

Sposób wytwarzania poli(cytrynianu gliceryny)

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania poli(cytrynianu gliceryny) wrażliwego na zmiany temperatury oraz charakteryzującego się wysoką czystością.

Poli(cytrynian gliceryny), PGCit jest biodegradowalnym poliestrem alifatycznym zbudowanym z kwasu cytrynowego oraz gliceryny. Budowa poliestru z takich monomerów niesie za sobą wiele potencjalnych korzyści. Gliceryna jest niezbędna dla wielu ważnych szlaków metabolicznych w komórkach. Tworzy szkielet wielu tłuszczów, w tym trójglicerydów oraz fosfolipidów, które mają kluczowe znaczenie dla uporządkowania wnętrza komórek (błony komórkowe). Kwas cytrynowy jest ważnym produktem przejściowym w cyklu Krebsa (cyklu kwasu cytrynowego), co potwierdza jego nietoksyczność oraz biodegradowalność. Ponadto jest to jeden z najpopularniejszych i najczęściej wykorzystywanych kwasów organicznych w przemyśle, często używany jako regulator kwasowości i przeciwutleniacz. Z kolei gliceryna stanowi odpad przy produkcji biodiesla. Zagospodarowanie tych dwóch substancji jest więc podyktowane zasadami ekologii oraz zielonej chemii.

Kwas cytrynowy wykorzystywano do produkcji polimerów, głównie do syntezy poli(kwasu cytrynowego), modyfikacji poliestrów, lub syntez kopolimerów. Poliestry gliceryny często znajdują zastosowanie w medycynie regeneracyjnej oraz systemach dostarczania leków. Na przykład poli(sebacynian gliceryny) (PGS), najbardziej znany poliester z tej rodziny, stosowany jest w inżynierii tkanek miękkich, takich jak: chrząstka, siatkówka, tkanka nerwowa, tkanek serca oraz jako nośnik leków (R. Rai, M. Tallawi, A. Grigore, A. R. Boccaccini, *Progress in Polymer Science*, 2012, 37, 1051-1078.) Poli(cytrynian 1,8-oktanodiolu) (POC) ma znaleźć zastosowanie głównie w rekonstrukcji chrząstki.(C. Jeong, S. Hollister, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2010, 9999B). POC jest poliestrem podobnym do PGCit (różniącym się w budowie częścią alkoholową).

Kwas cytrynowy wykorzystuje się do sieciowania wytworzonych wcześniej poliestrów (Y. Wu, R. Shi, D. Chen, L. Zhang, W. Tian, *Journal of Applied Polymer Science* 2011, 123, 1612-1620). W tej pracy do wcześniej wytworzonej mieszaniny PGS i krzemionki dodaje się kwasu cytrynowego w stosunku molowym 1:0,3 (PGS/kwas cytrynowy), miesza się obniżając ciśnienie do 1kPa, następnie prowadzi się reakcję przez 1 h w temperaturze 120°C. Produkt wylewa się do form wykonanych z PTFE i materiał sieciuje się pod ciśnieniem atmosferycznym

w temperaturze 120°C, do otrzymania bioelastomeru. W ten sposób istnieje możliwość otrzymania elastomerów zbudowanych z głównych łańcuchów poli(sebacynianu gliceryny) połączonych za pomocą kwasu cytrynowego. Do takich materiałów dodaje się składniki poprawiające ich właściwości, jak np. nano-krzemionkę. Dodatki mogą zmniejszyć cytotoksyczność materiałów, dzięki czemu z powodzeniem hoduje się na nich komórki, a co za tym idzie mogą zostać wykorzystane jako budulec rusztowania komórkowego. Nie ma więc przeciwwskazań do stosowania kwasu cytrynowego jako składnika polimerowych materiałów biomedycznych, a znane dodatki mogą zostać wykorzystane do modyfikowania PGCit w celu dopasowania właściwości do zastosowania.

Kwas cytrynowy i gliceryna są monomerami o dużej funkcyjności, odpowiednio 4 i 3, co sprzyja tworzeniu struktur rozgałęzionych. Takie materiały często znajdują zastosowanie jako nośniki leków. Wykorzystując duży nadmiar kwasu cytrynowego względem gliceryny można doprowadzić do powstawania rozgałęzionego poli(kwasu cytrynowego), który łączy się za pomocą gliceryny w hiperrozgałęzioną makrocząstkę. Kwas cytrynowy może reagować sam ze sobą dzięki występowaniu grupy hydroksylowej oraz grup karboksylowych w obrębie swojej cząsteczki. W dendrymerycznej cząsteczce produktu można umieszczać różne substancje aktywne, między innymi cis platynę (lek nowotworowy). W ten sposób można tworzyć nowoczesne systemy dostarczania leków. Synteza materiału polega na polikondensacji mieszaniny kwas cytrynowy/gliceryna o stosunku molowym 5, 8, lub 12 w wysokiej temperaturze. Reakcja dzieli się na dwa etapy, pierwszy 90-120°C przez 30 min, drugi 130-150°C przez 40-60 min. (M. Adeli, B. Rasouljan, F. Saadatmehr, F. Zabihi, *Journal of Applied Polymer Science* 2013, 129, 3665-3671).

Opisywane metody otrzymywania poli(cytrynianu gliceryny) polegają na zastosowaniu odpowiednich katalizatorów, takich jak: kwas p-toluenosulfonowy (PTSA, p-toluenesulfonate acid), ZnCl₂, gentamycyna (J. Halpern, R. Urbanski, A. Weinstock, D. Iwig, R. Mathers, H.A. von Recum, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2013, 102, 1467-1477). Zespół Halperna wykorzystywał w syntezach mieszaninę gliceryny i kwasu cytrynowego w stosunkach stechiometrycznych 1:1, 2:1, 3:1, dodatek katalizatora wynosił 1% masowy w przypadku PTSA i ZnCl₂ oraz 5% w przypadku gentamycyny. Reakcję prowadzono na szalkach umieszczonych w piecu rozgrzanym do temperatury 110°C. Szalki przetrzymywano w piecu 7, 15, lub 48h. Problemem jest tu długi czas reakcji.

Często produktem reakcji gliceryny i kwasu cytrynowego jest amorficzne ciało stałe nierozpuszczalne w wodzie i innych rozpuszczalnikach organicznych. (D. Pramanick, T.T. Ray, *Polymer Bulletin*, 1988, 19, 365-370). Jest to duży problem nie tylko ze względu na brak

możliwości oczyszczenia polimeru z użytego katalizatora, ale również ze względu znacznie utrudnionego przetwórstwa. Zespół Pramanicka wykorzystywał mieszaninę gliceryny i kwasu cytrynowego o stosunku stechiometrycznym oraz 0,8% dodatek PTSA, reakcję prowadzono w 170°C przez 12 h. Wodę odbierano jako azeotrop z benzenem, co dyskwalifikuje tę metodę w przypadku materiałów do zastosowań medycznych.

Problemy dotyczące syntezy znane już w 1988 roku nie doczekały się rozwiązania, a poli(cytrynian gliceryny) został niejako zapomniany. Jednak wzmianki o zastosowaniu tego materiału jako dodatku do blend bądź kopolimerów, zastosowanie kwasu cytrynowego i gliceryny jako czynników sieciujących, oraz synteza materiałów podobnych, takich jak POC, czy PGS, pozwalają sądzić o dużej atrakcyjności poli(cytrynianu gliceryny). Problemy wynikające z dotychczas stosowanych reakcji wynikają głównie z dużej funkcyjności monomerów oraz z obecności powstającej w reakcji wody. Dużym wyzwaniem staje się otrzymanie materiału, który można przetwarzać, tzn. rozpuszczalnego, bądź charakteryzującego się niską temperaturą płynięcia.

Problemy związane z otrzymywaniem poli(cytrynianu gliceryny) zostały rozwiązane w obecnym wynalazku poprzez dobór odpowiednich warunków wytwarzania oraz opracowanie metody odprowadzania powstającej wody.

Sposób wytwarzania poli(cytrynianu gliceryny) według wynalazku charakteryzuje się tym, że mieszaninę kwasu cytrynowego z gliceryną w stosunku molowym od 5:1 do 1:5. ogrzewa się w temperaturze od 90 do 130°C, w czasie od 3 do 10 min, a następnie do 130 – 170°C w czasie od 3 do 10 min. Reakcję prowadzi się w temperaturze 130 – 170°C w czasie 45 – 110 min, w zależności od pożądanego produktu. Reakcję początkowo prowadzi się pod chłodnicą zawrotną, a po czasie od 5 do 15 min, korzystnie po 10 min, reakcję prowadzi się z jednoczesnym oddestylowaniem wody wspomaganym przedmuchem gazu inertnego, korzystnie azotu lub argonu.

Korzystnie pierwszy etap ogrzewania mieszaniny kwasu cytrynowego z gliceryną prowadzi się w temperaturze 130°C, w czasie 5 min. Korzystnie drugi etap ogrzewania mieszaniny kwasu cytrynowego z gliceryną, do osiągnięcia temperatury reakcji, prowadzi się w czasie 5 min.

Korzystnie reakcję prowadzi się z wykorzystaniem mieszania w zakresie 150–300 rpm. Korzystne jest stosowanie mieszadła mechanicznego, z łopatkowym elementem mieszającym.

Korzystne jest jednoczesne oddestylowanie wody wspomaganie przedmuchem gazu inertnego prowadzone w aparacie Deana-Starka.

Produkt korzystnie oczyszcza się przez rozpuszczenie w rozpuszczalniku i dializę bądź wytrącenie. Produkt korzystnie suszy się w przepływie azotu, w temperaturze poniżej 25°C, pod zmniejszonym ciśnieniem.

Sposób według wynalazku zapewnia znacznie krótszy czas reakcji niż w dotychczas opisanych pracach. Zastosowanie specjalnego profilu temperaturowego oraz systemu odbierania wody pozwala na wyeliminowanie z procesu rozpuszczalników i katalizatorów. Synteza jest prowadzona w niższej temperaturze, a na podstawie ilości odbieranej wody można prowadzić kontrolę przereagowania grup karboksylowych. Lekkie oligomery zostają oddestylowane z mieszaniny reakcyjnej, zapobiega się też niepożądanym krystalizacji kwasu cytrynowego. Sposób według wynalazku zapewnia dużą kontrolę i bezpieczeństwo oraz powtarzalność. Otrzymane materiały mogą zostać sieciowane w szerokim zakresie temperatur i czasu pod ciśnieniem atmosferycznym, bądź zmniejszonym.

W zależności od doboru parametrów prowadzenia procesu uzyskuje się produkt w postaci wosku (przy nadmiarze kwasu), żywicy (przy równomolowym stosunku kwasu i gliceryny) lub ciała stałego (przy nadmiarze gliceryny). Należy zwrócić uwagę, że wydłużenie czasu reakcji oraz temperatury sprzyja przechodzeniu produktu ze stanu wosku do żywicy, a następnie ciała stałego, największy jednak wpływ ma stechiometria reakcji, dlatego nie zaleca się przekraczania zalecanych profili grzewczych. W zależności od prowadzenia procesu uzyskuje się konwersję 40 – 90% grup karboksylowych związanych z pierwszorzędowym atomem węgla kwasu cytrynowego oraz konwersję 25 – 55% grup karboksylowych związanych z drugorzędowym atomem węgla kwasu cytrynowego. Poprzez manipulację stosunkiem molowym monomerów reguluje się stopień zakończenia łańcuchów kwasem cytrynowym lub gliceryną, co jakościowo stwierdza się na podstawie widm NMR oraz FTIR. Produkty otrzymywane są z wydajnością bliską 100%, nie obserwuje się sygnałów monomerów na widmach NMR.

Produkty nieusieciowane (wosk, żywica) są rozpuszczalne w wodzie oraz organicznych rozpuszczalnikach polarnych (alkohole, THF, aceton, DMSO). Produkty w postaci wosków wykazują wrażliwość na temperaturę. Są materiałami sztywnymi i kruchymi w zakresie temperatur -40 – 10°C oraz materiałami plastycznymi w zakresie temperatur 25 – 50°C. Dokładne właściwości materiałów zależą od parametrów prowadzenia syntezy. Powyższe właściwości pozwalają na łatwe przetwórstwo oraz są korzystne ze względu na aplikację w formie systemów dozowania leków.

Produkty nierozpuszczalne po syntezie wykazują właściwości hydro i organozeli. Właściwości te zależą od sposobu prowadzenia syntezy oraz od temperatury. Z tego względu

materiały te świetnie nadają się jako matryce leków. Wartości *ESR* (równowagowy współczynnik pęcznienia) wynoszą odpowiednio dla rozpuszczalników: woda 250 – 350%, DMSO 500 – 600%, metanol 50 – 100%, n-heksan ok. 10%, eter dietylowy ok. 5%. Niska chłonność rozpuszczalników hydrofobowych oraz wysoka rozpuszczalników hydrofilowych, potwierdza możliwość „magazynowania” rozpuszczalników hydrofilowych w strukturze polimeru, a nie w porach związanych z ukształtowaniem materiału (*ESR* związany jest ze strukturą molekularną, a nie z porowatością). Ze względu na dostępność i niską cenę substratów oraz ekonomiczny sposób prowadzenia reakcji materiał może zostać zastosowany nie tylko w medycynie, ale również jako biodegradowalny sorbent, który po wchłonięciu niebezpiecznego rozpuszczalnika może zostać zutylizowany poprzez spalanie.

Produkty rozpuszczalne (woski i żywice) można formować w filmy poprzez wylewanie roztworów metanolowych. Filmy można sieciować w celu uzyskania przezroczystych folii, bądź materiałów porowatych, które mogą zostać wykorzystane jako rusztowania komórkowe.

Sposób według wynalazku został bliżej przedstawiony w przykładach.

Przykład 1.

Zmieszano kwas cytrynowy z gliceryną w stosunku molowym 2:1. Reakcję prowadzono w temperaturze 150°C przez 65 minut w reaktorze z mieszadłem mechanicznym (300 rpm). Zadaną temperaturę otrzymano przy użyciu profilu grzewczego: 5 min 130°C, 5 min 150°C. Reakcję prowadzono pod chłodnicą zwrotną przez 5 min. Następnie reaktor wyposażono w aparat Deana-Starka. Po kolejnych 5 min odbieranie wody wspomagano przepływem argonu. Po zakończeniu procesu polimer ogrzano do 60°C i wylano do formy. Formę schłodzono do temperatury 5°C. Otrzymano воск o konwersji grup karboksylowych 43% i 27%. Temperatura mięknięcia wosku wynosi 23°C, temperatura płynięcia wosku wynosi 37°C.

Przykład 2.

Zmieszano kwas cytrynowy z gliceryną w stosunku molowym 1:2. Reakcję prowadzono w temperaturze 150°C przez 65 min w reaktorze z mieszadłem mechanicznym (300 rpm). Zadaną temperaturę otrzymano przy użyciu profilu grzewczego: 5 min 130°C, 5 min 150°C. Reakcję prowadzono pod chłodnicą zwrotną przez 5 min. Następnie reaktor wyposażono w aparat Deana-Starka. Po kolejnych 5 min odbieranie wody wspomagano przepływem argonu. Po osiągnięciu żelowania wyłączono mieszadło mechaniczne oraz zalano reaktor metanolem. Po utworzeniu żelu polimer odsączono na sitku w celu pozbycia się nadmiaru rozpuszczalnika. Produkt suszono przez 5h w przepływie suchego powietrza w temperaturze 25°C. Otrzymano materiał o *ESR* 75% dla metanolu.

Przykład 3.

Zmieszano kwas cytrynowy z gliceryną w stosunku molowym 1:1. Reakcję prowadzono w temperaturze 150°C przez 65 min w reaktorze z mieszadłem mechanicznym (300 rpm). Zadana temperaturę otrzymano przy użyciu profilu grzewczego: 5 min 130°C, 5 min 150°C. Reakcję prowadzono pod chłodnicą zwrotną przez 5 min. Następnie reaktor wyposażono w aparat Deana-Starka. Po kolejnych 5 min odbieranie wody wspomagano przepływem argonu. Otrzymaną żywicę rozpuszczono w metanolu uzyskując roztwór o stężeniu 500 mg/mL. Roztwór wylano na teflonową formę i pozostawiono przez 1 h w temperaturze 25°C w celu odparowania rozpuszczalnika. Folię sieciowano w temperaturze 100°C przez 17 h w suszarce laboratoryjnej z wymuszonym obiegiem powietrza. Otrzymano folię o wysokiej przejrzystości.