



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 00246**

(22) Data de depozit: **18.03.2010**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29.11.2013** BOPI nr. **11/2013**

(41) Data publicării cererii:
30.09.2011 BOPI nr. **9/2011**

(73) Titular:
• **ACADEMIA ROMÂNĂ - INSTITUTUL DE
CHIMIE MACROMOLECULARĂ "PETRU
PONI" IAȘI,**
ALEEA GRIGORE GHICA VODĂ NR.41 A,
IAȘI, IS, RO

(72) Inventatori:
• **VASILE CORNELIA, STR.PANTELIMON
NR.29, BL.308, SC.A, ET.3, AP.12, IAȘI, IS,
RO;**
• **CHEABURU CĂTĂLINA NATALIA,**
ALEEA MUȘATINI NR.10, BL.A 19 BIS,
ET.4, AP.28, IAȘI, IS, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
CN 101565469 A

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE DE NOI COPOLIMERI GREFAȚI
TERMO ȘI pH-RECEPTIVI**



1 Invenția de față se referă la un procedeu de obținere a unor copolimeri grefați pe
bază de alginat de sodiu (NaAlg) termo- și pH- receptivi.

3 Copolimerii alginatului au o gamă largă de aplicații în industria maselor plastice,
cernelurilor de tipărire, dispersanților/agenților de emulsifiere, inhibitorilor de coroziune,
5 floculanților, biomaterialelor, sistemelor de eliberare controlată etc.

7 Prezența grupării carboxil în AgA imprimă proprietăți speciale copolimerilor
polielectrolitici precum variația viscozității cu gradul de neutralizare, tranziții conformaționale
induse de pH și interacțiuni specifice cu anumiți ioni organici sau anorganici. [P. G. Brown
9 and Fujimori, J. Polym. Sci., Polym. Chem., A. 1994, 32, 2971; G. C. Chitanu, I. L.
Zaharia și A. Carpov, Intern. J. Polym. Anal. Charact., 1997, 4, 1]

11 Unele macromolecule liniare și geluri polimerice prezintă temperaturi inferioare critice
de solubilitate (LCST). Acești polimeri suferă o tranziție de fază discontinuă sau continuă ca
13 răspuns la variația temperaturii, pH-ului, compoziției solventului etc. [M. Shibayama,
T. Tanaka, Adv. Polym. Sci., 1993, 109, 1]. Datorită acestei proprietăți, materialele sunt
15 intensiv studiate ca substanțe de plecare pentru sisteme de eliberare controlată a
medicamentelor, în sisteme de separare a mediilor biologice etc., fiind considerați polimeri
17 receptivi la stimuli externi sau polimeri "inteligenti" [A. S. Hoffman, Macromol. Symp., 1995,
98, 654; H. H. Schild, Progr. Polym. Sci., 1993, 110, 81]. Polimerii receptivi la variații de
19 temperatură sunt adesea utilizați în condiții fiziologice ca de exemplu pentru separarea
proteinelor și pentru eliberarea controlată a medicamentelor și a altor principii active. Un
21 polimer reprezentativ pentru această comportare și proprietăți este poli(N-isopropil-
acrilamida) (PNIPAM), și copolimerii ei. Au fost studiați copolimeri grefați pe bază de
23 PNIPAM și polizaharide precum chitosanul, dextranul, carboximetil celuloză [G. Bokias,
Z. Mylonas, G. Staikos, G. G. Bumbu, C. Vasile, Macromolecules, 2001, 34, 4958] etc., dar
25 studii de grefare a PNIPAM și a alginatului de sodiu nu s-au raportat până acum.

27 Soluțiile apoase ale alginatului prezintă o viscozitate mare chiar la concentrații mici
de material dizolvat de aceea ele își găsesc o varietate largă de aplicații: în farmaceutică,
cosmetică, vopsele, controlul reologiei fluidelor etc. Această schimbare în viscozitate este
29 datorată tendinței puternice a părților hidrofobe ale PNIPAM de a forma agregate micro- și
nanostructurate în soluții apoase.

31 Sistemele care prezintă fenomenul de îngroșare la încălzire sunt formulări apoase
a căror viscozitate crește prin încălzire fenomenul fiind reversibil la răcire. În principiu nu
33 există limitări în ceea ce privește domeniul de temperatură în care se pot aplica. Ele se pot
aplica pe un domeniu larg de temperatură, de la temperatura corpului, pentru scopuri
35 biologice până la aproximativ 200°C (sau mai mult) în cazul fluidelor de drenare sau procese
de cimentare. Creșterea de viscozitate cu temperatura a fost inițial observată pentru soluțiile
37 semidiluate ale derivaților celulozei, care prezintă o separare în faze cu o temperatură
inferioară critică de solubilitate de tip (LCST). Grefarea de PNIPAM pe catene hidrofile de
39 AgA va da naștere la copolimeri ce prezintă caracteristica de creștere a viscozității soluției
sale apoase odată cu creșterea temperaturii. Tranziția conformațională de la ghem statistic
41 macromolecular la globulă are loc la ~33°C, aproape de temperatura corpului, aceasta
făcând ca acești copolimeri să fie foarte interesanți din punct de vedere biomedical.

43 Invenția de față rezolvă problema obținerii de copolimeri grefați ai acidului alginic cu
poliN-izopropil acrilamida care pot fi utilizați pentru controlul reologiei fluidelor și ca
45 transportori biodegradabili pentru eliberarea controlată a medicamentelor, etc.

47 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția de față este obținerea de noi copolimeri
grefați ai copolimerului acidului alginic cu poliN-izopropilacrilamida, în ideea de a combina
caracteristicile unice ale celor doi polimeri și de a obține materiale receptive la acțiunea unor
49 stimuli externi și cu proprietăți farmacologice, având în vedere această calitate a
copolimerului AgA-g-PNIPAM.

Procedeul conform invenției constă în aceea că, pentru obținerea unor copolimeri grefați bicomponenti dual receptivi, pe bază de alginat de sodiu, se cuplează alginat de sodiu prin reacție cu poli(N-izopropil acrilamidă) având grupe terminale cu reactivitate mărită de 1-3-(3-dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimidă în raport în greutate alginat de sodiu : poli(N-izopropil acrilamidă) de 3/1... 1/3, cu agitare la temperatura camerei, un timp de 24 h la un pH = 8, rezultând copolimeri grefați cu dependență de pH în soluție și cu creștere a viscozității soluțiilor la temperatura camerei, fiind utilizați pentru controlul reologiei lichidelor.

Avantajele aplicării prezentei invenții constau în aceea că se obțin copolimeri grefați cu proprietăți speciale, pe bază de alginat de sodiu și poli(N-izopropilacrilamidă), dual receptivi la acțiunea temperaturii și pH-ului, ce se pot utiliza ca senzori în diferite ramuri ale industriei farmaceutice, cosmetice și alimentare.

Se prezintă în continuare o descriere pe larg a invenției.

În invenția de față a fost utilizat acidul alginic, o polizaharidă ce se extrage din surse naturale din diferite alge brune (*Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum*), un produs Fluka cu următoarele caracteristici: pierderea la uscare sub 10 wt %, conținutul de cenușă mai mic de 3 wt %, iar viscozitatea redusă (η_{red}) a unei soluții apoase de concentrație 0,2% de 2,41 ml·g⁻¹ la 25°C. Alginatul este atât un biopolimer, cât și un polielectrolit și este considerat ca fiind biocompatibil, netoxic, neimunogenic și biodegradabil. Acesta este un copolimer format din blocuri alternante de acid manuronic (bloc M) și acid guluronic (bloc G) aranjate într-o structură neregulată variind proporțiile de blocuri GG, MM sau blocuri alternante sau statistice de GM. Blocurile alternante formează catenele cele mai flexibile și sunt mai solubile la pH mic în comparație cu celelalte tipuri de blocuri GM. În funcție de natura sursei de extracție, compoziția secvențelor de guluronat sau manuronat variază, iar raportul dintre acid manuronic/guluronic s-a determinat ca fiind 1.3.

PNIPAM cu grupări terminale de amină s-a preparat prin polimerizarea radicalică a N-izopropilacrilamidei (Aldrich), în soluție apoasă, folosind ca agent de cuplare redox - aminoetanetiol hidroclorurat (Aldrich) și persulfatul de amoniu (Serva) ca inițiator. Masa sa moleculară determinată viscozimetrie la 20°C într-o soluție de 0,5 M LiNO₃ a fost de 43000 daltons.

Procedeul de obținere a copolimerilor grefați ai alginatului de Na cu poli(N-izopropilacrilamida), conform invenției, constă în aceea că, copolimerul grefat AgA-g-PNIPAM a fost sintetizat printr-o reacție de cuplare la temperatura camerei între grupările NH₂-terminale ale lanțurilor de PNIPAM și grupările -COOH ale AgA, folosind 1-3-(3-dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimida hidroclorurată 98% (Aldrich) în exces, ca agent de condensare și HOBt. pH-ul amestecului de reacție a fost ajustat la 5. După 8 h reacția a fost completă; amestecul de reacție a fost complet neutralizat cu un exces de NaOH, supus dializei față de apă și apoi liofilizat. Produsul de reacție a fost extras în cloroform timp de 8 h pentru a înlătura lanțurile reziduale de PNIPAM. După spălare, compozițiile au fost înghețate timp de 2 h, după care au fost uscate timp de 10 h, prin liofilizare cu ajutorul unui sistem LABCONCO FreeZone. Compoziția copolimerilor grefați a fost investigată prin ¹H-NMR, spectroscopie FT-IR și analiză elementală.

Soluțiile apoase ale copolimerilor prezintă fenomenul de îngroșare la creșterea temperaturii care este dependent de asemenea de concentrația soluției și pH. La pH-uri mari nu se observă separare în faze datorită interacțiunilor electrostatice dintre lanțurile polimere încărcate electric. Acești polimeri suferă o tranziție de fază discontinuă sau continuă ca răspuns la variația temperaturii, pH-ului solventului, compoziția copolimerului, etc. Aceștia prezintă LCST în medii apoase unde schimbul în hidratare/dehidratare are loc rapid și este reversibil pentru schimbări mici în temperatură. Sub LCST, lanțurile polimere se hidratează și formează structuri extinse, în timp ce la temperaturi mai mari decât LCST polimerii formează structuri compacte deshidratându-se. Astfel de tranziții reversibile au fost utilizate larg în diferite domenii, în special pentru sisteme cu eliberare controlată a principiilor active.

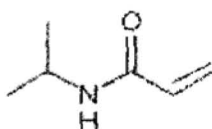
În sistemele inteligente de eliberare controlată a medicamentelor majoritatea polimerilor receptivi sunt preparați să fie receptivi la acțiunea unui singur stimul. Totuși cele mai eficiente medicamente utilizabile pentru terapii complicate necesită materiale care să fie interschimbabile, cu funcții variabile și responsive la acțiunea simultană a mai multor stimuli.

În continuare se dau 3 exemple de realizare a invenției, cu referire la rezultatele prezentate în tabel, unde sunt date caracteristicile copolimerilor obținuți, iar în fig. 2 și 3 este redată variația viscozității soluțiilor acestor copolimeri cu temperatura, compoziția copolimerului și respectiv pH-ul soluției.

În continuare, se vor folosi abrevierile: AgA-g-PNIPAM, AgA-g-PNIPAM 25 și AgA-g-PNIPAM 43, AgA-g-PNIPAM 68 care indică compoziția lor gravimetrică în unități de NIPAM.

Exemplul 1. Prima etapă a procesului constă în polimerizarea N-isopropilacrilamidei (NIPAM), polimer necesar apoi în reacția de grefare.

N-isopropilacrilamida (NIPAM) a fost furnizată de Aldrich și s-a folosit ca atare. Ea are următoarele proprietăți fizico-chimice: solid cristalin de culoare albă, cu masa moleculară: 113,16 g/mol, cu punct de topire 62°C, punct de fierbere 89 - 92°C la p=3 torr, formula moleculară C₆H₁₁NO, formula structurală:



Este parțial solubilă în apă rece.

Persulfatul de potasiu (KPS), 2-aminoetanetiol hidroclorurat (AET·HCl), 1-3-(3-dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimida hidroclorurată 98% (EDC) (Aldrich), clorura de litiu (Sigma) au fost de puritate analitică.

Apa s-a purificat prin distilare.

Reacția de polimerizare radicalică a NIPAM prin procedeul discontinuu se realizează într-un reactor de 500 ml, echipat cu agitator tip ancoră, termometru de imersie, condensator pentru reflux și tub capilar pentru introducerea azotului, reacția având loc în atmosfera inertă. Încălzirea vasului de reacție se realizează în baie termoreglabilă cu apă, cu dispozitiv de preaplin pentru menținerea nivelului constant și pentru răcirea finală. Fig. 1 prezintă schema instalației de laborator pentru sinteza PNIPAM.

Sinteza poli(N-isopropilacrilamidei) (PNIPAM)

PNIPAM s-a preparat prin polimerizare radicalică în soluție apoasă folosind un agent de cuplare și sistemul redox KPS/AET·HCl cu K₂S₂O₈ (KPS) ca inițiator. Polimerizarea s-a realizat într-un balon cu trei găuri echipat cu un condensator de refluxare, un agitator magnetic în atmosfera de azot. Monomerul s-a dizolvat în apă (0,108 mol în 120 ml apă) în care s-a barbotat azot. Temperatura s-a ajustat la 29°C (±1°C) cu ajutorul unei băi de apă. Inițiatorul (KPS (0,3 g în 12 ml apă) și AET·HCl (0,0022 mol în 12 ml apă) s-a dizolvat separat în apă și s-a adăugat repede la soluția de monomer la o oră după începerea procesului. Timpul de reacție a fost de aproximativ 3 ore. Polimerul rezultat s-a purificat prin dializă (membrană de ~12000 daltons - cumpărată de la Sigma) și apoi uscat prin liofilizare. Masa lui moleculară medie gravimetrică determinată prin viscozimetrie într-o soluție de 0,5 M LiNO₃ a fost de 43000 și s-a evaluat cu relația:

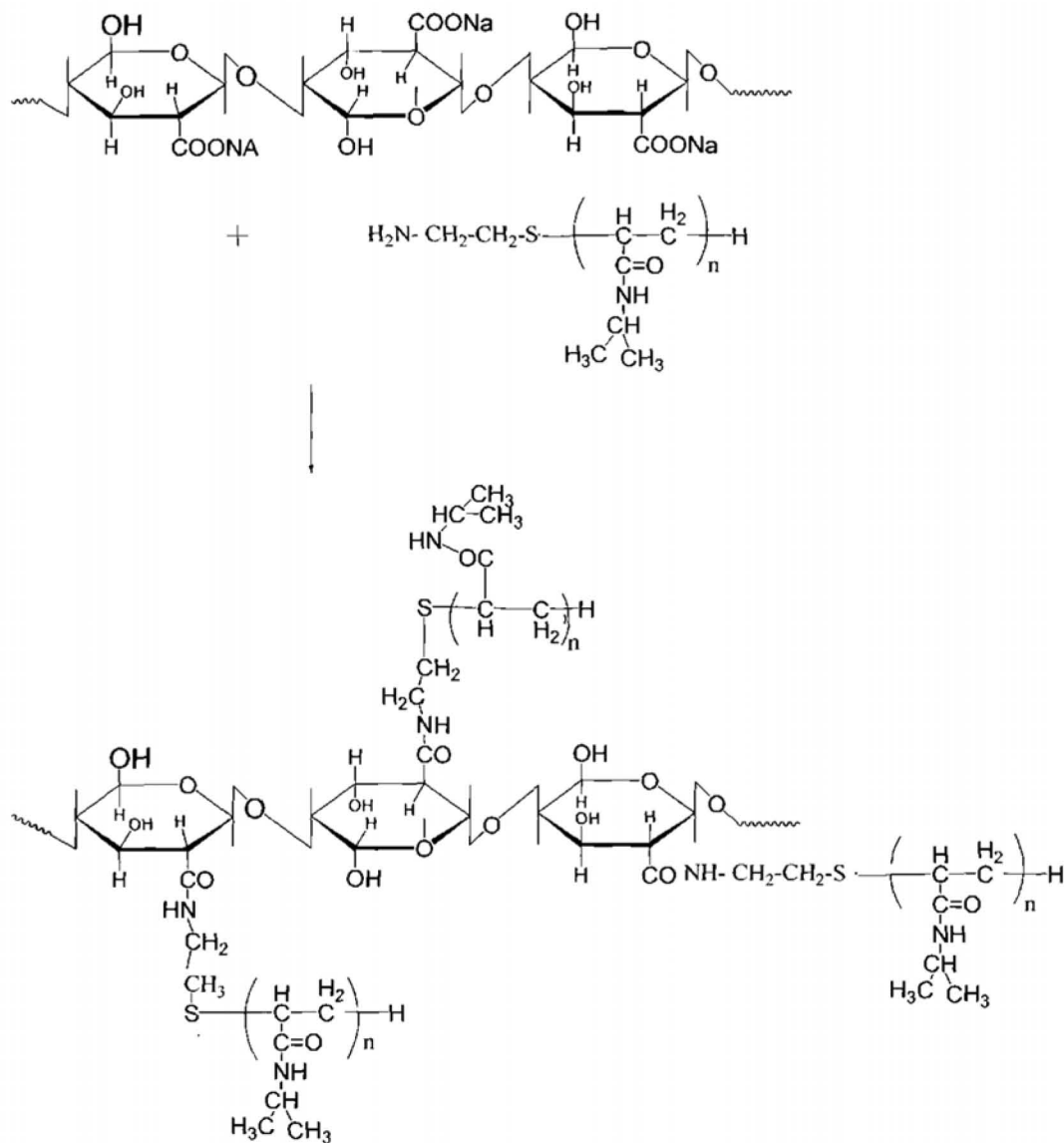
$$[\eta] = 0,047 [Mw]^{0,61}$$

stabilită prin măsurători de GPC - viscozimetrie.

Reacția de grefare

Copolimerul grefat AgA-g-PNIPAM s-a preparat printr-o reacție de cuplare între NaAlg și PNIPAM folosind ca agent de condensare 1-3-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida hidroclorurată 98% (EDC). Pentru sinteza copolimerului cu un raport gravimetric între componenți de 2 NaAlg /1 PNIPAM și condițiile de sinteză au fost de exemplu: 2,68 g NaAlg și 1,32 g PNIPAM s-au dizolvat în 160 mL și respectiv 35 mL (sau 70 mL) apă, sub agitare viguroasă, la temperatura camerei pentru 24 h. Cele două soluții s-au amestecat și pH-ul sistemului s-a ajustat la valoarea $pH = 8$ prin adăugarea câtorva picături de soluție de 2M NaOH. 1 mL din mediu s-a prelevat pentru analiza SEC 0,202 g sau 0,404 g de EDC dizolvat în 5 (sau 10) mL apă s-au adăugat la mediu de reacție. Evoluția reacției s-a urmărit cu ajutorul temperaturii de separare în faze a PNIPAM. Dacă soluția nu a devenit tulbure după 4 h de reacție s-a mai adăugat o nouă cantitate de EDC. După 4 h sau 8 h de reacție, la temperatura camerei, produsul de reacție s-a dializat față de apă timp de 48 h, pentru a înlătura compușii cu masa moleculară mică până la valoarea minimă a conductibilității apei separate (<10 mS) și apoi s-a liofilizat. Produsii rezultați s-au extras în cloroform timp de 8 h, pentru a înlătura PNIPAM nereacționată.

Schema reacției de grefare este următoarea:



Schema 1. Reacția de grefare a NaAlg cu PNIPAM

Compoziția copolimerilor a fost stabilită prin spectroscopie ^1H RMN și IR, analiza elementară, titrarea grupelor carboxil.

Randamentul de reacție raportat la masa celor doi polimeri este de ~81%.

Spectrele IR (KBr): prezintă următoarele benzi caracteristice: 1700-1680, 1420 (s, C=O, COOH), 1655 (s, C=O, amida I) 1623 (s, C=C) și 1555 cm^{-1} (s, NH, amida II).

Spectrele IR ale copolimerilor grefați prezintă nu numai benzile de absorbție caracteristice componentelor ci și grupe $-\text{CONH}_2$ (1650 cm^{-1}) indicând ca prin grefare s-au legat catene de PNIPAM. Spectrele ^1H RMN (D_2O) prezintă următoarele semnale: $\delta = 3,75$ ppm (m, grupa metin a PNIPAM) 3,12 - 3,22 ppm (m, 2H, NHCH_2), 2,26 ppm (t, 2H, CH_2COOH), 1,28 - 1,64 ppm (m, 6H, 3CH_2), 0,98 ppm (s - grupa metil a PNIPAM).

Câteva caracteristici ale copolimerilor grefați în raport cu cele ale homopolimerilor sunt date în tabel.

Tabel

*Caracteristicile copolimerilor grefați AgA-g-PNIPAM
în raport cu cele ale componentelor AgA și PNIPAM*

Proba	Notăție	Raportul între polimeri în amestecul de reacție wt. %	η_{red} ml/g	$M_{\text{vx}} 10^4$	Fracția gravimetrică a unităților de PNIPAM grefate evaluate din spectrul ^1H -RMN
Sare de Na a acidului alginic	NaAlg		2,41 ^a		
Poli(N-isopropilacrilamida)	PNIPAM		31,5 ^b	4,3	
Copolimer grefat acid alginic-PoliN izopropil acrilamida (AgA-g- PNIPAM)	AgA-g- PNIPAM25	3:1			25
Copolimer grefat acid alginic-PoliN izopropil acrilamida (AgA-g- PNIPAM)	AgA-g- PNIPAM43	1,3:1			43
Copolimer grefat acid alginic-PoliN izopropil acrilamida (AgA-g- PNIPAM)	AgA-g- PNIPAM68	1:3			68

^a viscozitatea redusă (η_{red}) a unei soluții apoase de concentrație 0,2% la 25°C;

^b 20°C în soluție apoasă de 0,5 M LiNO_3 .

Exemplul 2. Se procedează ca în exemplul 1, dar folosind următoarele cantități în amestecul de reacție: 1,742 g NaAlg și 1,32 g poli-N-isopropil acrilamidă PNIPAM) corespunzătoare unei compoziții procentuale de 43% PNIPAM), 0,345 g agent de condensare 1-3-(3-dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimida hidroclorurată 98% (EDC) dizolvate în 150 mL apă. Caracteristicile copolimerilor obținuți sunt date în tabel.

Exemplul 3. Se procedează ca în exemplul 1, dar folosind următoarele cantități în amestecul de reacție: 1,32 g NaAlg și 2,68 g PNIPAM poli-N-isopropil acrilamidă PNIPAM) corespunzătoare unei compoziții procentuale de 68% PNIPAM), 0,345 g agent de condensare 1-3-(3-dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimida hidroclorurată 98% (EDC) dizolvate în 150 mL apă. Caracteristicile copolimerilor obținuți sunt date în tabel.

Copolimerii prezintă o creștere însemnată a viscozității la creșterea temperaturii această creștere fiind dependentă de temperatură și conținutul de PNIPAM în copolimer după cum rezultă din fig. 2.

Semnificația simbolurilor este dată în legendă.

Dependența viscozității soluțiilor de concentrație 1g/dL de pH este redată în fig. 3.

Se poate ușor remarca dependența de pH a viscozității copolimerilor alginatului de sodiu imprimă o comportare specifică copolimerilor de diferite compoziții, aceasta fiind o curbă cu maxim pentru copolimerul cu PNIPAM 68 și o curbă cu minim la pH 5 pentru alte compoziții.

Procedeu de obținere a unor copolimeri grefați bicomponenți dual receptivi, pe bază	3
de alginat de sodiu, caracterizat prin aceea că se cuplează alginat de sodiu prin reacția cu	
poli(N-izopropil acrilamidă) având grupe terminale cu reactivitate mărită de 1-3-(3-	5
dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimidă, în raport în greutate alginat de sodiu : poli(N-izopropil	
acrilamidă) de 3/1...1/3, cu agitare la temperatura camerei, un timp de 24 h la un pH = 8,	7
rezultând copolimeri grefați cu dependență de pH în soluție și cu creștere a viscozității	
soluțiilor cu temperatura, fiind adecvați pentru controlul reologiei lichidelor.	9

(51) Int.Cl.

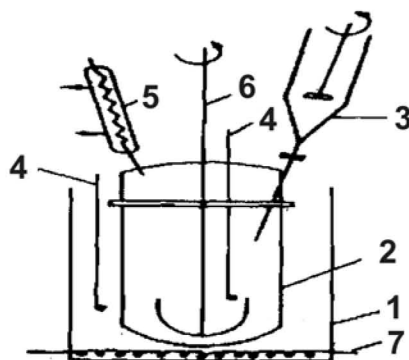
C08B 37/00 (2006.01),**A23L 1/05** (2006.01),**A61K 47/36** (2006.01)

Fig. 1

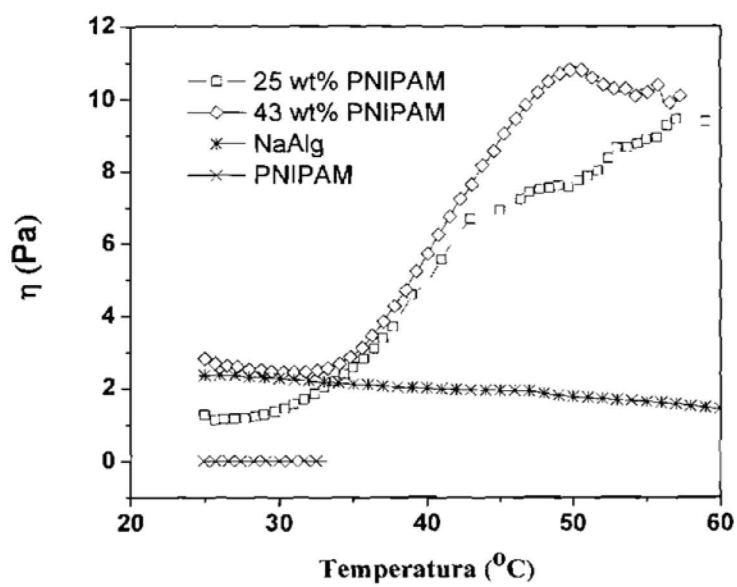


Fig. 2

(51) Int.Cl.

C08B 37/00 (2006.01),

A23L 1/05 (2006.01),

A61K 47/36 (2006.01)

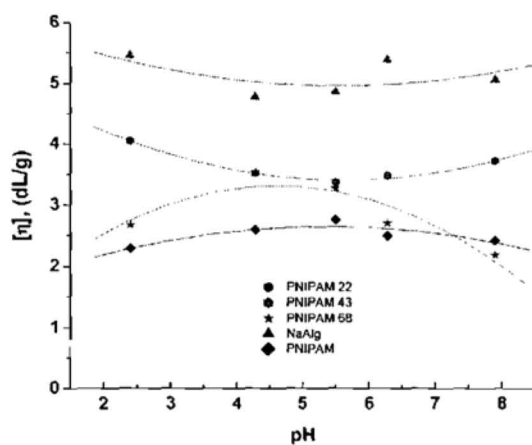


Fig. 3



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 1091/2013