

SPIS TREŚCI

WYKAZ OZNACZEŃ	7
1. WPROWADZENIE	9
2. CEL PRACY	14
3. PODSTAWY TEORII KOLOIDÓW	14
3.1. Oddziaływania międzycząsteczkowe w układach koloidalnych	15
3.1.1. Teoria warstwy podwójnej	18
3.1.2. Potencjał Zeta	20
3.1.3. Warstwa podwójna w roztworach polielektrolitów – podejście Poissona’a-Boltzmann	23
3.2. Konformacja przestrzenna łańcuchów polimeru w roztworach koloidalnych	29
3.3. Stabilność koloidów polimerowych	32
3.4. Kinetyka agregacji w roztworach koloidalnych	36
3.4.1. Agregacja limitowana dyfuzją (DLA)	36
3.4.2. Agregacja limitowana reakcją (RLA)	37
3.4.3. Porównanie szybkości agregacji limitowanej dyfuzją (DLA) i limitowanej reakcją (RLA)	39
3.4.4. Żelowanie zawiesin koloidalnych	40
4. KOLOIDY CHITOZANOWE O NISKIM STEŻENIU	42
4.1. Chityna i chitozan	42
4.2. Chitozan – budowa i właściwości fizykochemiczne	44
4.3. Hydrożele chitozanowe	47
4.3.1. Hydrożele chitozanowe wrażliwe na wzrost temperatury	49
4.3.2. Rola soli glicerofosforanu w procesie agregacji chitozanu	57
4.4. Reologiczne metody analizy hydrożeli chitozanowych	64
4.4.1. Pomiary właściwości lepkosprężystych chitozanu	65
4.4.2. Metody wyznaczania temperatury przemiany fazowej	68
4.4.3. Konfiguracja łańcuchów chitozanu w roztworze	71
5. PODSUMOWANIE PRZEGLĄDU LITERATURY	76

6. ANALIZA TEORETYCZNA MECHANIZMÓW PROCESU PRZEMIANY FAZOWEJ HYDROŻELI CHITOZANOWYCH.....	80
6.1. Jednozasadowe rozpuszczalniki stosowane w koloidalnych układach chitozanowych.....	85
6.2. Fosforan i glicerofosforan – rola w procesie neutralizacji ładunku polijonu.....	86
6.3. Kinetyka krystalizacji chitozanu	91
6.3.1. Energia agregacji	95
6.3.2. Kinetyka procesu agregacji w warunkach izotermicznych.	96
6.4. Perykinetyka i ortokinetyka	99
6.5. Wpływ lepkości na proces przemiany fazowej	103
7. ANALIZA DOŚWIADCZALNA PROCESU PRZEMIANY FAZOWEJ HYDROŻELI CHITOZANOWYCH	107
7.1. Materiał doświadczalny	107
7.1.1. Wyznaczenie naważek soli glicerofosforanu wapnia oraz glicerofosforanu magnezu	109
7.1.2. Preparatyka koloidalnych roztworów chitozanu	110
7.2. Metodyka badań doświadczalnych.....	110
7.2.1. Pomiar pH i potencjału Zeta.....	110
7.2.2. Pomiar kinetyki procesu perykinetycznego – turbidymetria...	111
7.2.3. Izotermiczne i nieizotermiczne pomiary reologiczne.....	112
7.2.4. Analiza struktury morfologicznej hydrożeli chitozanowych metodami FTIR i SEM.....	113
7.3. Wyniki pomiarów i dyskusja.....	114
7.3.1. Wyniki pomiarów pH.....	114
7.3.2. Pomiar potencjału Zeta.....	115
7.3.3. Perykinetyczny proces przemiany fazowej zol-żel.....	118
7.3.4. Widma mechaniczne koloidalnych układów chitozanowych.....	123
7.3.5. Izotermiczne kinetyki przemiany fazowej zol-żel.....	127
7.3.6. Nieizotermiczny proces przemiany fazowej zol-żel.....	131
7.3.7. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera.....	134
7.3.8. Struktura morfologiczna hydrożeli chitozanowych SEM.....	137

8. PODSUMOWANIE	140
BIBLIOGRAFIA	143
ZAŁĄCZNIK NR 1	157
ZAŁĄCZNIK NR 2	159
ZAŁĄCZNIK NR 3	164
STRESZCZENIE	165
SUMMARY	166

1. WPROWADZENIE

Polimery to makrocząsteczki o masie cząsteczkowej przekraczającej 10 000 daltonów, zbudowane z jednostek zwanych merami. Powstają one w reakcji polimeryzacji, polikondensacji lub poliaddycji. Ze względu na pochodzenie polimery możemy podzielić na dwie podstawowe grupy. Pierwszą stanowią związki występujące w przyrodzie lub ich pochodne nazywane polimerami naturalnymi. Do grupy tej należą między innymi celuloza, jedwab, bursztyn, amyloza, amylopektyna, kauczuk, proteiny, kwasy nukleinowe oraz znajdujące w ostatnich latach szerokie zastosowanie chityna i jej pochodna otrzymywana na drodze deacetylacji – chitozan. Drugą grupę stanowią związki wytworzone przez człowieka w wyniku syntezy chemicznej – polimery syntetyczne (plastomery, elastomery). Najbardziej znane polimery syntetyczne to polietylen, polipropylen, poliwęglan, polichlorek winylu, poliamidy i kauczuki syntetyczne.

Warunkiem koniecznym wystąpienia reakcji polimeryzacji jest obecność w cząsteczkach monomerów co najmniej dwóch grup funkcyjnych, zdolnych do takiej reakcji lub występowanie w monomerach liniowych lub pierścieniowych wiązań wielokrotnych. W wyniku reakcji monomerów dwufunkcyjnych powstają polimery liniowe, natomiast podczas reakcji trój- i wielofunkcyjnych monomerów powstają polimery przestrzennie usieciowane. Występujące w sieciach polimerowych odchylenia od właściwości sieci idealnych mogą być spowodowane niepełnym przereagowaniem grup funkcyjnych, tworzeniem pętli wewnątrzcząsteczkowych i trwałymi splątaniem łańcuchów polimeru. Ponadto rozkład wiązań sieciujących może być niejednorodny ze względu na różną reaktywność grup funkcyjnych. Do anomalii w procesie usieciowania może prowadzić także wyczerpanie się reaktywniejszego (o większej liczbie grup funkcyjnych) monomeru, znajdującego się w układzie polimeryzującym w małych ilościach. Wtedy pozostałe monomery dwufunkcyjne tworzą liniowe łańcuchy.

Wyróżniamy dwa rodzaje usieciowanych kopolimerów: żelowe i porowate. Kopolimery o strukturze żelowej są syntetyzowane z mieszaniny monomerów bez dodatkowych rozpuszczalników. Ich właściwości są funkcją stężenia monomeru sieciującego w kopolimerze. Kopolimery porowate powstają podczas polimeryzacji monomerów rozcieńczonych różnymi ilościami obojętnych rozpuszczalników. Przy czym, jeżeli są to termodynamicznie dobre rozpuszczalniki, a stopień usieciowania jest mały, nie wywołują one porowatości, ale zwiększają przenikalność ziaren kopolimerów. Takie kopolimery nazwano ekspandowanymi. Jednym z przykładów polimeryzacji porowatej jest polimeryzacja w zawiesinie (suspensyjna, perełkowa, mikroblokowa) [1-3]. Przebiega ona w kroplach monomeru zdyspergowanego w niemieszającej się z nim cieczy. W wyniku polimeryzacji krople monomeru stają się stałymi cząstkami polimeru zwanymi granulami lub perełkami. Fazą rozpraszającą jest najczęściej woda, a stabilizatorami polimery zawierające fragmenty hydrofilowe i hydrofobowe. Zmniejszenie rozpuszczalności monomerów hydrofilowych w wodzie osiąga się poprzez dodanie do fazy rozpraszającej soli nieorganicznych (np.: chlorku wapnia, chlorku sodu).

Polimery usieciowane znajdują bardzo szerokie zastosowanie. Stosuje się je jako sorbenty zamiast węgla aktywnych i mają nad nimi przewagę, ponieważ łatwo ulegają regeneracji za pomocą organicznych rozpuszczalników. Odzyskują wtedy pierwotne właściwości sorpcyjne i nie wymagają dodatkowej aktywacji. Polimerowe sorbenty stosuje się m.in. przy zatażeniu związków organicznych znajdujących się w śladowych ilościach w wodzie [4], do rozdziału związków organicznych (np. kwasów, fenoli i ich pochodnych) [5] oraz jako wypełnienia kolumn chromatograficznych [1, 6]. W przemyśle służą między innymi do oczyszczania ścieków [7], roztworów cukrów od barwnych zanieczyszczeń itp. Polimery te są również powszechnie stosowane jako nośniki substancji biologicznie czynnych np. do przyłączania białek (w tym przypadku wykorzystuje się właściwości adsorpcyjne nośnika, wiązania jonowe i kowalencyjne z grupami reaktywnymi nośników). Najczęściej są to kopolimery akrylowe usieciowane dimetakrylanem glikolu etylenowego. Nośniki polimerowe znalazły także zastosowanie w chromatografii powinowactwa, w której wykorzystywane jest specyficzne oddziaływanie zachodzące pomiędzy substancją biologicznie czynną a ligandem unieruchomionym na nośniku [8, 9].

Szczególną grupę polimerów stanowią hydrożele, czyli materiały charakteryzujące się bardzo dużym pęcznieniem w wodzie, otrzymywane z monomerów hydrofilowych (np.: akryloamid i jego pochodne, kwas akrylowy, skrobia oraz chitozan). Znalazły one zastosowanie jako materiały powszechnego użytkowania i materiały specjalne. Do pierwszej grupy zaliczamy między innymi materiały higieny osobistej, „super-absorbenty” do uszczelniania w górnictwie, geologii, budownictwie, stabilizacji gruntów przy pracach ziemnych, a także preparaty do granulacji materiałów pylistych i pasz, środki gaśnicze oraz jako porowate nośniki w transporcie palnych płynów. Specjalne hydrożele wykorzystywane są jako: opatrunki w leczeniu oparzeń i uszkodzeń skóry, szkła kontaktowe, nośniki do kontrolowanego uwalniania leków, immobilizacji enzymów, materiały chromatograficzne oraz membrany do zastosowań specjalnych [1, 10].

W ostatnich latach prowadzone są intensywne prace nad wykorzystaniem hydrożeli pochodzenia naturalnego, a w szczególności chitozanu. Polimery te zastępują materiały syntetyczne we wszystkich wymienionych wyżej obszarach zastosowań. Najnowsze badania dotyczą zastosowania chitozanu w inżynierii medycznej np. jako rusztowania komórkowe w warunkach *in vitro* i *in vivo* oraz systemy kontrolowanego uwalniania leków [11-17].

Hydrożele polimerowe reagujące skokowymi zmianami na niewielkie bodźce ze środowiska zewnętrznego nazywane są również „inteligentnymi polimerami” [18-24]. Zastosowanie odpowiedniego bodźca powoduje ich zmiany mikro- i makrostrukturalne. Przy czym, na poziomie mikrostruktury występuje zmiana charakteru powierzchni cząsteczek z hydrofilowej na hydrofobową i na odwrót oraz zmiana ładunku na powierzchni cząstek itp. Zmiany makroskopowe polegają na wytrąceniu z roztworu w przypadku liniowych kopolimerów, gwałtownej zmianie objętości w przypadku kopolimerów usieciowanych, a także zmianie zawartości wody związanej w przypadku hydrożeli [20]. Wrażliwość na bodźce jest powszechną cechą biopolimerów znajdujących się w organizmach

żywych. Na podstawie obserwacji tych związków powstała idea wytworzenia syntetycznych analogów biopolimerów, których wrażliwość na bodźce zewnętrzne można kontrolować [22]. Wrażliwe polimery nie tylko „rozpoznają” bodziec jako sygnał do gwałtownej zmiany swoich właściwości fizycznych lub chemicznych, ale odpowiedź na dany bodziec mogłaby być proporcjonalna do jego intensywności. Wśród bodźców stymulujących polimery wyróżniamy czynniki fizyczne takie jak: zmiany temperatury, pola elektrycznego, pola magnetycznego lub oddziaływania mechaniczne. Do czynników chemicznych wywołujących przemianę fazową należą: pH, siła jonowa, oddziaływanie z cząsteczkami związków chemicznych. „Inteligentne” polimery mogą być wrażliwe na jeden lub kilka bodźców jednocześnie. Zmiana temperatury, ze względu na stosunkowo łatwy sposób jej kontrolowania, jest najczęściej wykorzystywanym bodźcem stosowanym w technologiach farmaceutycznych jak i hodowlach komórkowych zarówno w testach *in vitro* jak i *in vivo*. Najczęściej wykorzystywane formy polimerów to usieciowane lub odwracalne hydrożele, micelle lub zmodyfikowane polimerami powierzchni substancji inertnych [22, 25].

Termoczule roztwory polimerów charakteryzują się krytyczną temperaturą rozpuszczalności (ang. critical solution temperature – CST). Jest to temperatura, w której układ polimer-rozpuszczalnik ulega przemianie fazowej. Jeżeli poniżej temperatury CST układ polimer-rozpuszczalnik jest jednofazowy, a powyżej dochodzi do separacji faz, wówczas mamy do czynienia z układem, który charakteryzuje się dolną krytyczną temperaturą rozpuszczalności (ang. lower critical solution temperature – LCST). W sytuacji odwrotnej układ charakteryzuje się górną krytyczną temperaturą rozpuszczalności (ang. upper critical solution temperature – UCST). W większości zastosowań wykorzystuje się polimery rozpuszczalne w wodzie i posiadające dolną krytyczną temperaturę rozpuszczalności. Szczególnie interesującym polimerem jest poli(N-(L)-(1-hydroksymetylo) propylometakryloamid, który jest wrażliwy nie tylko na zmianę temperatury, ale również aktywny optycznie [26] czy kopolimer blokowy poli(tlenku etylenu) i poli(tlenku propylenu), który w temperaturze około 36°C wykazuje przemianę fazową z zolu w żel, natomiast w temperaturze około 50°C ulega ponownej przemianie z żelu w zol [27, 28]. Wśród naturalnych polimerów wrażliwość na temperaturę wykazują: żelatyna [29, 30], skrobia [31, 32] oraz wiele innych polisacharydów np.: agarozę [33], pochodne celulozy [34] (metylo-, propyloceluloza itp.) i chityny, w tym chitozan [35-37]. Polimery te żelują w roztworach wodnych podczas obniżania (żelatyna, agarozę, amylozę) lub podwyższania temperatury (chitozan, metyloceluloza, hydroksypropyloceluloza). Ich łańcuchy tworzą przestrzenne struktury helikalne za pomocą oddziaływań fizycznych [25].

Istotnym parametrem wpływającym na zdolność polimeru do sieciowania jest konfiguracja makrocząsteczki w roztworze. Jest ona wynikiem oddziaływań polimer-rozpuszczalnik i polimer-polimer. W „dobrym” rozpuszczalniku dominują oddziaływania polimer-rozpuszczalnik. Cząsteczki rozpuszczalnika solwują łańcuchy, a oddziaływania pomiędzy segmentami polimeru są bardzo słabe. W „złym” rozpuszczalniku następuje agregacja segmentów polimeru, w wyniku której łańcuchy zbliżają się do siebie, silnie ze sobą oddziałując tworzą zwarty

kłębek [38]. Wprowadzenie do polimeru grup hydrofilowych lub kopolimeryzacja termoczułego monomeru z hydrofilowymi monomerami powoduje, że zmniejsza się liczba grup hydrofobowych i jednocześnie polimer jest bardziej hydrofilowy. W konsekwencji naładowane grupy na powierzchni polimeru silniej oddziałują z cząsteczkami wody, co prowadzi do podwyższenia temperatury LCST [39-41]. Obniżenie temperatury krytycznej LCST można uzyskać poprzez wprowadzenie do polimeru grup hydrofobowych [42].

Na proces przemiany fazowej zol-żel, obok modyfikacji polimerów, wpływ mają także modyfikacje składu rozpuszczalnika m.in. dodatek soli niebiorących bezpośredniego udziału w polimeryzacji. W przypadku polielektrolitów zmiana stężenia soli w roztworze wpływa głównie na oddziaływania jonowe stabilizujące makrocząsteczkę. Proces ten jest związany ze zmianą siły jonowej roztworu. Natomiast w przypadku hydrożeli niejonowych, zwiększenie stężenia soli wpływa na między- i wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe, oddziaływania polarne oraz hydrofobowe. Pomimo przeprowadzonych badań, mechanizm wywołujący zmiany hydrodynamicznych właściwości pozostaje nieznanym. Jest to spowodowane faktem, że w każdym przypadku oddziaływania polimer-sól mamy do czynienia również z wodą, jako rozpuszczalnikiem. Taki układ dąży do zminimalizowania energii swobodnej zarówno poprzez dynamiczne zmiany konformacji polimeru, jak i zmiany struktury przestrzennej cząsteczek wody przy określonych stężeniach soli [43]. Niewielkie stężenia soli powodują obniżenie temperatury LCST. Oprócz stężenia, istotne znaczenie mają również typ soli oraz wartościowość anionu.

Zawartość w roztworze, często stosowanego, fosforanu sodu wywiera duży wpływ na położenie LCST w roztworach polielektrolitów [26]. Sole fosforanu zawierające jony metali dwu- i trójwartościowych wywierają większy wpływ na LCST w porównaniu z solami metali jednowartościowych. Efekt wysalania można tłumaczyć zmianami w konformacji cząstek wody, w otocze hydratacyjnej polimeru oraz zmianami w oddziaływaniach pomiędzy polimerem a rozpuszczalnikiem w obecności soli fosforanowych. Elektrolit może zaburzyć wysoko uporządkowaną strukturę cząsteczek wody otaczających polimer, powodując wzrost jego hydrofobowości, a w rezultacie powoduje obniżenie LCST i szybsze wytrącanie cząsteczek z roztworu [38, 44].

Zjawiska zachodzące podczas zmian temperatury są intensywnie badane i opisywane w pracach [39, 42, 45-50]. Do badań tych wykorzystywane są różne techniki pomiarowe. Często wykorzystywanymi metodami badawczymi są pomiary reometryczne zarówno przy jednokierunkowej, jak i oscylacyjnej deformacji [36], pomiary mętności, potencjału Zeta czy siły jonowej.

Zmiany zachodzące pod wpływem temperatury w obrębie fazy polimerowej mogą być zastosowane w wielu dziedzinach współczesnej chemii i technologii. Od ponad 50 lat wykorzystuje się takie polimery w medycynie i farmakologii np.: w układach kontrolowanego uwalniania leków [24, 51-54], jako nośniki białek i peptydów [55-58]. „Inteligentne polimery” są wykorzystywane ponadto w procesach separacyjnych, np. odwadnianie roztworów białek i innych wielkocząsteczkowych substancji biologicznie czynnych [24, 59, 60].

W ostatnich latach jest obserwowany gwałtowny rozwój inżynierii biomedycznej wynikający ze wzrastającego zapotrzebowania na innowacyjne metody leczenia oraz rekonwalescencji ofiar wypadków komunikacyjnych. Nowe rozwiązania pozwalają na zapewnienie tymczasowego, przestrzennego środowiska do wzrostu komórek i tkanek w postaci matryc polimerowych (nazywanych szkieletem lub rusztowaniem) otrzymanej z hydrożelu w procesach *in vitro* lub *in vivo*. Rusztowania te najczęściej wytwarzane są z hybrydowych układów zawierających polimery (kwas hialuronowy, chitozan, kolagen, fibryna) oraz materiały ceramiczne (m.in. sole wapniowo-fosforanowe) [15, 61-66].

Hydrożele zawierające polimery z grupami zdolnymi do wymiany jonowej lub do chelatowania metali są stosowane do oczyszczania wody i ścieków, w analizie metali oraz w zatażaniu ich roztworów (np. metale przejściowe, lantanowce, uran i tor). Niektóre są wykorzystywane w procesach separacji metaloenzymów lub jako nośniki dla jonów metali w katalizie.

Szczególnym przykładem polisacharydu szeroko badanego w ostatnich latach pod względem zastosowania w farmakologii i medycynie jest chitozan. Zawdzięcza to swoim właściwościom antybakteryjnym [67, 68], antywirusowym [69], przeciwgrzybiczym [70] oraz wielokrotnie wskazywanej biokompatybilności oraz biodegradowalności [37, 71-74].

Chitozan jest polisacharydem nierozpuszczalnym w wodzie. Dobrze natomiast rozpuszcza się w kwasach zarówno organicznych, jak i nieorganicznych. W literaturze przedmiotu szeroko opisywane są roztwory koloidalne chitozanu otrzymane poprzez rozpuszczenie polimeru w kwasie chlorowodorowym z dodatkiem β -glicerofosforanu disodu ($\text{Na}_2\text{-}\beta\text{-GP}$) jako substancji sieciującej lub/ oraz regulującej pH – przy czym w doniesieniach literaturowych trwa dyskusja co do roli glicerofosforanu [75]. Ze względu na niekorzystne właściwości dla zdrowia jonów Cl^- zawartych w rozpuszczalniku oraz jonów Na^+ pochodzących z hydroлізу glicerofosforanu zasadne jest wytworzenie rusztowań z wykorzystaniem mniej szkodliwych substratów, umożliwiających uzyskanie przemiany fazowej w pobliżu temperatury ludzkiego ciała oraz w neutralnym pH. Ciekawym rozwiązaniem wydaje się zastosowanie, jako rozpuszczalnika kwasu organicznego np. octowego oraz glicerofosforanu dwuwartościowych jonów metali np. wapnia (Ca^{2+}) lub magnezu (Mg^{2+}).