr.ing. Didier Le Cerf	membru
Universitatea din Rouen (Franța)	
Prof.dr.ing. Mircea Lucian RUSNAC	membru
Universitatea POLITEHNICA din Timișoara	

Vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica, în scris, aprecierile dumneavoastră. Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

RECTOR,

Prof. univ. dr. ing. ION GIURMA

Secretar universitate,
Ing. Cristina Nagăț

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

STUDIU BIBLIOGRAFIC

CAPITOLUL I.

I.1. Polimeri amfifili pe bază de polizaharide	1
I.1.1. Polimeri amfifili	1
I.1.2. Polizaharide amfifile	13
I.1.2.1. Metode de obținere	15
I.1.2.2. Caracterizare	16
I.1.2.3. Aplicații	19
I.2. Reacția click chemistry	21
I.2.1. Prezentarea reacției click chemistry	21
I.2.2. Aplicații ale reacției click chemistry în domeniul polizaharidelor	25
I.3. Hidrogeluri pe bază de polizaharide cu hidrofilie redusă	29
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	34
I.3.3. Metode de hidrofobizare a hidrogelurilor pe bază de polizaharide	36
I.3.4. Aplicații ale hidrogelurilor pe bază de polizaharide cu hidrofilie redusă	37

REZULTATE ORIGINALE

CAPITOLUL II. MATERIALE ȘI METODE EXPERIMENTALE	43
II.1. Materiale utilizate	43
II.2. Metode și tehnici de lucru	45
II.2.1. Determinarea procentului fracțiilor amiloză/amilopectină din amidon	45
II.3. Metode de caracterizare	
II.3.1. Caracterizare structurală	47
II.3.1.1. Rezonanța magnetică nucleară (¹ H-RMN)	47
II.3.1.2. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) și cu transformată Fourier prin reflectanță totală atenuată (FTIR-ATR)	47
II.3.1.3. Analiza suprafețelor prin spectroscopie fotonelectron cu raze X (XPS) și prin Tof-Sims	47
II.3.2. Analiza termică - analiza termogravimetrică (ATG) și calorimetria diferențială de baleiaj (DSC)	48
II.3.3. Determinarea unghiului de contact	49
II.3.4. Analiza capacității de micelizare	50
II.3.5. Microscopia electronică de baleiaj (SEM)	50
II.3.6. Microscopia electronică prin transmisie (TEM)	50
II.3.7. Determinarea gradului de retenție a apei	50

II.3.8. Evaluarea <i>in vitro</i> a cineticii de încărcare/eliberare de principii active	50
II.3.9 Modelul teoretic de difuzie a principiului activ	50
CAPITOLUL III. MODIFICAREA CHIMICĂ A AMIDONULUI	53
III.1. Modificarea chimică a amidonului solubil cu cloruri acide	53
III.1.1. Principiul reacției	53
III.1.2. Analiza rezultatelor obținute	56
III.1.2.1. Analiza structurală a amidonului modificat cu lanțuri de clorură de palmitoil	57
III.1.2.1.1. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)	57
III.1.2.1.2. Analiza suprafeței prin XPS și determinarea gradului de substituție	59
III.1.2.2. Analiza tensiunii superficiale	61
III.1.2.3. Analiza morfologică	62
III.2. Modificarea chimică a amidonului solubil prin introducerea grupării alchine	62
III.2.1. Principiul reacției	62
III.2.2. Analiza rezultatelor obținute	
III.2.2.1. Analiza structurală	63
III.2.2.1.1. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)	63
III.2.2.1.2. Rezonanța magnetică nucleară (¹ H-RMN)	64
III.3. Sinteza de poli (ε-caprolactonă) cu grupare funcțională de tip azidă	65
III.3.1. Principiul reacției	65
III.3.2. Analiza rezultatelor obținute	
III.3.2.1. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)	66
III.3.2.2. Rezonanța magnetică nucleară (¹ H-RMN)	66
III.3.2.3. Calculul gradului de polimerizare	68
III.4. Concluzii	69
 CAPITOLUL IV. GREFAREA POLI (ε-CAPROLACTONEI) PE LANȚURILE DE AMIDON	
IV.1. Grefarea poli (ε-caprolactonei) pe lanțurile de amidon <i>via</i> “click chemistry”	71
IV.1.1. Grefarea poli (ε-caprolactonei) pe lanțurile de amidon <i>via</i> “click chemistry” prin metoda convențională	71
IV.1.1.1. Principiul reacției	71
IV.1.1.2. Analiza rezultatelor obținute	
IV.1.1.1. Analiza structurală	72
IV.1.1.1.1. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR	72
IV.1.1.1.2. Caracterizarea prin spectroscopie ¹ H-RMN	72
IV.1.1.2. Analiza suprafeței prin XPS	74
IV.1.1.3. Analiza suprafeței prin Tof-Sims	76
IV.1.1.3. Analiza termică (DSC, ATG)	78
IV.1.1.4. Determinarea gradului de cristalinitate din PCL după grefare	81
IV.1.1.5. Analiza morfologică	82
IV.1.1.6. Comportamentul copolimerilor în diferiți solvenți	83
IV.1.1.7. Investigarea proprietăților de micelizare ale copolimerilor	83

IV.1.1.8. Concluzii	88
IV.1.2. Grefarea poli (ϵ -caprolactonei) pe lanțurile de amidon via “click chemistry” prin metoda microundelor	89
IV.1.2.1. Principiul reacției	89
IV.1.2.2. Analiza rezultatelor obținute	90
IV.1.2.2.1. Influența solventului asupra timpului de reacție	90
IV.1.2.2.3. Analiza structurală	93
IV.1.2.2.3.1. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR	93
IV.1.2.2.3.2. Rezonanța magnetică nucleară (^1H -RMN)	93
IV.1.2.2.4. Analiza termică (DSC, ATG)	96
IV.2. Grefarea poli (ϵ-caprolactonei) prin polimerizarea ϵ-CL la grupările –OH ale amidonului	98
IV.2.1. Principiul reacției	98
IV.2.2. Analiza rezultatelor obținute	98
IV.2.2.1. Analiza structurală	100
IV.2.2.1.1. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR	100
IV.2.2.1.2. Rezonanța magnetică nucleară (^1H -RMN)	101
IV.2.2.1.3. Determinarea gradului de substituție al grefelor de PCL pe scheletul amidonului	102
IV.2.2.2. Analiza termică (ATG, DSC)	104
IV.2.2.3. Analiza suprafeței prin XPS și ToF-Sims	109
IV.2.2.4. Analiza tensiunii superficiale	112
IV.3. Concluzii	112
CAPITOLUL V. OBȚINEREA HIDROGELURILOR PE BAZĂ DE AMIDON	115
V.1. Obținerea hidrogelurilor pe bază de amidon prin reticulare cu epichlorhidrină	115
V.1.2. Principiul reacției	115
V.1.3. Program experimental	116
V.1.4. Analiza rezultatelor obținute	116
V.1.4.1. Analiza rezultatelor privind proprietățile de umflare în soluții apoase	116
V.2. Modificarea chimică a hidrogelurilor pe baza de amidon funcționalizat cu grupare de tip alchină, prin reacția cu PCLN_3 via « click chemistry »	118
V.2.1. Principiul reacției	118
V.2.2. Analiza rezultatelor obținute	119
V.2.2.1. Analiza structurală a hidrogelurilor	119
V.2.2.1.1. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR	119
V.2.2.1.2. Rezonanța magnetică nucleară (RMN ^1H HR-MAS)	120
V.2.2.3. Analiza morfologică	121
V.2.2.4. Analiza termică (ATG, DSC)	122
V.3. Obținerea hidrogelurilor pe bază de amidon și amidon modificat cu cloruri acide și cu poli (ϵ-caprolactonă) prin reticulare cu acid citric	124
V.3.1. Principiul reacției	126
V.3.2. Program experimental	127
V.3.3. Analiza rezultatelor obținute	127

V.3.3.1. Analiza structurală a hidrogelurilor	127
V.3.3.1.1. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR-ATR	127
V.3.3.2. Analiza morfologică	130
V.3.3.3. Analiza rezultatelor privind proprietățile de umflare în soluții apoase	132
V.3.3.4. Analiza capacității de includere și eliberare a levofloxacinei	134
V.3.3.5. Studiul matematic al procesului de eliberare a medicamentului	138
V.4. Concluzii	143
VI. CONCLUZII GENERALE	146
VII. PERSPECTIVE	149
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE	150

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 biologice 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(ϵ -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.

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.

Teza prezintă procesele de obținere și caracterizarea de noi polimeri 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. Amfifilicitatea 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 ulterior cu acid citric. A fost evaluată capacitatea lor de absorbție a apei și a eliberării de principii active.

Studiul de față se ocupă de sinteza și caracterizarea unor sisteme de eliberare a principiilor biologice active, realizate în urma hidrofobizării amidonului.

Lucrarea cuprinde cinci capitole și anume:

Capitolul I, consacrat studiului bibliografic, unde se detaliază ultimile cercetări în domeniul polimerilor amfifili pe bază de polizaharide, în ceea ce privește reacția click chemistry și hidrogelurile pe bază de polizaharide cu hidrofilie redusă.

Capitolul II este dedicat materialelor, tehnicilor de lucru și metodelor de caracterizare.

Rezultatele originale sunt prezentate începând cu *Capitolul III* și conțin cercetări privind metode de hidrofobizare a polizaharidei prin reacția de esterificare cu clorura de palmitoil, precum și prin reacția de introducere a triplelor legături. Această idee se continuă cu *Capitolul IV*, unde se descrie grefarea poli (ϵ -caprolactonei) pe lanțurile de amidon *via* “click chemistry”, prin metoda clasică, respectiv prin una modernă, folosind microundele, precum și prin polimerizarea cu deschidere de ciclu (ROP) a ϵ -CL la grupările –OH ale amidonului.

Capitolul V conține rezultatele originale obținute pornind de la prepararea unor sisteme de tip hidrogel pe bază de amidon și amidon modificat, după cum s-a descris în capitolele

anterioare. Hidrogelurile au fost obținute prin reticulare cu epiclorhidrină și cu acid citric și au fost caracterizate din punct de vedere structural și morfologic, dar și al interacțiunii cu soluțiile apoase la pH fiziologic și cu soluții de medicament.

Lucrarea se încheie cu o secțiune de Concluzii Generale, Perspective și Bibliografie.

Rezumatul respectă denumirea capitolelor, numerotarea figurilor și a tabelelor din teza de doctorat.

CAPITOLUL I.

I.1. POLIMERI AMFIFILI PE BAZĂ DE POLIZAHARIDE

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 tehnologice¹.

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^{2,3}. 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 copolimerice⁴. Compoziția copolimerilor este definită în mare parte de masa moleculară și dimensiunile blocurilor homopolimerice⁵. Acestea din urmă reprezintă un parametru important, iar valoarea lungimii secvenței blocurilor depinde de tipul auto-asamblărilor⁶. 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).

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.

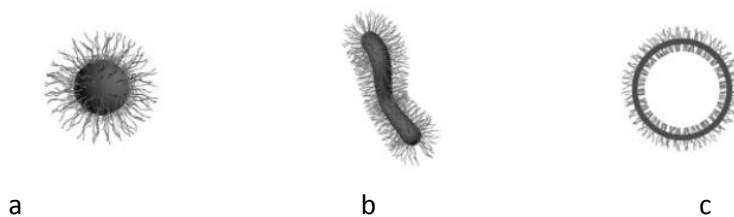


Figura 1. Morfologii ale agregatelor blocurilor polimerice în soluție a) micelă sferică, b) micelă cilindrică, c) veziculă.

I.2. REACȚIA CLICK CHEMISTRY

I.2.1. Prezentarea reacției *click chemistry*

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.¹ 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, eficace 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.

Cicloadiția Huisgen 1,3-dipolară

Descoperită în anii 1960 de Huisgen, cicloadiția 1,3-dipolară este exemplul tipic de « click chemistry », satisfăcând 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).

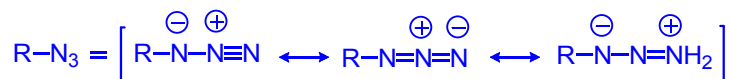


Figura 2: Natura dipolară a azidei

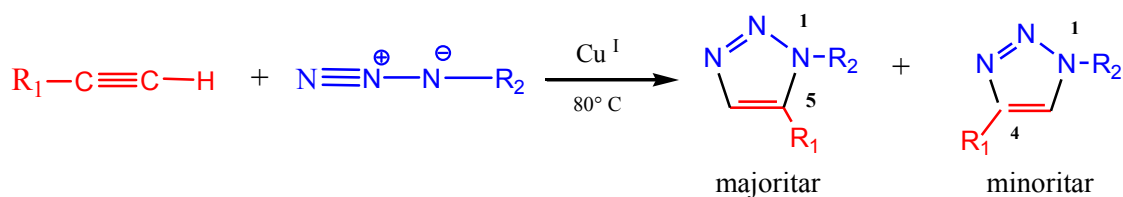


Figura 3: Principiul « Click Chemistry »: formarea triazolilor 1,2,3

Capitolul II.

MATERIALE ȘI METODE EXPERIMENTALE

II.2. Metode și tehnici de lucru

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

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 (10 ml) după adăugarea succesivă (20 μ 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 1). 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.⁷ au arătat că iodul este prezent în aproape fiecare întorsătură a helixului amilozei, paralel cu axa sa lungă.

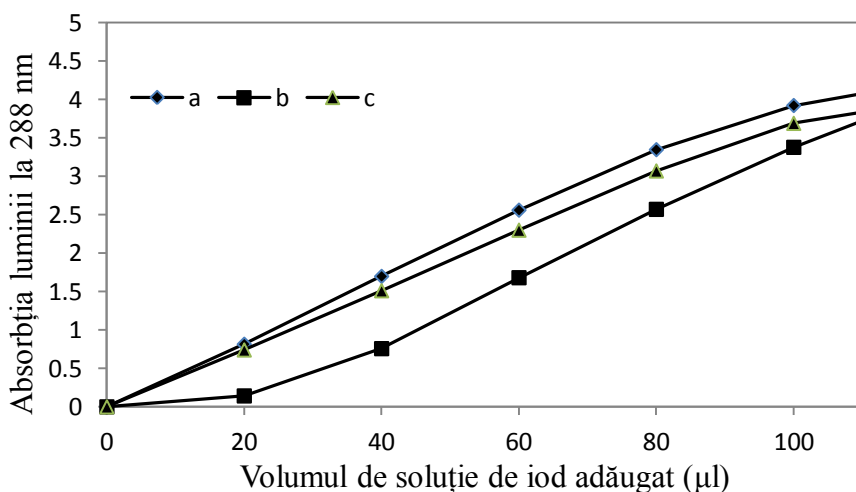


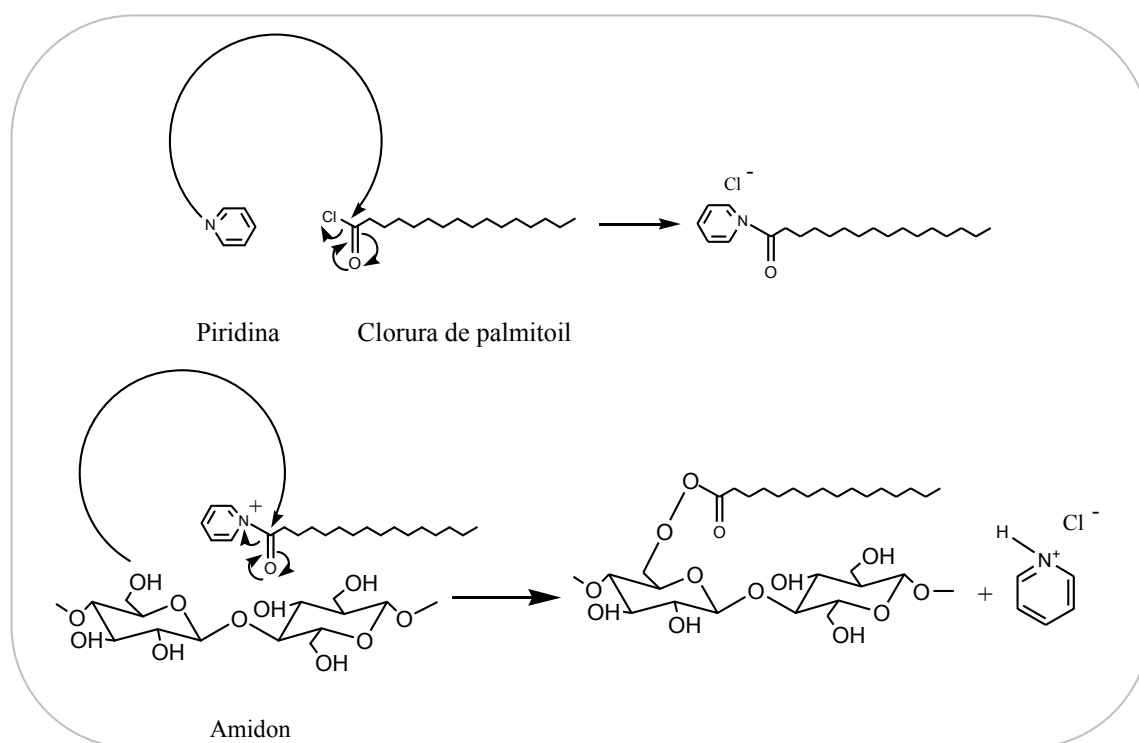
Figura 1. Evoluția absorbției în funcție de adăugarea iodului în timpul determinării CLI pentru a) blanc, b) amiloză, c) amidon.

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.

III.1.2. Analiza rezultatelor obținute

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 cm^{-1} . Cele două peak-uri de intensități puternice ce corespund valorilor 2922 și 2851 cm^{-1} sunt atribuite grupărilor metil și metilen asociate substituenților palmitoici. Vibrațiile puternice caracteristice grupărilor hidroxil ale amidonului nativ, sunt diminuate în intensitate după acilare, deoarece numărul lor scade. Intensitatea benzii OH de la 3600 la 3400 cm^{-1} depinde de DS-ul esterilor. Banda de vibrație a grupărilor metilenice crește odată cu creșterea gradului de substituție. La 1746 cm^{-1} apare banda $C=O$ a esterului.

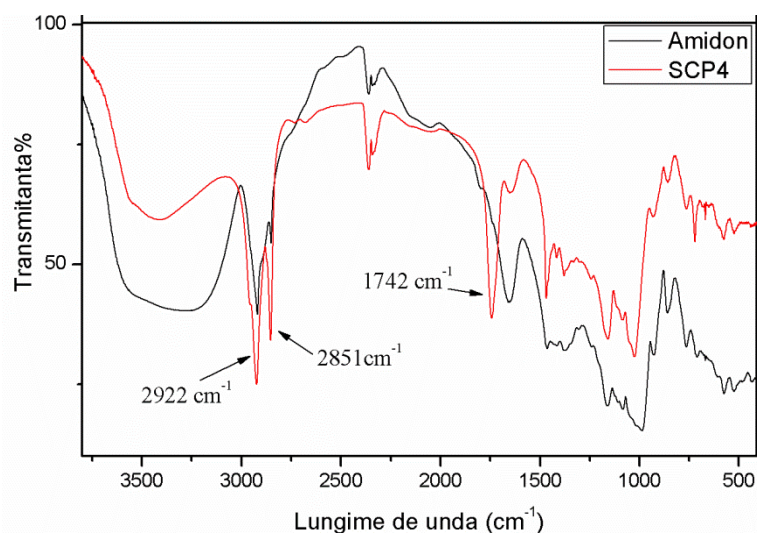


Figura 1. Spectru FTIR pentru amidonul nemodificat și pentru amidonul esterificat cu clorura de palmitoil (SCP4).

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

Spectroscopia RMN este o metodă preferată în determinarea DS-ului, cu precădere în domeniul polizaharidelor neramificate, foarte substituite, 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, prezintând o rezoluție slabă și asimetrică. Această vâscozitate și mărire a peak-urilor poate fi parțial compensată de folosirea concentrațiilor scăzute, cu costul de a avea un semnal slab comparativ cu cel al artefactelor. De aceea, polizaharidele sunt parțial sau complet degradate de enzime, tratamente 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 și cazul spectrelor noastre.

Astfel, gradul de substituție a fost calculat cu ajutorul analizei XPS (Figura 2) după cum a fost descris anterior ⁸, ca fiind raportul dintre suprafața peak-ului (-O-C-O) ce corespunde esterului și aria peak-ului -O-C-O corespunzător unității glucozidice (Tabel 1).

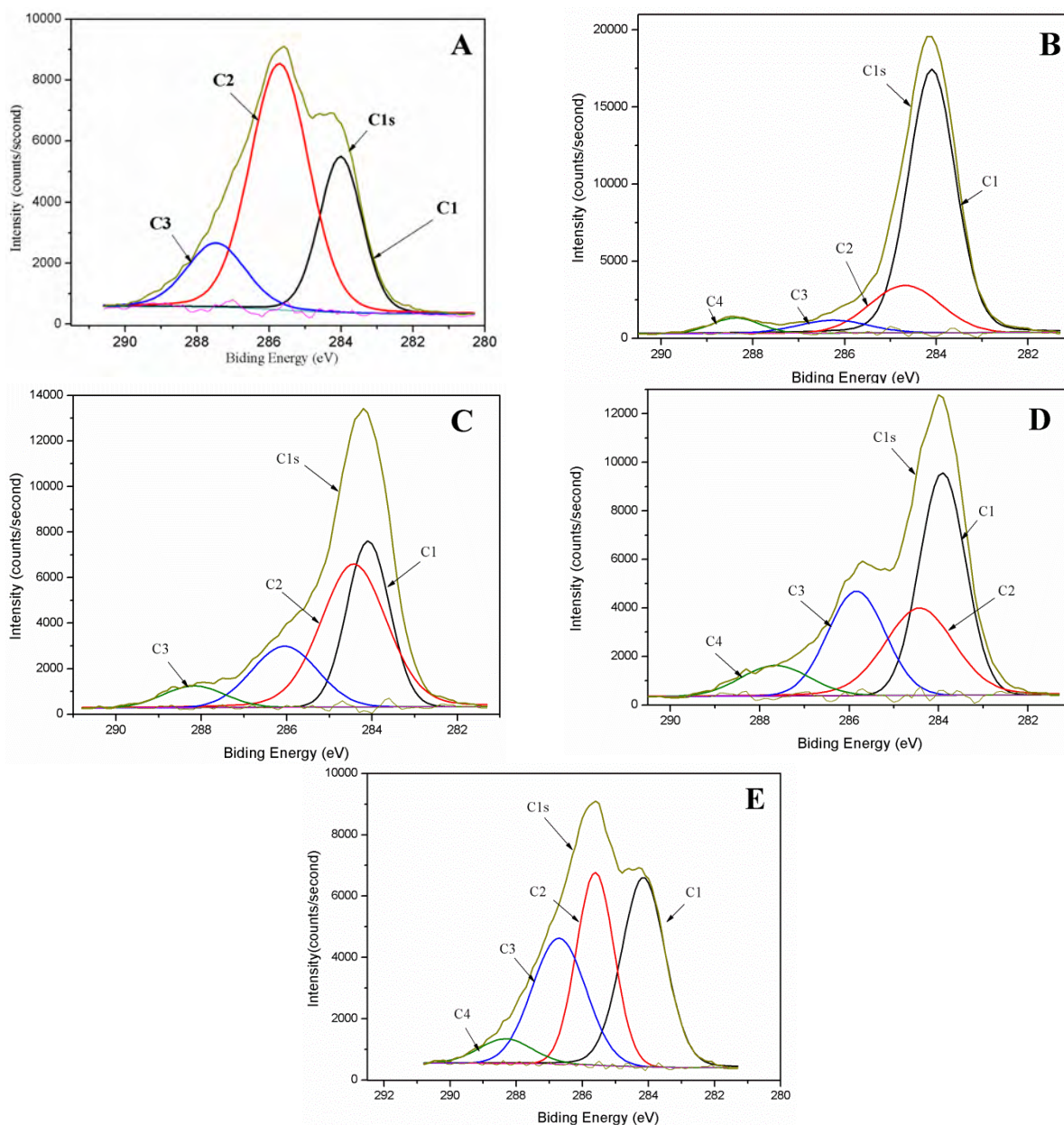


Figura 2. Deconvoluția XPS a peak-ului C1s pentru a. amidon, b. SCP1, c. SCP2, d.SCP3,e. SCP4.

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)
Energie (eV)	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 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 prin studii dedicate acestui subiect că amidonul cu 28% amiloză prezintă 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 suprafeței probelor a dezvăluit o bună corelare a rezultatelor cu valorile obținute în urma determinării gradului de substituție și cu valorile unghiului de contact la interfața lichid-aer. Această investigație a fost realizată prin metoda picăturii și a ilustrat că hidrofobicitatea produșilor este direct proporțională cu gradul lor de substituție.

III.1.2.3. Analiza morfologică

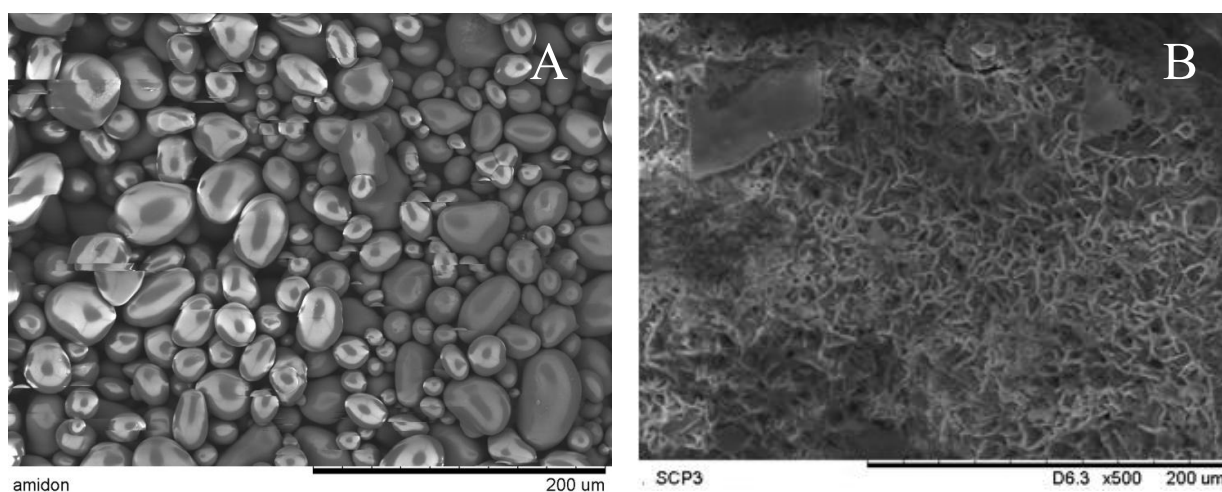


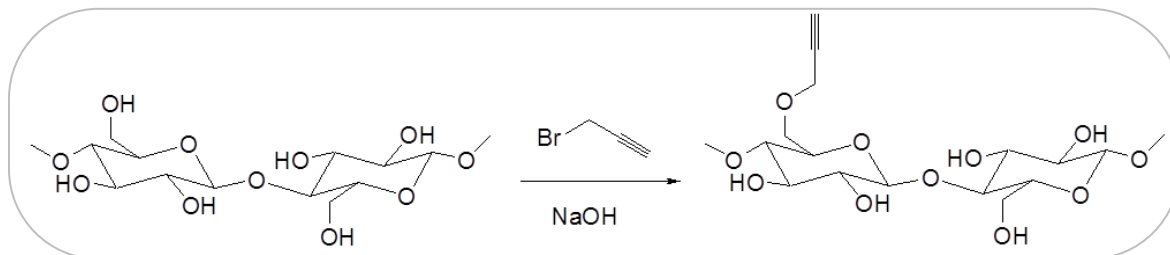
Figura 3. Imagini SEM pentru a. amidon și b. amidon modificat (SCP3)

Imaginile SEM, obținute pe probe neliofilizate, 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.

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

III.2.1. Principiul reacției

Această reacție 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) ⁹.



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

III.2.2.1. Analiza structurală

III.2.2.1. 1. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)

Amidonul a fost funcționalizat printr-o substituție nucleofilică a bromurii de propargil cu alcoxizi de sodiu, conform unei proceduri descrise anterior de Tizzotti și colab. ^[15] pentru funcționalizarea alchinică a guarurilor.

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

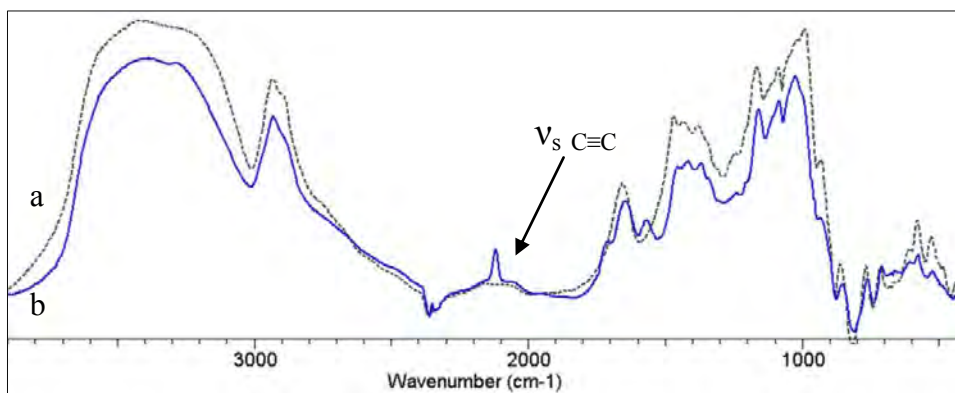
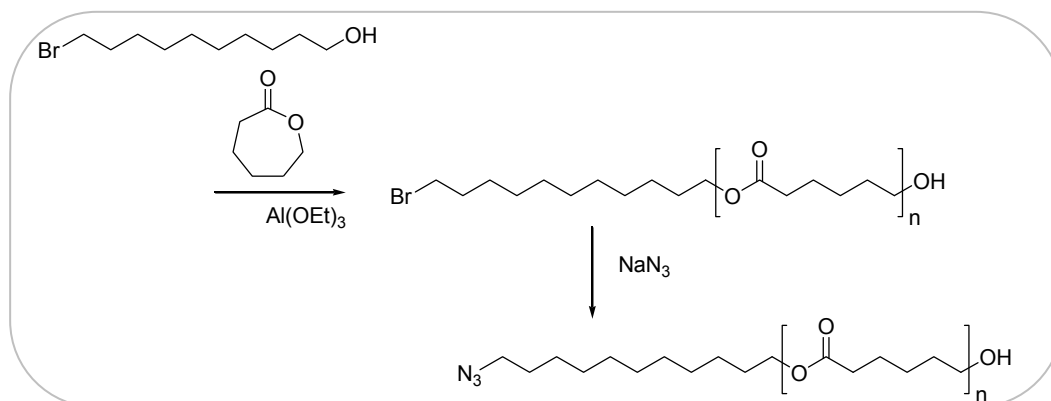


Figura 4. Comparație între spectrele FT-IR ale a) amidonului nemodificat și b) amidonului funcționalizat.

III.3. Sinteza poli(ϵ -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 acidă, terminală.



Schema 4. Mecanismul reacției de polimerizare a ϵ -caprolactonei și a substituirii bromului terminal cu NaN_3 .

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.

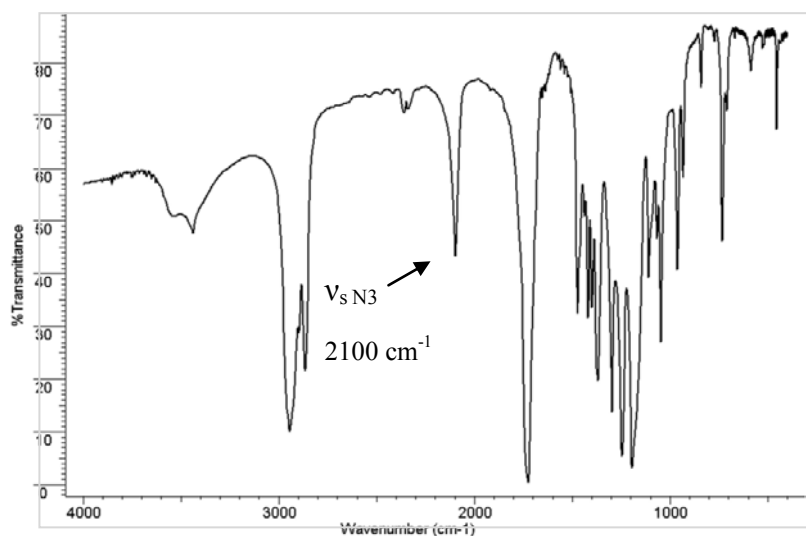


Figura 6. Spectrul FT-IR PCL- N_3 DP=13.

III.3.2.2. Rezonanța magnetică nucleară (^1H -RMN)

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) ¹⁰.

Prin spectroscopia ^1H NMR, s-a determinat gradul de polimerizare ¹¹ din intensitățile relative ale peak-urilor ce aparțin lanțului polimeric, H_α sau $\text{H}_\varepsilon + \text{H}_{\varepsilon'}$ și a celor aparținând grupului terminal metilenic $\text{H}_{\varepsilon'}$.

Ținând cont de faptul că I_α , I_ε reprezintă valorile integralei peak-urilor de rezonanță, valoarea medie a gradului de polimerizare poate fi determinată folosind ecuațiile de mai jos:

$$X_n = \frac{I_\varepsilon + I_{\varepsilon'}}{I_{\varepsilon'}} \quad \text{sau} \quad X_n = \frac{I_\alpha}{I_{\varepsilon'}}.$$

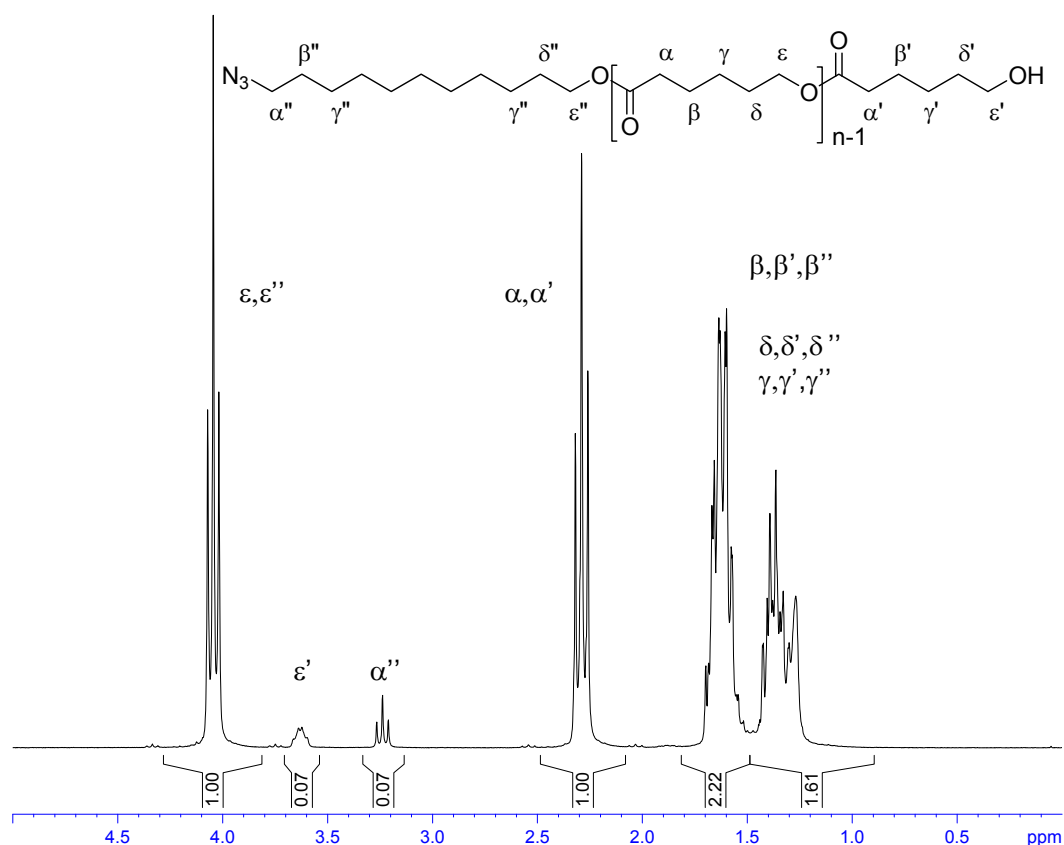


Figura 7. Spectrul ^1H RMN al PCL- N_3 DP=13

Caracterizarea RMN ^1H a produsului final, a confirmat reușita reacției prin prezența peak-urilor caracteristice grupării azidice CH_2N_3 la valoarea așteptată 3,25 ppm (Figura 7).

Azido-PCL: NMR ^1H (CDCl_3 , δ , ppm) : 1,24 (m, γ , γ' -PCL), 1,54-1,61 (m, β and β' -PCL), 2,23-2,29 (t, α and α' -PCL), 3,25 (t, α'' -PCL and CH_2N_3), 3,58-3,63 (t, ε' -PCL), 4,02 (t, ε -PCL);

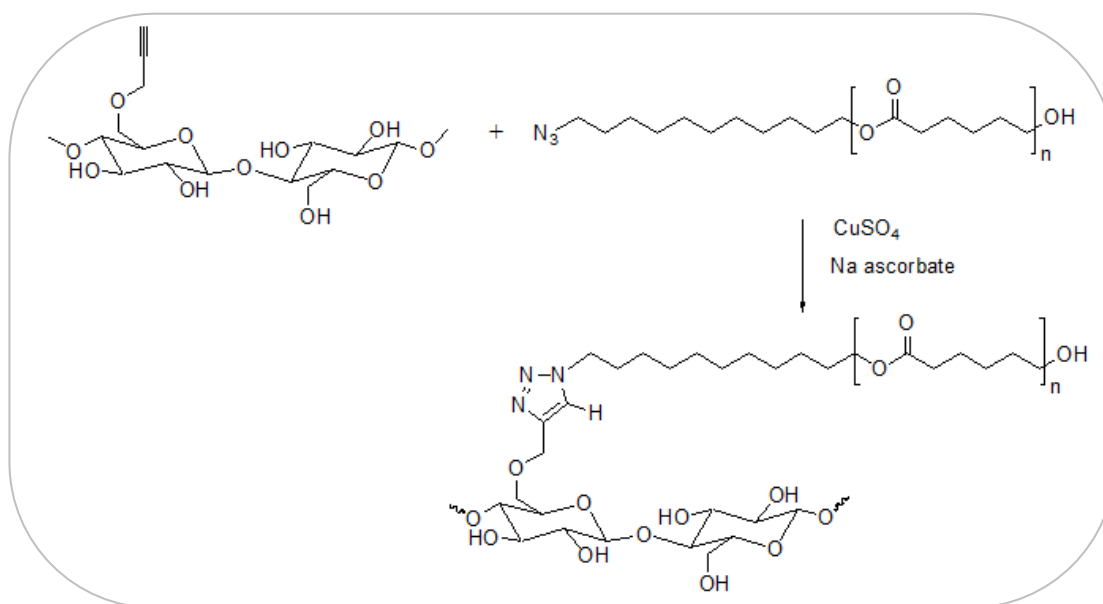
^{13}C NMR (CDCl_3 , δ , ppm) : 25,2 (s, β -PCL), 25,8 (s, γ -PCL), 28,7 (s, δ -PCL), 32,3 (s, α -PCL), 51,4 (s, CH_2N_3), 62,5 (s, ε -PCL), 173,5 (s, $\text{C}=\text{O}$).

CAPITOLUL IV.

GREFAREA POLI (ϵ -CAPROLACTONEI) PE LANȚURILE DE AMIDONIV.1. Grefarea poli (ϵ -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 μ L, 1M) în apă și o soluție 75% de sulfat de cupru hidratat cu 5 molecule de apă (8 μ L, 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 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 FT-IR

Cicloadiția dintre azido-PCL și amidonul propargilat a fost confirmat pentru început de FT-IR. Inițial, alchina și azida prezentau peak-uri caracteristice la 2117 cm^{-1} (Fig.1.a), respectiv la 2100 cm^{-1} (Fig.1.b). După formarea triazolului, aceste peak-uri au dispărut, după cum se poate observa în spectrul copolimerului final (Fig.1.c).

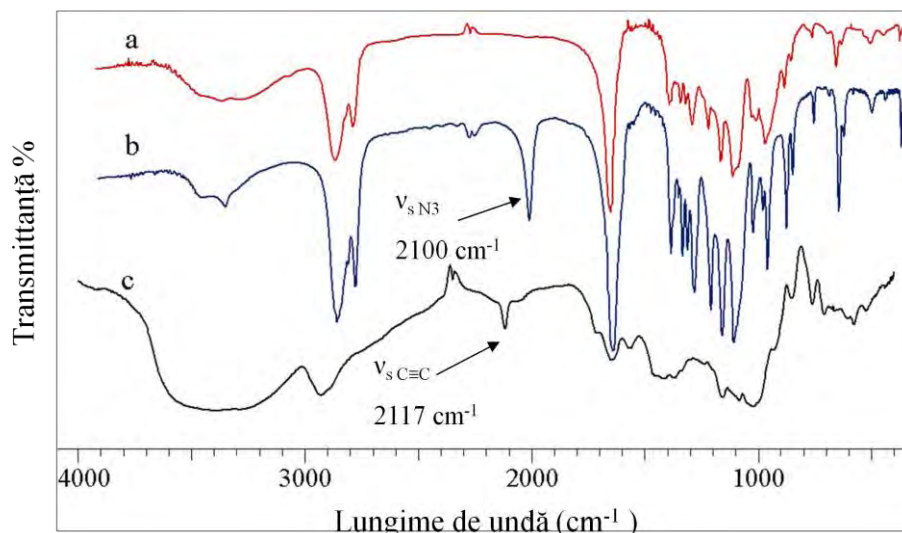


Figura 1. Spectrul FT-IR pentru a) copolimerul grefat, b) azido-policaprolactonă și c) amidon propargilat.

Alchinele interne, vor prezenta benzi slabe pentru legătura triplă, în regiunea $2100\text{--}2260\text{ cm}^{-1}$. Totuși, această întindere este relativ redusă, nefiind deloc prezentă în cazul în care alchina internă este simetrică. În aceste cazuri, spectrul IR își pierde valoarea de instrument util¹². Alchinele terminale, pentru care carbonul 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 peak slab la $2100\text{--}2260\text{ cm}^{-1}$.

IV.2.1.2. Caracterizarea prin spectroscopie ^1H -RMN

Solubilizarea amidonului funcționalizat cu triple legături, s-a dovedit inefficientă atât în D_2O cât și în DMSO și semnalele protonului rezidual al apei s-au dovedit un factor perturbator pentru integrarea precisă a peak-urilor dorite și astfel pentru calcularea DS-ului. Astfel, prin analizele ^1H -RMN și FT-IR s-a arătat că cicloaditia este cantitativă și s-a determinat $\text{DS}_{\text{alchina}}$ din

spectrul copolimerului obținut în urma reacției “click”, presupunând că DS-ul este același înainte și după cuplare. Această procedură a fost aplicată cu succes și pentru caracterizarea guarului funcționalizat cu PEG ^[15]. Peak-ul pentru protonul $-\text{CH}_2\text{N}_3$ de la 3,25 ppm a dispărut complet și un nou peak triazolic a apărut în intervalul 7,8 – 8,1 ppm (Figura 2).

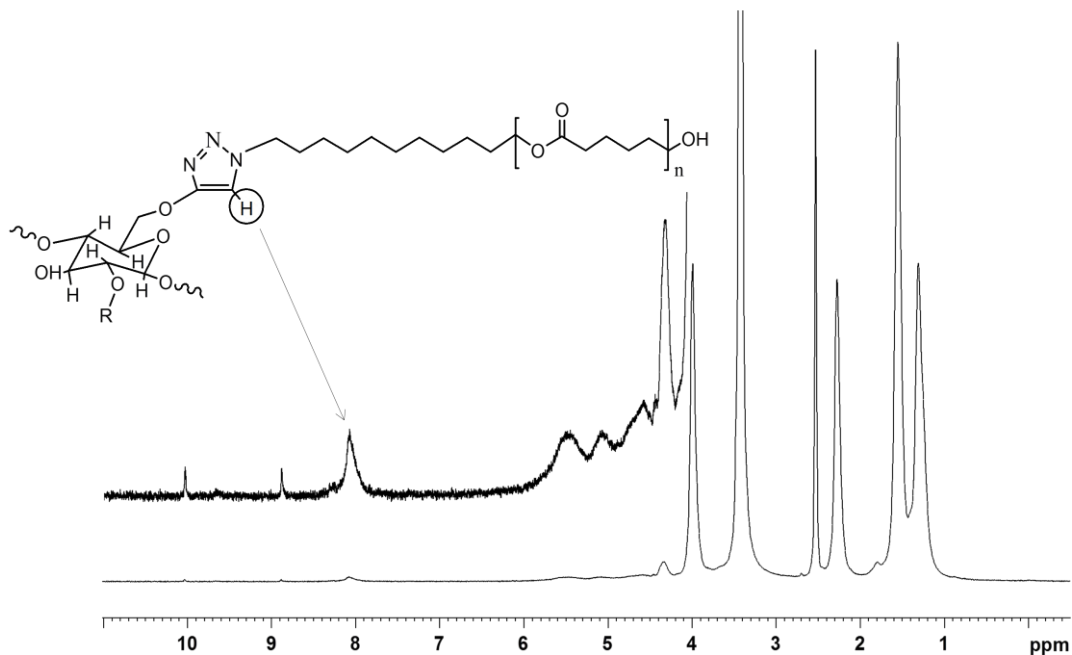


Figura 2. Spectrul RMN ^1H HR-MAS al CC20.

RMN ^1H HR-MAS (DMSO- d_6 , δ , ppm): 1,31 (m, γ -PCL), 1,54 (m, β and δ -PCL), 2,25 (t, α -PCL), 3,37 (t, ϵ' -PCL), 3,98 (t, ϵ -PCL), 3,5–5,4 (m, peak-uri largi, amidon), 8,09 (s, $\text{C}=\text{CHN}$, inel triazolic).

Este important să menționăm că acest DS este legat de funcțiile acetilenice implicate în formarea triazolului. S-a 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 ^{13,14}. Se cunoaște că oxidarea este promovată de folosirea acetilurilor de cupru, dar din punct de vedere preparativ, cele mai bune randamente ale dienele sunt obținute prin oxidarea acetilurilor de oxigenul liber și nu de sărurile de cupru ¹⁵. Până în prezent, în cazul amidonului propargilat, doar Tankam și colab. ¹⁶ 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 RMN ^{13}C , semnalele atribuite carbonului C2 și C4 din amidon au devenit foarte largi datorită substituției și două peak-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}C și DEPT a amidonului acetilenic.

A fost posibilă realizarea calculului pentru determinarea DS-ului direct pe amidonul acetilenic, pentru un spectru cantitativ RMN ^{13}C achiziționat pentru aceste probe. Semnalele utilizate pentru acest calcul au fost în acest caz ale carbonului C1 și (C6+CH₂CCH), fiind considerate toate grupările acetilenice, atât cele libere cât și cele cuplate. În mod contrar, DS-ul calculat din spectrul RMN ^1H al copolimerului cuplat a inclus doar funcțiile acetilenice libere. Ca un exemplu, valoarea DS-ului probei CC20 a fost 0,25 conform spectrului ^1H 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.

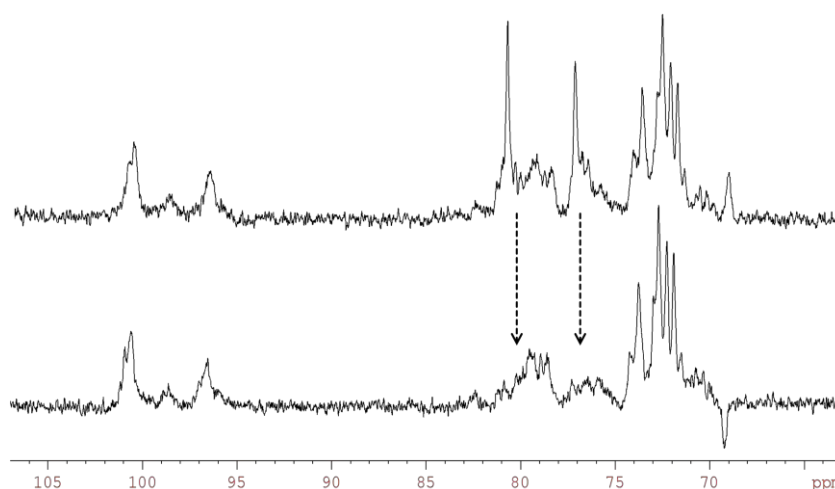


Figura 3. Spectrul DEPT și ^1H NMR pentru CC13.

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 de plecare și a celui grefat cu lanțuri de PCL. S-a efectuat deconvoluția peak-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. Peak-urile largi găsite în regiunea corespunzătoare N1s la valoarea de 398 eV și 400 eV au fost atribuite grupărilor N–N, respectiv N=N¹⁷, ca rezultat al formării inelului triazolic¹⁸.

În urma comparării peak-urilor C1s atât pentru amidonul nativ cât și pentru cel modificat, se observă o creștere în ceea ce privește peak-ul carbonului C1 de la 26,7% la 41,6% datorită prezenței lanțurilor de propargil, precum și o descreștere în intensitate pentru peak-ul C2 odată

cu procesul de esterificare. Deplasările chimice relative la peak-ul C1 au fost de 1,6 eV pentru C2 și 3,5 eV pentru C3.

După modificarea cu PCL- N_3 , peak-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.

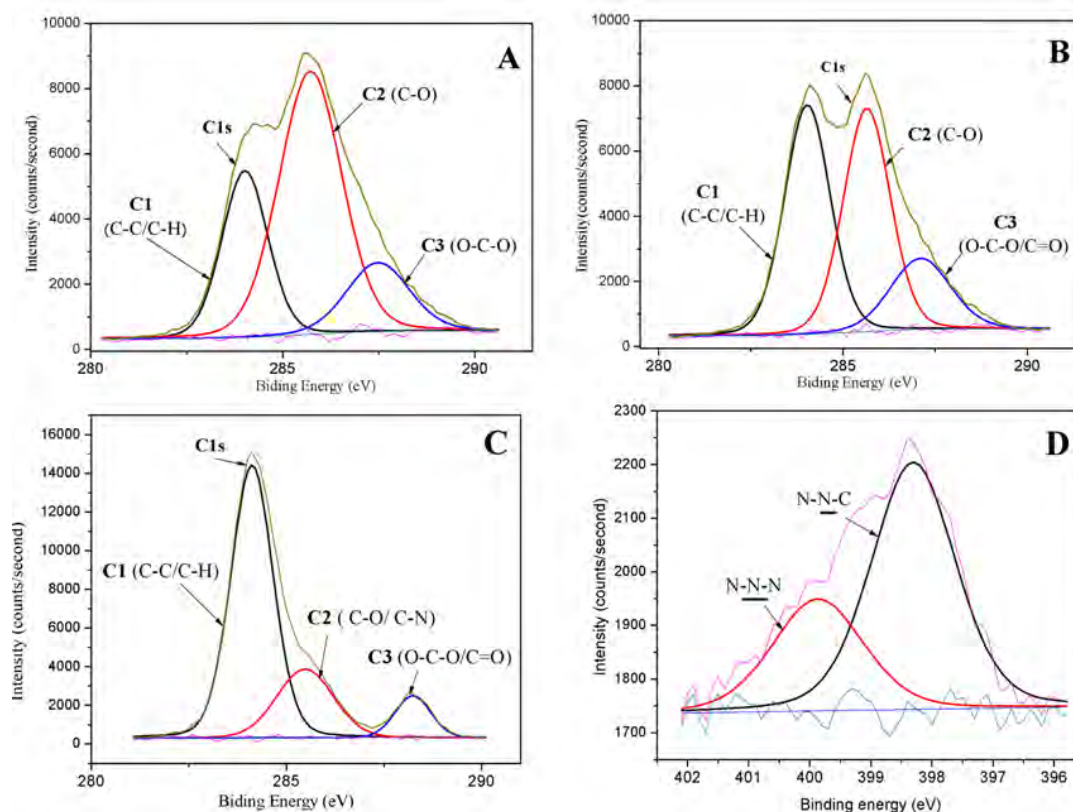


Figura 4 . Deconvoluția peak-ului C1s pentru a) amidonul nemodificat, b) amidonul propargilat, c) CC4 și d) deconvoluția N1s pentru CC4.

Tabelul 1 . Compoziția suprafeței chimice a amidonului, înainte și după modificări, ca rezultat al deconvoluției 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 alcătuită și

din alte componente, azotul fiind menționat în literatură ca provenind din proteinele ce sunt încă prezente în polimerii naturali¹⁹.

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

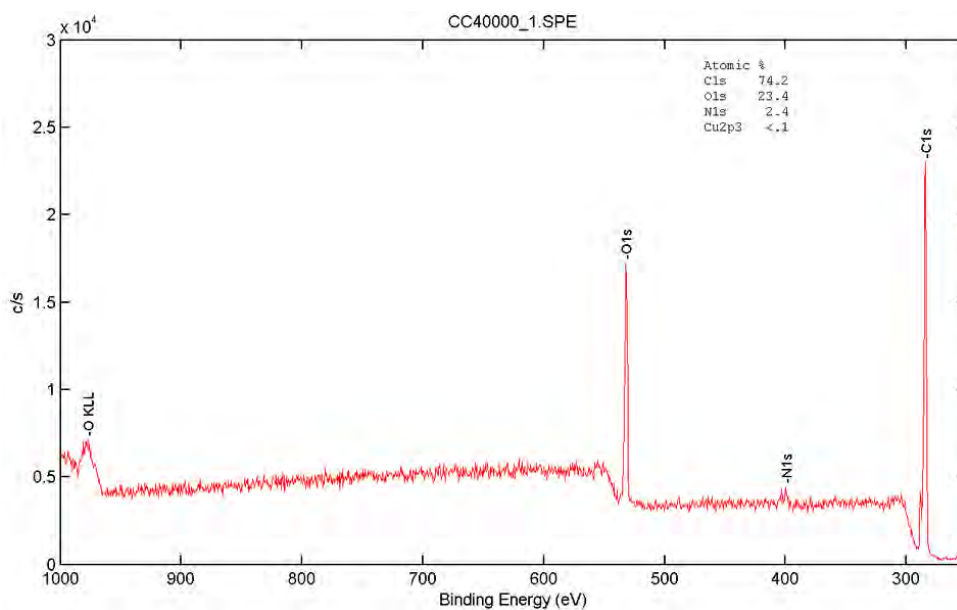


Figura 5. Spectrul larg XPS pentru CC4.

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 peak-uri proeminente de fragmente derivate din scheletul liniar al PCL (figura 6). Toate concluziile au fost în concordanță cu rezultatele găsite prin investigările XPS.

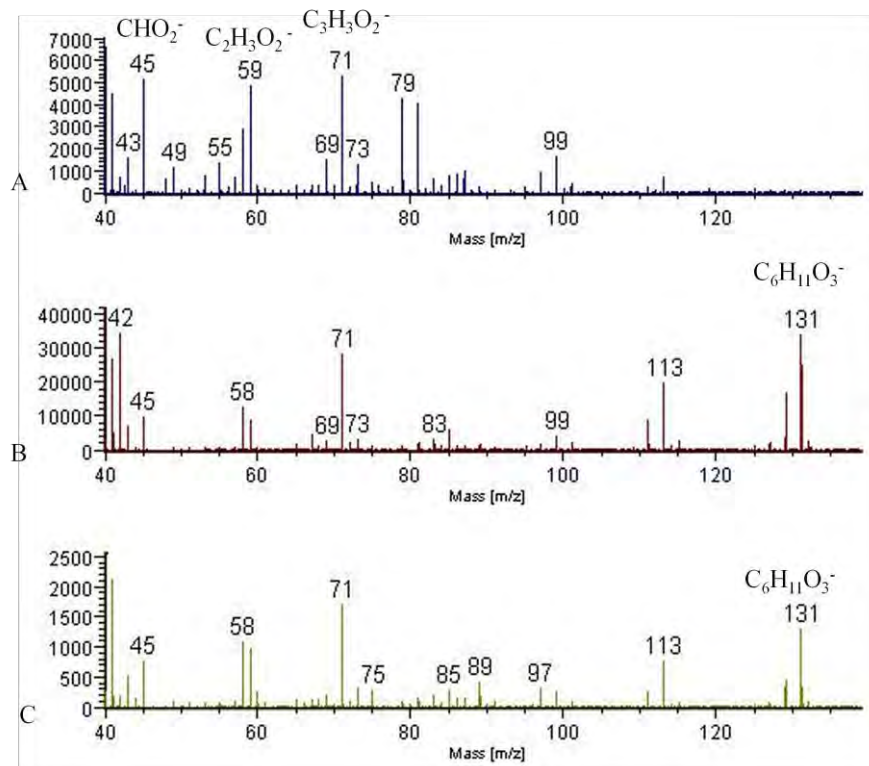


Figura 6. Modul negativ al spectrului TOF-SIMS pentru A- amidonul propargilat, B - PCLN₃,
C- CC4.

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

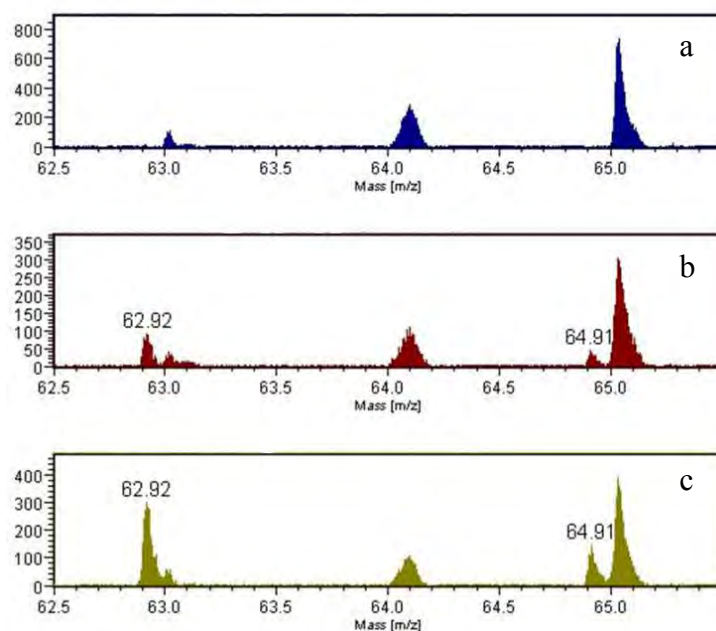


Figura 7. Spectrul pozitiv ToF-Sims al probelor cu conținut variat de cupru, purificate a) 5 zile, b) 3 zile, c) 2 zile.

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

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 8 arată în mod clar o rezistență termică scăzută a amidonului și a PCL- N_3 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 convergentă 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.

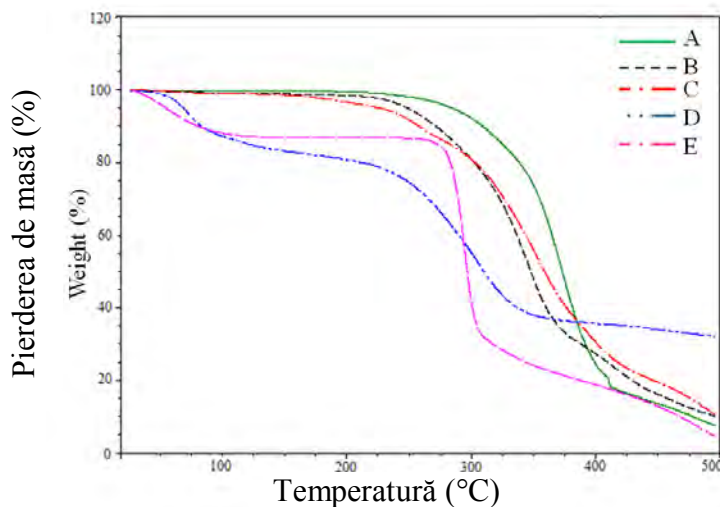


Figura 8. Analiza ATG pentru a) CC20, b) CC13, c) CC4, d) PCL- N_3 DP=13, e) amidon.

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).

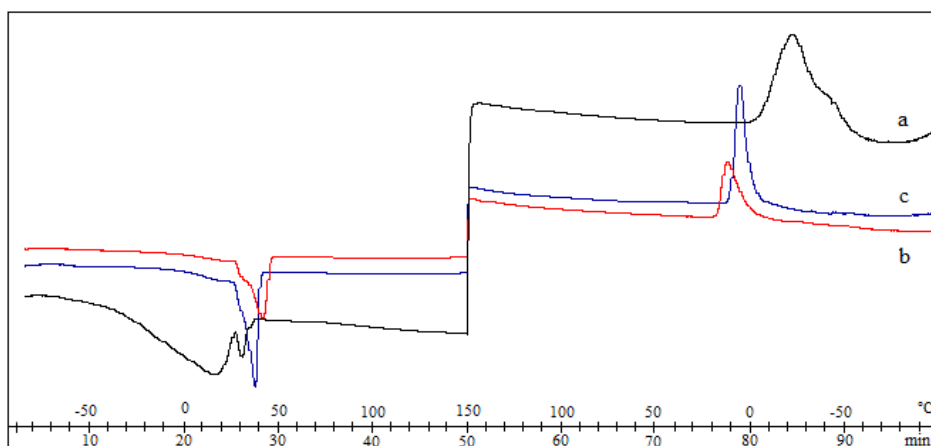


Figura 8. Curbele DSC pentru copolimerii a) CC4, b) CC13, c) CC20.

Termogramele ilustrează topirea (în timpul încălzirii) și recrystalizarea (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 recrystalizare. Datorită masei medii moleculare reduse, polimerul cu lungimea lanțului de PCL, $X_n = 4$, 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°C și cu T_g de -60°C ²⁰. 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 arata endoterme probabil relaționate cu topirea cristalelor de diferite mărimi din copolimerii finali. Răcirea arata exoterma de re-cristalizare. Al doilea pasaj încă arată endotermele dar cu valori mai scăzute decât cele din primul pasaj, fapt ce poate indică 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.

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 correlate cu o mai bună stabilitate, fapt deja arătat prin ATG.

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.

Tabel 4. Cristalinitatea lanțurilor de PCL după grefarea pe scheletul amidonului.

Probă	Masa moleculară PCL	" Masa moleculară " a copolimerului	% N	% PCL masic *	ΔH_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

unde, $\% \text{PCL} = 114 \cdot n / \text{masa totală} \cdot 100$. Pentru topirea PCL s-au luat în calcul valorile standard : $T_m = 64^\circ\text{C}$; $\Delta H_m = 142 \text{ J/g}$ iar $\% \text{crist} = 100 \cdot \Delta H_m / 142 \cdot \% \text{PCL}$.

IV.1.1.4. Analiza morfologică

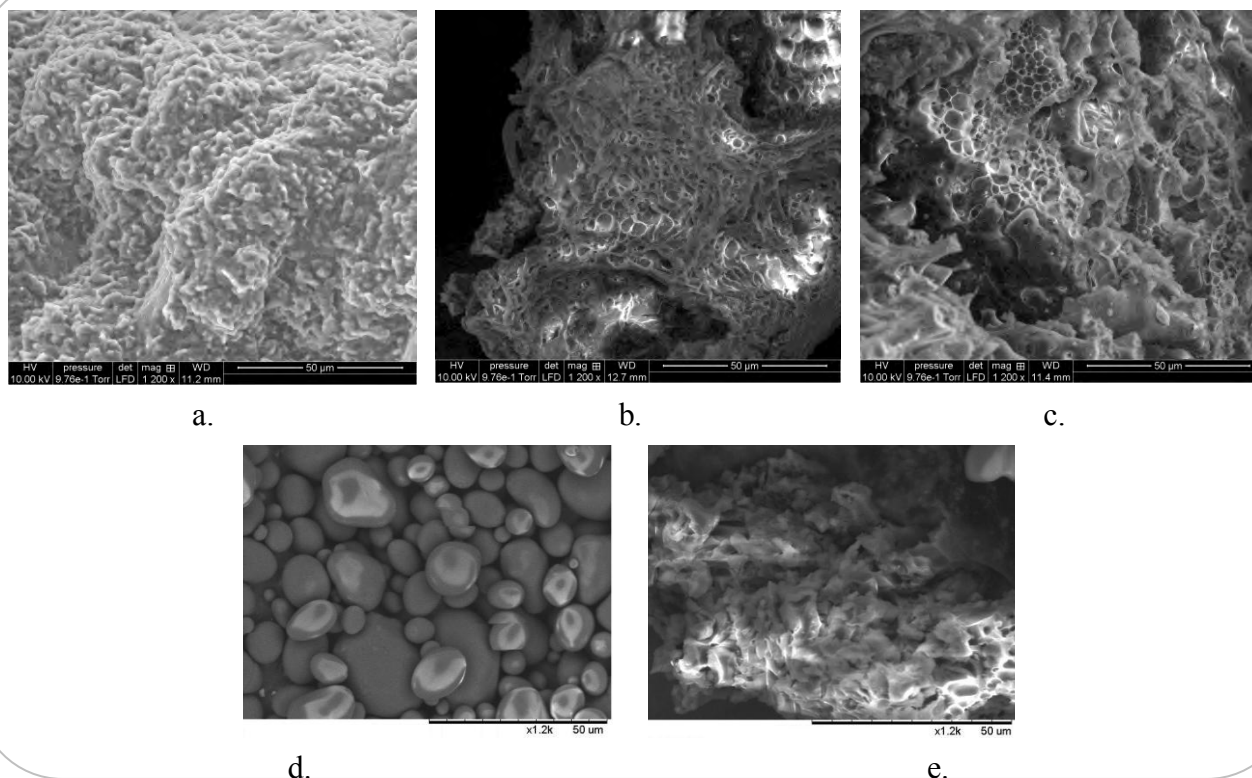


Figura 9. Imagini SEM ale morfologiei interne pentru a) CC4, b) CC13, c) CC20, d) amidon, e) amidon propargilat.

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.

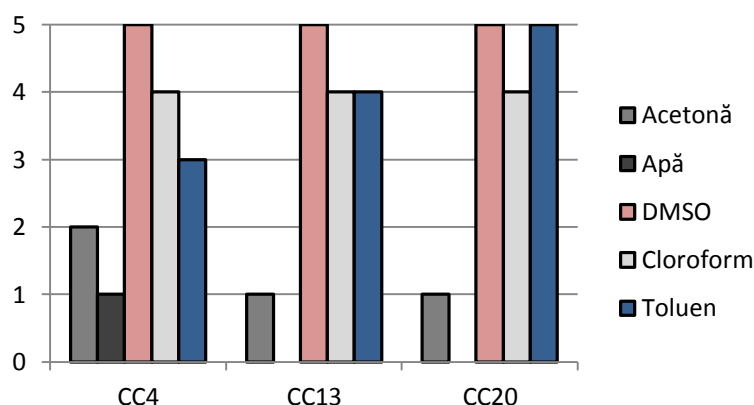


Figura 10. Comportamentul copolimerilor CC4, CC13, CC20 în diferiți solvenți.

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 (5 mg) 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, 3 ore). Concentrația finală a fost de 0,5 mg/mL atât pentru măsurătorile DLS cât și pentru TEM.

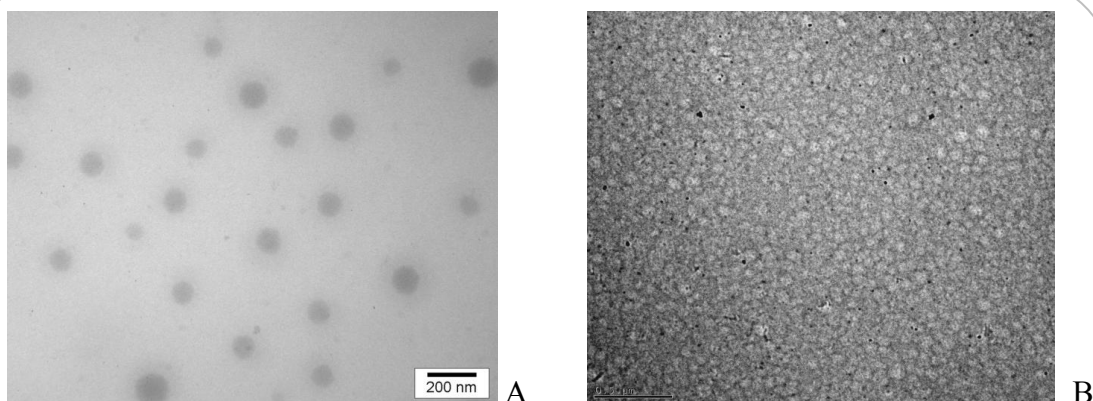


Figura 11. Imagini TEM pentru a) C20 si b) CC4

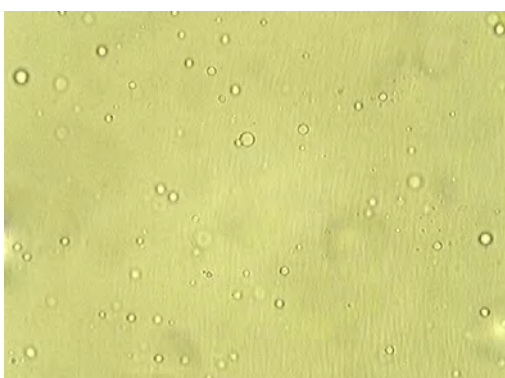


Figura 12. Imagini obținute cu microscopul optic pentru micellele C20

Morfologia micelilor formate a fost investigată prin tehnica TEM; Figura 11 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.

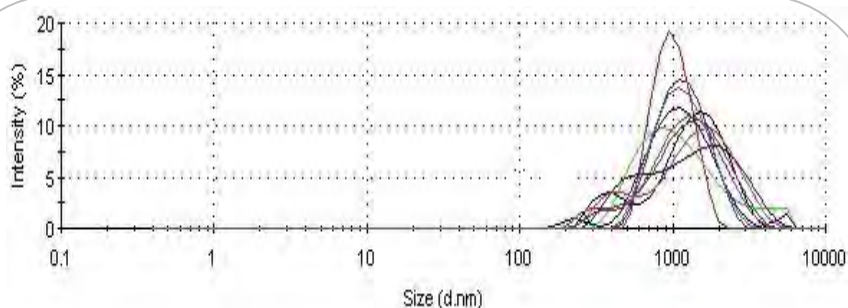


Figura 13. Distribuția dimensiunii micelilor pentru CC20

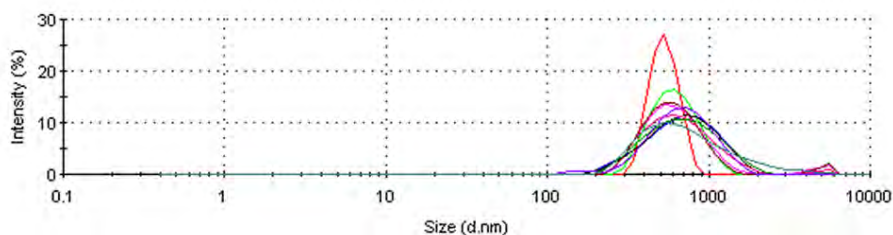


Figura 14. Distribuția dimensiunii micelilor pentru CC4

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

Tabel 5. Diametrul micelilor 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.

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 aggregate micelare pot forma morfologii multiple care sunt dependente de lungimea blocurilor copolimerului, morfologii ce includ sfere, bastonașe, vezicule (polimerosomi), micle lamelare.

Autoasamblarea copolimerilor amfifili în polimerosomi s-a demonstrat a fi dependentă de blocul hidrofilic²¹, în cazul nostru amidonul.

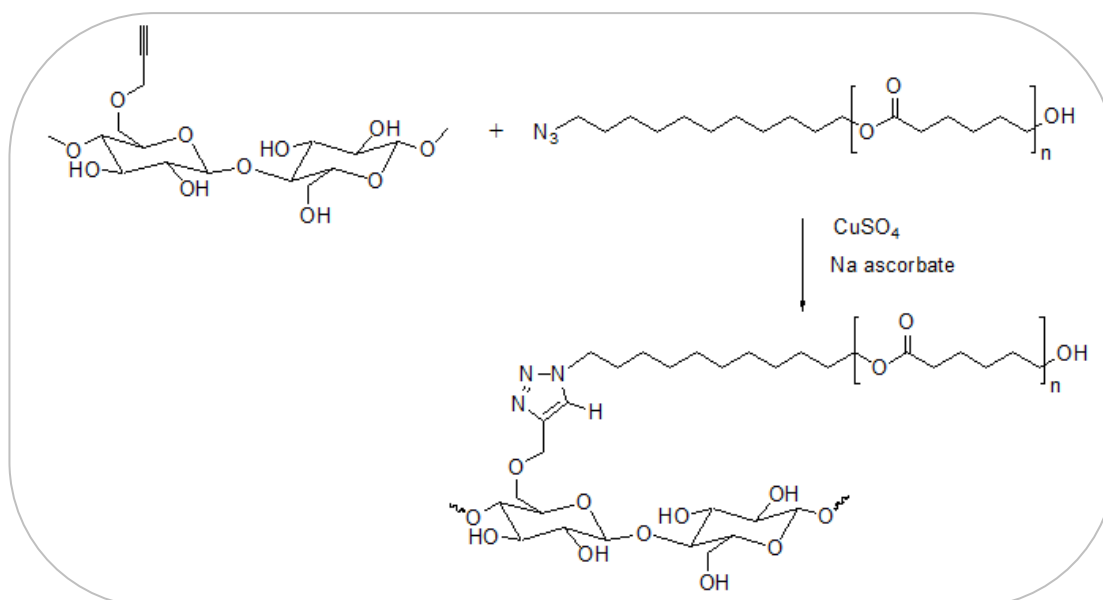
IV.1.1.7. Concluzii

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 hidrofobicitatii 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 (ϵ -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.

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.1.2.3. Analiza structurală

IV.1.2.3.1. Caracterizarea prin spectroscopie FT-IR

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.

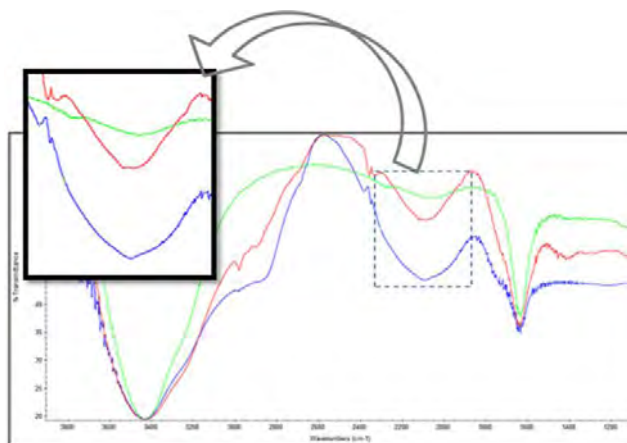


Figura 16 . Cinetica FT-IR pentru „click chemistry”, cu ajutorul MW.

IV.1.2.3.2. Rezonanța magnetică nucleară (^1H -RMN)

Spectrele RMN ^1H și ^{13}C au fost înregistrate în aceleași condiții ca în cazul cuplajului prin metoda convențională și nu s-au observat diferențe între ele. Astfel, timpul de reacție a fost redus 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, $\tan \delta = 0,047$.

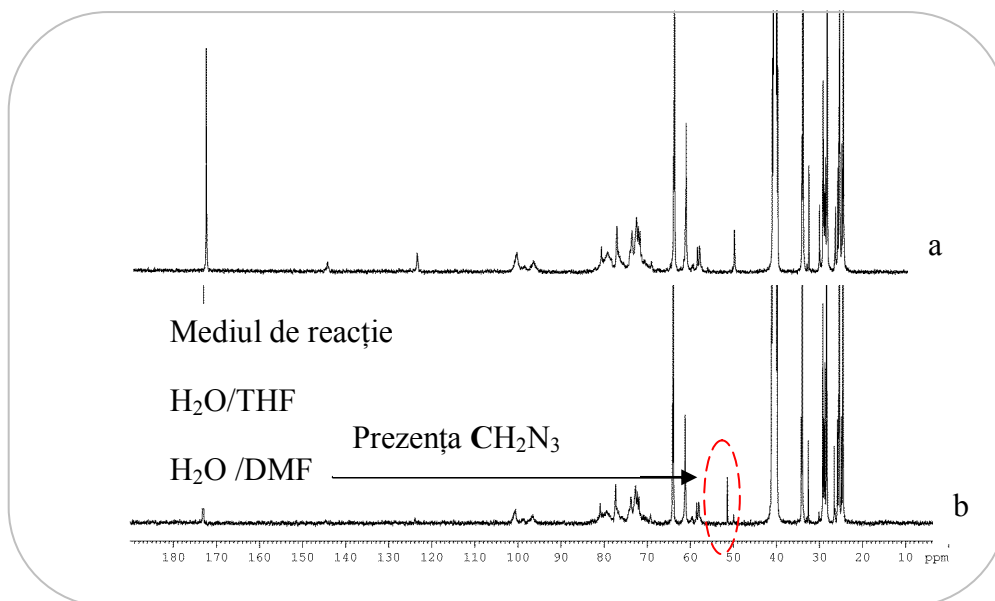
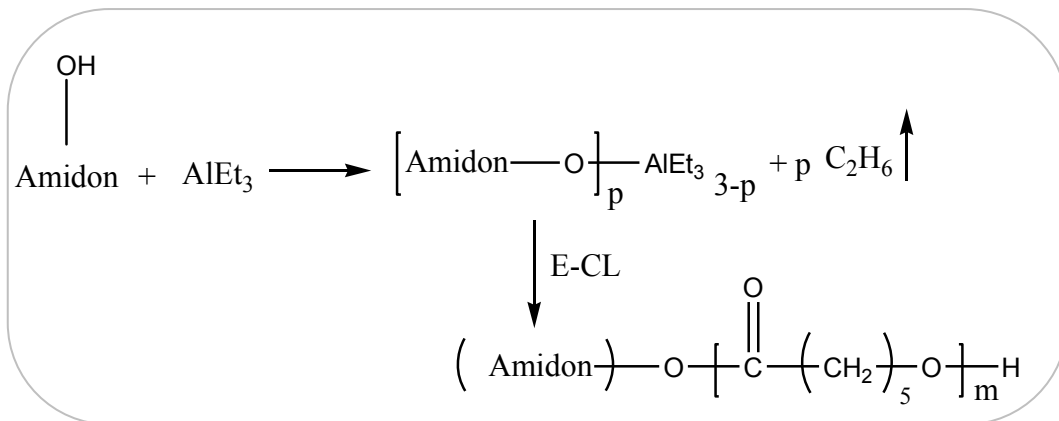


Figura 18. Comparație între spectrele RMN ^{13}C ale reacției ”click chemistry” realizată în a) apă/DMF și b) apă/THF.

IV.2. Grefarea poli (ϵ -caprolactonei) prin polymerizarea ϵ -CL la grupările $-\text{OH}$ ale amidonului

IV.2.1.Principiul reacției



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

IV.2.1. Analiza rezultatelor obținute

IV.2.1.1. Analiza structurală

IV.2.1.1.1. Caracterizarea prin spectroscopie FT-IR

Picurile caracteristice ²² PCL (3300–3700, 1737, 1725, 850–1480, și 720 cm^{-1}) apar în spectrele FIR, alături de absorbanta largă a grupărilor O-H de 3200–3700 cm^{-1} . Rezultate similare au fost raportate și de alți autori ²³.

Figura următoare surprinde intensitatea vibrațiilor grupării C=O ca bandă largă la 1731 cm^{-1} în spectrul PCL/amidon, un rezultat similar celui obținut de Wang și colab ²⁴.

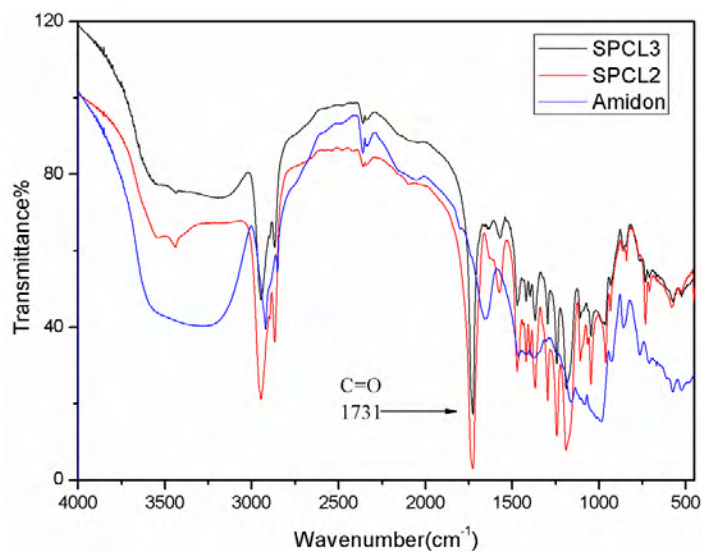


Figura 22. Spectrul FT-IR al pentru a) amidon, b) SPCL2, c) SPCL3.

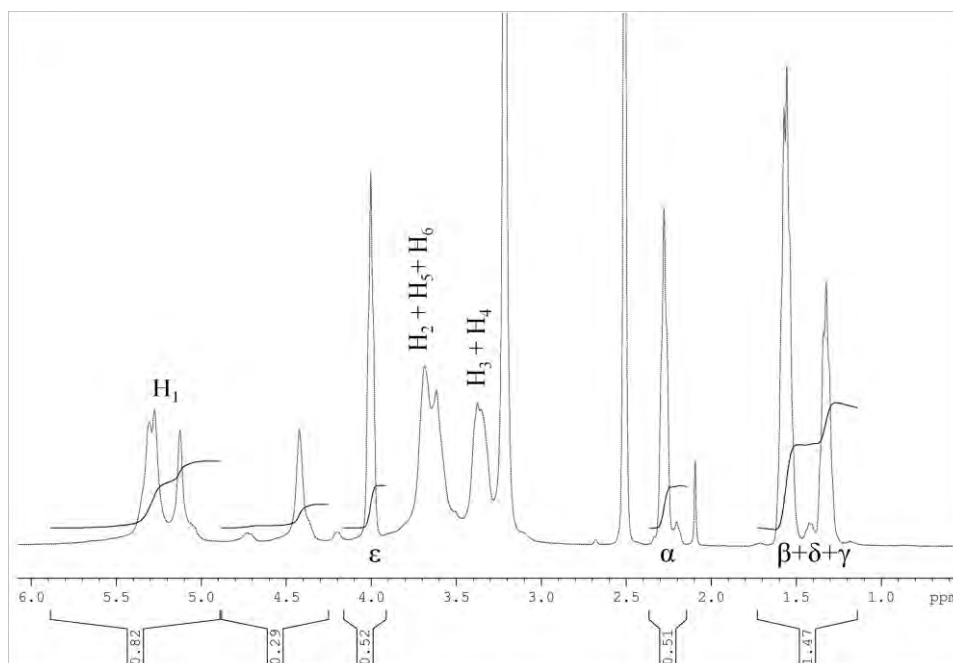
IV.2.1.1.2. Rezonanța magnetică nucleară (^1H -RMN)

Figura 23. Spectrul ^1H RMN(DMSO) al 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 H₂, H₅, H₆ ai unității de amidon, fiind clar diferențiați 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 ¹H RMN după o procedură descrisă anterior²⁵ și anume:

$$N_{CL} = \frac{CL}{Amidon} = \frac{\text{Intensitatea relativă a semnalelor protonilor metilenici } \alpha-\delta}{\text{Intensitatea relativă a semnalelor protonilor H}_2, \text{H}_5, \text{H}_6}$$

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.

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 (ΔH_f) fiind afectate de greutatea lor moleculară. Comparând ciclurile 1 și 2 care au același bloc de amidon, atât T_m, cât și ΔH_f ale blocului PCL cresc odată cu creșterea greutatei moleculare.

Peak-ul T_m din blocul amidonului din ciclul 2 este destul de larg cu ΔH_f redusă, fapt ce indică dificultatea în cristalizarea segmentului de amidon, deoarece este înconjurat de segmentul cu greutate moleculară mare al PCL. Rezultate similare au fost observate în alte sisteme copolimerice amifile.²⁶ 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 cristalizare a PCL. Acest fapt ar duce la o descreștere a ratei de cristalinizare, în special atunci când conținutul compusului amorf crește.

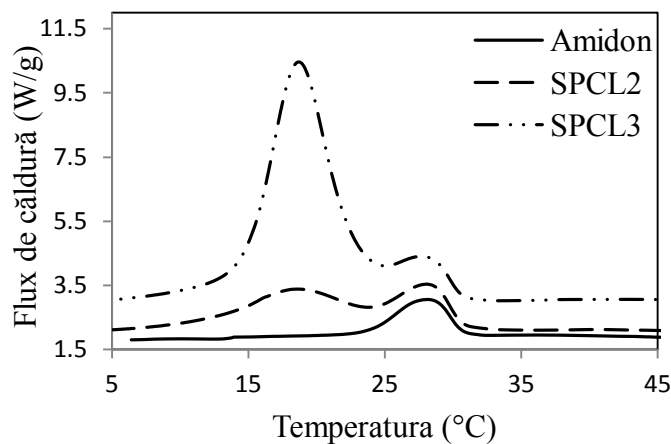


Figura 25. Primul ciclu de încălzire de la -50 °C până la 100 °C la o rată de 10 °C/min

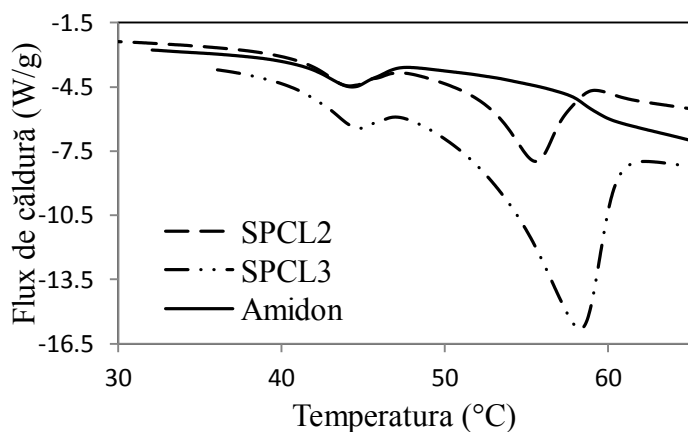


Figura 26. Primul ciclu de răcire de la 100 °C până la -100 °C la o rată de 10 °C/min

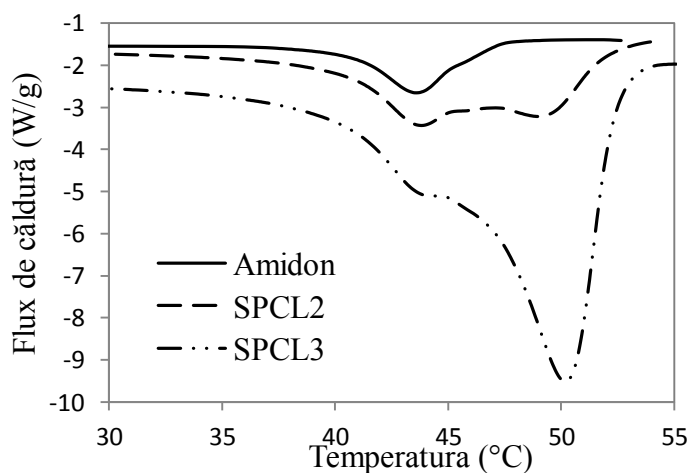


Figura 27. Al doilea ciclu de răcire de la 100 °C până la -100 °C la o rată de 10 °C/min

Atât din spectrele FT-IR și RMN, cât și în DSC s-a văzut o creștere a intensității picurilor corespunzător caprolactonei pentru proba SPCL2, ceea ce s-a dovedit a fi în concordanță cu rezultatele obținute prin celelalte 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 .

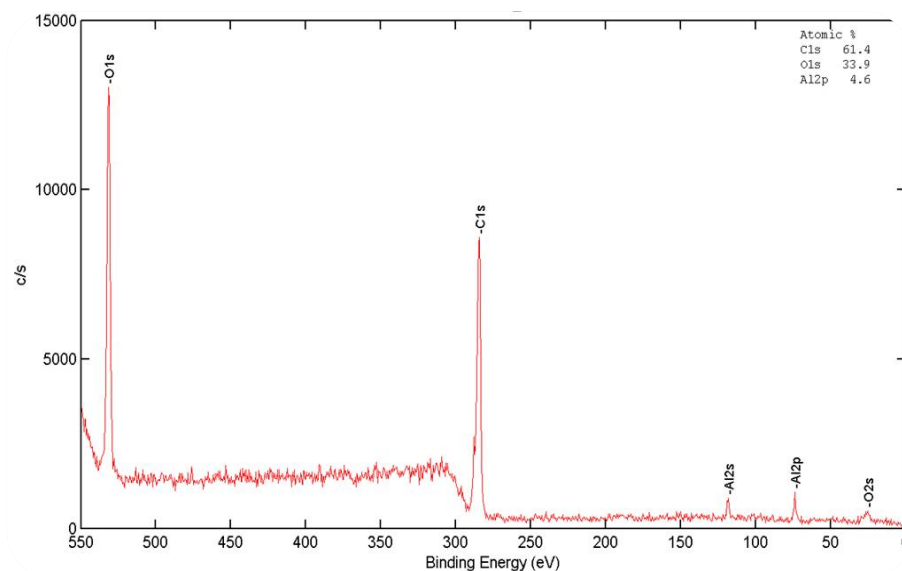


Figura 28. Studiul XPS pentru proba SPCL2.

Procentajul atomic (%) al elementelor detectate în suprafața atât a amidonului de plecare cât și a celui modificat cu caprolactonă sunt prezentate în tabelul 10.

Tabel 10. 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

CAPITOLUL V

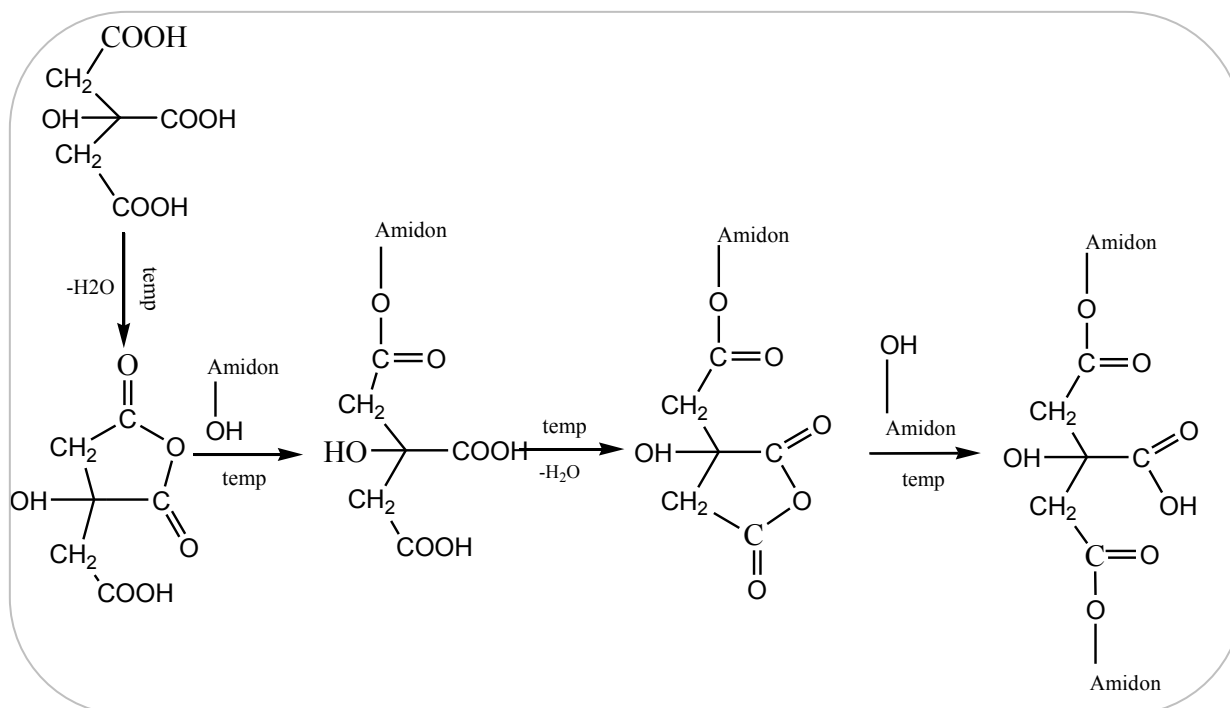
OBȚINEREA HIDROGELURILOR PE BAZĂ DE AMIDON

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

Reactivii acceptați de către FDA²⁷ pentru obținerea de amidon reticulat pentru utilizarea sa în domeniul alimentar sunt reprezentați de clorura de fosforil, trimetafosfatul de sodiu, anhidrida acetică adipică mixtă și amestecuri de trimetafosfat de sodiu și tripolifosfați. Epiclorhidrina 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 scop²⁸.

Cele două stadii ale reacției dintre amidon și acidul carboxilic constau mai întâi dintr-o atașare a acestuia prin procedeul de esterificare cu gruparea hidroxilică și reacția acesteia mai departe, tot prin 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 esterificarea primului ciclu anhidridic ar expune o nouă unitate de acid în acidul citric care are conectivitatea chimică exactă pentru a forma o un nou compus intramolecular 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 hidrofilic 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 un 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.

V.3.2. Program experimental

Tabelul 3. Programul experimental al hidrogelurilor sintetizate.

Nume probă	Conc. soluției de polimer	T° C	t _r (ore)	Raport molar Polimer/CA
HS HSCP HSPCL	12%	50°	5	10:0,25
				10:0,5
				10:1,5
				10:1
			4	10:1
			5	
			6	

V.3.3. Analiza rezultatelor obținute

V.3.3.1.1. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR-ATR

Figura 39 prezintă spectrul FTIR-ATR al citratului de amidon și al amidonului nemodificat. Rezultatele sunt aceleași cu cele raportate de Iizuka 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 peak-uri în regiunea $3700-800\text{ cm}^{-1}$. Din studii anterioare, Irudayaraj și Yang au arătat că absorbanta la 3381 și 2931 cm^{-1} poate fi atribuit grupării O-H și C-H. Absorbanta de la 1350 cm^{-1} a fost atribuită grupărilor O-C-H, C-C-H și C-O-H. Absorbantele de la 1150 și 1080 cm^{-1} sunt atribuite amândouă cuplării C-O, C-C respectiv O-H.

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

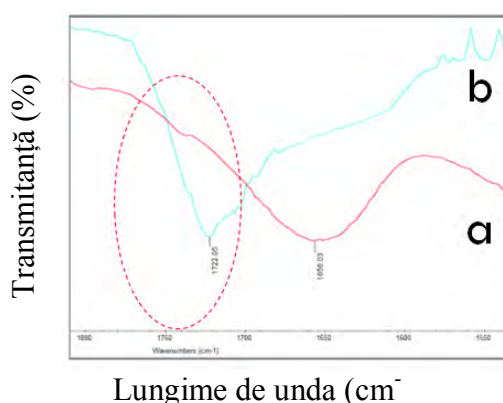


Figura 39. Spectrele FT-IR ale a. amidonului, și b. hidrogelului pe bază de amidon nemodificat (HS)

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 ($\text{C}=\text{O}$) la 1743 cm^{-1} . Cele două peak-uri de intensități puternice corespunzătoare valorilor 2922 și 2851 cm^{-1} sunt atribuite grupărilor metil și metilen asociate substituenților palmitoici.

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 cm^{-1} .

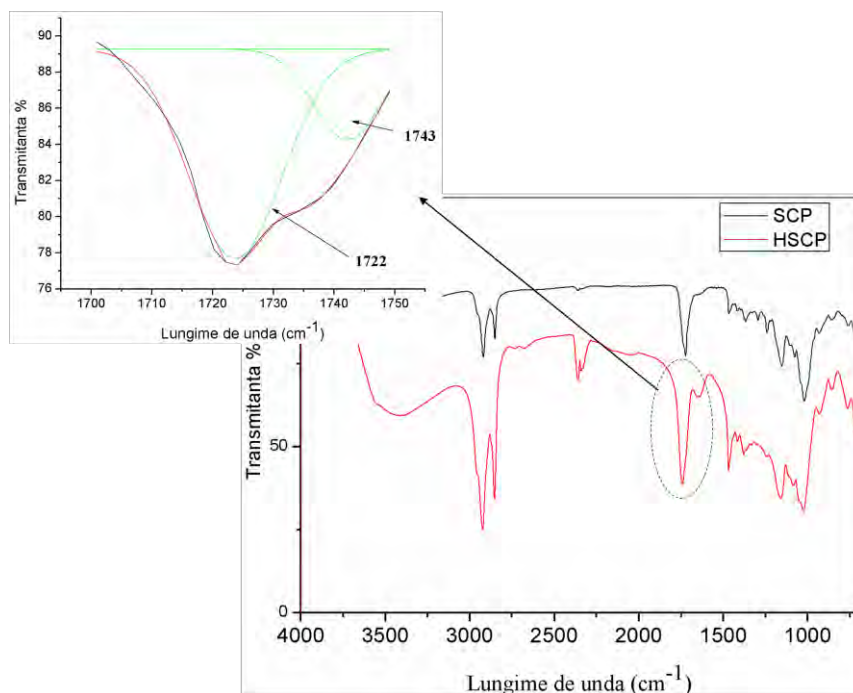


Figura 10. Spectrele FT-IR ale peak-urilor carbonil, respectiv deconvoluția lor pentru HSCP.

Vibrația puternică localizată la 3481 cm^{-1} 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. Este demn de menționat că intensitatea legăturii esterice este mai puternică odată cu creșterea conținutului de CA în hidrogel²⁹.

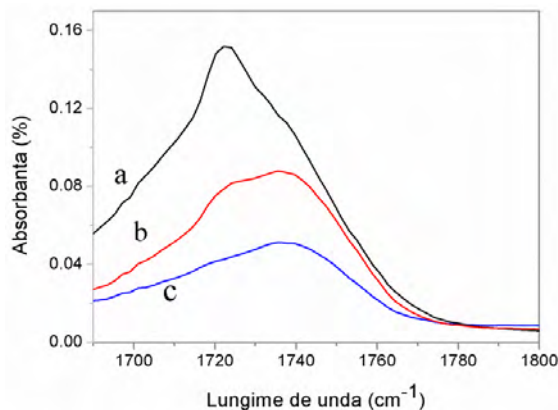


Figura 11. Spectrul FT-IR al intensităților peak-urilor carbonil pentru a) HSCP0.25, b) HSCP 0.5, c) HSCP 1.5.

Peak-urile caracteristice ale PCL apar atât în polimerul grefat cât și în cel reticulat, pentru hidrogel nu s-a înregistrat nici un nou peak. S-a realizat o deconvoluție (Figura 12) pentru a dezvălui peak-ul anhidridei. Singura diferență remarcabilă în spectrul FT-IR a fost diminuarea evidentă a vibrațiilor grupărilor OH corespunzătoare polimerului grefat.

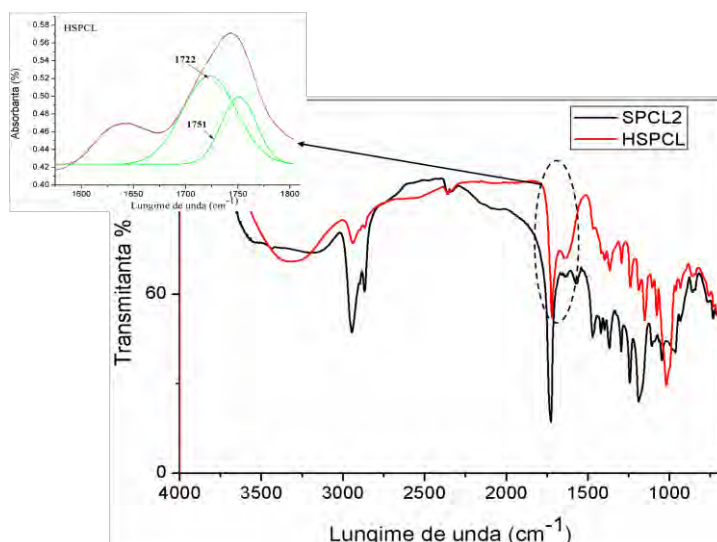


Figura 12. Deconvoluția peak-ului carbonil din spectrul FT-IR pentru HSPCL.

V.3.3.2. Analiza morfologică

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

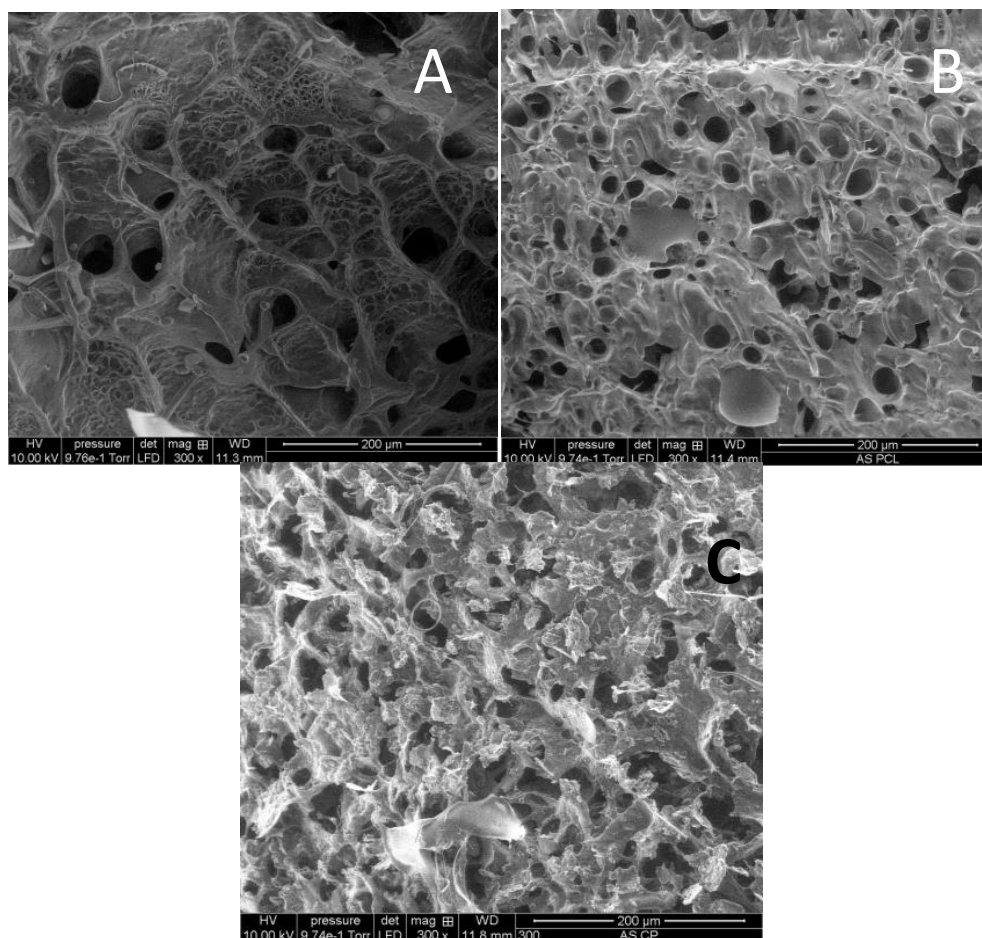


Figura 13. Imagini SEM pentru HS(A), HSPCL(B), HSCP(C).

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 (Figura 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.

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

Capacitatea hidrogelurilor obținute de a absorbi apă se datorează prezenței grupărilor hidrofile din polimerii ce formează structura rețelei, grupări datorită cărora polimerul va fi hidratat la grade diferite în funcție de compoziție. 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.

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 iar hidrogelurile cele mai umflate sunt cele pe bază de amidon nemodificat.

O altă observație ar fi că 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.

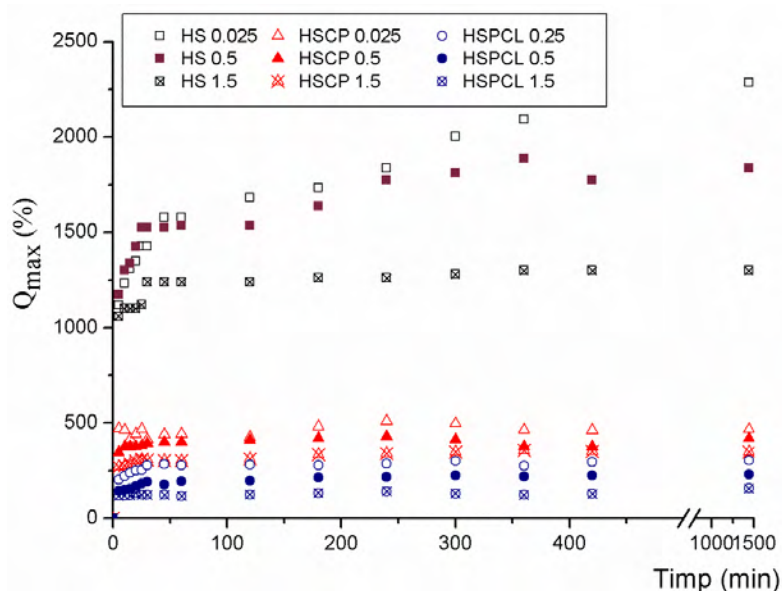


Figura 14. Gradul de umflare a hidrogelurilor obținute prin varierea raportului molar polimer/agent reticulant.

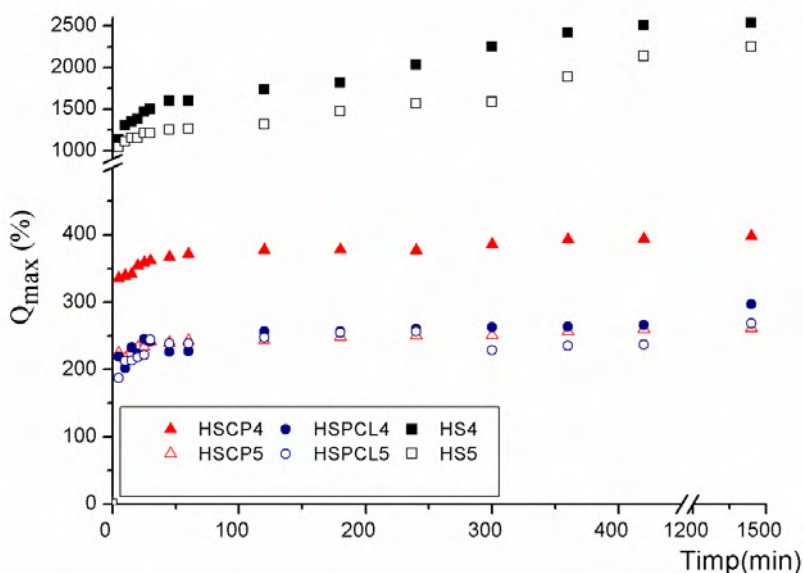


Figura 15. Absorbția apei pentru hidrogelurile reticulate 4 și 5 ore.

Având în vedere că scopul acestor hidrogeluri a fost acela de imobilizare și de eliberare de medicamente, am încheiat cercetările cu includerea de levofloxacină, antibiotic hidrosolubil și urmărirea cineticii sale de eliberare. Trei tipuri de hidrogeluri au fost încărcate, 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 levofloxacin

Probele uscate și cântărite au fost imersate într-o soluție de levofloxacin (10 mL, soluție apoasă) 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:

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

- 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 levofloxacin 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 levofloxacin 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.

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

$$m_{L,f} = \frac{C_{L,f} \times 100}{m_S} \quad \text{ecuația (4)}$$

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

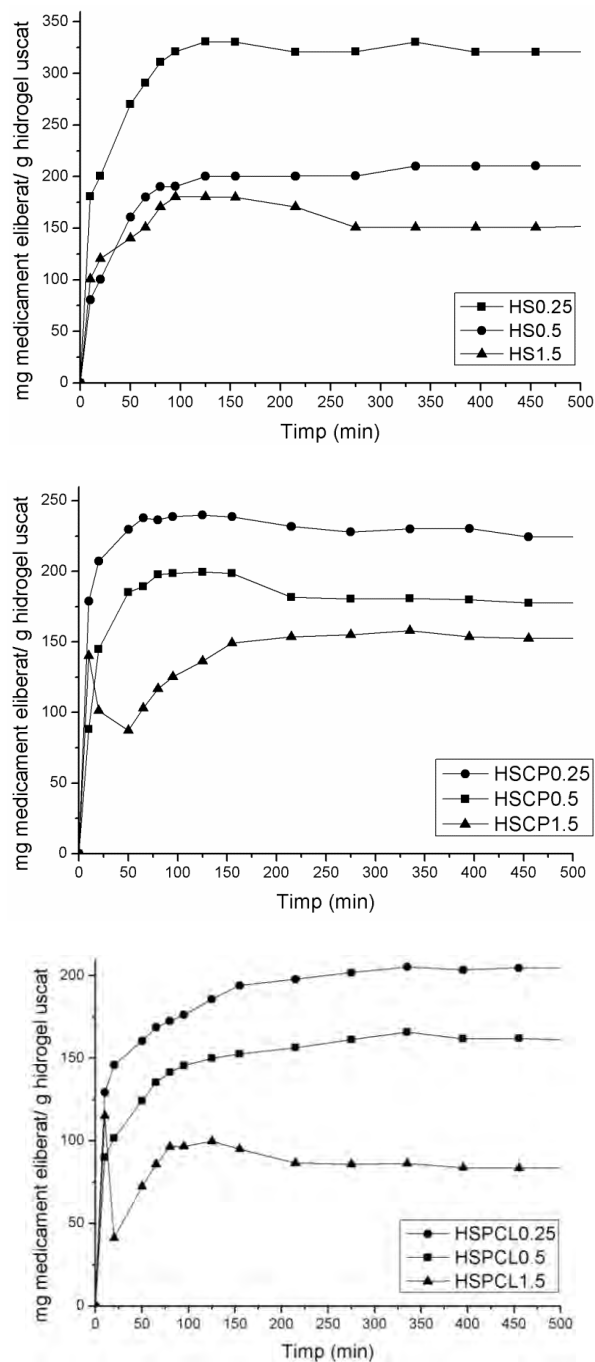


Figura 16. Eliberarea levofloxacinei (mg / g hidrogel uscat) la pH = 7,4 pentru hidrogelurile obținute în urma varierii raportului molar polimer/CA. Concentrația de medicament încărcată a fost de 20 mg / mL.

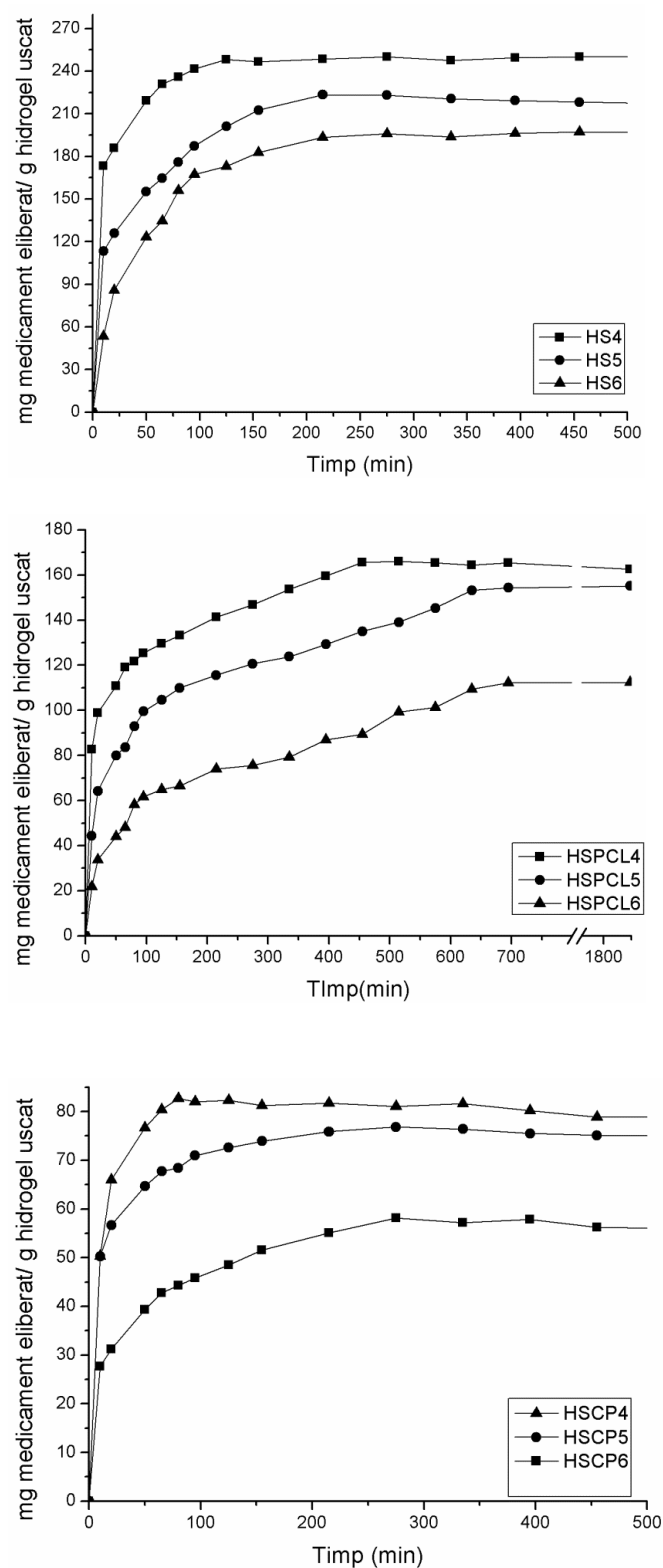


Figura 17. Eliberarea levofloxacinii (mg / g hidrogel uscat) la pH = 7,4 pentru hidrogelurile obținute în urma varierii timpului de reticulare. Concentrația de medicament încărcată a fost de 20 mg/mL.

Levofloxacina, 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 levofloxacinei pentru mai mult de șapte ore, cu o cinetică liniară, susținută, în timp ce produșii pe bază de amidon modificat cu clorură 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.

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 timpului de reticulare asupra eliberării medicamentului.

$t_{\text{reticulare}}$ (ore)	Timpul pentru eliberarea medicamentului (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

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 și a lui Ho.

Ecuția de ordin 1 a lui Lagergren

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

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 (min^{-1})

t = timp

Ecuția de ordinul 2 a lui Ho

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

unde, $h = k_2 q_e^2$

k_2 = constanta relativă a acestui model [g/(mg*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 levofloxacinei 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.

Pentru a afla mecanismul de eliberare, curbelor de eliberare li s-a aplicat Korsmeyer–Peppas:

$$M_t / M_\infty = Kt^n \quad (3)$$

unde M_t / M_∞ reprezintă fracția de medicament eliberat la timpul t , iar k este constanta ratei de eliberare și n exponentul de eliberare. Au fost obținuți indici $n \sim 0.5$, ceea ce indică o difuzie de tip Fickian.

Difuzia medicamentului din matricea hidrogelurilor a fost în strânsă relație cu umflarea acestora în mediul de eliberare.

Concluzii generale

- Datorită biocompatibilității și biodegradabilității specifice polizaharidelor, amidonul este un biopolimer cu caracteristici favorabile pentru utilizarea sa pentru o gamă largă de aplicații;
- Modificarea chimică a amidonului a fost confirmată prin analize spectroscopice (FT-IR și ¹H-RMN), precum și prin investigații morfologice și de suprafață;
- Morfologia materialelor pe bază de amidon a prezentat modificări pentru toate metodele de hidrofobizare ale polizaharidei, în toate cazurile, aceasta trecând de la un aspect granular către unul ce prezintă pori în structura sa;
- Am obținut polimeri cu hidrofilie controlată prin esterificarea cu clorura de palmitoil, variind gradul de substituție în intervalul 0,13-0,3;
- S-au obținut noi copolimeri de tip pieptene, pe bază de amidon grefat cu PCL prin procedeul „click chemistry” și prin polimerizarea cu deschidere de ciclu a ϵ -caprolactonei;
- 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 cu diametre diferite ce variază odată cu creșterea lungimii lanțului hidrofobic. 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 amidonului și cu ajutorul microundelor, timpul de reacție scăzând de la 24 ore la 60 minute, în funcție de solventul folosit;
- Reacția de polimerizare cu deschidere de ciclu a ϵ -caprolactonei a condus la obținerea de compuși ce au evidențiat prin curbele DSC că PCL grefat are o greutate moleculară suficientă pentru a permite lanțului poliesteric să cristalizeze;
- Au fost obținute prin reticulare cu acid citric hidrogeluri noi, pe bază de amidon și amidon hidrofobizat cu lanțuri palmitoil și PCL;
- Hidrogelurile au prezentat o hidrofobicitate controlată prin natura agentului de modificare a amidonului precum și prin parametrii de reticulare ai procesului;

- Proprietățile de umflare, încărcare și eliberare a hidrogelurilor pot fi ușor controlate prin ajustarea parametrilor studiați;
- S-a studiat capacitatea de înglobare și eliberare a unui medicament din clasa antibioticelor hidrosolubile (Levofloxacină) în/din structura hidrogelurilor. Mecanismul de încorporare a fost unul fizic, cinetica de eliberare fiind controlată de difuzia soluției tampon în structura rețelei;
- Levofloxacină din hidrogelurile pe bază de amidon hidrofobizat fost eliberată într-un timp mai îndelungat din hidrogelurile pe bază de amidon modificat cu PCL comparativ cu cantitatea eliberată din hidrogelurile pe bază de amidon modificat cu clorură de palmitoil;
- Creșterea concentrației de acid citric și a timpului de reticulare conduce la o densitate mai mare a rețelei finale, 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;
- Se poate afirma, că sistemele studiate eliberează principiul activ hidrofil printr-un mecanism combinat: pe de o parte medicamentul este eliberat datorită hidratării hidrogelurilor la suprafața rețelei și, pe de altă parte datorită umflării lor în interior după care acesta se eliberează prin difuzie din matrice în supernatant;
- 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;
- Difuzia medicamentului din hidrogeluri a fost datorată umflării acestora în mediul de eliberare, soluție tampon, pH 7,4, modelul propus pentru cinetica de eliberare a fost cel descris de Lagergren și Ho;
- Conform ecuației lui Peppas sistemele prezintă o difuzie de tip Fickian.
- S-a constatat că cinetica de eliberare depinde de tipul de material hidrofob din rețea. Studiul a ilustrat că este posibilă obținerea hidrogelurilor prin combinația adecvată a matricilor hidrofobe în vederea obținerii unui profil farmacocinetic acceptabil pentru mediul *in vitro*.

Bibliografie selectivă

- [1] Mishra M.K., Yagci Y., *Handbook of vinyl polymers: radical polymerization, process and technology*, Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2009;
- [2] IUPAC. "Glossary of Basic Terms in Polymer Science". *Pure Appl. Chem.*, 68:2287-2311, 1996;
- [3] Hamley I. W., *Introduction to block copolymers in developments in block copolymer science and technology*, Hamley I. W. Ed.; Wiley, 2004;
- [4] Soo P. L., Eisenberg A. J., *Preparation of block copolymer vesicles in solution*, *Polym. Sci. B: Polym. Phys.*, 42:923-938, 2004;
- [5] Zhang L., Eisenberg A. J., *Novel Morphologies of "Crew-Cut" Aggregates of Amphiphilic Diblock Copolymers in Dilute Solution*, *Langmuir*, 12:5980-5984, 1996;
- [6] Allen C., Maysinger D., Eisenberg A., *Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery*, *Colloids Surf. B*, 16: 3, 1999;
- [7] McGrance S.J., Cornell H.J., Rix C.J., *A simple and rapid colorimetric method for the determination of amylose in starch products*, *Starch*, 50:158-163, 1998;
- [8] Bengtsson, M.; Koch, K.; Gatenholm, P., *Surface octanoylation of high-amylose potato starch films*, *Carbohydrate Polymers*, 54(1):1-11, 2003;
- [9] Heinze T., Liebert T., *Unconventional methods in cellulose functionalization*, *Progress in Polymer Science*, 26:1689-1762, 2001;
- [10] Habnoui S., Blanquer S., Darcos V., Coudane J., *Aminated PCL-based copolymers by chemical modification of poly(α -iodo- ϵ -caprolactone-co- ϵ -caprolactone)*, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 47:6104–6115, 2009;
- [11] Hamaide T., Pantiru M., Fessi H., Boullanger, *Ring-opening polymerisation of ϵ -caprolactone with monosaccharides as transfer agents. A novel route to functionalised nanoparticles*, *Macromol. Rapid Commun.*, 22:659-663, 2009;
- [12] Vollhardt P., Schore N., *Organic Chemistry: Structure and Function*. New York: W.H. Freeman Company, 2007;
- [13] Tedeschi C., Saccavini C., Maurette L., Soleilhavoup M., Chauvin R., *1,4-diynes from alkynyl-propargyl coupling reactions*, *J. Organomet. Chem.*, 670:151-169, 2003;
- [14] Liu Q., Burton D. J., *A facile synthesis of diynes*, *Tetrahedron Letters*, 38: 4371-4374, 1997;
- [15] Clifford A. A., Waters W., *Oxidations of organic compounds by cupric salts*, *J. Chem. Soc.*, 3056-3062, 1963;
- [16] Tankam P. F., Muller R., Mischnicka P., Hopf H., *Alkynyl polysaccharides: synthesis of propargyl potato starch followed by subsequent derivatizations*, *Carbohydr. Res.*, 342:2049–2060, 2007;

- [17] Liu X., Zheng H.-N., Maa Y.-Z., Yan Q., Xiao S.-J., *Microwave irradiated click reactions on silicon surfaces via derivatization of covalently grafted poly(PEGMA) brushes*, Journal of Colloid and Interface Science 358:116–122, 2011;
- [18] Fukuda T., Onogi S., Miura Y., *Dendritic sugar-microarrays by click chemistry*, Thin Solid Films, 518:880–888, 2009;
- [19] Rindlav-Westling A., Gatenholm P., *Surface composition and morphology of starch, amylose and amylopectin films*, Biomacromol., 4:166–172, 2003;
- [20] Jeong J.H., Kang H. S., Yang S. R., Kim J-D., *Micelle- like aggregates of novel amphiphilic biodegradable poly(asparagine) grafted with poly (ϵ -caprolactone)*, Polymer, 44:583-591, 2003.
- [21] K. Letchford, H. Burt, *A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymerosomes*, Europ. Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 65:259–269, 2007 ;
- [22] Wu C.-S., *Performance of an acrylic acid grafted polycaprolactone/starch composite: Characterization and mechanical properties*, Journal of Applied Polymer Science , 89:2888–2895, 2003;
- [23] Kim J., Tirrell, D. A., *Synthesis of well-defined poly(2-ethylacrylic acid)*, Macromol., 32: 945-948, 1999;
- [24] Wan, J., Cheung M. K., Mi, Y., *Miscibility and morphology in crystalline/amorphous blends of poly(caprolactone)/poly(4-vinylphenol) as studied by DSC, FTIR, and C-13 solid state NMR*, Polymer, 43:1357, 2002;
- [25] Choi E.J., Kim C.-H., Park J.K., *Synthesis and characterization of starch-g-polycaprolactone copolymer*, Macromolecules, 32:7402-7408, 1999;
- [26] Yingying L., Youliang H., Wang Z. M., Manias E., Chung T.C., *Synthesis of new amphiphilic diblock copolymers containing poly(ethylene oxide) and poly(α -olefin)*, Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, 40:3416–3425, 2002;
- [27] Seib P.A. *Starch Chemistry and Technology*, Syllabus. Kansas State University, Manhattan, KS, 1996;
- [28] Xie X., Liu Q., *Development and physicochemical characterization of new resistant citrate starch from different corn starches*, Starch/Starke 56:364-370, 2004;
- [29] Coma V., Sebti I., Pardon P., Pichavan, F.H., Deschamps A., *Film properties from crosslinking of cellulosic derivatives with a polyfunctional carboxylic acid*, Carbohydrate Polymers 51:265-271, 2003.

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*“, 7th 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*“, 24th 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*“, Xème 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).