



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 00246

(22) Data de depozit: 18.03.2010

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

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL DE CHIMIE MACROMO-
LECULARĂ "PETRU PONI", IAȘI -
ACADEMIA ROMÂNĂ,
ALEEA G. GHICA VODĂ NR. 41A, 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

(54) PROCEDEU ȘI COMPOZIȚIE PENTRU OBTINEREA DE NOI
COPOLIMERI GREFAȚI TERMO ȘI PH-RECEPTIVI

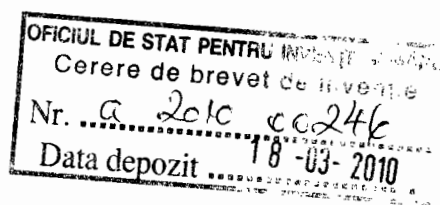
(57) Rezumat:

Invenție se referă la copolimeri bicomponenți, utilizați în industria farmaceutică, cosmetică și alimentară. Copolimerii conform invenției sunt obținuți prin reacția de cuplare a poli(N-izopropil acrilamidei) având grupe terminale amino cu reactivitate mărită, utilizând, ca agent de condensare, 1,3-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, cu alginat de sodiu, la rapoarte de

amestecare a componentelor de 3/1 și 1, 3/1 și 1/3, sub agitare, la temperatura camerei, timp de 24 h, la o valoare pH de 8, rezultând copolimeri grefați termo- și pH-receptivi.

Revendicări: 4





PROCEDEU ȘI COMPOZIȚIE PENTRU OBTINEREA DE NOI COPOLIMERI GREFAȚI TERMO ȘI PH- RECEPTIVI

Invenția de față se referă la un procedeu de obținere și la compoziția unor copolimeri grefați pe bază de alginat de sodiu (NaAlg) și poli-N-izopropil acrilamidă (PNIPAM), termo- și pH- receptivi de diferite compoziții.

Copolimerii alginatului au o gamă largă de aplicații în industria maselor plastice, cernelurilor de tipărire, dispersanților/ agenților de emulsifiere, inhibitorilor de coroziune, floculanților, biomaterialelor, sistemelor de eliberare controlată, etc.^{1,2}

Prezența grupării carboxil în AgA imprimă proprietăți speciale copolimerilor polielectrolitici precum variația vascozității cu gradul de neutralizare, tranziții conformaționale induse de pH și interacțiuni specifice cu anumiți ioni organici sau anorganici.^{3,4}

Unele macromolecule liniare și geluri polimerice prezintă temperaturi inferioare critice de solubilitate (LCST). Acești polimeri suferă o tranziție de fază discontinuă sau continuă ca răspuns la variația temperaturii, pH-ului, compoziției solventului, etc.⁵ Datorită acestei proprietăți, materialele sunt intens studiate ca substanțe de plecare pentru sisteme de eliberare controlată a medicamentelor, în sisteme de separare a mediilor biologice, etc., fiind considerați polimeri receptivi la stimuli externi sau polimeri "inteligenti"^{6, 7}. Polimerii receptivi la variații de temperatură sunt adesea utilizați în

condiții fiziologice ca de exemplu pentru separarea proteinelor⁸ și pentru eliberarea controlată a medicamentelor și a altor principii active. Un polimer reprezentativ pentru această comportare și proprietăți este poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM), și copolimerii ei. Au fost studiați copolimeri grefați pe bază de PNIPAM și polizaharide precum chitosanul^{9,10}, dextranul¹¹, carboximetil celuloza^{12,13,14} etc, dar studii de grefare a PNIPAM și a alginatului de sodiu nu s-au raportat până acum.

Soluțiile apoase ale alginatului prezintă o vâscozitate 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 datorată tendinței puternice a părților hidrofobe ale PNIPAM de a forma agregate micro- și nanostructurate în soluții apoase.

Sistemele care prezintă fenomenul de îngrosare la încălzire sunt formulări apoase a căror viscozitate crește prin încălzire fenomenul fiind reversibil la răcire. În principiu nu 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 biologice până la aproximativ 200°C (sau mai mult) în cazul fluidelor de drenare sau procese de cimentare. Creșterea de vâscozitate cu temperatura a fost inițial observată pentru soluțiile semi-diluate ale derivaților celulozei care prezintă o separare în faze cu o temperatură inferioară critică de solubilitate de tip (LCST).

Grefarea de PNIPAM pe catene hidrofobe de AgA va da naștere la copolimeri ce prezintă caracteristica de creștere a vâscozității soluției sale apoase odată cu creșterea temperaturii. Tranziția conformațională de la ghem statistic 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.

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 transportori biodegradabili pentru eliberarea controlată a medicamentelor, etc.

Scopul invenției 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 stimuli externi și

cu proprietăți farmacologice, având în vedere această calitate a copolimerului AgA-g-PNIPAM. Au fost utilizate următoarele materiale:

A fost utilizat în studiu 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 vâscozitatea 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 viscozimetric la 20°C într-o soluție de 0.5 M LiNO₃ a fost de 43 000 daltons.

Procedeele 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-dimethylaminopropil)-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 8h 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 8h pentru a înlătura lanțurile reziduale de PNIPAM. După spălare, compozițiile au fost înghețate timp de 2 ore, după care au fost uscate timp de 10 ore,

prin liofilizare cu ajutorul unui sistem LABCONCO FreeZone. Compoziția copolimerilor grefați a fost investigată prin $^1\text{H-NMR}$, spectroscopie FT-IR și analiză elementală.

Soluțiile apoase ale copolimerilor prezintă fenomenul de îngroșare la creșterea temperaturii care este dependent de asemeni 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.¹⁵

Invenția prezintă avantajul 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 și în diferite ramuri ale industriei farmaceutice, cosmetice și alimentare.

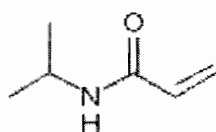
În continuare se dau 3 exemple de realizare a invenției, cu referire la rezultatele prezentate în Tabelul 1, unde sunt date caracteristicile de copolimerilor obținuți, iar în Figurile 2 și 3 este redată variația vascozității soluțiilor acestor copolimeri cu temperatura, compoziția copolimerului și respectiv 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 hidrociorurat* (AET.HCl), *1-3-(3-dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimida hidrociorurata 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. Figura 1 prezintă schema instalației de laborator pentru sinteza PNIPAM.

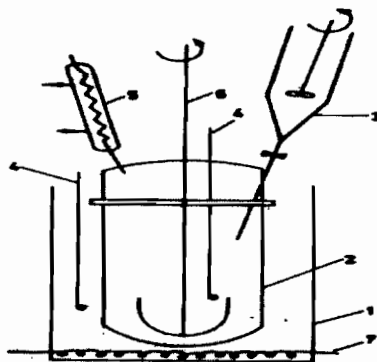


Figura 1. Instalația de laborator de sinteză a polimerilor și copolimerilor greși AgA-g-PNIPAM:

1 - baie termoreglabilă; 2 - vas de reacție; 3 - vas de alimentare; 4 – termometru de imersie; 5 - condensator; 6 - agitator tip ancoră; 7 - rezistență electrică

Sinteza poli(N-izopropilacrilamidei) (PNIPAM)

PNIPAM s-a preparat prin polimerizare radicalică în soluție apoasă folosind un agent de cuplare și sistemul redox KPS/AET.HCl cu $K_2S_2O_8$ (KPS) ca inițiator. Polimerizarea s-a realizat într-un balon cu trei gâturi echipat cu un condensator de refluxare, un agitator magnetic în atmosfera de azot. Monomerul s-a dizolvat în apă (0.108 mol în 120ml apă) în care s-a barbotat azot. Temperatura s-a ajustat la 29 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$) cu ajutorul unei băi de apă. Inițiatorul (KPS (0.3g în 12mL apă) și AET.HCl (0.0022mol în 12mL 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 (membrana ~12 000 daltons – cumpărată de la Sigma) și apoi uscat prin liofilizare. Masa lui moleculară medie gravimetrică determinată prin viscozimetrie într-o soluție de 0.5M $LiNO_3$ a fost de 43 000 și s-a evaluat cu relația:

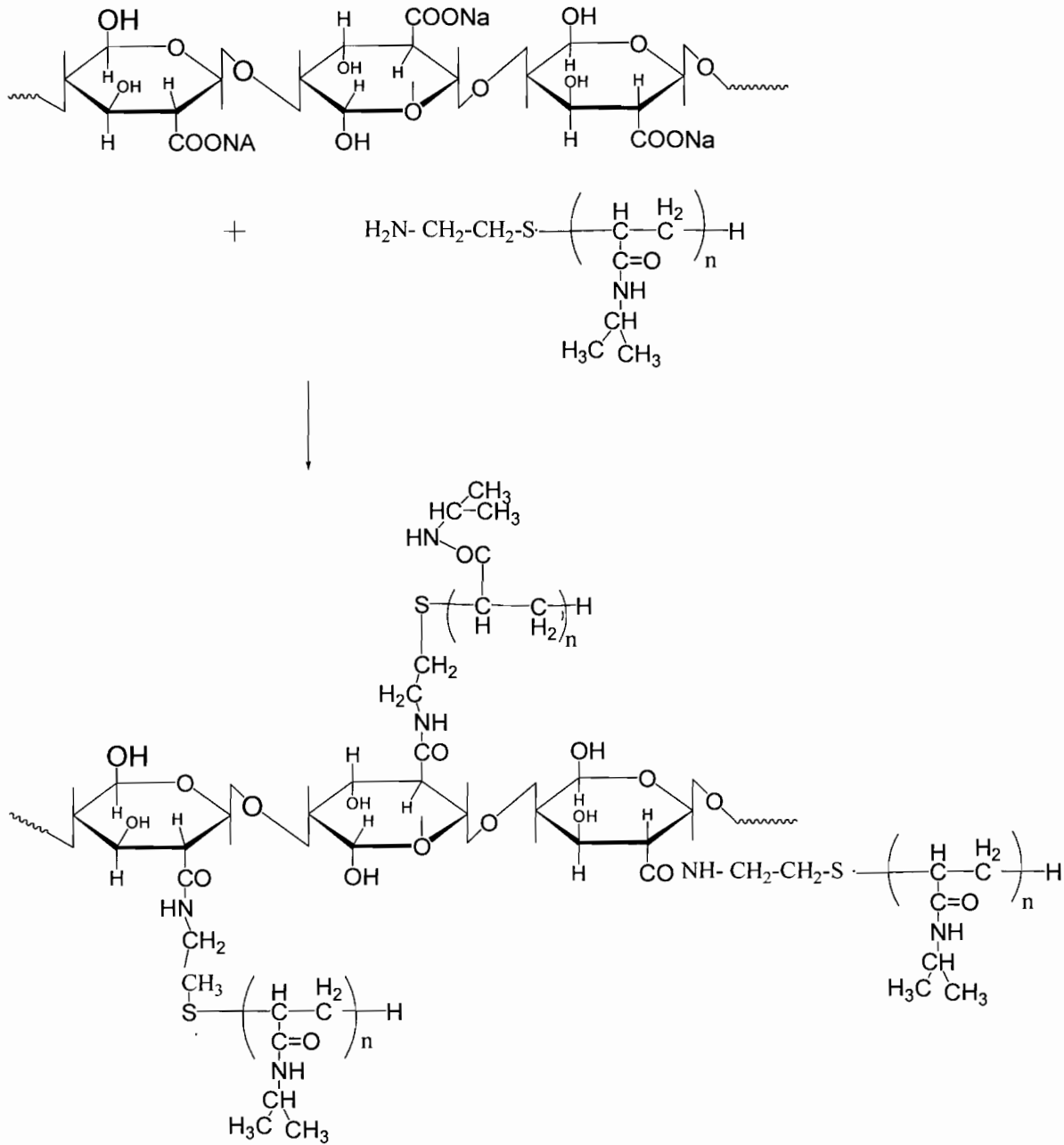
$$[\eta] = 0.047 [M_w]^{0.61}$$

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-etil-carbodiimida hidroclorurată 98% (EDC). Pentru sinteza copolimerului cu un raport gravimetric între componenți de 2 NaAlg /1PNIPAM și condițiile de sinteză au fost de exemplu: 2.68g NaAlg și 1.32g PNIPAM s-au dizolvat în 160mL și respectiv 35 mL (sau 70mL) apă, sub agitare viguroasă, la temperatura camerei pentru 24h. 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. 1mL din mediu s-a prelevat pentru analiza SEC. 0.202g sau 0.404g 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 4h de reacție s-a mai adăugat o nouă cantitate de EDC. După 4h sau 8h de reacție, la temperatura camerei, produsul de reacție s-a dializat față de apă timp de 48h pentru a înlătura compușii cu masa moleculară mică până la valoarea minimă a conductibilității apei separate (<10mS) și apoi s-a liofilizat. Produsul rezultat s-a extras în cloroform timp de 8h pentru a înlătura PNIPAM nereacționată.

Schema reacției de grefare este următoarea:



Schema 1. Reactia de grefare a NaAlg cu PNIPAM

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

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

18-03-2010

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 $-\text{CONH}_2$ (1650cm^{-1}) indicând ca prin grefare s-au legat catene de PNIPAM. Spectrele ^1H NMR (D_2O) prezintă următoarele semnale: $\delta=3.75\text{ppm}$ (m, grupa metin a PNIPAM) 3.12-3.22ppm (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 NIPAM).

Câteva caracteristici ale copolimerilor grefați în raport cu cele ale homopolimerilor sunt date în Tabelul 1.

Tabelul 1. 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. %	$[\eta]$ ml/g	$M_v \times 10^4$	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), 0,345g agent de condensare 1-3-(3-dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimida hidroclorurată 98% (EDC) dizolvate în 150 mL apă. Caracteristicile copolimerilor obținuți sunt date în tabelul 1.

Exemplul 3

Se procedează ca în exemplul 1, dar folosind următoarele cantități în amestecul de reacție: 1.32 g NaAlg și 2.68g PNIPAM poli-N-isopropil acrilamidă (PNIPAM) corespunzătoare unei compoziții procentuale de 68 % PNIPAM), 0,345g agent de condensare 1-3-(3-dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimida hidroclorurată 98% (EDC) dizolvate în 150 mL apă. Caracteristicile copolimerilor obținuți sunt date în tabelul 1.

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

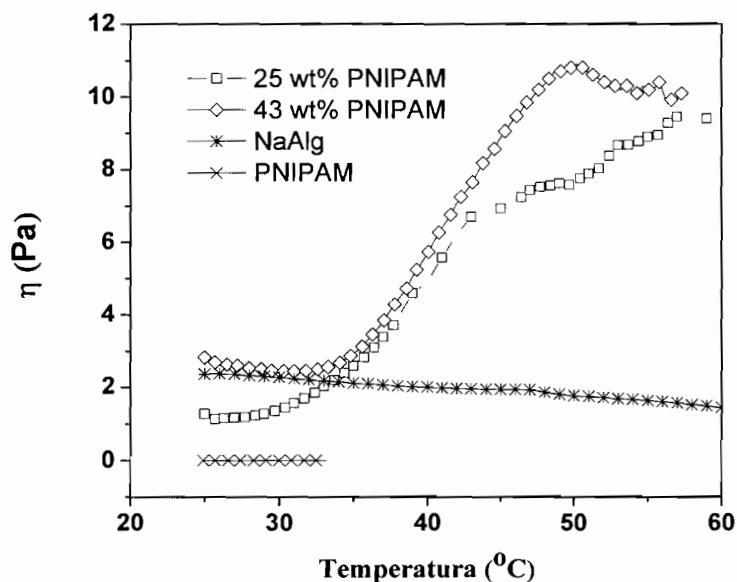


Figura 2 Dependența de temperatură a vâscozității dinamice la o forță de forfecare $\gamma = 50 \text{ s}^{-1}$ pentru componenții puri (NaAlg și PNIPAM) și copolimerii grefați

AgA-g-PNIPAM 25 și AgA-g-PNIPAM 43. Concentrația polimerului 10 mg cm⁻³.
Semnificația simbolurilor este dată în legendă.

Dependenta vâscozității soluțiilor de concentrație 1g/dL de pH este redată în Figura 3.

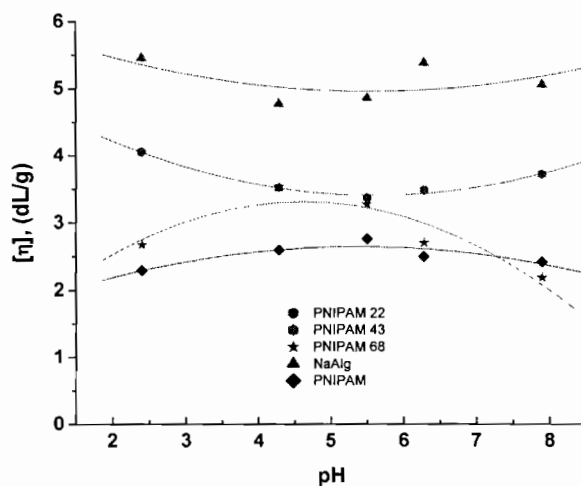


Figura 3. Variația vâscozității intrinseci a soluțiilor diluate cu pH solventului

Se poate ușor remarca dependența de pH a alginatului de sodiu care 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.

REVEDICĂRI

1. Procedeu de obținere și compoziție a unor copolimeri grefați bicomponenți dual receptivi **caracterizat prin aceea că** sunt constituiti din alginat de sodiu și poli(N-izopropil acrilamidă), componenții fiind in rapoartele de amestecare 3/1 și 1,3/1 și 1/3.
2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** reacția de sinteză are loc prin cuplarea poli(N-izopropil acrilamidei) având grupe terminale cu reactivitate mărită de 1-3-(3-dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimida cu alginatul de sodiu, sub agitare viguroasă, la temperatura camerei pentru 24h la pH = 8.
3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** copolimerii grefați prezintă o creștere a vâscozității soluțiilor apoase prin încălzire comparativ cu vâscozitatea soluției la temperatura camerei de aceea pot fi folosiți pentru controlul reologiei altor lichide.
4. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, copolimerii grefați prezintă o dependență de pH soluției fiind prin urmare receptivi la pH mediului.